



**ECOLOGIA DA LEVEDURA *Dekkera bruxellensis* NO AMBIENTE DA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA INDUSTRIAL**

TERESA CRISTINA DOMINGOS DA SILVA

RECIFE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**ECOLOGIA DA LEVEDURA *Dekkera bruxellensis* NO AMBIENTE DA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.
Área de Concentração: Fungos de interesse industrial

Teresa Cristina Domingos da Silva

Orientador: Dr. Marcos Antônio de Moraes
Junior

Co-orientador: Dra. Fernanda Cristina
Bezerra Leite

RECIFE

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Teresa Cristina Domingos da
Ecologia da levedura *Dekkera bruxelensis* no ambiente da
fermentação alcoólica industrial/ Teresa Cristina Domingos da Silva–
Recife: O Autor, 2015.

54 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marco Antonio de Moraes Junior

Coorientador: Fernanda Cristina Bezerra Leite

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2015.

Inclui bibliografia

1. Leveduras 2. Fermentação 3. Alcool I. Moraes Júnior, Marco Antonio de (orientador) II. Leite, Fernanda Cristina Bezerra (coorientadora) III. Título

579.562

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-135

**ECOLOGIA DA LEVEDURA *Dekkera bruxellensis* NO AMBIENTE DA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL**

TERESA CRISTINA DOMINGOS DA SILVA

Data da defesa: 06 de Março de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr.. Marcos Antônio de Moraes Junior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Will de Barros Pita (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Elaine Malosso (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

MEMBROS SUPLENTES

Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Suplente interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Márcia Vanusa da Silva (Suplente externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior pela oportunidade, pela confiança, ensinamentos e dedicação.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite pela ajuda e contribuições na realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco pelos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro durante esses dois anos de trabalho.

Aos colegas de Mestrado em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco pela convivência e aprendizado.

Aos participantes dos laboratórios de Genética Molecular do Departamento de Genética e de Bioquímica da UFPE.

Às amigas, Ana, Carolina, Laura, Luana, Nathalia pelo companheirismo diário.

Aos novos amigos Bruno Sampaio, Danielli Cajueiro, José Nunes e Thereza Liberal.

À Cyndy Mary por me incentivar sempre e pela amizade desde a graduação.

Agradeço aos meus pais Severino Galdino da Silva e Carmem Lucia Domingos da Silva, ao meu irmão Bruno Domingos da Silva, à minha tia Maria da Paz Domingos pela compreensão e apoio nesta fase da minha vida.

RESUMO

A levedura *Dekkera bruxellensis* foi identificada como principal contaminante dos processos de fermentação alcoólica em destilaria de vários países, com destaque para as encontradas no nordeste brasileiro. A presença dessas leveduras pode resultar em uma diminuição na produtividade do etanol combustível, causando grande prejuízo econômico. Atualmente, vários estudos estão sendo realizados para um melhor entendimento sobre a fisiologia dessa espécie e pouco se sabe sobre como essa levedura contaminante se instala no processo industrial. Assim, esse trabalho se propõe a investigar os possíveis pontos de surgimento desta levedura em destilarias do estado da Paraíba, no Nordeste Brasileiro, a partir de amostras coletadas da água de lavagem da cana-de-açúcar, do caldo misto da fermentação e da vinhaça, um resíduo industrial. As leveduras foram isoladas usando meios seletivos com WLN e YNB-Nit e posteriormente identificadas a partir de sequenciamento de DNA. Foram isoladas 157 espécimes de *D. bruxellensis*. Estes isolados estavam presentes nos três pontos de coletas em ambas as destilarias, mas com diferentes percentuais de distribuição. Na destilaria A o surgimento das leveduras foi ditribuido em 33,9% nas amostras de caldo misto, 13,1% nas de água e 53% nas de vinhaça. Na destilaria B as percentagens foram 19,8% para caldo misto, 33,4% para água de lavagem e 46,8 para vinhaça Este estudo mostra que a levedura *D. bruxellensis* está presente em todas as amostras analisadas e em quantidade significantes, sendo o nitrato presente nessas amostras o possível responsável poe essa presença. Entretanto, mais estudos acerca da presença de nitrato e a presença da levedura nessas amostras são necessários para confirmar a adaptação de *D. bruxellensis* em diferentes nichos ecológicos.

Palavras-chave: Ecologia de *D. bruxellensis*, contaminação, fermentação alcoólica.

ABSTRACT

The Yeast *Dekkera bruxellensis* was identified as the main contaminant of fermentation processes in distillery many countries, especially those found in northeastern Brazil. The presence of these yeasts can result in a decrease in fuel ethanol productivity, causing great economic damage. Currently, several studies are being conducted to a better understanding of the physiology of this species and little is known about how this contaminant yeast settles in the industrial process. Thus, this study aims to investigate the possible points of emergence of this yeast in distilleries in the state of Paraíba, in Northeastern Brazil, from samples collected wash sugarcane water, the mixed fermentation broth and vinasse, an industrial residue. The yeasts were isolated using selective media with WLN and YNB-Nit and later identified from DNA sequencing. They were isolated 157 specimens of *D. bruxellensis*. These isolates were present in the three collection points in both distilleries, but with different percentage distribution. The distillery in the emergence of yeast was distributed at 33.9% in mixed juice samples, 13.1% water and 53% in the vinasse. In distillery percentages were 19.8% for mixed juice, 33.4% for wash water and 46.8 for vinasse. This study shows that the yeast *D. bruxellensis* is present in all samples and in significant quantity, and the nitrate present in these samples the possible responsible for this presence. However, more studies about the presence of nitrate and the presence of yeast in these samples are needed to confirm the adaptation of *D. bruxellensis* in different ecological niches.

Key-words: ecology of *D. bruxellensis*, contamination, alcoholic fermentation.

LISTA DE ABREVIATURAS

CBS	Coleção Holandesa de Culturas
pH	Potencial hidrogeniônico
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ETA	Estação de tratamento de água
K	Potássio
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
WLN	W-1 nutrient médium
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract, peptone, dextrose
URM	University Recife Micology
Rpm	Rotações por minuto
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
µM	Micromolar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
TBE	Tris borato edta
nm	Nanômetro
EtBr	Brometo de etidio
pb	Pares de base
U.V	Ultravioleta
µg	Micrograma
mL	Mililitro
Cm	Centímetro
CCB	Centro de Ciências Biológicas
NCBI	National Center for Biotechnology Information
UFC	Unidades Formadora de Colônia
mg	Miligrama

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Fluxograma representativo do processo fermentação para produção de etanol.....	16
Figura 2: Linhagens da espécie <i>Dekkera bruxellensis</i> . (A) linhagem CBS 74; (B) linhagem CBS 2499; (C) linhagem GDB 248 (industrial) em meio YPD (Microscopia de contraste de fase).....	19
Figura 3: Leveduras selvagens crescidas em meio WLN.....	21
Figura 4: Fluxograma da fermentação alcoólica destacando (*) os pontos onde foram coletadas as amostras.....	27
Figura 5: Placas com colônias de leveduras em meio WLN, cultivadas por 5 dias a 30°C.....	28
Figura 6: Gráfico comparativo das leveduras não- <i>Saccharomyces</i> crescidas em WLN nas diferentes amostras provenientes da destilaria A.....	33
Figura 7: Gráfico comparativo das leveduras não- <i>Saccharomyces</i> crescidas em WLN nas diferentes amostras provenientes da destilaria B.....	33
Figura 8: População percentual de <i>D.bruxellensis</i> provenientes das diferentes amostras nas duas destilarias.....	44

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Composição química do caldo de cana.....	22
Tabela 2: Características das sequências iniciadoras utilizadas neste estudo.....	30
Tabela 3: Quantificação de isolados crescidos em meio WLN da destilaria A.....	34
Tabela 4: Quantificação de isolados crescidos em meio WLN da destilaria B.....	34
Tabela 5: Quantificação total de isolados crescidos em meio WLN nas duas destilarias.....	35
Tabela 6: Quantificação de isolados da destilaria A nos meios WLN, YNB-Nit e percentual de leveduras assimiladoras de nitrato na população total de leveduras encontradas.....	38
Tabela 7: Quantificação de isolados da destilaria B nos meios WLN, YNB-Nit e percentual de leveduras assimiladoras de nitrato na população total de leveduras encontradas.....	38
Tabela 8: Identificação dos isolados procedentes da destilaria A, Identificação do isolado na amostra, Porcentagem de similaridade (S%).....	41
Tabela 9: Identificação dos isolados procedentes da destilaria B, Identificação do isolado na amostra, Porcentagem de similaridade (S%).....	42
Tabela 10: Quantidade de leveduras da espécie <i>D. bruxellensis</i> nas diferentes amostras da destilaria A.....	43
Tabela 11: Quantidade de leveduras da espécie <i>D. bruxellensis</i> nas diferentes amostras da destilaria B.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	A Fermentação Alcoólica	15
2.2	Taxonomia do Gênero <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	17
2.3	A espécie <i>Dekkera bruxellensis</i>	19
2.3.1	Características Gerais	19
2.4	Ecologia de leveduras	20
2.4.1	Caldo de cana-de-açúcar	21
2.4.2	Água.....	23
2.4.3	Vinhaça	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Cultivo, manutenção e manuseio de culturas de leveduras.....	26
3.2	Amostragem e Coletas	26
3.3	Identificação da diversidade de leveduras nas amostras.....	27
3.3.1	Plaqueamento, Contagem e Isolamento dos micro-organismos	27
3.3.2	Triagem dos isolados	28
3.4	Caracterização molecular das culturas.....	28
3.4.1	Extração de ácidos nucléicos (DNA).....	28
3.4.2	Quantificação e determinação do fragmento	29
3.4.3	Identificação molecular dos isolados.....	30
3.4.4	Reação de sequenciamento e análise das sequências.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Contagem de leveduras crescidas nas amostras analisadas no meio WLN32	
4.2	Contagem de leveduras crescidas nas amostras analisadas no meio YNB-Nitrato	37
4.3	Identificação molecular dos isolados assimiladores de nitrato	39
5	CONCLUSÃO	46

6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
---	----------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são micro-organismos eucarióticos unicelulares, se reproduzem assexuadamente e encontrados em vários ambientes. Estes micro-organismos são cultivados em destilarias para a produção de etanol (álcool combustível) a partir do açúcar da cana. Assim, são de extrema importância para a produção de álcool (álcool combustível e bebidas alcoólicas), além de outros produtos de grande interesse industrial até para a saúde e alimentação animal.

A levedura mais conhecida e mais utilizada é a espécie *Saccharomyces cerevisiae* que é considerada como a principal levedura de fermentação na indústria (Tamai et al., 2000). Ela é usada na fabricação do pão, produção de bebidas alcoólicas (por exemplo, vinho e cerveja) e na indústria do etanol combustível (Kurtzman et al., 2011). Durante o processo fermentativo pode ocorrer contaminação por diversos micro-organismos (Delia et al., 2006) como, por exemplo, ocorre na fermentação alcoólica industrial de larga escala, pela instalação no processo de leveduras e bactérias indesejáveis (Schell et al., 2004; Basílio et al., 2008).

A espécie *Dekkera bruxellensis* tem sido considerada a principal levedura contaminante tanto na indústria do vinho (Oelofse et al., 2008; Renouf et al., 2007; Cocolin et al., 2004) quanto na produção de etanol (Basilio et al., 2008; Liberal et al., 2007). Atualmente existem cerca de 31 linhagens depositadas na coleção Holandesa de culturas, CBS, que foram isoladas de diferentes processos fermentativos industriais, tais como vinhos, cervejas, cidras e sucos industrializados (www.cbs.knaw.nl).

Algumas indústrias tem se deparado com problemas atribuídos à presença de leveduras contaminantes que, altamente competitivas dentro das condições existentes, passam a predominar na população de células presentes. Estas leveduras podem vir de fontes como melão, caldo, água de lavagem da cana e o próprio solo onde é cultivada a cana-de-açúcar (Antonini, 2004). A contaminação por *D. bruxellensis* prejudica o processo de fermentação devido ao ácido acético produzido que, frequentemente, é considerado como um inibidor de *S. cerevisiae* (Delia et al., 2006), levando a uma queda no rendimento do etanol e a um aumento no tempo de fermentação para produção de álcool nas destilarias (Araújo et al., 2005). Por outro lado, essa contaminação leva a uma mudança na população de leveduras do mosto, causando prejuízo econômico devido à competição pelo açúcar que

seria utilizado para produção de etanol, ou ainda pela produção de compostos tóxicos à levedura do inoculo inicial (Souza-Liberal et al., 2005).

As leveduras do gênero *Dekkera* foram apontadas com responsáveis pela contaminação em destilarias de países da América do Norte como Estados Unidos e Canadá (Abbott et al., 2005), em destilarias da Europa na França, Alemanha, Portugal e Espanha (Ciani et al., 2003; Miniac, 1989) e em destilarias da América do Sul, no Brasil (Basilio et al., 2005) e também na Austrália e África do Sul. Apesar disso, pouco se sabe sobre a presença desta levedura em outros nichos ecológicos (Rodrigues *et al.*, 2001). O que se sabe sobre esta espécie é que há linhagens que são ótimas produtoras de biofilmes (Joseph et al., 2007), isto ajudaria a explicar porque essa levedura é recorrente em usinas de etanol já que os micro-organismos produtores de biofilmes são difíceis de remover da superfície ao qual se encontram ligados (Kumar & Anand, 1998). Mas, mesmo que *D. bruxellensis* produza biofilmes nas destilarias de etanol, isso ainda não explicaria seu aparecimento no processo de fermentação alcoólica (Joseph et al., 2007).

