



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

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS DO SOLO
DO SEMI-ÁRIDO DA BAHIA, BRASIL.**

Misael Silva Ferreira Costa

**RECIFE
2006**



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

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS DO SOLO
DO SEMI-ÁRIDO DA BAHIA, BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Biologia de Fungos.

Misael Silva Ferreira Costa
Autor

Lusinete Aciole de Queiroz
Orientadora

**RECIFE
2006**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

C837d Costa, Misael Silva Ferreira
Diversidade de leveduras do solo semi-árido da Bahia, Brasil / Misael Silva Ferreira
Costa. – Recife: O Autor, 2006.

65 f.: il., fig., tab.

Orientador: Lusinete Aciole de Queiroz

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2006.

Inclui bibliografia

1. Fungos 2 Fungos do solo I. Queiroz, Lusinete Aciole de II. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-235



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

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS DO SOLO
DO SEMI-ÁRIDO DA BAHIA, BRASIL.**

Banca examinadora:

Dra. Lusinete Aciole de Queiroz
Departamento de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti
Departamento de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neiva Tinti de Oliveira
Departamento de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Aristóteles Góes Neto
Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Feira de Santana

Dr. Guilherme Maranhão Chaves
Departamento de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

Suplentes:

Dra. Elaine Malosso
Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho
Departamento de Genética - Universidade Federal de Alagoas

“Posso todas as coisas Naquele que me fortalece”

Filipenses 4.13

MENSAGEM

A **Jesus Cristo**, Autor e Consumador da minha fé, por ter-me acompanhado e ajudado na minha trajetória de vida pessoal e profissional.

OFEREÇO

A **minha família**, pelo exemplo de vida, por me ensinar o valor de respeitar para ser respeitado, amar para ser amado. Pelo infinito amor, carinho e dedicação.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial a Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia – Centro de Ciências Biológicas pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, em nome do Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto, que gentilmente permitiu a realização desta pesquisa e concedeu o apoio crucial para o seu desenvolvimento e conclusão.

À minha orientadora Dra. Lusinete Aciole de Queiroz, por sua capacidade profissional inspiradora, que me mostrou o verdadeiro sentido de ser um mestre sem mediocridade, mas com argumentos, que me ensinou a olhar além, sem ter medo de enfrentar as coisas futuras. Obrigado, enfim, por ser não apenas uma grande Mãe-Minha, Avó-Minha e Amiga-Minha. Deus continue abençoando-te.

Aos meus pais, irmãos, tios, primos, cunhados, pelo amor, carinho, compreensão e dedicação em todos os momentos.

À minha esposa Tércia e meus filhos Marina e Theo, por fazerem parte da minha vida, pelo apoio e contribuição em todas as circunstâncias.

À todos os colegas de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (Mestrado e Doutorado), pelo fraterno convívio do dia-a-dia. Sucesso em suas carreiras.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Micologia pelo apoio.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta obra. Meu muito obrigado. Deus abençoe a todos.

A Deus sobre todas as coisas, pois sem a sua dádiva divina seria impossível a realização desse trabalho.

RESUMO

O presente trabalho objetivou conhecer de forma pioneira, a diversidade de leveduras presentes no solo de três municípios do semi-árido da Bahia, Mucugê, Ipirá e Paulo Afonso, caracterizando as mesmas nos níveis de fenotipagem e genotipagem através da análise filogenética. As amostras de solo foram coletadas nos períodos de seca e de chuvas, e analisadas quanto a temperatura e pH. A temperatura média das amostras de solo foi 27°C; o pH das mesmas amostras foi ácido, em torno de 5.31. Foram obtidas 130 amostras de leveduras; 100 foram identificadas através das características morfológicas e fisiológicas do sistema clássico; no entanto, 30 amostras foram identificadas através da taxonomia molecular, utilizando-se a região D1/D2 do 26S rDNA pela qual leveduras conhecidas encontram-se seqüenciadas. Esta região foi capaz de diferenciar quase todas as espécies testadas, o que indica o desenvolvimento de novos estudos de taxonomia molecular. Maior número de táxons foi obtido de amostras de solo do município de Mucugê, seguido de Ipirá e Paulo Afonso. Entre os táxons, 24 têm afinidade ascomicética, 26 basidiomicética e 04 com os leveduróides (black yeast). Foram identificadas as espécies *Brettanomyces bruxellensis*, *Bullera alba*, *Candida catenulata*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *Cryptococcus humicola*, *C. laurentii*, *C. luteolus*, *Rhodotorula minuta*, *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Trichosporon pullulans*. Entre 30 isolados submetidos à caracterização molecular, foram obtidas 22 seqüências; 12 grupos foram reconhecidos depois de submetidos à comparação das seqüências pelo GenBank usando o BLAST (NCBI). Com todos os isolados foi possível chegar a espécie com um alto grau de similaridade, a maioria acima de 90%. Os grupos foram: *Hortaea Werneckii* (I), *Pichia guilliermondii* (II), *Candida parapsilosis* (III), *Rhodotorula glutinis* (IV), *Rhodotorula laryngis* (V), *Rhodotorula phylloplana* (VI), *Rhodotorula bacarum* (VII), *Rhodotorula slooffiae* (VIII), *Rhodotorula minuta* (IX), *Pseudozyma aphidis* (X), *Cryptococcus podzolicus* (XI) e *Rhodosporidium diobovatum* (XII). Na árvore de consenso estrito pela análise filogenética foram evidenciados 20 grupos, na maioria com valor de bootstrap superior a 90% o que indica que as amostras pertencem realmente ao táxon dos grupos formados. Os resultados indicam que existe uma grande diversidade de leveduras no solo do Semi-árido da Bahia.

Palavra-Chave: Diversidade, leveduras, solo, Semi-árido.

ABSTRACT

This study focused on the so pioneered the diversity of yeasts present in the soil in three municipalities of the semi-arid region of Bahia, Mucuge, Ipirá and Paulo Afonso, featuring the same levels of phenotyping and genotyping by phylogenetic analysis. Soil samples were collected during periods of drought and rainfall, and analyzed for pH and temperature. The average temperature of the soil samples was 27°C. The pH of the samples was the same acid, at around 5:31. 130 samples were obtained from yeasts, 100 were identified using morphological and physiological characteristics of the conventional system, however, 30 samples were identified using the molecular taxonomy, using a D1/D2 region of 26S rDNA in which yeasts are known sequenced. This region capable of differentiating almost all species tested, which indicates the development of new studies of molecular taxonomy. Highest number of taxa was obtained from soil samples of the municipality of Mucuge, followed by Ipirá and Paulo Afonso. Among taxa, 24 affinity ascomycetic, 26 and 04 basidiomycetous with leveduróides (black yeast). We identified the species *Brettanomyces bruxellensis*, *Bullera alba*, *Candida catenulata*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *Cryptococcus humicola*, *C. laurentii*, *C. luteolus*, *Rhodotorula minuta*, *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Trichosporon pullulans*. Among 30 isolates subjected to molecular characterization, were obtained 22 sequences, 12 groups were recognized after comparison of sequences submitted to GenBank by using the BLAST (NCBI). With all isolates was possible to reach the species with a high degree of similarity, mostly above 90%. The groups were: *Hortaea werneckii* (I), *Pichia guilliermondii* (II), *Candida parapsilosis* (III), *Rhodotorula glutinis* (IV), *Rhodotorula laryngis* (V), *Rhodotorula phylloplana* (VI), *Rhodotorula bacarum* (VII), *Rhodotorula slooffiae* (VIII), *Rhodotorula minuta* (IX), *Pseudozyma aphidis* (X), *Cryptococcus podzolicus* (XI) and *Rhodospiridium diobovatum* (XII). In the strict consensus tree in the phylogenetic analysis were shown as 20 groups, with the majority bootstrap value higher than 90% which indicates that the samples actually belong to the groups formed taxon. The results indicate that there is a great diversity of yeasts in the soil of semi-arid region of Bahia.