Devido ao importante papel que as leveduras da espécie *D. bruxellensis* exercem nos processos fermentativos como contaminantes, esse trabalho se propõe a investigar os possíveis pontos de surgimento desta levedura em alguns ambientes de destilarias do estado da Paraíba, no Nordeste Brasileiro, a fim de explicar o seu aparecimento durante o processo de fermentação alcoólica para produção de álcool combustível. Para isso tivemos como objetivos específicos deste trabalho:

- Isolar, identificar e determinar a população de leveduras do caldo de misto do processo de fermentação na produção de álcool em destilarias paraibanas.
- Isolar, identificar e avaliar a população de leveduras presentes nos tanques de estocagem de vinhaça usada na ferti-irrigação da cana-de-açúcar.
- Isolar, identificar e avaliar leveduras presentes em amostras de água usadas na lavagem da cana de açúcar.
- Correlacionar a composição e a dinâmica da população de leveduras encontradas no entorno do processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Fermentação Alcoólica

Durante o processo de fermentação, as leveduras, que estão em vários ambientes, são utilizadas como micro-organismos fermentadores para produção de vinhos, cervejas e etanol. Esse processo bioquímico consiste na atividade desses micro-organismos em assimilar fontes nutrientes de vários substratos originando outras substâncias em qualidade e quantidades variáveis, dependendo do micro-organismo usado (Silva, 1994). O processo de fermentação está resumido na seguinte reação:



Na fermentação alcoólica para produção de etanol combustível, o processo é iniciado com a lavagem da cana-de-açúcar para retirada de detritos, em seguida a cana é cortada e prensada para a retirada do caldo (Wheals et al., 1999). Segundo Antonini (2004), a fermentação é realizada em três fases distintas: a pré-fermentação, a fermentação principal e pós-fermentação. A pré-fermentação se inicia quando o caldo é então levado para o processo de fermentação propriamente dito, o caldo é diluído formando o que se chama de mosto de alimentação. Para iniciar a fermentação principal esse mosto é misturado com as leveduras, as quais foram cultivadas em um pré-fermentador para a geração de biomassa. Esta etapa de fermentação principal dura cerca de 5 a 6 horas e após este período pode-se observar uma queda nas concentrações de açúcar (sacarose) do mosto e sua conversão a etanol.

Ao final da fermentação principal, o mosto fermentado é centrifugado para separação do vinho e das leveduras. O vinho, parte líquida que contém o álcool, é submetido a destilação e as leveduras, que serão reutilizadas para um próximo ciclo de fermentação, são tratadas com água, açúcar e ácido sulfúrico ou com antibióticos para controle de bactérias (Wheals et al., 1999). Tradicionalmente, a fermentação alcoólica é um processo conduzido em batelada, apesar da existência dos sistemas de fermentação em fluxo contínuo, devido a assepsia mais fácil e também a não necessidade de sempre manter o sistema trabalhando, o que facilita as situações de parada na usina. Na figura 1, vemos um fluxograma que representa as etapas do processo fermentativo em batelada.

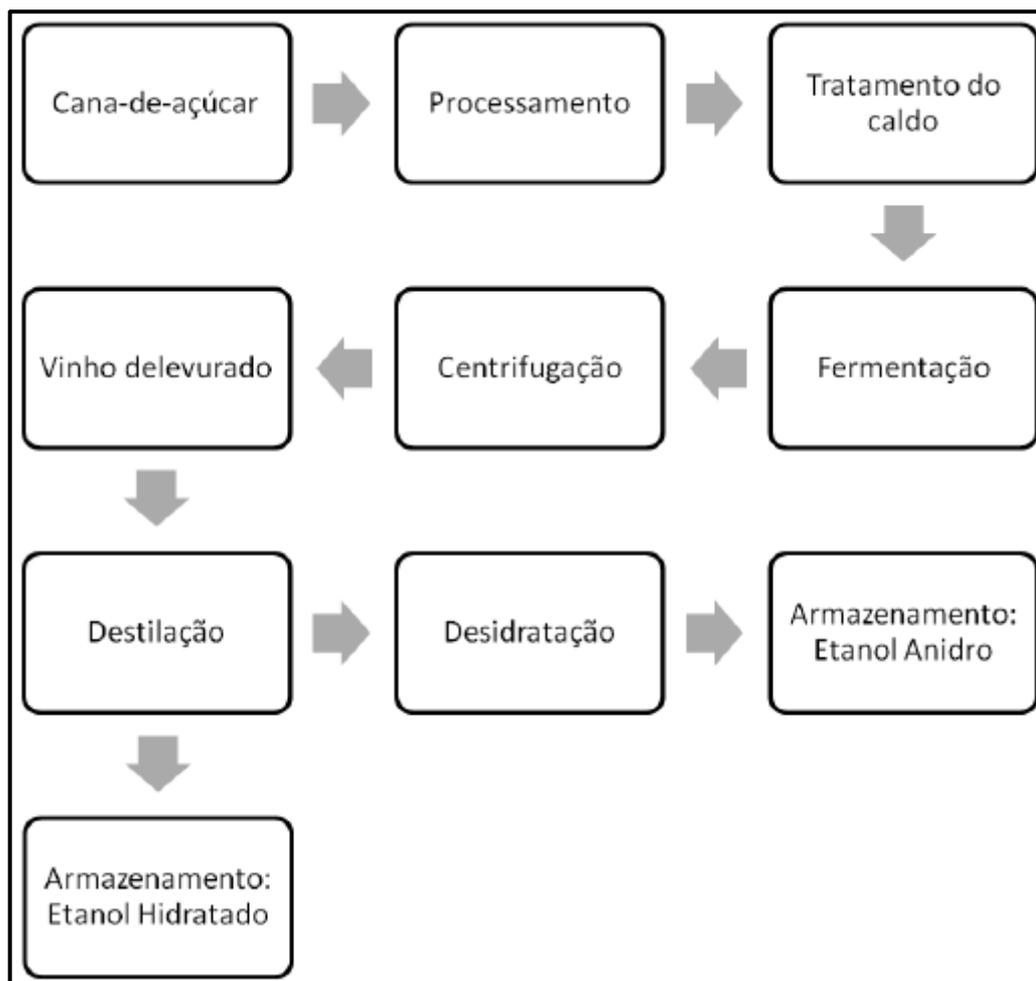


Figura. 1: Fluxograma representativo do processo fermentação para produção de etanol.

Fonte: Adaptado de Chieppe Júnior, 2012.

Os processos fermentativos utilizados no Brasil não ocorrem de forma estéril e o mosto consiste em uma fonte rica em nutrientes para uma grande quantidade de micro-organismos (Amorim, 1997). Apesar de o mosto favorecer a proliferação dos micro-organismos selvagens e não selvagens, a contaminação pode vir da cana, das esteiras, moendas, tubulações e outros equipamentos (Gallo; Canhos, 1991).

Alguns parâmetros devem ser mantidos durante o processo de fermentação industrial, dentre eles estão a composição de leveduras do fermento na dorna, a viabilidade celular, o controle de infecções, o pH, a temperatura e a concentração de açúcar redutor total no mosto, sendo necessário, então, um constante monitoramento da fermentação (Ceccato-Antonini; Silva, 2000). Muitas usinas não fazem esse acompanhamento, o que é uma grande desvantagem, já que a ausência do mesmo representa perdas econômicas devido aos efeitos combinados de formação de espuma, floculação, alta produção de

glicerol e um residual elevado de açúcar que podem ser resultantes de contaminações (Basso et al., 2008).

Algumas práticas na rotina industrial podem ser aplicadas para que a frequência de contaminações seja reduzida, dentre elas, deve-se usar matéria-prima bem conservada e não queimada; tornar mínimo o tempo entre corte e moagem; filtrar o caldo após a moagem; efetuar os devidos ajustes de concentração de açúcar no mosto, com emprego de água de boa qualidade na embebição ou na diluição; utilização de antissépticos; uso de um fermento viável; manutenção da temperatura em torno de 30°C durante a fermentação; proceder exames microscópicos para verificar o grau de contaminação; e limpezas periódicas de todas as instalações da destilaria, que é um dos fatores mais importantes para o controle de micro-organismos selvagens (Mutton,2008).

2.2 Taxonomia do Gênero *Brettanomyces/Dekkera*

A Taxonomia Clássica para micro-organismos faz uso de características morfológicas, estruturais, bioquímicas e fisiológicas para criar comparações entre organismos e grupos de organismos. Nesse conjunto de características analisadas há uma ordem de importância, ou peso, para cada grupo taxonômico. Para leveduras, as características morfológicas que são observadas para identificação dos gêneros levam em consideração a forma da célula, os tipos de brotamento e de esporo, e a formação ou não de filamentos. Para identificação taxonômica ao nível de espécie são considerados os caracteres fisiológicos como assimilação e fermentação de açúcares (Kurtzman e Fell, 1998).

Com o advento da Biologia Molecular e da Bioinformática surgiu a Taxonomia Polifásica (Colwell, 1970) que inclui um conjunto de dados moleculares ao conjunto de dados utilizados na Taxonomia Clássica (Uilenberg e Goff, 2006). Esta concepção do uso de ácidos nucleicos, principalmente de genes ribossômicos, ampliou a noção que se tinha da diversidade da vida no planeta (Woese et al., 1990). À medida que os dados de sequenciamento ficam cada vez mais acessíveis, a taxonomia polifásica é utilizada para classificar e descrever novas espécies e promover rearranjos nos clados de leveduras existentes (Montes et al, 1999; Gadanho et al., 2001).

As primeiras citações ao gênero *Brettanomyces* foi em 1904, segundo Smith et al. (1990), em que linhagens desse gênero foram isoladas ao final da fermentação em uma

cervejaria inglesa, mas somente em 1940 Custer descreveu sua morfologia e fisiologia. Nos trabalhos realizados por van der Walt e van Kerken (1958) não foi feita menção ao gênero *Dekkera*. Isso deve ser devido ao fato de que, antigamente, pensava-se que o gênero *Brettanomyces* não possuía a forma perfeita, ou seja, não formava ascósporos. Dois anos mais tarde, em 1960, eles mostraram a formação de ascósporos em leveduras classificadas como *Brettanomyces*, então, van der Walt (1964) criou um novo gênero para essas linhagens, o gênero teleomórfico *Dekkera*.

Com a criação do novo gênero, duas espécies foram incluídas nesse grupo: a *D. bruxellensis* e *D. intermedia* (van der Walt, 1964). Já nos estudos realizados por Barnett et al (1990) foi observado que as espécies *D. custersiana* e *D. naardenensis* não apresentaram reprodução sexuada. Assim, estas duas espécies deveriam ser consideradas como um Deuteromycotina da família Cryptococcaceae e do gênero *Brettanomyces*. Corroborando a afirmação anteriormente feita por van der Walt (1984) que demonstrou que estas duas espécies pertenciam ao gênero *Brettanomyces*, são elas: *Brettanomyces custersianus* e *Brettanomyces naardenensis*. Assim Barnett et al (1990) viram que quatro espécies compunham esse gênero: *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *D. custersiana* e *D. naardenensis*.

Como o gênero *Brettanomyces* é a forma anamórfica do gênero *Dekkera*, as quatro espécies pertencentes a esse gênero foram incluídas também no gênero da forma teleomórfica. Essa inclusão foi realizada com base na homologia de sequência do DNA ribossomal, logo, o gênero foi formado por cinco espécies; *B. nanus* (forma teleomórfica que já era conhecida) e as quatro formas homologas: *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus* e *B. naardenensis* (Hoeben; Clark-Walker, 1986; Boekhout et al, 1994).

O termo *Brettanomyces/Dekkera* tem sido usado indistintamente causando problemas na uniformização da taxonomia relacionados a esta levedura. Por causa disso a Comissão Internacional de Nomenclatura (Hibbett e Taylor, 2013) propôs uma mudança, na qual só se usaria um único termo para a descrição desse gênero como pode ser visto no trabalho realizado por Borneman et al, 2014, no qual o termo *Brettanomyces* já está sendo usado como recomendado para a uniformização.

2.3 A espécie *Dekkera bruxellensis*

2.3.1 Características Gerais

Leveduras da espécie *Dekkera bruxellensis* são eucariotos que foram encontrados como contaminantes em diferentes episódios de contaminações industriais (Oelofse et al., 2008; Basilio et al., 2008; Liberal et al., 2007). Estão classificadas taxonomicamente no Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Saccharomycotina*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*; Família *Saccharomycetacea*, Gênero *Dekkera*, Espécie *D. bruxellensis* (Barnett et al, 1990).

Como características morfológicas gerais, ao microscópio, na descrição realizada por Walt em 1984, apresentam células esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais (Figura 2). Sua reprodução se dá por brotamento e, exibem pseudomicélio. Possui um lento crescimento, curta duração de vida em placas, aroma característico e, forte produção de ácido acético (Barnett et al., 1990; Kreger van-rij, 1984). São leveduras oportunistas e apresentam caráter não competitivo, ou seja, permitem que outras leveduras atuem no processo fermentativo (Silva et al, 2005).

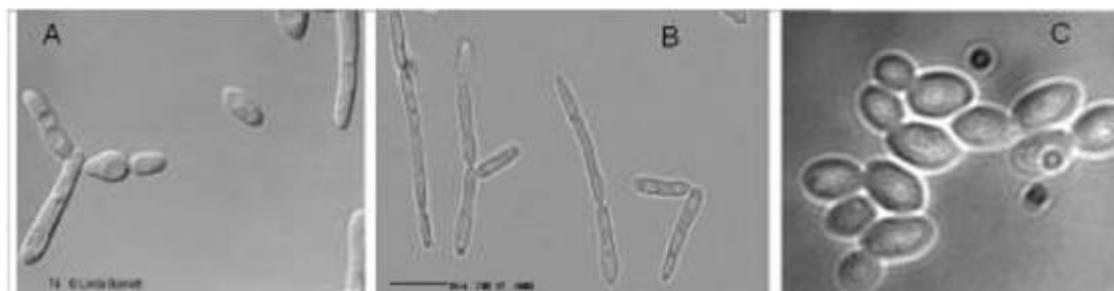


Figura 2: Linhagens da espécie *Dekkera bruxellensis*. (A) linhagem CBS 74; (B) linhagem CBS 2499; (C) linhagem GDB 248 (industrial) em meio YPD (Microscopia de contraste de fase). Retirado de Leite (2012).

Em relação a sua fisiologia, a levedura *Dekkera bruxellensis*, é capaz de metabolizar diversas fontes de carbono, dentre elas estão glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e etanol. Elas também assimilam fontes de nitrogênio como amônia, prolina, arginina e nitrato (Conterno et al., 2006). *D. bruxellensis* é Crabtree positiva (apresenta metabolismo fermentativo quando em altas concentrações de glicose), possui alta tolerância a etanol e é anaeróbica facultativa (Woolfit et al., 2007; Piskur et al., 2006).

2.4 Ecologia de leveduras

Atualmente, no estudo da ecologia de comunidades, o termo biodiversidade pode ser entendido como a variedade que existe entre os organismos e as complexidades ecológicas nas quais ocorrem (Botha, 2006). As leveduras são organismos ubíquos na natureza (Lachance e Starmer, 1998; Phaff e Starmer, 1987; Botha, 2006), importantes componentes de ecossistemas contribuindo com formação da biodiversidade (Fleet, 1998). São encontradas associadas a diversos substratos como plantas, folhas, frutas, flores, tecido em decomposição (Phaff e Starmer, 1987), em sedimentos, água, superfície externa e trato intestinal de animais (Phaff e Starmer, 1987; Lachance e Starmer, 1998; Molnár et al., 2008).

A sucessão de leveduras em um determinado nicho está envolvida em uma variedade de processos ecológicos e bioquímicos devido à sua habilidade em usar açúcares simples como fonte nutricional (Kurtzman e Fell, 1998). É o que ocorre nas indústrias sucroalcooleiras onde estes micro-organismos podem ser encontrados desde a matéria-prima até o subproduto final da produção (Migriari, 2001). Dentre as leveduras encontradas durante a fermentação alcoólica destacam-se os gêneros *Saccharomyces*, que é a levedura usada como fermento, e leveduras que são ditas contaminantes que podem ou não causar prejuízo ao processo, como por exemplo, espécies dos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Torula* entre outras (Sunao, 1992).

Lima (2001), em seus estudos, relatou que o começo da safra no setor sucroalcooleiro se inicia com culturas puras e no decorrer da safra as linhagens do início do processo foram substituídas por leveduras contaminantes, como também foi demonstrado por Possas (2012) (Figura 3). Em um estudo realizado em destilarias do nordeste brasileiro, Souza Liberal et al. (2007) demonstraram que a subpopulação de *D. bruxellensis* substituiu a de *S. cerevisiae*, o que deu a esta levedura o título de principal contaminante do processo de fermentação alcoólica industrial.



Figura. 3: Leveduras selvagens crescidas em meio WLN.
Fonte: Possas, 2012.

Como o processo fermentativo de produção do álcool combustível é um processo aberto, ou seja, propício a qualquer tipo de contaminação, a seguir serão destacados alguns ambientes com suas respectivas características que podem favorecer o crescimento e propagação da população de leveduras selvagens nesses ambientes.

2.4.1 Caldo de cana-de-açúcar

Além da produção de açúcar, álcool e aguardente, a cana-de-açúcar é muito utilizada para a produção de garapa (caldo de cana), muito apreciada pelo consumidor brasileiro (Soccol *et al.*, 1990). O caldo-de-cana é obtido pela moagem da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), rico em açúcares que são assimilados durante a fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* para conversão (produção) do etanol combustível (Lima, 2001).

A cana-de-açúcar, uma vez coletada no campo, é encaminhada a uma série de análises realizada na própria destilaria, para determinação de teor de açúcar (grau brix), graus de pureza e teor de fibras, dentre outros parâmetros. Estes dados auxiliarão na decisão de se utilizar determinadas carga de cana-de-açúcar como substrato do processo fermentativo. Quando a cana é moída, o caldo que é extraído contém uma série de compostos. Esse caldo se encontra dentro das células do parênquima e sua composição química pode variar em função de vários fatores, entre os quais incluem variedade da cana, clima, tipo de solo, adubação, tempo de maturação e outros fatores (Horii, 2004).

O caldo de cana é definido como uma solução impura e diluída de sacarose, composto basicamente de água, açúcares, outros compostos orgânicos e inorgânicos (Lima, 2001). A composição química do caldo consiste em cerca de 75% de água, 14% de açúcares, frutose, glicose e sacarose, sendo este último o principal deles (Tabela 1). Composto o percentual de fibras (10%), apresentam-se a celulose, lignina, pentosana e arabana. Possui ainda, em proporções menores, compostos nitrogenados, aminoácidos, gorduras e ceras, ácidos e cinzas (Stupiello, 1987).

TABELA 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CALDO DE CANA.

Elemento	%
Águas	74,50
Açúcares	14,00
Sacarose	12,50
Glicose	0,90
Frutose	0,60
Fibras	10,00
Celulose	5,50
Lignina	2,00
Pentosana (xilina)	2,00
Goma de cana (arabana)	0,50
Cinzas	0,50
Materiais nitrogenados	
Aminoácidos (ácido aspártico)	0,40
Albuminódeos	0,20
Amidas	0,12
Ácido nítrico	0,07
Amoníaco	0,01
Corpos xânticos	Traços
Gorduras e ceras	Traços
Substâncias pécicas e mucilagem	0,20
Ácidos combinados	0,20
Ácidos livres	0,12
Materiais corantes	0,08
Total	100,00

Fonte: Adaptado de Stupiello, 1987.

Após a moagem, o caldo de cana extraído passa por algumas etapas, por exemplo, filtração e clarificação, como preparação para a fermentação. Em função de sua rica composição química, é um meio adequado ao crescimento e desenvolvimento de microorganismos (Yusof *et al.*, 2000). A temperatura ideal para a fermentação está entre 28°C e 32°C e o pH 4 é alcançado naturalmente durante a fermentação, qualquer alteração nesses dois parâmetros pode favorecer o desenvolvimento de bactérias e leveduras contaminantes (Silva-Filho, 2003).

2.4.2 Água

No processo industrial de fermentação alcoólica utiliza-se um grande volume de água, como é recomendado pelos fabricantes de equipamentos de usinas de açúcar e álcool. A água é usada em processos como lavagem da cana-de-açúcar, lavagem de pisos e equipamentos; resfriamento dos aparelhos da destilaria; colunas barométricas; descarga de caldeiras; etc., porém a grande parte da água utilizada com estas finalidades pode ser reutilizada (Braile *et al.*, 1993).

Nas destilarias, antes de ser triturada para obtenção do caldo, a cana-de-açúcar é lavada. Esta operação é realizada para retirar os resíduos sólidos que são carregados durante a operação de corte, transporte e recepção na usina. No caso de carregamento mecanizado, recomendam-se a utilização de cerca de 6000 litros de água por tonelada de cana. Entretanto, isso pode variar de acordo com a quantidade de água disponível (Braile *et al.*, 1993). A água utilizada para a lavagem, na maioria das vezes, é de um manancial, já que as instalações das destilarias normalmente, são próximas à mananciais (Freitas et al, 2006).

A presença de fungos na água já é bem conhecida, mais pouca atenção tem sido dada a estes micro-organismos, no que diz respeito ao tratamento de água para consumo, pois de acordo com diretrizes internacionais que definem os parâmetros analisados sobre a qualidade da água, a presença de fungos não é considerada como fator de reprovação para qualidade da água (Pereira et al. 2009). A presença de fungos em reservatórios de água pode estar associada a sua capacidade de aderência a um substrato como no estabelecimento de biofilmes (Hageskal et al. 2009, Grabińska-Loniewska et al. 2007).

Fungos filamentosos são encontrados em grande número em ambientes aquáticos, mais vários autores reportaram também a presença de leveduras. Dos fungos aquáticos encontrados destacam-se espécies patogênicas, tóxicas e alergênicas (Pereira et al. 2010). Hageskal et al (2009) verificaram uma ampla presença de fungos em águas de consumo, na Noruega. Faia et al (2011) encontraram leveduras e fungos filamentosos em água predial e em estação de tratamentos de água (ETA) em seus experimentos realizados em Portugal.

2.4.3 Vinhaça

A vinhaça é um efluente de destilarias com alto poder poluente e alto valor fertilizante (Freire & Cortez, 2000). Caracterizada por ser um líquido escuro, viscoso e

concentrado, de odor desagradável, sem oxigênio dissolvido, alta turbidez e baixo pH (Francisco, 2008). Este efluente é um subproduto rico em nutrientes, principalmente matéria orgânica, tendo um alto potencial poluente quando disposto no ambiente (Ferreira, 2009). É considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação (Freire & Cortez, 2000).

A riqueza nutricional da vinhaça varia de acordo com o tipo de mosto utilizado na destilaria (Voll, 2005). O principal constituinte da vinhaça é a matéria orgânica, basicamente sob a forma de ácidos orgânicos e, em menor quantidade, por cátions como o K, Ca e Mg. Quando o álcool produzido foi originado de melão, a vinhaça possui maiores concentrações em matéria orgânica, potássio, cálcio e magnésio, em contrapartida esses elementos decaem consideravelmente quando se trata de mosto de caldo de cana, como é feito nas destilarias autônomas (Rossetto, 1987). O uso da vinhaça como fertilizante é principalmente devido a alta quantidade de potássio que ela possui (Voll, 2005).

A vinhaça deve ser considerada também como agente do aumento da população e atividade microbiana no solo e plantas irrigadas por ela (Silva & Ribeiro, 1998). As áreas irrigadas sofrem um aumento no pH do solo principalmente em áreas cultivadas há mais tempo. Este efeito é uma das características que proporciona um aumento na proliferação dos micro-organismos (Rossetto, 1987). Recentemente, estudos estão sendo realizados com vinhaça como substratos para micro-organismos em que os nutrientes disponíveis são aproveitados para a obtenção de biomassa de valor comercial, por exemplo, a produção de lipídios. Um dos principais motivos para o descarte da vinhaça é o alto custo tecnológico (Azania, 2003).

Meurer et al, (2000) aponta que a vinhaça, amplamente utilizada nas lavouras canavieiras para fertirrigação, se destaca como contaminante de águas superficiais e subterrâneas. Esse contaminante, principalmente fosfato e nitrato, tem gerado grande preocupação, nos últimos anos, acerca dos seus efeitos na saúde da população humana e animal (Resende et al. 2002). Segundo Stevenson (1986), esses contaminantes, principalmente o nitrato, pode causar além dos danos a saúde humana e animal, um aumento ou uma diminuição de plantas e micro-organismos no ambiente levando ao fenômeno conhecido como eutrofização.

As características físico-químicas da vinhaça já são bem conhecidas. De maneira geral, apresenta elevadas concentrações de nitrato, potássio e matéria orgânica (Madejón et al. 2001). Já que nos estudos realizados por Barros Pita et al.,(2011) afirmam que leveduras

da espécie *D. bruxellensis* podem utilizar compostos nitrogenados para o seu crescimento, podemos inferir que as lagoas de vinhaça são ambientes favoráveis para o crescimento desse micro-organismo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo, manutenção e manuseio de culturas de leveduras.

Os meios utilizados para a seleção, isolamento e crescimento das culturas de leveduras foram os meios W-L Nutrient Medium (WLN), um meio complexo da Acumedia, para uma primeira triagem selecionando leveduras resistentes a ciclohexamida. YNB (Nitrogênio Levedura Base) com nitrato de sódio para seleção de leveduras assimiladoras de nitrato como segunda triagem e YPD (extrato de levedura (1%), peptona (2%), dextrose (2%)) para crescimento dos isolados. E como terceira triagem os isolados foram submetidos a PCR como os iniciadores específicos (DB-90F e DB-394R) e aqueles que foram positivos para essa amplificação foram cultivados em tubos rosqueados com meio YPD-ágar inclinado e guardados sob óleo mineral a temperatura ambiente para posterior sequenciamento de DNA e incorporação na coleção de culturas da Micoteca URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

3.2 Amostragem e Coletas

As amostras utilizadas nos experimentos deste trabalho foram coletadas em duas destilarias durante o período de safra 2013/2014. A destilaria Japungú - Agroindustrial que está localizada no município de Santa Rita e a destilaria Tabu – Agroindustrial que localiza-se no município de Caaporã, ambas no estado da Paraíba, região Nordeste, Brasil. As coletas foram realizadas por funcionários da empresa Fermenta Biotecnologia Industrial & Meio ambiente em sacos estéreis.

Os pontos de coletas foram escolhidos de forma a verificar em que locais das várias etapas do processo fermentativo poderiam aparecer contaminantes. As amostras coletadas foram a água de lavagem da cana-de-açúcar, o caldo misto e a vinhaça, podendo assim analisar um estágio antes da entrada no processo, um durante o processo e um posterior ao processo de fermentação (Figura 4). Estas amostras foram analisadas mensalmente durante toda a safra.