Keywords: Diversity, yeasts, soil, semi-arid.

SUMÁRIO

Página

RESUMO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1. A REGIÃO SEMI-ARIDA.....	01
1.2. BIODIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO DO SEMI-ARIDA.....	03
1.3. CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	07
1.4. TAXONOMIA CLÁSSICA E MOLECULAR DAS LEVEDURAS.....	08
1.5. REFERÊNCIAS.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS ESTUDADAS.....	22
2.2. COLETAS DAS AMOSTRAS DE SOLO.....	22
2.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	24
2.4. CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLOGICA.....	24
2.4.1. ASPECTOS DAS COLÔNIAS.....	24
2.5. CARACTERIZAÇÃO MICROMORFOÓGICA.....	25
2.5.1. FORMAÇÃO DE ASCOSPOROS.....	25
2.5.2. PRODUÇÃO DE BALISTOSPOROS.....	26
2.6. TESTES FISIOLÓGICOS.....	27
2.6.1. TESTE DE ASSIMILACAO DE FONTES DE CARBONO.....	27
2.6.2. TESTE DE ASSIMILACAO DE FONTES DE NITROGENIO.....	27
2.6.3. TESTE DE FERMENTACAO.....	28
2.6.4. PRODUÇÃO DE UREASE.....	29
2.7. TRATAMENTO ESTATISTICO.....	30
2.8. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	30
2.8.1. EXTRAÇÃO DO DNA DAS LEVEDURAS.....	30
2.8.2. REAÇÃO DE PCR – AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS ALVO.....	31

2.8.3. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	32
2.8.4. PURIFICAÇÃO DOS PROD. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	33
2.8.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	34
2.9. REFERÊNCIAS.....	35

3. ARTIGOS **37**

ARTIGO 1: LEVEDURAS DO SOLO DO SEMI-ÁRIDO DA BAHIA, BRASIL.	38
---	----

ABSTRACT

RESUMO

INTRODUÇÃO

MATERIAL E MÉTODOS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

REFERÊNCIAS

ARTIGO 2: DIVERSIDADE E FILOGENIA DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO DO MUNICÍPIO DE MUCUGÊ, SEMI-ÁRIDO DA BAHIA, BRASIL.	47
---	----

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO

MATERIAL E MÉTODOS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

REFERÊNCIAS

4. CONCLUSÕES FINAIS **65**

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A Região Semi-árida

O Semi-Árido do Brasil se estende por uma área que abrange 86,48% dos Estados da Região Nordeste, 11,01% da região setentrional do Estado de Minas Gerais e 2,51% do norte do Espírito Santo, ocupando uma área total de 974.752 Km². O semi-árido baiano compreende 70% do território do estado e 44% do semi-árido Nordestino, caracterizado por diversificados ambientes (Mendes, 1997). Figura 1.

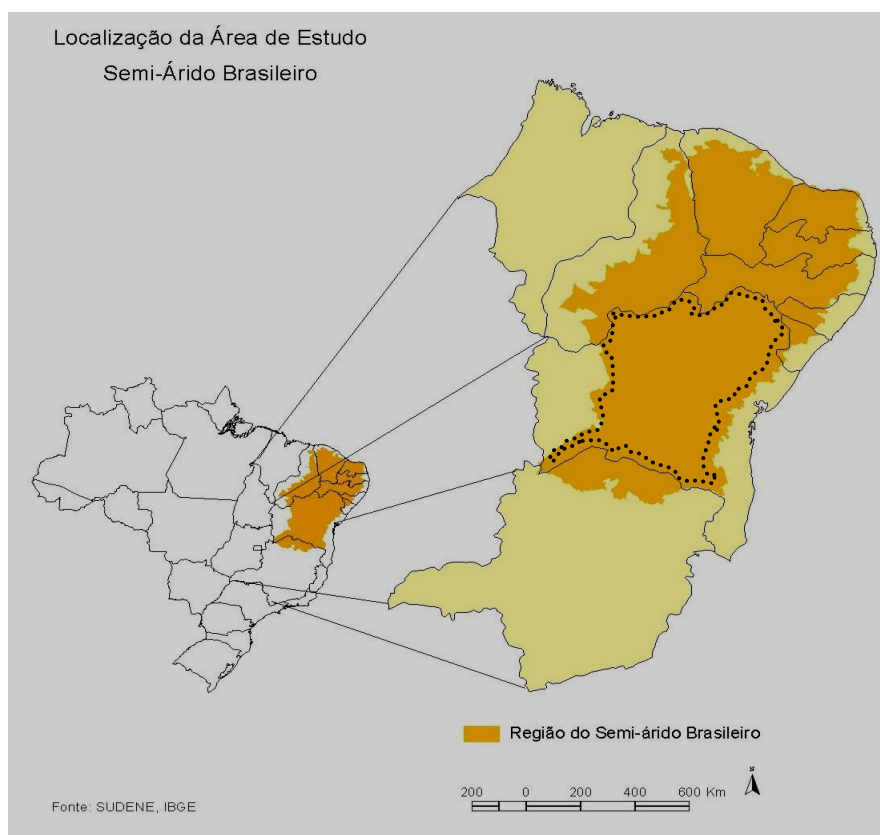


Figura 1. Mapa do semi-árido do Brasil, destacando área que abrange o semi-árido da Bahia. Fonte: Sudene, IBGE – 2006.

As condições ecológicas típicas do semi-árido estão representadas nas depressões interplanálticas, onde predominam as Caatingas, e que contrastam com áreas das Chapadas, onde predominam os Cerrados, Campos Rupestres e diferentes tipos de Florestas. O clima é caracterizado por temperaturas médias elevadas, em torno de 27°C, e amplitude térmica em torno de 5°C. As chuvas, além de irregulares, não excedem os 1000 mm/ano, ocorrendo geralmente por 3-6 meses, com longos períodos de estiagem (Reis, 1976; Sampaio, 1996; Rodal, 1999; Velloso *et al.*, 2002). Em toda a região semi-árida os solos são formados por um mosaico, desde solos rasos e pedregosos, associados às caatingas típicas e degradadas, aos solos arenosos e profundos, associados a processos de desertificação que dão lugar às caatingas de areia e grandes áreas desprovidas de vegetação (Rodal *et al.*, 1992).

Segundo Canhos; Manfio (1998) estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes na Terra tenham sido caracterizados e descritos. Devido aos diversificados e ricos biomas da região do semi-árido, considera-se que exista uma microbiodiversidade bem representativa.

Os microrganismos, dentre estes as leveduras, apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais nos ecossistemas. Entre os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana do semi-árido baiano, estão incluídos, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento das interações com outros componentes da biodiversidade, incluindo plantas e animais. Os

benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para novos antibióticos e agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, biorremediação de poluentes, e biolixiviação e recuperação de minérios, além da otimização da capacidade microbiana para a fertilização dos solos e despoluição das águas. Outros benefícios incluem o prognóstico e prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais e plantas (Borneman; Triplett, 1996; Hugenholtz; Pace, 1996; Borneman *et al.*, 1996; Borneman; Triplett, 1997; Kennedy; Gewin, 1997; Furman; Campbell, 1998; Lacaz *et al.*, 2002).

1.2. Biodiversidade microbiana do solo do Semi-árido

O termo biodiversidade foi usado pela primeira vez em 1986, resultado da concentração das palavras “diversidade biológica ou diversidade biótica”, e mede, a princípio, toda a variação biológica do planeta Terra (Azevedo, 1998).

Diversidade biológica, ou biodiversidade, “significa a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas” (Artigo 2 da Convenção sobre Diversidade Biológica). Refere-se ainda a variedade de vida no planeta Terra, incluindo a variedade genética dentro das populações e espécies, a variedade de espécies da flora, da fauna e de microrganismos, a variedade de

funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas e a variedade de comunidades, habitats e ecossistemas formados pelos organismos (Azevedo, 1998).