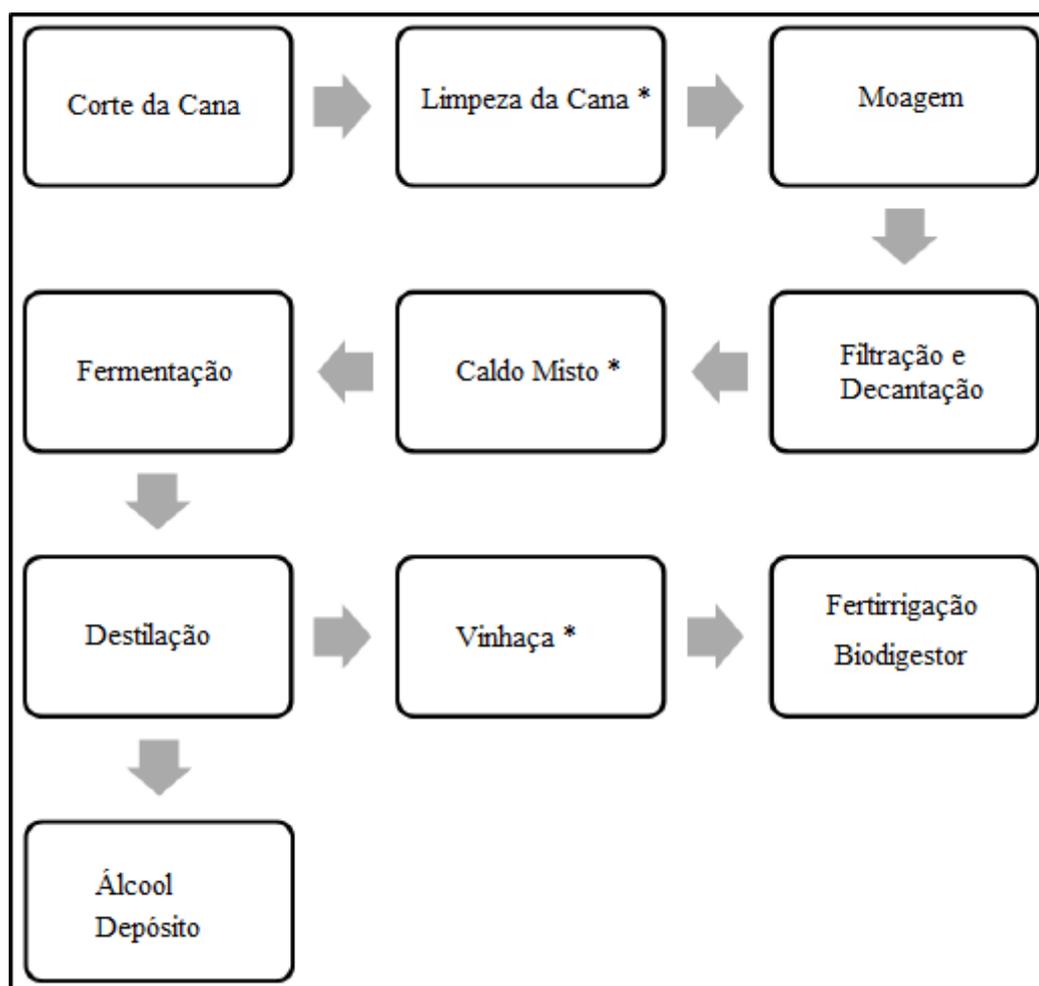


Fig. 4: Fluxograma da fermentação alcoólica destacando os pontos onde foram coletadas as amostras (*).

3.3 Identificação da diversidade de leveduras nas amostras

3.3.1 Plaqueamento, Contagem e Isolamento dos micro-organismos

As amostras industriais foram diluídas em solução salina 0,85% em diluições seriadas até $1:10^5$ e 0,1 mL das diluições foram plaqueados em duplicata por espalhamento na superfície das placas contendo meio WLN adicionado de ampicilina, cloranfenicol e ácido nalidíxico (todos numa concentração de $100\mu\text{g/mL}$) para inibir o crescimento bacteriano e com cicloheximida (numa concentração de 5 mg/L) para inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por cinco a sete dias e aquelas contendo entre 50 a 100 colônias foram escolhidas para as análises (Figura 5).



Fig. 5: Placas com colônias de leveduras em meio WLN, cultivadas por 5 dias a 30°C.

3.3.2 Triagem dos isolados

Após incubação, foram selecionadas placas com aproximadamente 100 colônias que apresentassem boa distribuição com relação ao crescimento. Como primeira triagem, as colônias foram repicadas para placas com o meio sintético YNB contendo nitrato de sódio (YNB-Nit) como fonte de nitrogênio, já que as células de *D. bruxellensis* podem utilizar esse nutriente para o seu crescimento (Barros Pita et al., 2011). As colônias isoladas do cultivo em meio YNB-Nit foram inoculadas em meio YPD líquido para extração do DNA.

3.4 Caracterização molecular das culturas

3.4.1 Extração de ácidos nucleicos (DNA)

A extração de DNA total das leveduras foi realizada a partir de 2mL de cada cultura crescida em YPD. As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 10.000 rpm a 24°C para obtenção das células de leveduras. O sobrenadante foi retirado e as células foram suspensas em 600 µl de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8.0; NaCl 250mM;

EDTA 25Mm; SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10% e incubadas a 65°C durante 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos. Logo após esta etapa de lise celular, foram acrescentados 600 µl de clorofane (fenol/clorofórmio (24:1)), os tubos homogeneizados por inversão e centrifugados a 10.000 rpm durante 5 minutos a 24°C para precipitação de proteínas. O sobrenadante foi coletado cuidadosamente com micropipeta e transferido para um micro tubo plástico de 1,5mL. Ao sobrenadante foram adicionados 500 L de clorofil (clorofórmio/álcool isoamílico (1:1)) e, a mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada durante 5 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, foram recuperados 400 µL da fase superior e transferidos para novos micro tubos de 1,5 mL. A estes tubos foram adicionados 800 µL de etanol absoluto gelado para precipitação do DNA.

Após essa etapa de precipitação, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a fim de que o DNA se depositasse no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o DNA precipitado foi lavado cuidadosamente com 300 µL etanol 70% gelado com agitação em vórtex. Ao final da lavagem o material foi centrifugado e o etanol 70 % também foi descartado. A amostra de DNA foi colocada para secar na estufa a 37°C por cerca de 30 a 60 minutos. Os ácidos nucléicos extraídos foram ressuspensos em 25 µL de água miliQ e estocado a -20°C para posterior uso nas reações de PCR.

3.4.2 Quantificação e determinação do fragmento

A extração foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) utilizando 3 µL do DNA total extraído de cada isolado, e sob uma voltagem 7,5V/cm por 30 minutos. Para estimar a quantidade do DNA extraído, foi utilizado 5µL do marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen). Os géis foram corados com uma solução de brometo de etídio e o material extraído visualizado com iluminação ultravioleta. A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260 nm em aparelho Nanodrop (Thermo scientific).

Os produtos de amplificação também foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) a 7,5 volts/cm por 60 minutos em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) utilizando-se o marcador de peso molecular de 100bp, corados em brometo de etídio (TBE 1X/EtBr 0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz U.V.

3.4.3 Identificação molecular dos isolados

3.4.3.1 Amplificação da região do domínio específico para a espécie *D. bruxellensis*

A região gênica estudada para a amplificação da região de identificação (domínio específico da espécie *D. bruxellensis*) corresponde a uma região dentro do domínio D1/D2 da região variável do gene que codifica o RNAr 26S. Esse domínio específico foi amplificado utilizando-se os iniciadores DB90F e DB394R (Tabela 2), como descrito por Souza Liberal et al. (2007). Neste trabalho, o ciclo de amplificação utilizado foi: desnaturação inicial a 94°C por 6 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento dos Primers a 55°C por 20 segundos e, extensão a 72°C por 60 segundos. Ao final dos 35 ciclos de amplificação, a extensão final a 72°C por 5 minutos foi ainda realizada.

As reações de PCR foram realizadas com os seguintes reagentes nas concentrações citadas a seguir: MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), Tampão (1X), Taq polimerase da invitrogen (0,3 U/μL), Primers (0,2 mM cada) e DNA (2 ng/μL) todos com um volume para compor uma reação de 25 μL.

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DAS SEQUÊNCIAS INICIADORAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO.

Nome	Sequência (5' - 3')	Nº Bases	Tamanho do Fragmento	T _m °C
DB90F	5'-GAYACTAGAGAGARRGGARGGC-3'	23	310 pb	57,7
DB394R	5'-ACGAGGAACGGGCCGCT-3'	17		62,9
NL 1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	24	680 pb	54,2
NL 4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	19		56,2

3.4.3.2 Amplificação da região do domínio D1/D2

Para comprovação da identificação do domínio específico, o domínio D1/D2 do gene 26S rDNA das leveduras foi sequenciado utilizando os iniciadores NL1 e NL4 (Tabela 2) como descrito por Souza Liberal et al. (2007), seguindo os mesmos parâmetros de ciclagem e análise anteriormente citados. Os fragmentos produzidos foram purificados para eliminação dos iniciadores e enzima utilizados durante a reação de amplificação, com o sistema de purificação por coluna de afinidade do kit Wizard PCR (Promega). O produto amplificado foi misturado a 100 μL da solução de ligação e aplicado em uma coluna

fornecida pelo sistema de purificação, montada sobre um micro tubo e centrifugado a 16.000g por 1 minuto. O eluído foi descartado e 500 µL da solução de lavagem foram aplicados sobre a coluna. Foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições da anterior. Repetiu-se o processo de lavagem e centrifugou-se a amostra durante 5 minutos. A coluna foi então repassada para um novo micro tubo e adicionada 15 µL de água livre de nucleasse fornecida pelo sistema de purificação. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 min e centrifugada a 16.000g por 5 min. O material eluído em 15 µL foi quantificado em Nanodrop e mantido a – 20°C.

3.4.4 Reação de sequenciamento e análise das sequências

As amostras quantificadas foram submetidas à reação de sequenciamento do tipo Sanger na plataforma de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Ciências Biológicas (CCB). Os cromatogramas gerados foram analisados utilizando os programas Trev, Gap4 e Pregap4 (pacote Staden) para montar as sequências e gerar os contigs e as sequências consenso. As sequências consensus obtidas foram analisadas utilizando a ferramenta BLASTn, nucleotídeo a nucleotídeo, no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos realizados voltados à pesquisa da microbiota selvagem presente na fermentação alcoólica tinha como fontes amostras de caldo-de-cana e amostras das dornas de fermentação. Nestes ambientes, os micro-organismos encontram um ambiente favorável a sua multiplicação, como fonte nutricional e condições de crescimento apropriadas. No presente trabalho, as amostras foram coletadas em três diferentes pontos do processo industrial de produção de álcool combustível de forma a tentar explicar a entrada e a recorrência desses micro-organismos. As amostras coletadas foram o caldo misto que consiste no caldo-de-cana, a água de lavagem da cana-de-açúcar e a vinhaça que é o subproduto final da fermentação alcoólica.

No período de agosto de 2013 a abril de 2014 foram coletadas e analisadas um total de 39 amostras, sendo 20 (9 de caldo misto, 7 de água de lavagem e 4 de vinhaça) na destilaria Japungu e 19 (8 de caldo misto, 6 água de lavagem e 5 de vinhaça) da destilaria Tabu. Para efeitos didáticos iremos chamar de destilaria A e B as destilaria Tabu e Japungu, respectivamente. Ao analisar os resultados obtidos, foi possível acompanhar a população de leveduras nas diferentes amostras durante toda a safra. Os primeiros resultados referentes ao crescimento em meio WLN possibilitaram descrever / quantificar a população de leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae*. A partir deste conjunto de isolados não-*Saccharomyces* as colônias foram transferidas para meio YNB contendo nitrato como fonte de nitrogênio e, assim, pôde-se isolar apenas aquelas leveduras que usam este composto para seu crescimento.

4.1 Contagem de leveduras crescidas nas amostras analisadas no meio WLN

Na contagem de colônias realizadas vemos que cada amostra apresenta um crescimento leveduriforme diferente. Na população de leveduras crescidas no meio WLN podemos ver uma grande oscilação na quantificação de leveduras em cada coleta para as amostras de caldo misto, água de lavagem e vinhaça (Figuras 6 e 7).

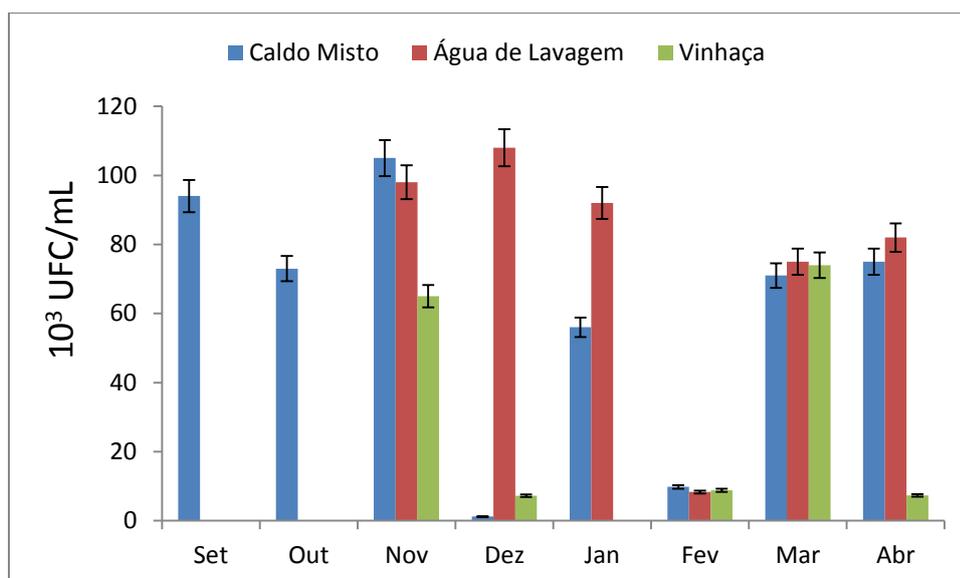


Fig. 6: Gráfico comparativo das leveduras não-*Saccharomyces* crescidas em WLN nas diferentes amostras provenientes da destilaria A.

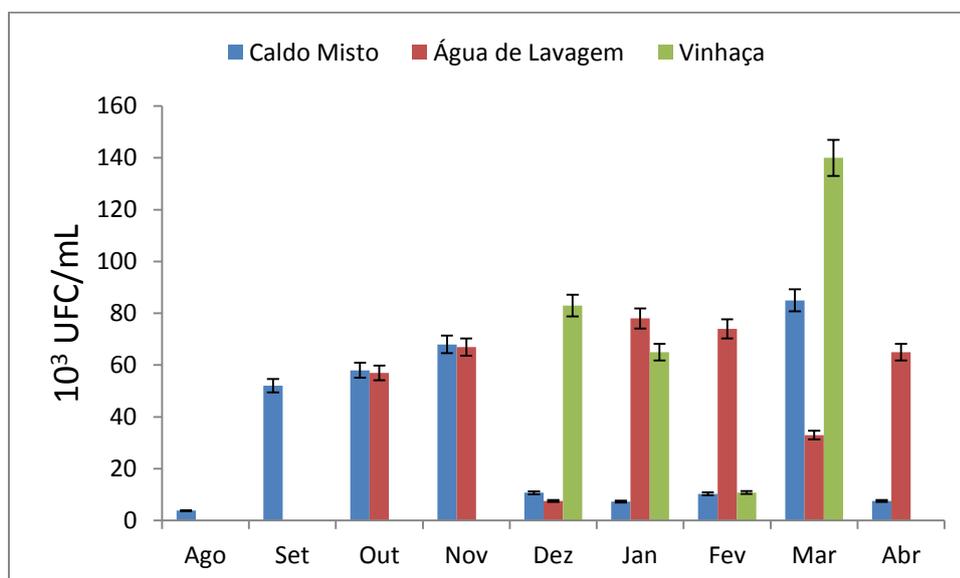


Fig. 7: Gráfico comparativo das leveduras não-*Saccharomyces* crescidas em WLN nas diferentes amostras provenientes da destilaria B.

Para as amostras de caldo misto podemos ver que em todas as coletas, do início ao fim da safra, nas duas destilarias os micro-organismos selvagens estão presentes e diferem apenas na quantidade de isolados obtidos. Analisando a quantidade de leveduras da destilaria A, observa-se sua maior contagem na terceira coleta (novembro) com uma ordem de grandeza com cerca de 10^5 UFC/mL, sua menor contagem foi observada no mês de dezembro em que obteve-se uma ordem de grandeza de 10^3 UFC/mL. Para a destilaria B, vemos que a contagem variou apenas em uma casa decimal, a maior contagem foi

observada no mês de março com 10^4 UFC/mL e a menor foi observada na primeira coleta (agosto) com 10^3 UFC/mL (Tabela 3 e 4).

TABELA 3: QUANTIFICAÇÃO DE ISOLADOS CRESCIDOS EM MEIO WLN DA DESTILARIA A

Mês de Coleta	Amostras		
	Caldo Misto (UFC/mL)	Água de Lavagem (UFC/mL)	Vinhaça (UFC/mL)
Set	$9,4 \cdot 10^4$	-	-
Out	$7,3 \cdot 10^4$	0	0
Nov	$1,05 \cdot 10^5$	$9,8 \cdot 10^4$	$6,5 \cdot 10^4$
Dez	$1,19 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^5$	$7,2 \cdot 10^3$
Jan	$5,6 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^4$	0
Fev	$9,8 \cdot 10^3$	$8,3 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^3$
Mar	$7,1 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^4$
Abr	$7,5 \cdot 10^4$	$8,2 \cdot 10^4$	$7,3 \cdot 10^3$

(-) coletas não realizadas

TABELA 4: QUANTIFICAÇÃO DE ISOLADOS CRESCIDOS EM MEIO WLN DA DESTILARIA B

Coleta	Amostras		
	Caldo Misto (UFC/mL)	Água de Lavagem (UFC/mL)	Vinhaça (UFC/mL)
Ago	$3,8 \cdot 10^3$	-	-
Set	$5,2 \cdot 10^4$	0	0
Out	$5,8 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^4$	0
Nov	$6,8 \cdot 10^4$	$6,7 \cdot 10^4$	0
Dez	$1,07 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^3$	$8,3 \cdot 10^4$
Jan	$7,3 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^4$	$6,5 \cdot 10^4$
Fev	$1,03 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^4$	$1,08 \cdot 10^4$
Mar	$8,5 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^5$
Abr	$7,5 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^4$	0

(-) coletas não realizadas

Para as amostras de água de lavagem da cana-de-açúcar, foi observado um comportamento semelhante ao das amostras de caldo misto nas duas destilarias. Com uma alta contagem de leveduras em todas as amostras coletadas na ordem de 10^3 UFC/mL, havendo uma pequena queda na contagem em apenas uma amostra em cada destilaria. As maiores contagens de leveduras para água de lavagem foram observadas no mês de dezembro na destilaria A ($1,08 \times 10^5$), enquanto na destilaria B a maior contagem foi $7,8 \times 10^4$ no mês de janeiro e a menor foi no quinto mês de safra (dezembro) com cerca de $7,5 \times 10^3$ UFC/mL. Outra observação que se pode fazer é que a ordem de grandeza da contagem de leveduras nessa amostra é a mesma das amostras de caldo misto, sugerindo que as leveduras encontradas nessa amostra podem ser provenientes da cana-de-açúcar já que a água não fornece vantagens (nutrientes) para multiplicação de leveduras e que essa água é

reutilizada nas diversas lavagens. Isto justificaria as oscilações nas contagens de leveduras nessa amostra.

A contagem de leveduras observada nas amostras de vinhaça foi a que mais diferiu de todas as amostras analisadas. A vinhaça é um subproduto da destilação do mosto fermentado que é armazenada nas lagoas de tratamento, e de lá são utilizadas para a fertirrigação dos campos de cana. Desta forma, este tipo de amostra não foi coletado no primeiro mês de safra já que não havia material estocado. Portanto, as amostras de vinhaça só foram analisadas a partir do segundo mês de coletas. O crescimento leveduriforme foi observado a partir do mês de novembro na destilaria A e na destilaria B apenas no mês de dezembro, quinto mês de safra. Foi observado ainda que estes episódios de ausência de crescimento repetiu-se nas duas destilarias, para destilaria A no quinto mês de safra e para a B no ultimo mês (9º mês). Apesar desse comportamento peculiar, as amostras deste ponto de coleta também apresentaram uma população de leveduras não-*Saccharomyces* que merece destaque. As contagens de leveduras em meio WLN foram bastante elevadas e variaram entre $6,5 \times 10^3$ e $7,4 \times 10^4$ para destilaria A e entre $1,08 \times 10^4$ e $1,4 \times 10^5$ para destilaria B. Próximo ao final da safra da destilaria B, no mês de março, observou-se o maior pico (crescimento) da população de leveduras não-*Saccharomyces*, com uma estimativa na ordem de 10^5 UFC/mL.

Quando comparamos a população total de leveduras de cada destilaria podemos observar que o aparecimento de leveduras selvagens foi maior na destilaria A. E analisando a população de cada amostra vemos que em cada destilaria houve um comportamento diferente quanto à distribuição destes isolados nos três pontos onde houve coletas. Para a destilaria A, a contagem foi maior nas amostras de caldo misto seguidos de água de lavagem e a menor contagem foi nas amostras de vinhaça. Já na destilaria B, como podemos ver na tabela 5, a ordem crescente das contagens de leveduras foram vinhaça, caldo misto e água de lavagem.

TABELA 5: QUANTIFICAÇÃO TOTAL DE ISOLADOS CRESCIDOS EM MEIO WLN NAS DUAS DESTILARIAS

Amostras	Destilaria A (UFC/mL)	Destilaria B (UFC/mL)
Caldo Misto	484.990	302.600
Água de Lavagem	463.300	381.500
Vinhaça	162.300	298800
Total	1.110.590	982.900

Desde 1950, quando Green & Gray demonstraram que a adição de ciclohexamida ao meio WLN inibia a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, permitindo o crescimento de

outros micro-organismos, este tem sido bastante utilizado como meio de rotina no controle de qualidade microbiológica em cervejarias e destilarias de álcool combustível. Os dados obtidos indicam que o uso do meio WLN com ciclohexamida pode proporcionar a separação final entre cepas de *S. cerevisiae* e as linhagens selvagens que podem estar associadas ao processo industrial, resultados estes que são corroborados por Andrietta et al. 2006. O meio WLN adicionado de antibióticos e ciclohexamida têm sido empregado com frequência em muitas destilarias produtoras de álcool combustível no nordeste para monitorar leveduras selvagens resistentes a este antifúngico (Silva Filho, 1993). As leveduras selvagens detectadas nas destilarias estudadas apareceram no meio WLN após 72 horas de incubação como descrito por Oliveira e Silva (1994).

Em seus estudos Beech & Carr (1958) verificaram que, ao contrário das outras leveduras, isolados do gênero *Brettanomyces* apresentavam resistência à ciclohexamida (50 mg/mL) e ao ácido sórbico (500 mg/mL). A adição destes dois compostos, embora não tenha acarretado inibição completa de todas as outras leveduras, possibilitou seu isolamento de uma maneira mais segura. Oliveira e Silva (1994) utilizaram o meio WLN adicionado dos antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico na concentração final de 50 mg/ml para quantificar leveduras totais, e WLN com ciclohexamida na concentração final de 5mg/L para quantificar leveduras selvagens resistentes. Esses autores analisaram amostras de mosto de alimentação, mosto fermentado, fermento tratado, vinho de levedurado e espuma de vinho, em várias unidades industriais produtoras de álcool combustível no Estado de São Paulo, com o objetivo de caracterizar, quantificar e identificar leveduras contaminantes de processo industriais para produção de álcool combustível.

Castro (1995) utilizou o WLN para avaliação da diversidade de leveduras em usinas de açúcar e etanol. Campbell (1999) indicou a análise da variação de morfologia e cor de colônias de leveduras crescidas em meio WLN como um dos testes para distinção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo o autor, este é um teste simples e suficiente para reconhecer similaridades ou diferenças entre isolados de levedura, apesar de não fornecer informações sobre sua identidade. Entretanto, essas características morfológicas não parecem muito discriminatórias, já que colônias com morfologias diferentes podem pertencer a mesma espécie de levedura e colônias semelhantes podem pertencer a espécies diferentes (Silva-Filho, 2003). Após essa etapa de triagem por coloração e/ou morfologia, deve-se proceder com os testes de identificação, através de análises bioquímicas ou moleculares, como realizado por Silva-Filho (2003) que através da amplificação de

sequências simples entre repetições (ISSR), com o iniciador (GTG)₅, identificou perfis espécie-específicos a partir dos polimorfismos genéticos que permitiram a discriminação de espécies de leveduras contaminantes diferentes de *Saccharomyces*, e de linhagens nativas de *S. cerevisiae* em amostras de mosto fermentado coletadas em dorna de fermentação industrial.

O meio WLN suplementado com ciclohexamida é muito eficiente na separação de leveduras resistentes a este antibiótico como, por exemplo, é o que acontece com as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que são inibidas com 5mg/L de ciclohexamida. Entretanto, Basilio et al. (2008) mostraram que o número de leveduras não *Saccharomyces* em amostras industriais é muito grande, chegando a quase trinta espécies. Portanto, é necessário que se utilize um segundo método de seleção para se aumentar o percentual de colônias de *D. bruxellensis* nas placas, facilitando a posterior identificação. O método utilizado para isso foi a suplementação do meio sintético YNB com nitrato no qual, como demonstrado por Barros Pita et al. (2011), as leveduras da espécie *D. bruxellensis* tem a capacidade de assimilar e crescer em nitrato como única fonte de Nitrogênio.

4.2 Contagem de leveduras crescidas nas amostras analisadas no meio YNB-Nitrato

Em todas as amostras coletadas, o número de leveduras que crescem na presença de nitrato é menor quando comparamos com o número de leveduras crescidas no meio WLN, condição na qual foram inicialmente selecionadas. Isto corrobora a presença de muitas espécies não-*S. cerevisiae* nas amostras que são resistentes a ciclohexamida, mas não assimilam nitrato. A partir desta contagem de UFC crescidas em WLN suplementado com nitrato, os dados foram usados para estimar a população destas leveduras no ponto de coleta como também o percentual dessas leveduras com relação a população total de leveduras selvagens encontradas no meio WLN.

Para a destilaria A, vemos que em cada coleta houve uma redução na população de leveduras. Nas coletas realizada nos meses de novembro e dezembro, nas amostras de caldo misto observou-se a redução mais acentuada para essa destilaria, a diferença entre a contagem nos dois meios chegou a ser de duas casas decimais (Tabela 6), entretanto analisando a contagem total cerca de 20% da população total de leveduras são capazes de crescer usando nitrato como fonte. Para as amostras de água de lavagem esse percentual foi de 11,8%. No entanto, as amostras de vinhaça apresentaram a menor contagem (5,7%) em

relação a água de lavagem e ao mosto de alimentação, nas quais em apenas duas coletas foram registradas leveduras assimiladoras de nitrato.