A biodiversidade é uma das propriedades fundamentais da natureza, responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas, e fonte de imenso potencial de uso econômico, uma vez que constitui a base das atividades agrícolas, pecuárias, pesqueiras e florestais (Melo; Azevedo, 1998). As funções ecológicas desempenhadas pela biodiversidade são ainda pouco compreendidas, muito embora se considere que ela seja responsável pelos processos naturais e produtos fornecidos pelos ecossistemas e espécies que sustentam outras formas de vida e modificam a biosfera, tornando-a apropriada e segura para a vida. A diversidade biológica possui, além de seu valor intrínseco, valor ecológico, genético, social, econômico, científico, educacional, cultural, recreativo e estético. Com tamanha importância, é preciso evitar a perda da biodiversidade (Melo; Azevedo, 1998).

A geografia convencional divide o Nordeste brasileiro em zonas: Litorânea, Agreste e Sertão, sendo que as duas últimas formam, essencialmente, a região semi-árida (Assuntos do Meio Ambiente - SCA Agenda 21, 2000), Segundo Mendes (1997), considera-se como Região semi-árida aquela que possibilita o desenvolvimento de uma cobertura vegetal mais ou menos contínua, como a caatinga, a savana ou a estepe, que não permite o cultivo de plantas anuais, de maneira regular e com boa produtividade, em virtude da baixa pluviosidade e da má distribuição das chuvas.

Acredita-se que a população de microrganismos desse bioma seja riquíssima, com várias espécies endêmicas, porém a análise dos dados

demonstra o conhecimento insuficiente que deles se tem. Vale salientar que em relação a diversidade de microrganismos nos solos do semi-árido, não há um só relato (Queiroz *et al.*, 2006).

Vem se constatando que os grandes esforços de maior conhecimento e uso sustentável da biodiversidade têm sido focada em mamíferos, aves, peixes e plantas. Estimativas recentes indicam que microrganismos e invertebrados constituem aproximadamente 90% das espécies da Terra e desempenham um papel fundamental no funcionamento de ecossistemas (Kennedy; Smith, 1995).

Do total de espécies de plantas estima-se que se conhece mais de 80%, e mais de 90% dos vertebrados, enquanto que é estimado que menos de 1% das bactérias e vírus e menos de 5% dos fungos são conhecidos. Embora sejam menos estudados, muitos grupos de microrganismos são essenciais para a sobrevivência das formas de vida na Terra (Brasil, 2001).

Sem os organismos, os solos não seriam formados. A intemperização físico-química das rochas matrizes por si só resultaria em terrenos sem nenhuma fertilidade, visto que há necessidade de nitrogênio e esqueletos de carbono para que a vida se estabeleça. As algas são tidas como colonizadores primários do solo, pela sua capacidade de fixar carbono e nitrogênio da atmosfera através dos processos de fotossíntese e fixação biológica de nitrogênio, respectivamente. A partir daí, fungos e bactérias terão recursos para se desenvolver e liberar nutrientes dos minerais do solo, como o fósforo, o cálcio e o ferro (Coutinho, 1996).

O solo formado, havendo a disponibilidade de água, permitirá o crescimento de plantas, que ao serem decompostas gerarão matéria orgânica que reterão nutrientes, liberando-os lentamente para os próximos

colonizadores. Esta maneira simplificada de apreender o processo de pedogênese, do ponto de vista biológico, ilustra a importância da biodiversidade para a formação dos solos (Coutinho, 1996).

Por outro lado, a biodiversidade de solos tem um papel fundamental na regulação dos processos biogeoquímicos formadores e mantenedores dos ecossistemas (Hungria; Araújo, 1994). É nos solos que se realiza a maior parte da ciclagem de nutrientes da qual o planeta Terra depende para se manter vivo. Portanto, o solo é um recurso natural que deve ser conservado para que os serviços que ora prestam às sociedades sejam sustentáveis para as próximas gerações. (Drozdowicz, 1977).

A elaboração de medidas para a conservação da biodiversidade microbiana dos solos deve considerar as peculiaridades da diversidade microbiana e da biodiversidade de solos, dada a importância deste componente biológico para o funcionamento do Planeta e para a sustentabilidade de atividades econômicas, como a agricultura. Outra justificativa para um esforço integrado de pesquisa e prospecção tecnológica da biodiversidade de solos é a falta de conhecimento da verdadeira extensão desta diversidade nos bioma tropicais, e o grau de ameaça em que se encontra. (HUNGRIA, 1994; ROSADO, 1997; AZEVEDO, 1998).

É preciso, pois, aprimorar significativamente, e o mais rapidamente possível, o conhecimento sobre a biodiversidade desse bioma. De acordo com o Documento Estratégia Nacional de Biodiversidade: Microrganismos e Biodiversidade dos Solos (2001), são extremamente importantes atividades que conduzam à definição das espécies de organismos do solo, à elucidação da

influência da composição de espécies e ao entendimento da estrutura de comunidades no funcionamento de ecossistemas.

1.3. Caracterização das Leveduras

As leveduras são fungos predominantemente unicelulares, cujo crescimento se faz preferencialmente por brotação ou fissão. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que a maioria dos fungos filamentosos, podendo ser mais eficientes na realização de alterações químicas por causa da sua maior relação área/volume. Geralmente são encontradas em folhas, frutos, grãos de cereais ou substratos contendo açúcares. Podem ainda ser isoladas do ar, do solo, de águas de lagos, rios e mares e da pele e do intestino de animais, bem como em associações com insetos (Carmo de Souza, 1969; Lodder, 1970).

Existem, aproximadamente, 678 espécies de leveduras, distribuídas em cerca de 93 gêneros, das quais aproximadamente 30 espécies são consideradas patogênicas. Possuem importância econômica sob vários aspectos: são agentes de fermentação alcoólica, na produção do álcool industrial e de todas as bebidas alcoólicas não destiladas ou destiladas; são utilizadas na panificação; são, pelo menos potencialmente importantes fontes de proteína e de fatores de crescimento, possíveis de serem utilizadas na alimentação animal e humana; como agentes de fermentação são prejudiciais à conservação de frutos; algumas espécies são patogênicas a plantas, animais e ao homem (Lodder, 1970; Conant, 1972; Kreger-van Rij, 1984; Kwun Chung; Bennet, 1985; Khozel, 1995; Barnett *et al.*, 2000; Lacaz *et al.*, 2002).

As leveduras são encontradas nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e entre os fungos mitospóricos, anteriormente denominados Deuteromycetes (sem reprodução sexuada conhecida), constituindo um grupamento artificial (Hawksworth *et al.*, 1995).

A maioria das espécies de leveduras basidiomicéticas possui um perfil assimilativo amplo de fontes de carbono quando comparadas com as leveduras ascomicéticas, que se restringem a poucas fontes de carbono (Kurtzman; Fell, 1998). As leveduras basidiomicéticas são ricamente encontradas em substratos que possuam componentes mais complexos, como solo e folhas, ao contrário das leveduras ascomicéticas, que são freqüentemente encontradas em substratos ou fontes ricas em açúcares simples, como frutos (Santos, 1997).

1.4. Taxonomia Clássica e Molecular das leveduras

A identificação das leveduras é feita, tradicionalmente, com base em características morfológicas e fisiológicas, entretanto, muitas vezes, pode ocorrer dificuldade de avaliação dos resultados, devido a estes organismos apresentarem características fenotípicas altamente variáveis mesmo entre linhagens de uma única espécie. As ferramentas de biologia molecular atualmente utilizadas visam auxiliar as dificuldades de identificação pelo método convencional, complementando essa identificação, mas não excluindo a realização de observações morfofisiológicas. (Lodder, 1970; Kreger-van Rij, 1984; Samaranayake *et al.*, 1984; Chakrabarti, *et al.*, 1991; Khozel, 1995; Vidotto *et al.*, 1996; Ghannoum, 2000; Foschino *et al.*, 2004; Villa-Carvajal *et al.*, 2004; Trost *et al.*, 2004).