TABELA 6: QUANTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DA DESTILARIA A NOS MEIOS WLN, YNB-NIT E PERCENTUAL DE LEVEDURAS ASSIMILADORAS DE NITRATO NA POPULAÇÃO TOTAL DE LEVEDURAS ENCONTRADAS.

Coletas/Mês	Caldo Misto			Água de Lavagem			Vinhaça		
	WLN	YNB-Nit	% *	WLN	YNB Nit	% *	WLN	YNB-Nit	% *
Set	9,4. 10 ⁴	1,3. 10 ⁴	13,8	-	-	-	-	-	-
Out	7,3. 10 ⁴	1,9. 10 ⁴	26,0	0	0	0	0	0	0
Nov	1,05. 10 ⁵	5. 10 ³	4,8	9,8. 10 ⁴	1,2. 10 ⁴	12,2	6,5. 10 ⁴	0	0
Dez	1,19. 10 ³	2. 10 ¹	1,7	1,08. 10 ⁵	2. 10 ⁴	18,5	7,2. 10 ³	0	0
Jan	5,6. 10 ⁴	1,6. 10 ⁴	28,6	9,2. 10 ⁴	1. 10 ⁴	10,9	0	0	0
Fev	9,8. 10 ³	3,2. 10 ³	32,7	8,3. 10 ³	1,6. 10 ³	19,3	8,8. 10 ³	2,3. 10 ³	26,1
Mar	7,1. 10 ⁴	2,1. 10 ⁴	29,6	7,5. 10 ⁴	1,4. 10 ⁴	18,7	7,4. 10 ⁴	3,7. 10 ⁴	50
Abr	7,5. 10 ⁴	2. 10 ⁴	26,7	8,2. 10 ⁴	1,5. 10 ⁴	18,3	7,3. 10 ³	0	0
Total	484990	97220	20,0	463300	54600	11,8	162300	9300	5,7

(-) coletas não realizada/ (*) % de leveduras assimiladoras de nitrato na população crescida em WLN

A destilaria B apresentou também a mesma redução no número de colônias observada na destilaria anterior, quando no meio existia nitrato. No entanto, ao contrário da destilaria A, as maiores contagens foram verificadas nas amostras de vinhaça (55%). Se observarmos coleta a coleta (Tabela 7) podemos ver que na amostra da coleta realizada em dezembro cerca de 96% das leveduras isoladas são assimiladoras de nitrato. O segundo maior percentual ficou com as amostras de água de lavagem (35%) e o menor foi nas amostras de caldo misto, 19,1 %, basicamente o mesmo visto na destilaria A.

TABELA 7: QUANTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DA DESTILARIA B NOS MEIOS WLN, YNB-NIT E PERCENTUAL DE LEVEDURAS ASSIMILADORAS DE NITRATO NA POPULAÇÃO TOTAL DE LEVEDURAS ENCONTRADAS.

Coleta/ Mês	Caldo Misto			Água de Lavagem			Vinhaça		
	WLN	YNB-Nit	%*	WLN	YNB-Nit	%*	WLN	YNB-Nit	%*
Ago	3,8. 10 ³	5. 10 ²	13,2	-	-	-	-	-	-
Set	5,2. 10 ⁴	1. 10 ⁴	19,2	0	0	0	0	0	0
Out	5,8. 10 ⁴	1. 10 ⁴	17,2	5,7. 10 ⁴	1. 10 ⁴	17,5	0	0	0
Nov	6,8. 10 ⁴	4. 10 ³	5,9	6,7. 10 ⁴	1. 10 ⁴	14,9	0	0	0
Dez	1,07. 10 ⁴	6. 10 ³	56,1	7,5. 10 ³	1. 10 ³	13,3	8,3. 10 ⁴	8. 10 ⁴	96,4
Jan	7,3. 10 ³	8. 10 ²	11,0	7,8. 10 ⁴	2,1. 10 ⁴	26,9	6,5. 10 ⁴	1,3. 10 ⁴	20,0
Fev	1,03. 10 ⁴	2,9. 10 ³	28,2	7,4. 10 ⁴	6,5. 10 ⁴	87,8	1,08. 10 ⁴	1. 10 ⁴	92,6
Mar	8,5. 10 ⁴	2,2. 10 ⁴	25,9	3,3. 10 ⁴	2. 10 ⁴	60,6	1,4. 10 ⁵	6,2. 10 ⁴	44,3
Abr	7,5. 10 ³	1,5. 10 ³	20,0	6,5. 10 ⁴	9. 10 ³	13,8	0	0	0
Total	302600	57700	19,1	381500	136000	35,6	298800	165000	55,2

(-) coletas não realizada / (*) % de leveduras assimiladoras na população crescida em WLN

A procura por meios diferenciais para detectar *Dekkera* tem sido realizada fundamentalmente para avaliar sua presença em amostras de vinho. As exigências

nutricionais e as características fisiológicas do gênero sempre dificultaram seu isolamento, como por exemplo, a presença de sulfato de amônio acima de 2 g/L inibe o crescimento desta levedura enquanto a presença de extrato de levedura estimula o crescimento (Uscanga et al., 2000). Os autores mostraram haver até mesmo alteração morfológica das células da referida levedura quando o extrato de levedura era omitido, uma descoberta interessante que estimulou a pesquisa para o desenvolvimento de meios diferenciais para separar *Dekkera* e outras leveduras que podem estar ocupando o mesmo nicho ecológico.

Rodrigues et al. (2001) avaliaram diversos meios de cultura para a detecção de *Dekkera* e verificaram que os meios bacteriológicos não permitiam o crescimento das linhagens de *Dekkera* testadas. Na verdade, esta levedura parece preferir ambientes ricos em etanol e açúcares fermentescíveis, habitar locais com adequada quantidade de biotina e tiamina ou viver onde micro-organismos formadores e doadores de vitaminas costumam se desenvolver. Quanto à fonte de carbono, independentemente da fonte usada não resultou em diferenciação satisfatória. No meio GYP com glicose, etanol em diferentes concentrações e ácido p-cumárico a diferenciação também não foi obtida, embora o etanol, quando utilizado como a única fonte de carbono, tenha inibido um maior número de gêneros não relacionados com *Dekkera*. Quanto ao uso dos agentes inibidores cicloeximida e ácido sórbico, observaram que os agentes inibidores só foram eficientes no meio mineral quando a maltose era a única fonte de carbono.

Em estudos comparativos sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, foi observado que ambas as leveduras podem fazer uso de compostos nitrogenados, mas, apenas a *D. bruxellensis* pode consumir o nitrato presente em amostras industriais. Pita et al. (2011) observaram que nos meios contendo amônia e nitrato, a velocidade de crescimento é maior em relação ao meio contendo apenas nitrato. Neste mesmo estudo, Pita et al. (2011) mostraram que os genes do metabolismo de nitrato em *D. bruxellensis* são induzidos apenas quando na presença desses compostos. Portanto, o meio YNB-Nit pode ser também uma ferramenta muito útil na seleção dessas leveduras.

4.3 Identificação molecular dos isolados assimiladores de nitrato

Métodos para identificação e contagem de contaminação pelo gênero *Dekkera* são muito demorados e dependem do crescimento em meios de cultura seletivos, seguido de identificação final por análise de morfologia, bioquímica e fisiológica (Chen et al. 2000;

Granchi *et al.* 1999). Com isso, técnicas moleculares têm sido bastante aplicadas, como por exemplo, técnicas baseadas nos polimorfismos e análises das similaridades entre sequências com o objetivo de diferenciar espécies próximas. Cocolim *et al.* (2004) relataram o uso de PCR-DGGE, transcrição reversa (RT) -PCR-DGGE e hibridação com sonda específica de *D. bruxellensis*, para confirmação dessa espécie em amostras de vinho.

Após a triagem dos micro-organismos assimiladores de nitrato, os isolados foram crescidos em YPD líquido e as células utilizadas para extração de DNA, os quais foram utilizados nas reações de PCR para identificação molecular. Foram extraídos DNA de 466 isolados, destes, 261 pertenciam a destilaria A e 205 a destilaria B. Todos os 466 isolados foram submetidos a tipagem molecular com Primers específicos DB-90F e DB-394R, como proposto por Cocolin *et al.* (2004), para rápida identificação de linhagens de *D. bruxellensis*. Esses iniciadores foram desenhados tomando como referência a região D1-D2 do gene 26S rDNA das leveduras pertencentes ao gênero *Brettanomyces* e regiões homólogas *B. bruxellensis* e *B. anomalus* foram selecionados para o desenho de iniciadores específicos (Cocolin *et al.* 2004; De Souza Liberal *et al.*, 2007). Do total de 466 isolados capazes de assimilar nitrato, apenas 175 isolados amplificaram com o primer específico, sendo 87 da destilaria A e 88 da destilaria B. Para confirmar a eficiência desta metodologia de rápida identificação de *D. bruxellensis*, os isolados positivos para este teste foram utilizados numa segunda metodologia para identificação baseada no sequenciamento de DNA.

A região flanqueada pelos Primers NL1 e NL4 foram analisadas para extensão da divergência no domínio D1/D2 do gene 26S rDNA. Cerca de 500 espécies de leveduras foram testadas nesse estudo e a divergência neste domínio foi suficiente para identificar espécies individuais. Isto permitiu a diferenciação de numerosas espécies aparentemente sinônimas, assim como o reconhecimento de relações estreitas anteriormente insuspeitas (Kurtzman e Robnett, 1998).

Apesar dos Primers DB-90F e DB-394R apresentarem alta especificidade para *B. bruxellensis* e *B. anomalus*, obtivemos alguns isolados que amplificaram com o primer DB-90F e DB-394R cujo resultado do sequenciamento apontou para espécies diferentes de *D. bruxellensis*. Esta discordância na identificação de espécies pode ser explicada devido ao fato do primer específico ter sido testado apenas com um número limitado de espécies consideradas contaminantes de processos industriais aos quais a *D. bruxellensis* tem sido associada (De Souza Liberal *et al.*, 2007). Como se pode ver, o limite de detecção proposto pela técnica de Cocolin (2004), em relação a concentração celular (UFC/mL), é o mesmo

observado em nossas amostras. No entanto, nos testes realizados com o primer específico em vinhos, já sabidamente contaminado por *D. bruxellensis*, a diversidade encontrada é mínima quando compara-se com os dados observados neste estudo. Além disso, a quantidade de amostras testadas por Cocolin é bem inferior a que foi testada em nosso, estudo proporcionando assim a análise de uma maior diversidade de leveduras.

Na primeira destilaria (A), 87 exemplares amplificaram com o primer específico (22 de caldo misto, 12 de água de lavagem e 53 de vinhaça). Para esses isolados a maioria das sequencias analisadas também confirmou ser de *D. bruxellensis* (75 linhagens), como podemos ver na tabela 8. Os 12 isolados restantes foram considerados com pertencentes as espécies *Lodderomyces elongisporus* (2), *Lachancea fermentati* (5), *Kluyveromyces marxianus* (3), *Meyerozyma caribbica* (1) e *Candida xylopsoci* (1).

TABELA 8: IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PROCEDENTES DA DESTILARIA A, IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO NA AMOSTRA, PORCENTAGEM DE SIMILARIDADE (S%)

N°	ISOLADO	IDENTIF.	S(%)	N°	ISOLADO	IDENTIF.	S(%)
1	TB2M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	99	39	TB246V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
2	TB3M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	99	40	TB247V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96
3	TB6M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	98	41	TB249V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99
4	TB7M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	98	42	TB254V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98
5	TB8M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	98	43	TB255V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98
6	TB9M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	99	44	TB256V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99
7	TB10M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	100	45	TB257V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96
8	TB11M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	100	46	TB258V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96
9	TB12M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	100	47	TB259V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99
10	TB13M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	100	48	TB263V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
11	TB56M2013-C2	<i>D. bruxellensis</i>	100	49	TB270V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
12	TB72M2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	99	50	TB271V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
13	TB74M2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	98	51	TB272V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99
14	TB76M2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	98	52	TB273V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98
15	TB79M2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	99	53	TB274V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98
16	TB172M2014-C5	<i>D. bruxellensis</i>	98	54	TB275V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98
17	TB199M2014-C5	<i>D. bruxellensis</i>	99	55	TB277V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96
18	TB240M2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99	56	TB280V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96
19	TB242M2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100	57	TB281V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98
20	TB377M2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	100	58	TB282V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98
21	TB378M2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	100	59	TB283V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
22	TB390M2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	99	60	TB284V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99
23	TB205V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	61	TB285V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96
24	TB207V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	62	TB286V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99
25	TB213V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	63	TB287V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99
26	TB214V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	99	64	TB41A2013-C3	<i>D. bruxellensis</i>	98
27	TB215V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96	65	TB42A2013-C3	<i>D. bruxellensis</i>	96
28	TB216V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	66	TB43A2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	96
29	TB217V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96	67	TB345A2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	99
30	TB218V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96	68	TB348A2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	98
31	TB219V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	69	TB350A2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	98
32	TB220V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	99	70	TB422A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	96
33	TB221V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	100	71	TB424A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	99
34	TB222V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	72	TB425A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	99
35	TB227V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	73	TB443A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	99
36	TB229V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	74	TB450A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	99

37	TB230V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	75	TB457A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	99
38	TB231V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	99				

Oitenta e oito isolados da destilaria B amplificaram com DB-90F e DB-394R sendo 22 de caldo misto, 25 de água de lavagem e 41 de vinhaça. Após o sequenciamento utilizando os iniciadores NL1 e NL4 podemos ver na tabela 9 que 82 isolados confirmaram ser da espécie *Dekkera bruxellensis* com 94% a 100% de similaridade com exemplares depositados no banco de dados do NCBI. Para os outros 6 isolados que amplificaram com o primer específico, os resultados do sequenciamento da região NL1 e NL4 mostraram pertencer as espécies *Lachancea fermentati* (5 exemplares) e *Meyerozyma guilliermondii* (1 exemplar).