As primeiras observações microscópicas de leveduras foram feitas por Antonie van Leeuwenhoek em 1680, analisando a borra do vinho. Cagniard de la Tour, Kiitzing e Schwann, em 1826 demonstraram que as leveduras de cerveja e vinho apresentavam capacidade de reprodução por gemulação. Posteriormente, Pasteur demonstrou que as leveduras possuíam habilidade respiratória e fermentativa, e introduziu métodos para obtenção de culturas puras. Emil Christian Hansen descreveu características morfológicas e fisiológicas das leveduras, estabelecendo o primeiro sistema de identificação em 1896, que abordou a caracterização de um grande número de espécies, muitas das quais reconhecidas até hoje. Nestes esquemas foram discutidos alguns aspectos fisiológicos importantes de classificação, como a habilidade de leveduras em fermentar glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose e rafinose, e, alguns compostos nitrogenados, tais como: sulfato de amônia, asparagina, uréia, peptona e nitrato. (Phaff *et al.*, 1978).

Em 1952, Lodder e Kreger-van Rij escreveram a mais extensa publicação sobre taxonomia de leveduras, revisada por Lodder (1970), Barnett *et al.* (1983), Kreger-van Rij (1984) e Barnett *et al.* (1990, 2000). Na tentativa de simplificar os processos de identificação de leveduras foi editado um programa para computadores de acordo com as publicações de Barnett *et al.* (1983, 1990), utilizando-se predominantemente, testes fisiológicos. Este programa permite fazer uma seleção de espécies com resultados semelhantes às espécies não conhecidas, e pode ser utilizado para espécies com características individuais ou para um número de espécies com características em comum.

As leveduras são tradicionalmente caracterizadas, classificadas e identificadas através de características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos fisiológicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica. Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares (Kreger-van Rij, 1984; Barnett *et al.*, 2000).

Embora muitos estudos sobre a caracterização de leveduras já tenham sido elaborados, uma classificação natural é ainda um grande objetivo a ser alcançado. A classificação ideal deve estar baseada na filogenia destes microrganismos. Esta interação classificação-filogenia é de grande importância, pois permite prever similaridades genéticas entre os microrganismos, fornecendo informações necessárias para a descoberta e avaliação de parentescos entre linhagens e espécies, resultando em maior compreensão da evolução das leveduras (Kreger-van Rij, 1987; Kurtzman, 1988).

Segundo Kreger-van Rij (1987) as metodologias aplicadas à identificação de leveduras envolvem procedimentos como o isolamento do ambiente, determinação de propriedades morfológicas e fisiológicas, descrição e comparação com microrganismos padrão e ocasionalmente, avaliação de propriedades tecnológicas. O conjunto de dados obtidos, obedecendo rigorosamente a protocolos padronizados, resulta na identificação e posicionamento taxonômicos da levedura.

Os testes fisiológicos têm sido utilizados como um importante marcador, auxiliando na definição dos grupos delimitados pelos métodos moleculares. Por estes estudos foi estabelecida a sua importância para a taxonomia, demonstrando a eficiência do método, principalmente para a diferenciação interespecífica e similaridade intraespecífica.

A partir da década de 1960 a análise de variantes de uma população deixou de ser restrita a caracteres morfológicos, pois surgiram os marcadores moleculares.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) marcador molecular consiste em todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não no genoma. Portanto, pode-se dizer que atualmente a detecção de variabilidade genética pode ser feita através de diferentes níveis de observação.

De acordo com Hoog (1997), os métodos moleculares são ferramentas úteis no esclarecimento mais preciso da posição das leveduras dentro do reino Fungi.

Os métodos moleculares, segundo Hoog *et al.* (1998), são utilizados em grande escala para o estudo da diversidade de fungos. No caso de fungos ambientais e industriais, os métodos podem ser aplicados envolvendo a obtenção de dados mais precisos para a taxonomia, uma vez que métodos clássicos apresentam uma limitada resolução, tanto para fungos leveduriformes que apresentam pouca variação morfológica, bem como para aqueles grupos

variáveis e com espécies até então pouco descritas, e estão sendo reconhecidas como um conjunto de pequenas entidades. Outra aplicabilidade é na filogenia, pois estes métodos facilitam a construção de árvores filogenéticas, as quais podem servir como um modelo do suposto curso da evolução.

Em leveduras, a caracterização genotípica vem sendo feita em maior intensidade em espécies de *Saccharomyces* e *Candida*. O nível de diferenças entre DNAs de diferentes espécies de ambos os gêneros é detectado para a confirmação de espécies identificadas (Quesada e Cenis, 1995). Além disto, novas espécies de leveduras também vêm sendo identificadas, tendo seu DNA comparado com as espécies já conhecidas (Baleiras e Hofstra, 1995; Masneuf *et al.*, 1996; Valente *et al.*, 1996).

Grandes progressos na taxonomia das leveduras vêm ocorrendo em função do emprego de técnicas moleculares que fornecem informações essenciais sobre a composição química da parede celular e seqüências de ácidos nucléicos e proteínas (Meyer, 1991), o que tem resultado na descoberta de novas espécies e rearranjos de gêneros e espécies já conhecidas.

O rDNA é muito empregado em estudos taxonômicos devido à presença de regiões codificantes e não-codificantes, que evoluem em diferentes taxas, e também pelo fato de os ribossomos estarem presentes em todos os organismos a partir de uma origem evolutiva comum (Valente *et al.*, 1996). A região gênica do rDNA possui as seguintes estruturas na disposição 5'-3': a região espaçadora externa (ETS), o gene 18S, a região espaçadora interna (ITS1), o gene 5.8S, uma segunda região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S. Este último gene apresenta as seqüências menos conservadas, em

relação aos genes 18S, 5.8S e 5S (que não está situada nesta unidade repetitiva), sendo a região de escolha para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados. A região dos domínios divergentes D1/D2 do 26S rDNA de grande parte das leveduras conhecidas encontra-se seqüenciada e observou-se que essa região é capaz de diferenciar quase todas as espécies de leveduras testadas, visando estudos de taxonomia (Kurtzman; Robnett, 1998).

Com o desenvolvimento da biotecnologia, a grande biodiversidade presente nos ecossistemas brasileiros tornou-se alvo de interesse da comunidade científica, do governo e de empresas, principalmente as indústrias de fármacos. Definiu-se então, que quanto maior a diversidade de vida de um país, maior a oportunidade de desenvolvimento de novos e variados produtos químicos e biológicos. Através do emprego de técnicas de biologia molecular, será possível desvendar a enorme diversidade de leveduras existentes na região e a correlacioná-las com o funcionamento de ecossistemas. No Brasil, que é um dos países que possui a maior biodiversidade do mundo, a busca de novas espécies de fungos deverá produzir resultados extremamente interessantes do ponto de vista biotecnológico (Foschino *et al.*, 2004; Villa-Carvajal *et al.*, 2004).

Este trabalho teve como objetivos: **Geral**, isolar leveduras de amostras de solo das regiões de Mucugê, Ipirá e Paulo Afonso do semi-árido da Bahia; **Específicos**, caracterizar em níveis fenotípico, fisiológico e genotípico leveduras isoladas do solo de regiões do semi-árido da Bahia; verificar a ocorrência e variabilidade de leveduras no solo das três áreas estudadas;

verificar a diversidade das leveduras isoladas do solo, através da caracterização molecular pela região D1/D2 do gene codificador do rRNA 26S.

1.5. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J. L. 1998. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I. S. de; Azevedo, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna, SP: CNPMA, p.445- 461.

BALEIRAS-COUTO, M. M.; HOFSTRA, H. 1995. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, n. 5, p. 525-535.

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

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. 1990. **Yeasts, characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1139p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. 1983. **Yeasts: characteristics and identifications**. Cambridge: Cambridge University Press. 811p.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P. W.; OSULLIVAN, K. M.; PALUS, J. A.; RUMJANEK, N. G.; JANSEN, J. L.; NIENHUIS J.; TRIPLETT, W. .1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, 62: 6, 1935-1943.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 7, 2647-2653.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL (MMA). 2000. Secretaria de Coordenação dos Assuntos do Meio Ambiente (SCA). **Agenda 21**: Agricultura sustentável. Brasília, D.F. 190 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL (MMA). 2001. Secretaria de Coordenação dos Assuntos do Meio Ambiente (SCA). **Estratégia Nacional de Diversidade Biológica**: Microrganismos e Biodiversidade dos Solos. Brasília, D.F. 53 p.

CANHOS, P. F. 1998. Strategies for rapid assessment of fungal diversity. *Biodiversity and Conservation* 6: 669-680.

CARMO DE SOUZA, L. 1969. Distribution of yeasts in natura. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**: biology of the yeasts. London: Academic Press, v. 1, p. 9-106.

CHAKRABARTI, A.; NAYAK, N.; TALWAR, P. 1991. *In vitro* proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia*, 141:163-168.

CONANT, N..F. 1972. **Micologia**. 3 ed. México: Interamericana, 1972, 592p

COUTINHO, H. L. C. 1996. Avaliação da Biodiversidade do Solo através de Exame de DNA. Disponível em <http://www.cnps.embrapa.br/documentos>. Acesso em 11/09/2005.

DROZDOWICZ, A. 1977. Equilíbrio microbiológico dos solos de cerrados. In: ANAIS DO SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 4. Brasília. Bases para utilização agropecuária. São Paulo: EDUSP/Belo Horizonte: Itatiaia, 1977. p.233-245.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 220p.

FOSCHINO, R.; GALLINA, S.; ANDRIGHETTO, C.; ROSSETTI, LIA; GALLI, A. 2004. Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. **FEMS Yeast Research**, 4:609-618.

FURMAN, A.; CAMPBELL, D. 1998. Microbial microdiversity. **Nature** 393:410-411.

GHANNOUM, M. A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenicity. **Clin. Microb. Ver.**, 13(1):122-143.

HAWKSWORTH, D. L. 1995. **Ainsworth & bisby's dictionary of the fungi**. 8^a ed. London: Ed. CAB International, 616p.

HOOG, G. S. DE. 1997. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity illustrated with agents of phacohyphomycosis. **Mycosis**, v.40, p. 5-8. Supplement 2.

HOOG, G. S. DE; BOWMAN, B.; GRASER, Y. 1998. Molecular phygeny and taxonomy of medically important: Fungi. **Medical Mycology**, v. 36, p. 52-56. Supplement 1.

HUGENHOLTZ; PACE. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnol.** 14: 190-197.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. 1994. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília. 180 p.

KENNEDY A. C.; GEWIN, P. 1997. Soil microbial diversity: present and future considerations. **Soil Science**, 162: 9, 607-617.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. 1995. Soil microbial diversity and sustainability of agricultural soil. **Plant and Soil**, The Hague, v.170, p.75-86.

KHOZEL, T. R. 1995. Virulence factors of *Cyptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, 3:295-299.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. 1987. **Classification of yeasts**. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed). **The yeasts**. London: Academic Press, v.1, p.5-61.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 1984. **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1082 p.

KURTZMAN, C. P. 1988. Identifications and taxonomy. In: KIRSOP, B. E.; KURTZMAN, C. P. (Ed). **Living resources for biotechnology: yeasts**. New York: Cambridge, p. 99-140.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. 1998. **The yeasts, a taxonomic study**. 4 ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1088 p.

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

KWUN CHUNG; BENNET. 1985. **Medical Mycology**. 615p.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E .C. 2002. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo, Sarvier Editora de livros médicos Ltda.

LODDER, J. 1970. **The Yeast: a taxonomic study**. Oxford: North Holland Publishing Company. 1395p.

LODDER, J. 1971. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. 1385p.

MASNEUF, I; AIGLE, M.; DUBORDIEU, D. 1996. Development of a polymerase chain-restriction reaction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. **FEMS Microbiology Letters**, v.138, n.2-3, p. 239-244.

MELO, I.S. DE; AZEVEDO, J.L. 1998. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA

MENDES, B.V. 1997. **Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável do SemiÁrido**. Fortaleza: Benedito Vasconcelos Mendes, SEMACE.

MEYER, S. A. 1991. DNA reassociation and prtein electrophoresis useful tools to evaluated yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; MEYER, S. A.; SCHENBERG, A. C. G. et al. **Leveduras para biotecnologia**: Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 49p. Curso.

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MRAK, E. M. 1978. **The life of the yeasts**. Cambridge: Harvard University Press. 341p.

QUEIROZ, L. P. DE; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. (eds.). 2006. Towards greater knowledge of the Brazilian Semi-arid biodiversity. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT).

QUESADA, M. P.; CENIS, J. L. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.46, n.2, p. 204-208.

REIS, A. C. S. 1976. Clima da Caatinga. Anais da Academia Brasileira de Ciências 48 (2):325-335.

RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S.; FIGUEIREDO, M. A. 1992. Manual sobre métodos e estudo florístico e fitossociológico – ecossistema caatinga. Sociedade Botânica do Brasil, Brasília.

RODAL, M. J. N.; NASCIMENTO, L. M.; MELO, A. L. 1999. Composição Florística de um trecho de vegetação arbustiva caducifólia, no município de Ibimirim, PE, Brasil. Acta Botânica Brasílica 13(1):14-29.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L. & ELSAS, J. D. VAN. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. **Microbiology**, Spencers Wood, v.28, p.135-147.

SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE, J. M.; MACFARLANE, T. W. 1984. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. **J. Med. Vet. Mycol.**, 22:201-207.

SAMPAIO, E. V. S. B. 1996. Overview of the Brazilian caatinga. In: Burlock, S. H.; Mooney, H. A.; Medina, E. (eds.). *Seasonally dry tropical forest*. Cambridge University Press. p. 35-63.

SANTOS, M.G.G.R. 1997. Yeast in Biotechnology. In: Progress in microbial ecology. Rio de Janeiro: Eds. M.T. Martins, M.I.Z. Sato, J.M. Tiedje, L.C.

Mendonça-Hagler, J. Dobereiner & P.S. Sanchez. Sociedade Brasileira de Microbiologia. p. 571-576.

TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O; POSSINGER, K. GOBEL, U & ADAM, T. 2004. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **Jornal of Microbiological Methods**, 56:201-211.

VALENTE, P.; GOUVEIA, F. C.; DELEMOS, G. A. 1996. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. **FEMS Microbiology Letters**, v. 137, n. 2-3, p. 253-256.

VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PEREYRN F. G. C. (eds). 2002. Ecorregiões Propostas para o Bioma Caatinga. Associação Plantas do Nordeste, Recife.

VIDOTTO, V.; SINNICCO, A; DI FRAIA, D.; CARDAROPOLI, S.; AOKI, S.; ITO-KUWA, S. 1996. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, 126:119-123.