TABELA 9: IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PROCEDENTES DA DESTILARIA B, IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO NA AMOSTRA, PORCENTAGEM DE SIMILARIDADE (S%)

N°	ISOLADO	IDENTIF.	S(%)	N°	ISOLADO	IDENTIF.	S(%)
1	JP14M2013-C1	<i>D. bruxellensis</i>	99	42	JP331A2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	100
2	JP19M2013-C2	<i>D. bruxellensis</i>	98	43	JP458A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	99
3	JP20M2013-C2	<i>D. bruxellensis</i>	98	44	JP459A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	98
4	JP28M2013-C2	<i>D. bruxellensis</i>	99	45	JP460A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	98
5	JP33M2013-C3	<i>D. bruxellensis</i>	96	46	JP461A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	98
6	JP34M2013-C3	<i>D. bruxellensis</i>	94	47	JP462A2014-C9	<i>D. bruxellensis</i>	96
7	JP35M2013-C3	<i>D. bruxellensis</i>	99	48	JP143V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	96
8	JP36M2013-C3	<i>D. bruxellensis</i>	100	49	JP144V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	94
9	JP37M2013-C3	<i>D. bruxellensis</i>	100	50	JP145V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	98
10	JP56M2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	100	51	JP146V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	100
11	JP57M2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	99	52	JP147V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	99
12	JP156M2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	98	53	JP148V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	96
13	JP157M2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	98	54	JP149V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	99
14	JP186M2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	98	55	JP150V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	99
15	JP187M2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96	56	JP151V2013-C5	<i>D. bruxellensis</i>	98
16	JP188M2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96	57	JP179V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96
17	JP200M2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	94	58	JP180V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96
18	JP202M2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98	59	JP181V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	99
19	JP204M2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100	60	JP182V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	94
20	JP206M2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99	61	JP183V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	100
21	JP297M2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	96	62	JP184V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	100
22	JP302M2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	99	63	JP185V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	100
23	JP42A2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	99	64	JP186V2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	100
24	JP47A2013-C4	<i>D. bruxellensis</i>	98	65	JP281V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
25	JP170A2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96	66	JP285V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
26	JP174A2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	96	67	JP286V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
27	JP175A2014-C6	<i>D. bruxellensis</i>	99	68	JP287V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100
28	JP245A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100	69	JP288V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	94
29	JP246A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100	70	JP289V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98
30	JP247A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100	71	JP290V2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96
31	JP249A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100	72	JP345V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	96
32	JP2512014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100	73	JP346V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	98
33	JP252A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	94	74	JP350V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	94
34	JP253A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96	75	JP352V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	100
35	JP254A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	98	76	JP353V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	98
36	JP255A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99	77	JP354V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	98

37	JP256A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	96	78	JP360V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	96
38	JP257A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	94	79	JP366V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	94
39	JP258A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	99	80	JP384V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	99
40	JP264A2014-C7	<i>D. bruxellensis</i>	100	81	JP386V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	100
41	JP328A2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	100	82	JP391V2014-C8	<i>D. bruxellensis</i>	94

Ao multiplicarmos o número de isolados obtidos nas duas destilarias pelos respectivos fatores de diluição das amostras analisadas é possível estimar o número real de *D. bruxellensis* nas amostras (Tabelas 10 e 11). A presença de *D. bruxellensis* foi registrada na maioria das coletas de caldo misto e água de lavagem nas duas destilarias. Quanto a presença da levedura nas amostras de vinhaça foi detectada em apenas duas coletas na destilaria A, mas apesar disso a quantidade de leveduras encontradas foi significativa quando comparamos com as outras amostras. Na destilaria B o registro de *D. bruxellensis* foi feito em quatro coletas e assim como na destilaria anterior a quantidade populacional dessa levedura também foi maior nas amostras de vinhaça.

TABELA 10: QUANTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DA ESPÉCIE *D. bruxellensis* NAS DIFERENTES AMOSTRAS DA DESTILARIA A

Coleta	Amostras		
	Caldo Misto	Água de Lavagem	Vinhaça
Ago	1. 10 ⁴	-	-
Set	1. 10 ³	0	0
Out	0	2. 10 ³	0
Nov	4	1. 10 ³	0
Dez	2. 10 ³	0	0
Jan	0	6. 10 ²	1,6. 10 ³
Fev	2. 10 ³	0	2,5. 10 ⁴
Mar	2. 10 ³	3. 10 ³	0
Total	1,7. 10⁴	6,6. 10³	2,6. 10⁴

TABELA 11: QUANTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DA ESPÉCIE *D. bruxellensis* NAS DIFERENTES AMOSTRAS DA DESTILARIA B

Coleta	Amostras		
	Caldo Misto	Água de Lavagem	Vinhaça
Ago	1.10 ²	-	-
Set	3. 10 ³	0	0
Out	5. 10 ³	0	0
Nov	2. 10 ³	2. 10 ³	0
Dez	2. 10 ³	0	9. 10 ³
Jan	3. 10 ²	3. 10 ³	8. 10 ³
Fev	4. 10 ²	1,3. 10 ⁴	7. 10 ³
Mar	2. 10 ³	2. 10 ³	1,1. 10 ⁴
Abr	0	5. 10 ³	0
Total	1,48. 10⁴	2,5. 10⁴	3,5. 10⁴

Analisando a população de *D. bruxellensis* percebemos que a composição da população é diferente quanto a origem dos isolados nas duas destilarias. Na destilaria A 33,9% vieram do caldo misto, 13,1% da água de lavagem e 53% da vinhaça. Já a população de *D. bruxellensis* da destilaria B 19,8% vieram do caldo misto, 33,4% da água de lavagem, e 46,8% da vinhaça (figura 9). Como podemos observar, nas duas destilarias, a vinhaça é a maior contribuinte da população de *D. bruxellensis* isolada neste trabalho. Quanto às leveduras encontradas nas amostras de água da segunda destilaria terem sido maior que as do caldo misto, este fato pode estar relacionado a quantidade de vezes que a água de lavagem foi reutilizada, já que a segunda destilaria teve um mês a mais de safra.

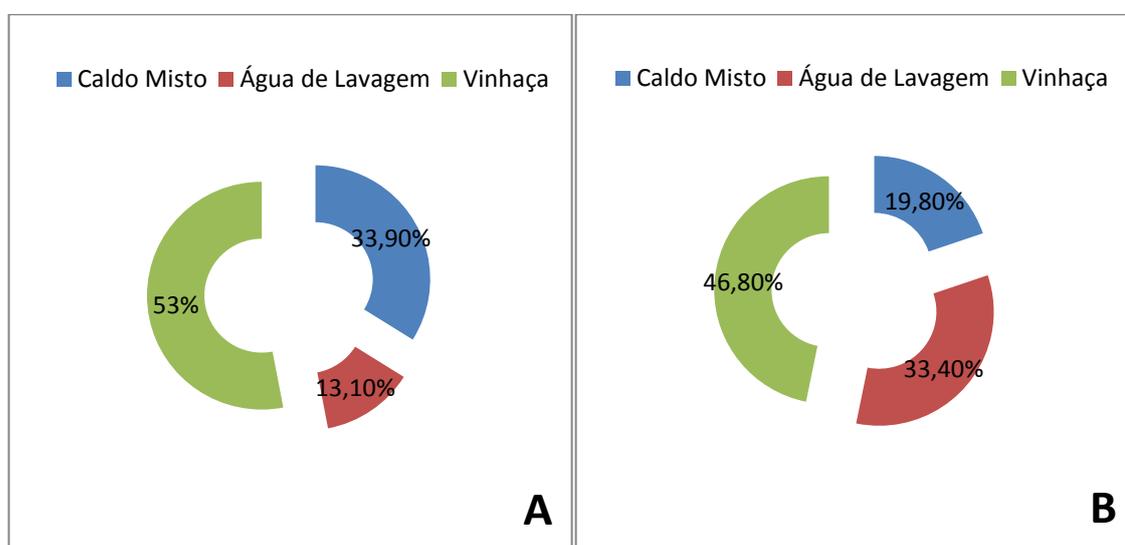


Fig. 8: População percentual de *D.bruxelensis* provenientes das diferentes amostras nas duas destilarias. (A) Destilaria Tabu e (B) Destilaria Japungu

As leveduras são encontradas em todas as partes: solo, água, ar, alimentos, insetos e animais, exercendo grandes influências nas atividades humanas (Hageskal, 2009). Entre a vasta diversidade de micro-organismos, a levedura tem estado com o homem há muitos séculos, sendo usada na fermentação de sucos a base de frutas e para levedar pães, há cerca de 30 mil anos (Hatoum *et al.*, 2012). Estes micro-organismos estão associados a processos fermentativos e a substratos que contenham açúcares. Eles geralmente crescem sobre uma grande variedade de valores de pH e de temperatura. Estes fatores definem o nicho das leveduras, e, por sua vez, permitem prever que os habitats das leveduras são, na grande maioria das vezes, ricos em fontes de carbono orgânico simples, líquidos ou muito úmidos, ácidos ou ocasionalmente alcalinos, e nutricionalmente complexos. A capacidade das leveduras em utilizar uma variedade de compostos orgânicos através do processo

respiratório e fermentativo, expande a variedade dos nichos ecológicos que elas podem ocupar (Phaff & Starmer, 1980).

Resíduos da agroindústria como melão e vinhaça são excelentes fontes nutricionais quando utilizados nos meios de cultura (Azania, 2003 e Delabio, 2012). E como esperávamos, a população de *D. bruxellensis* foi observada em vários pontos da destilaria. A população dessa levedura encontrada nas amostras de caldo misto pode ser justificada pela presença de nitrato, como propôs Pita et al. (2011) em cujas análises verificou a presença de altos níveis de nitrato em caldo de cana-de-açúcar, que por sua vez pode ser justificado pelo processo de adubação do campo com fertilizantes a base de nitrato, muito utilizado nos canaviais. Logo, a entrada da levedura *D. bruxellensis* na fermentação alcoólica se dá provavelmente através do caldo da cana de açúcar, isso poderia explicar os diversos episódios de colonização por *D. bruxellensis* em usinas de etanol brasileiras.

Já a população de *D. bruxellensis* encontrada nas amostras de vinhaça também poderia ser justificada pela presença de nitrato nessas amostras. A vinhaça, largamente utilizada nas lavouras canavieiras, possui, em grandes quantidades, elementos que, dependendo da concentração, segundo Meurer et al. (2000) e Madejón et al. (2001), destacam-se como contaminantes como por exemplo o fosfato e o nitrato. Esses elementos, conforme Resende et al. (2002), têm gerado grande preocupação acerca dos efeitos, principalmente do nitrato, na saúde da população humana e animal.

5 CONCLUSÃO

O uso de meios seletivos como WLN e YNB-Nit são ferramentas eficientes na seleção de leveduras da espécie *D. bruxellensis*.

Os ambientes naturais das destilarias de álcool combustível são reservatórios de leveduras da espécie *D. bruxellensis*.

As estirpes selecionadas revelaram que esta espécie se mostra bem adaptada a diversos nichos, indicando que ela pode ser encontrada em ambiente distinto.

A utilização de nitrato por essa espécie pode ser o grande responsável pela adaptação dessas leveduras nas diferentes amostras.

Apesar dos Primers DB-90F e DB-394R serem descritos como específicos para a espécie *D. bruxellensis*, esta metodologia não teve 100% de especificidade como relatado anteriormente, embora ainda seja uma ferramenta extremamente útil para este fim.

A entrada da levedura *D. bruxellensis* na fermentação alcoólica se dá através do caldo da cana de açúcar utilizado no processo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D.A., Hynes, S.H. and Ingledew, W.M. 2005. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 641-647.
- Amorim, H.V. 1997. Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica. Araras: IAA/Cordenadoria Regional Sul.
- Antonini, S. R. C. 2004. Métodos de Análises e Monitoramento Microbiológico em Laboratório de Destilaria. Universidade de São Carlos - Depto. de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural - Centro de Ciências Agrárias. Araras.
- Azania, A.A.P.M.. 2003. Influência de subprodutos da indústria alcooleira nos atributos químicos do solo e em plantas de cana-de-açúcar, guaxuma e capim-braquiária. Tese (Mestrado em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal). Apresentada à Faculdade de *S. cerevisiae* Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal.
- Araújo, P.R.L.; Basílio, A.C.M.; Simões, D.A.; Morais Jr, M.A.; Morais, J.O.F. 2005. Informações sobre algumas leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial isoladas no Nordeste do Brasil. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos. Recife. Anais.
- Barros Pita W., Leite, F.C.B., Liberal, A.T.S., Simões, D.A., de Morais Jr, M.A. 2011. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 99-107
- Barnett, J.A., Payne, W. and Yarrow, D. 1990. Yeast: characteristics and identification. 2. Ed. Cambridge: University Press.
- Basílio, A.C.M., de Araujo, P.R.L., de Morais, J.O.F., de Silva, E.A., de Morais, M.A. & Simoes, D.A. 2008. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Current Microbiology* 56(4), 322-326.
- Basso, L.C., Amorim, H.V., Oliveira, A.J. and Lopes, M.L. 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research* 8(7): 1155-63.
- Beech, F. W., Carr, J. G. 1958. Selective isolation of micro-organisms. *Chemical Products*, v. 21, p. 285-287.
- Borneman, A.R., Zeppel, R., Chambers, P.J., Curtin, C.D., 2014. Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates. *Plos Genet.* 10 (2).
- Boekhout, T.; Kurtzman, CP.; O'Donnel, K.; Smith, MT. 1994. Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniela* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washinton, v. 44, p 781-786.