VILLA-CARVAJAL, M.; COQUE, J.J.R.; ALVARES-RODRIGUEZ, M.L.; URUBURU, F.; & BELLOCH, C. 2004. Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers. **FEMS Yeast Research**, 4:745-750.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS ESTUDADAS

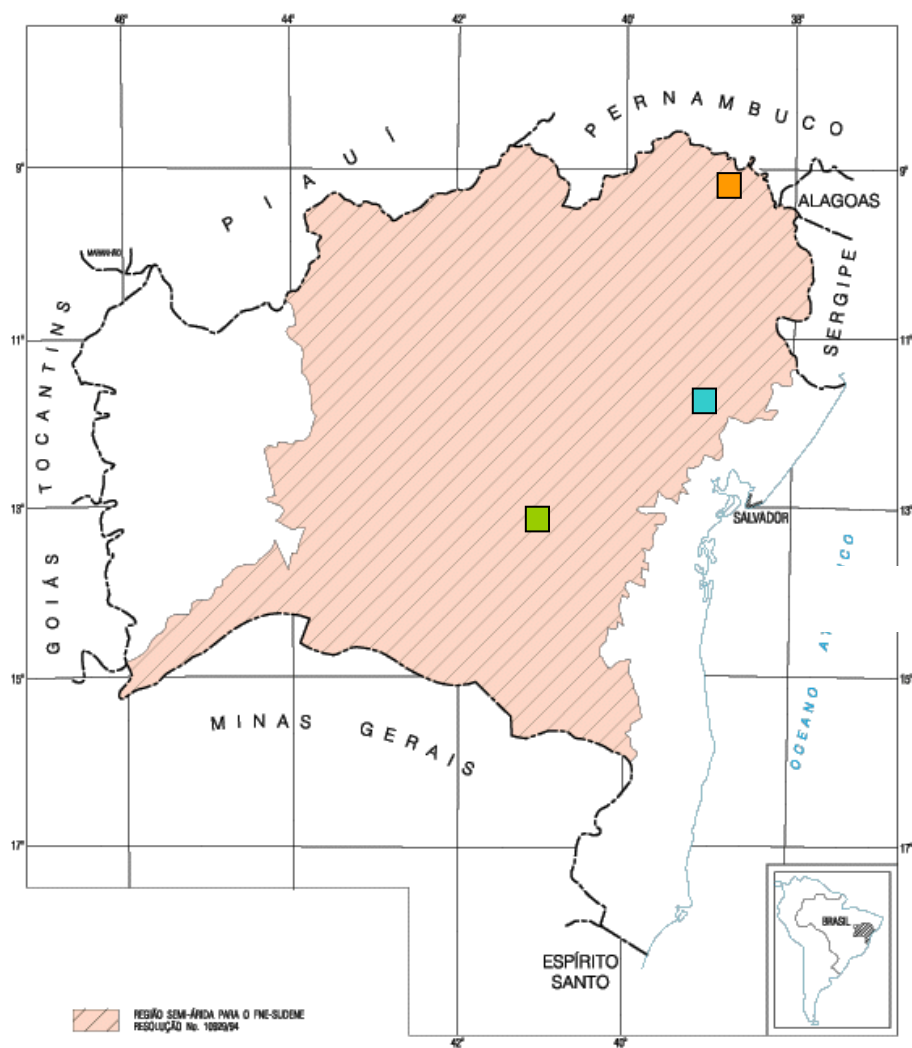
Foram investigados solos de três regiões do semi-árido da Bahia. A primeira no município de Mucugê, localizado na Chapada Diamantina a 448 Km da capital, Salvador, BA. Possui área de 2.491,80 Km² e altitude de 981 m, nas coordenadas 13° 03' 0" S e 41° 22' 0" W, com temperatura média de 20°C. A segunda, no município de Ipirá, localizado a 202Km da capital, com área territorial de 3.035,40Km² e altitude de 328m, nas coordenadas de 12° 09' 0" S a 39° 44' 0" W e temperatura média de 26°C. A terceira área, localizada em Paulo Afonso, município localizado a 450Km da capital, possui área de 1.700,40Km² e altitude de 262m, com coordenadas de 09° 24' 0" S a 38° 13' 0" W, e temperatura média de 29°C (Figura 1).

2.2. COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SOLO

De cada área analisada foram realizadas duas coletas, uma no período chuvoso entre fevereiro e março de 2005 e outra no período seco entre agosto e setembro de 2005, obtendo-se um total de 18 amostras de solo, seis de cada localidade.

As amostras foram coletadas em perfil da superfície a uma profundidade de 20cm, e posteriormente acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia - UEFS/BA para análise. A determinação da temperatura do solo foi realizada in loco utilizando termômetro digital e para a determinação do pH em H₂O, utilizou-se a base metodológica de MOK *et al.* (1984).

REGIÃO SEMI-ÁRIDA (FNE)



FONTE: SUDENE, 1994



Figura 1. Mapa com a localização das áreas estudadas do semi-árido da Bahia. ■ Paulo Afonso; ■ Ipirá e ■ Mucugê. Mapa extraído do SEI-BA. Fonte: Sudene, 1994.

2.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

De cada uma das 18 amostras de solo coletadas foram pesados 10 g e colocados em 90 mL de H₂O dest/esterilizada e posteriormente preparadas suspensões aquosas na diluição de 10⁻². Esse procedimento foi feito em triplicata para cada solo.

Um volume de 0,2 mL da suspensão foi semeado em superfície de placa de Petri contendo o meio ágar YMA+C (extrato de levedura e extrato de malte) acrescido de cloranfenicol e incubadas a temperatura ambiente, esse procedimento foi realizado em quadruplicatas. Todas as colônias macroscopicamente semelhantes a leveduras foram isoladas, purificadas e identificadas através do sistema VITEK da Biomérieux, e morfofisiológico de acordo com Lodder, (1970); Kreger van Rij., (1984); Barnett *et al.*, (1990).

2.4. CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA

2.4.1. Aspectos das colônias

Foram observadas as características das colônias das leveduras quanto a cor (branca, creme, amarelada, laranja, rosa, vermelha, marrom, preta), ao brilho (brilhante, opaca), forma (circular, oval ou fusiforme), margem (regular, irregular, lobada ou com raízes), superfície (lisa ou rugosa), elevação (plana, convexa, umbonada ou crateriforme) e consistência (cremosa, mucóide, butirosa, membranosa, esfarelada, dura, seca), segundo Yarrow (1998).

2.5. CARACTERIZAÇÃO MICROMORFOLÓGICA

Foram realizadas lâminas a fresco a partir do crescimento de culturas em Ágar YEPG com, no máximo, uma semana de incubação a 25°C e a observação foi feita em microscopia óptica com aumento de 40X a 100X. Os caracteres morfológicos celulares observados foram: forma e tamanho da célula, presença de pseudomicélio, tipo de reprodução assexuada (brotamento e/ou fissão) e, no caso de brotamento, tipo de brotamento (multipolar, bipolar, unipolar), presença de ascosporos e de balistosporos, segundo Barnett *et al.* (1990) e Kurtzman e Fell (1998).

2.5.1. Formação de ascosporos

A observação de ascosporos foi realizada utilizando um meio especial para induzir a sua produção: o meio Agar acetato (0,5% de acetato de sódio trihidratado + 2% de ágar), com incubação a 22°C por até um mês. A pequena quantidade de carboidratos nesse meio de indução restringe o crescimento vegetativo e aumenta a produção de ascosporos. As características observadas em microscopia óptica foram a presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascósporos por asco e liberação ou não de esporos logo após a sua formação.

Devido à dificuldade de visualização dos ascosporos em montagens diretas em água de alguns isolados, dois procedimentos de coloração de ascosporos foram empregados. O primeiro, denominado método de Wirtz, cora os esporos de verde azulados e as células vegetativas de vermelho. No esfregaço da cultura teste, cobriu-se a lâmina com uma solução aquosa de verde malaquita 5%, aquecendo-a até a emissão de vapores por 5 minutos.

Lavou-se e, posteriormente foi realizada a contra-coloração com uma solução aquosa de safranina por 30 segundos. Após lavagem e secagem da lâmina, examinaram-se os ascosporos em objetiva de imersão. O segundo procedimento de coloração de ascosporos é o método de Ziehl-Neelsen. Neste método, após confecção do esfregaço da cultura teste, cobriu-se a lâmina com fuccina de Ziehl concentrada, aquecendo-a durante 5 minutos a lâmina até a emissão de vapores. Após escorrer o excesso de corante da lâmina, adicionou-se etanol 95% com 1% de ácido clorídrico para promover a diferenciação das células vegetativas dos ascosporos, já que estes são álcool-ácido resistentes. Em seguida foi realizada a contra-coloração do fundo com azul de metileno 1% por 30 segundos, lavagem com água corrente e secagem para observar sob imersão os ascosporos avermelhados, sobre um fundo azul disposto de células vegetativas (Neufeld, 1999).