- Botha, A. Yeasts in Soil In: Péter, G; Rosa, C. 2006. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, Berlin Heidelberg: Springer, p. 221-240.
- Braile, P.M., Cavalcanti, J.E. 1993. Manual de Tratamento de Águas Residuárias. In: São Paulo: CETESB. 764p.
- Ceccato-Antonini, S.R., Silva, D.F. 2000. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. STAB, Piracicaba, v.18, n.4, p.40-46.
- Ciani, M., Maccarelli, F., Fatichenti, F. 2003. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 19, p 419-422.
- Chen, Y. C., Eisner, J.D., Kattar, M.M., Rassouljian-Barret, S. L., Lafe, K., Yarfitz, S. L., Limaye, A.P. and Cookson, B.T. 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. Journal of Clinical Microbiology 38: 2302-2310.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R. & Comi, G. 2004. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. Applied and Environmental Microbiology 70(3), 1347-1355.
- Colwell, R.R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. Journal of Bacteriology, v.104, n.1, p.410-433.
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., Bisson, L.F. 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. Am. J. Enol. Vitic. 57: 139-147.
- Delia, M.L.; Phowchinda, O.; Alfenore, S.; Stehaiano, P. 2006. Brettanomyces as a polluting yeast in alcoholic fermentations: study of its relations to Saccharomyces. Disponível em: <http://ebookbrowse.com/brettanomyces-as-a-polluting-yeast-in-alcoholic-fermentations-study-of-its-relation-to-saccharomyces-pdf-d43223200>. Acesso em Abril 2013.
- Delabio, A. S., Remédio, R. R., Cazassa, S., Monteiro, R. T. R., Harder, M. N. C. 2012. Seleção de leveduras para a produção de lipídios como matéria-prima para biodiesel. Bioenergia em revista: diálogos, ano 2, n. 2, p. 26-38.
- Faia, A.M. 2011. Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água. Dissertação (Mestrado em biologia Celular e Biotecnologia) Faculdade de Ciências, departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa.
- Freire, W. J.; Cortez, L. A. B. 2000. Vinhaça de cana-de-açúcar. Guaíba: Agropecuária. 203p.

- Ferreira, L. F. R. 2009. Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos. p.135. Tese (Doutorado em Agronomia, na área de Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Fleet, G.H. 1998. Microbiology of alcoholic beverages. In: Microbiology of fermented food, Vol 1. Wood, B.J. (ed). London: Blackie Academic e Professional 217-262.
- Francisco, G. A. 2008. Biodegradação da vinhaça resíduo da produção de etanol, 2008, p. 47. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Rio Claro.
- Freitas, G.L. e Ferreira, O.M. Uso da água no processo de produção de álcool: Estudo de Caso. Disponível em: <http://www.ucg.br/ucg/prope/cpgss/ArquivosUpload/36/file/USO%20DA%20C3%81GUA%20NO%20PROCESSO%20DE%20PRODU%20C3%87%20C3%83O%20DE%20C3%81LCOOL.pdf>. Visualizado: em dezembro de 2014.
- Gadanh, M., Sampaio, J.P., Spencer-Matins, I. 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *R. azoricum* sp. Nov. Canadian Journal of Microbiology, v.47, n.3, p.213-221.
- Gabińska-Loniewska, A., Konillowicz-Kowalska, T., Wardzyńska, G., Boryn, K. 2007. Occurrence of Fungi in Water Distribution System. Polish Journal of Environmental Studies, 16, 539-547.
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A. and Vincenzini, M. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. Journal of Applied Microbiology 87:949-956.
- Gallo, C.R., Canhos, V.P. 1991. Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 9, n.6, p 35-37.
- Hatoum, R., Labrie., S., Fliss., I. 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology. v. 3, a.421, p. 1-12.
- Hageskal, G., Lima, N., Skaar, I. 2009. The study of fungi in drinking water. Elsevier, 113, 165-172.
- Hibbett, D.S., Taylor, J.W., 2013. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? Nat. Ver. Microbiol. 11, 129-133.
- Hoeben, P.; Clark-Walker, G.D. 1986. Na approach to yeast classification by mapping mitochondrial DNA from *Dekkera/Brettanomyces* and *Eeniella* genera. Current Genetics, Berlin, v. 10, p. 371-379.
- Horii, J. 2004. A cana-de-açúcar como matéria-prima. Piracicaba: ESALQ, Depto. De Agroindustria, Alimentos e Nutrição. 27p.

- Joseph, C.M.L., Kumar, G., Su, E. & Bisson, L.F. 2007. Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *American Journal of Enology and Viticulture* 58(3), 373-378.
- Kreger van-Rij, N.J.W. 1984. *The yeasts: a taxonomic study*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier. 1082 p.
- Kumar, C.G. & Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42(1-2), 9-27.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. *The Yeasts – A taxonomic Study*, 4th Edition. 1074 pp. Amsterdam, NL: Elsevier.
- Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:331-371.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. 2011. *The yeasts, a taxonomic study*. 5. ed: Elsevier; 1). ISBN 978-0-444-52149.
- Lachance, M.A., Starmer, W.T. 1998. Ecology and Yeasts In: Kurtzman, CP.; Fell, JW. *The yeasts, a Taxonomic Study*, ed 4, Amsterdam: Elsevier Science. P.21-30.
- Leite, F. C. B.; Basso, T. O.; Pita, W. B.; Gombert, A. K.; Simões, D. A.; Morais-Jr, M. A. 2013. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *Yeast Res.*, v. 13, p.34–43.
- Liberal, A.T.D., Basilio, A.C.M., Resende, A.D., Brasileiro, B.T.V., da Silva, E.A., de Morais, J.O.F., Simoes, D.A. & de Morais, M.A. 2007. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 102(2), 538-547.
- Lima, U.A. 2001. *Biotechnology industrial. Processos fermentativos e enzimáticos*. Vol.1, SP, Editora Blucher LTDA.
- Lucena, B.T.L., Silva-Filho, E.A., Coimbra, M.R.M., Morais, J.O.F., Simões, D.A., de Morais Jr, M.A. 2007. Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch-cultivated under laboratory conditions. *Genetic and Molecular Research* 6: 1072-1084
- Madejón, E., Lopez, R., Murillo, J. M., Cabrera, F. 2001. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 84, n.1, p.55-65.
- Meurer, E. J.; Bissani, C. A.; Selbach, P. A. 2000. Poluentes do solo e do ambiente. In: Meurer, E. J. (ed.). *Fundamentos de química do solo*. Porto Alegre:Genesis, v.1, p.151-168.
- Miniac, M. 1989. Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre *Brettanomyces*. *Industries Agricoles et Alimentaires*, Paris, v. 106, p. 559-563.

- Migliari, P. M. 2001. Classificação das Cepas de Leveduras Dominantes de Processos Fermentativos Utilizando Parâmetros Fermentativos e Taxonomia Numérica. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Montes, M.J., Belloch, C., Galiana, M., Garcia, M.D. Andres, C. Ferrer, S. Torres-Rodriguez, J.M. Guinea, J. 1999. Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 22, n.1, p. 97-105.
- Molnár, O., Wuczowski, M., Prillinger, H. 2008. Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison of three methods: classical isolation, cloning and DGGE. *Micology Progress*, 7: 11-123.
- Mutton, M.J.R. 2008. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação alcoólica. In: Workshop sobre produção de etanol: Qualidade de matéria prima, 2008. Anais.
- Oelofse, A., Pretorius, I.S. & du Toit, M. 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 29(2), 128-144.
- Oliveira e Silva, R.B. 1994. Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita, São Paulo.
- Pereira, V.J., Fernandes, D., Carvalho, G., Benoliel, M.J., San Romão, M.V., Barreto Crespo, M.T. 2010. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Elsevier*, 44, 4850-4859.
- Pereira, V.J., Basílio, M.C., Fernandes, D., Domingues, M., Paiva, J.M., Benoliel, M.J., Crespo, M.T., San Romão, M.V. 2009. Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. *Elsevier*, 43, 3813-3819.
- Phaff, H.J. e Starmer, W.T. 1987. Yeast Associated with Plants, Insects and Soil. In: Rose and Harrison eds. *The Yeasts*. Vol 1. Academic Press, London, pp. 123-180.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A. e Compagno, C. 2006. How Did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22: 183-186.
- Possas, T. C. V. 2011. 11^a GEMEA. Disponível em: <http://www.gemea.com.br/media/downloads/AUMENTO_DA_EFICIENCIA_INDUSTRIAL.pdf>. Acesso em: dezembro/ 2014.
- Renouf, V., Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A. 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(1), 149-164.
- Resende, M.; Curi, N.; Rezende, S. B.; Corrêa, G. F. 2002. *Pedologia: base para distinção de ambientes*. 4.ed. Viçosa: NEPUT, 338p.

- Rodrigues, N., Goncalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology* 90(4):588-99.
- Rossetto, A. J. 1987. Utilização agrônômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: Paranhos, S.B. (ed.). *Cana-de-açúcar: cultivo e utilização*. Campinas:Fundação Cargill, v.2, p.435-504.
- Schell, D.J., Riley, C.J., Dowe, N., Farmer, J., Ibsen, K.N., Ruth, M.F., Toon, S.T. & Lumpkin, R.E. 2004. A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock. *Bioresource Technology* 91(2), 179-188.
- Silva, R.B.O. 1994. Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação. 145p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.
- Silva, L.R., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Trujillo, M.E., Velásquez, E. 2005. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. *Food Chemistry, Barking*, v.89, p. 185-189.
- Silva-Filho, E.A. 2003. Caracterização genética de populações de leveduras em destilarias de álcool combustível com vistas a seleção de linhagens promissoras para expressão heteróloga de genes de interesse industrial. Tese de Doutorado, UFPE- Biologia de Fungos. 120p.
- Silva, A. J. N.; Ribeiro, M. R. 1998. Caracterização de um Latossolo Amarelo sob cultivo contínuo de cana-de-açúcar no Estado de Alagoas: propriedades químicas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.22, n.2, p.291-299.
- Silva-Filho, E.A. 1993. Fermentação etanólica: influência do ácido sulfúrico sobre a viabilidade da levedura de processo, bactérias e leveduras contaminantes. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita, São Paulo.
- Smith, M.T., Yamazaki, M., Poot, G.A., 1990. *Dekkera, Brettanomyces* and *Eeniella*: electrophoretic comparison of enzymes and DNA-DNA homology. *Yeast*, v. 6, p.299-310.
- Souza-Liberal, A.T., da Silva Filho, E.A., de Moraes, J.O.F., Simões, D.A., de Moraes, M.A., Jr. 2005. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Lett Appl Microbiol* 40, 19–23.
- Socol, C. R.; Schwab, A.; Kataoka, C. E. 1990. Avaliação microbiológica do caldo de cana (garapa) na cidade de Curitiba. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.8, n.2, p.116-125.
- Sousa, R. L., Scabora, M. H., Silva, E. M., Petroni, T.F. 2011. Identificação de leveduras contaminantes em fermentação do tipo batelada em usina de álcool de Pereira Barreto-SP. ENCONTRO CIENTÍFICO DOS ESTUDANTES DA AEMS.

- Stevenson, F. J. 1986. Cycles of sil-carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrientes. In: Tan, K.H. (Ed.). Principles of soil chemistry. 2.ed. New York:Marcell, 362p.
- Stupiello, J. P. 1987. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: Paranhos, S. B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas-SP: Fundação Cargill, v.2.
- Sunao, S. 1992. Contribuição ao estudo de fermentação alcoólica com o aproveitamento de sacarídeos obtidos a partir de cana-de-açúcar. São Paulo, 1992. 138f. Dissertação (Mestrado Bioquímica Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Tamai, Y., Tanaka, K., Umemoto, N., Tomizuka, K. & Kaneko, Y. 2000. Diversity of the HO gene encoding an endonuclease for mating-type conversion in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* 16(14), 1335-1343.
- Uilenberg, G; Goff, WL. 2006. Polyphasic Taxonomy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1081, p.492-497.
- Uscanga, M. G. A., Delia, M.L., Strehaiano, P. 2000. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 46, n.11, p. 1047.
- Única, 2011. União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 18 de dezembro 2014.
- van der Walt, J.P. 1964. *Dekkera*, a new genus of Saccharomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v.30, p. 273-280.
- van der Walt, J.P., van Kerken, A.E. 1958. The wine yeasts of the cape: part I: a taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in South African table wines. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 24, p. 239-252.
- van der Walt, J. P. 1984. Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts: genus 2: *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. In: KREGGER-van RIJ. N. J. W. (Ed.). *The Yeast a taxonomic study*, Amsterdam, Elsevier Science, p. 562-576.
- Voll, C. E. 2005. Aplicação de vinhaça e do extrato de palhiço de cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas . Tese (Mestre em Agronomia, na área de concentração: Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Wheals, E.A., Basso, L.C., Alves, D.M.G. and Amorim, H.V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology* 17: 482-487.
- Woese, C.R., Kandler, O. Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for thr domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United states of America*, v.87, p. 4576-4579.
- Woolfit, M., Rozpedowska, E., Piskur, J. and Wolfe, K.H. 2007. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotic Cell* 6(4): 721-733.

Yusof, S., Shian, L. S., Osman, A. 2000. Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. *Food Chemistry*, v.68, p.395-401.