2.5.2. Produção de balistosporos

A produção de balistosporos é um critério importante para a distinção de espécies de leveduras com afinidade basidiomicética. Os balistosporos, quando amadurecidos, são ejetados para o meio ambiente violentamente. Uma característica indicativa de que os balistosporos estão sendo produzidos pelo isolado é a produção espontânea de colônias satélites (Kreger-van Rij, 1984; Neufeld, 1999). Um simples procedimento para a demonstração dessa característica foi aplicado. Inoculou-se a levedura suspeita na superfície de uma placa contendo Agar Fubá (1,7% fubá; 0,5% Agar). Fechou-se a base desta placa com a base de uma outra placa contendo Agar YEPG, selando ambas, assepticamente, com fita adesiva. Incubou-se a placa, com a base

contendo o inóculo para cima, durante 7 dias a 25°C. As culturas produtoras de balistosporos desenvolveram um crescimento no Agar YEPG idêntico ao semeado no Agar Fubá (Barnett *et al.*, 2000).

2.6. TESTES FISIOLÓGICOS

2.6.1. Teste de assimilação de fontes de carbono

O teste baseou-se na capacidade de assimilação das leveduras nas respectivas fontes de carbono: glicose, galactose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, amido solúvel, xilose, L-arabinose, ramnose, etanol, glicerol, isopropanol, manitol, glucitol, salicina, citrato, inositol e N-acetilglicosamina. A habilidade ou não de assimilar diferentes açúcares permite a separação das espécies de acordo com o seu padrão de assimilação. Foi aplicado o método de auxanograma em placas contendo o meio YNB (yeast Nitrogen Base) e o inóculo da levedura, e posteriormente adição dos açúcares. As leituras foram realizadas com 24h e 48h, consideradas positivas todas que apresentaram uma zona de crescimento macroscópico em torno do local onde foi adicionado o açúcar. (Barnett *et al.*, 2000).

2.6.2. Teste de assimilação de fontes de nitrogênio

As leveduras e fungos semelhantes a leveduras possuem a capacidade de utilizar sulfato de amônia, asparagina, peptona e uréia aerobicamente como única fonte de nitrogênio. Porém, determinados compostos nitrogenados como nitrato de potássio, nitrito de sódio, lisina, creatina, creatinina, aminas alifáticas e alguns aminoácidos são seletivamente utilizados por diferentes leveduras (Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000). Assim, o propósito de testar se uma

levedura possui a habilidade de utilizar determinadas fontes de nitrogênio é uma característica importante na sua identificação.

O teste de assimilação de fontes de nitrogênio baseou-se na utilização de nitrato, nitrito, lisina, creatina e creatinina como única fonte desse elemento, utilizando a técnica de auxanograma.

Foi preparado meio contendo YCB 1,17% com 2% de ágar em uma quantidade proporcional a 15mL para cada placa que for inoculado o isolado, porém sendo hidratado em apenas 12mL. Após essa fase, foram misturados os 3mL do inóculo de cada isolado em água estéril com os 12mL do meio preparado, previamente resfriado a aproximadamente 45°C, e vertidos em uma placa estéril. Após a solidificação do meio, pitadas das respectivas fontes de nitrogênio foram adicionadas de forma equidistante no perímetro da placa, tendo o centro desta servido como controle negativo e a peptona como controle positivo (Kreger-van Rij, 1984; Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

2.6.3. Testes de fermentação

A fermentação alcoólica pode ser considerada como a oxidação anaeróbica de um carboidrato com a produção final de álcool etílico e anidrido carbônico, além de outros produtos secundários. Se um carboidrato for fermentado, ele será assimilado, porém o contrário não é necessariamente uma verdade. Se a fermentação ocorre, a glicose será sempre fermentada (Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000)

Verificou-se, portanto, a capacidade de cada levedura de fermentar a glicose, a galactose e a maltose. Antes da realização de cada teste, as culturas

foram repicadas em Ágar YEPG para obtenção de células ativas metabolicamente e incubadas por 48 horas a temperatura ambiente ($26 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

Estas culturas foram, posteriormente, inoculadas em tubos de ensaios com meio para fermentação contendo tubos de Durham invertidos no seu interior. Os tubos de fermentação foram lidos regularmente em 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a inoculação. A produção de gás foi confirmada pelo seu acúmulo nos tubos de Durham. A leitura foi considerada negativa quando não houve acúmulo de gás ou quando apenas foram observadas algumas bolhas de gás no tubo de Durham, +1 quando apenas 1/3 do tubo de Durham estava ocupado por gás, +2 quando o gás estiver presente em 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham encontrou-se cheio de gás. As cepas cujas leituras registraram-se +2 ou +3 foram consideradas fermentadoras. As que tiveram leitura +1 foram consideradas fermentadoras fracas (Kreger-van Rij, 1984; Yarrow, 1998; Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000).

2.6.4. Produção de Urease

No teste de produção de urease em meio uréia de Christensen, as linhagens foram inoculadas a partir de culturas recentes em ágar YEPG em tubos contendo 3 mL do meio sólido Agar Uréia (Peptona 1%, Glicose 1%, NaCl 5%, Fosfato monopotássico 2%, Vermelho de fenol 0,012% e Uréia 3%). Inicialmente autoclavaram-se todos os constituintes nos tubos com 2,5 mL cada, com exceção da uréia que foi esterilizada por filtros de celulose de 0,22 μm . Após autoclavagem, adicionou-se 0.5 mL de uréia filtrada (20%), homogeneizaram-se e inclinaram-se os tubos, deixando-os até a completa solidificação do meio. Os tubos de ensaio foram inoculados e incubados a

temperatura ambiente por 3 dias, sendo as leituras realizadas diariamente. A atividade da enzima urease, quando presente na cepa, provocou uma viragem do indicador vermelho de fenol de uma cor amarelada para rosada (Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000).

2.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para a comparação de cada parâmetro, individualmente, entre os tratamentos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi ainda realizada uma análise de agrupamento utilizando o algoritmo de UPGMA e o índice de similaridade de Bray-Curtis para avaliar o grau de similaridade entre as áreas de coleta utilizando o programa PAST versão 1.3 (Hammer *et al.*, 2001).

2.8. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

2.8.1. Extração do DNA das leveduras

As amostras não identificadas fenotipicamente foram cultivadas em 10 mL de ágar Yeast Peptona Dextrose (YPD) a 27°C por 12 horas a 250 rpm em shaker. Foi transferido 1 mL desse cultivo para um microtubo de 2 mL. Com auxílio de um bastão de vidro o material foi macerado e pulverizado em contato com nitrogênio líquido. Após esse processo, adicionou-se 1 mL de tampão CTAB [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; 2% PVP-40] e 4 µL de β-mercaptoetanol, pré-aquecido a 65°C, e homogeneizado. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria a 60-65°C por 20-30 minutos, sendo agitadas periodicamente mantendo o extrato ressuspendido. Adicionou-se aos tubos clorofórmio:álcool isoamílico

(24:1; v/v) e foram mantidos sob agitação por 60 minutos, centrifugados à temperatura ambiente por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido para um novo microtubo de 2 mL. Adicionou-se aos microtubos o mesmo volume de isopropanol ou 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C e então misturou-se suavemente até formar um precipitado. A amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos, e descartado o sobrenadante, obtendo o precipitado (*pellet*) que foi lavado com 1 mL de etanol 70% por duas vezes e colocado para secar ao ar, a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM) e incubado a 4°C por meia hora. A solução foi conservada a -20°C até o uso. A verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada através de corrida eletroforética em 0,7% (w/v) gel de agarose usando TBE (Tris-borato 0,045 M, EDTA 0,001 M, pH 8), a 80 V por 60 minutos.

2.8.2. Reação de PCR – Amplificação dos fragmentos alvo

As reações em cadeia da polimerase (PCR) simétricas (Saiki *et al.*, 1988) foram executadas, usando um termociclador. As reações foram realizadas em um volume reacional total de 50 µL, contendo os seguintes componentes: 50 ng de DNA molde, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP; 3,75 mM de MgCl₂; 5,0 U de Taq DNA polimerase em 50 mM KCl e 20 mM Tris - HCl, pH 8,4. Os seguintes iniciadores (*primers*) foram utilizados para a amplificação LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') e LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') (Moncalvo *et al.*, 2000a). (Figura 1). Em geral, 5µL de cada amostra amplificada foi submetida à eletroforese em gel de agarose (1%) e comparada a um padrão de DNA com bandas variando de 500 a 12000 pb (Amersham-

Pharmacia Biotech, KiloBase DNA Marker). A PCR foi usada para amplificar um fragmento de cerca de 940 pb, homólogo a uma região do gene que codifica para o RNA 26S da subunidade maior de ribossomos nucleares em *Saccharomyces cerevisiae*, da posição 26 à posição 964. Após a amplificação os produtos de PCR (amplicons) foram purificados.

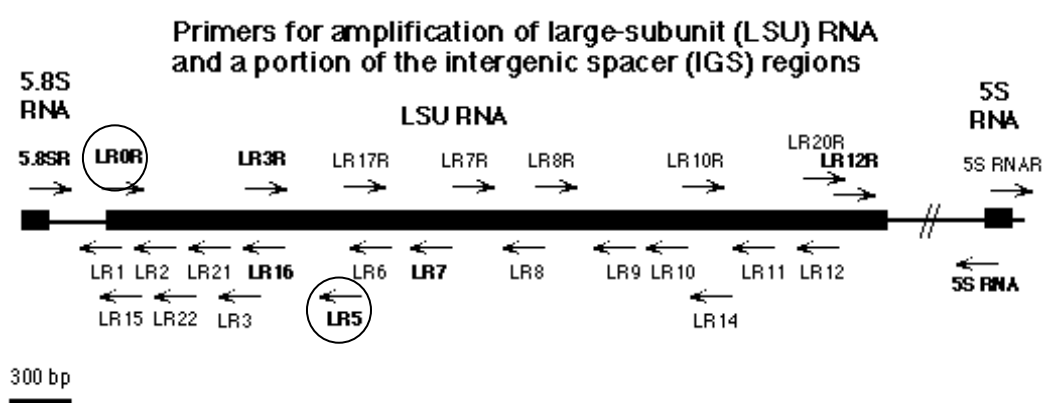


Figura 1. Primers utilizados para a amplificação e seqüenciamento do gene de RNA ribossômico (25-28S) da subunidade maior do ribossomo nuclear.

2.8.3. Reação de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada usando para cada amostra 2 µL de tampão, 2 µL do kit Big Dye terminator, 1 µL de *primer* (3,2 pmol/µL), 2 µL do produto do PCR e 5 µL de água ultrapura, completando o volume final de 12 µL. Após a preparação do mix, as amostras foram colocadas no termociclador para a reação do seqüenciamento. A reação foi iniciada com uma desnaturação a 94 °C por 4 min, seguindo 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 10 seg (anelamento) e 60 °C por 4 min (extensão enzimática).

2.8.4. Purificação dos produtos de Seqüenciamento e análise dos dados

Após a reação os produtos de seqüenciamento foram purificados completando-se o volume para 20 μ L (acrescentando 8 μ L aos 12 μ L). Posteriormente foram adicionados 2 μ L de acetato de sódio 3 M pH 4,6 e 50 μ L de etanol 95%. As amostras foram agitadas suavemente em vórtex e deixadas precipitando durante 15 min a temperatura ambiente (no escuro). Em seguida foram centrifugadas durante 30 min a 14000 rpm. Descartados os sobrenadantes, os *pellets* foram então lavados com 100 μ L de etanol a 70%. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 14000 rpm, descartados os sobrenadantes, e então secas à temperatura ambiente por 30 min. Foram então adicionados 18 μ L de formamida + EDTA (misturando bem para ressuspender o *pellet*) e desta solução transferidos 9 μ L para placa de seqüenciamento. As amostras foram levadas ao seqüenciador SCE 2410 (Spectrumedix LLC), para eletroforese capilar.

Os eletroferogramas foram analisados visualmente e editaram-se as seqüências utilizando o programa FinchTV 1.4. (Geospiza Inc.). As seqüências resultantes foram submetidas à pesquisa, utilizando-se o programa BLASTn do NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov) alinhadas utilizando o programa Clustral X (Thompson *et al.* 1997) e posteriormente ajustadas manualmente com as seqüências obtidas no Genbank (submissão direta).

2.8.5. Análise Filogenética

A análise filogenética foi efetuada com o programa PAUP versão 4.0b10 (Swofford, 1998), utilizando-se o método da parcimônia sem pesagem, atribuindo-se pesos iguais a todos os tipos de substituições nucleotídicas. Utilizou-se uma sequência homóloga do *Schizosaccharomyces pombe* como grupo externo.

Avaliou-se a robustez dos clados usando o índice de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com 1000 pseudoreplicações. A árvore de consenso estrito gerada foi editada utilizando-se o programa TreeView versão 1.6.6 (Page, 2001).

2.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT J.A.; PAYNE R.W.; YARROW D. 1990. **Yeasts, characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1139p.

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

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-91.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T & RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4(1).

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 1984. **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1082 p.

KURTZMAN, C. P. 1988. Identifications and taxonomy. In: KIRSOP, B. E.; KURTZMAN, C. P. (Ed). **Living resources for biotechnology: yeasts**. New York: Cambridge, p. 99-140.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. 1998. **The yeasts, a taxonomic study**. 4 ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1088 p.

LODDER, J. 1970. **The Yeast: a taxonomic study**. Oxford: North Holland Publishing Company. 1395p.

MONCALVO, J-M.; LUTZONI, F. M.; REHNER, S. A.; JOHNSON, J.; VILGALYS, R., 2000. Phylogenetic relationships of agaricus fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. **Systematic Biology**, v.49, p.278-305.

MOK, W. Y.; LUIZAO, R. C. C.; SILVA, M. S. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; MUNIZ, E. G. 1984. Ecology of Pathogenic Yeasts in Amazonian Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 390-394.

NEUFELD, P. M. 1999. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico**. Rio de Janeiro: ed. Programa Nacional de Controle de qualidade, 240 p.

PAGE, R. D. M. 2001. *NEXUS Data Editor version 0.4.9*.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A., 1988. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. *Science*, v.239, n.4839, p.487-91.

SWOFFORD, D. L., 1998. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods, version 4.0b6. Sunderland: Sinauer

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. HIGGINS, D. G. 1997. The clustral – Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alingnment aided by quality analysis tool. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882.

YARROW, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds.) **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science. p. 77-100.

3. ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 1

LEVEDURAS DO SOLO DO SEMI-ÁRIDO DA BAHIA, BRASIL.

Elaborado conforme normas da Revista ao qual será submetido:

**BIOTA
NEOTROPICA**

Leveduras do solo do semi-árido da Bahia, Brasil.

Misael Silva Ferreira Costa¹; Lusinete Aciole de Queiroz²; Aristóteles Góes Neto³

¹Faculdade Nobre de Feira de Santana, Bahia. Av. Maria Quitéria 2116. Kalilândia, Feira de Santana, Bahia. CEP. 44001-008

²Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.

³Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, Brasil.

Corresponding author: ffcost@hotmail.com

ABSTRACT: The Brazilian Northeastern Semi-arid region is represented by distinct environments, which bear a rich and diversified biota, from which the yeasts are important members in many ecosystems. The present work aimed to carry out an inventory of the diversity of soli yeasts in three localities of the Semi-arid region of the State of Bahia, Brazil. Collections were performed in three municipalities of the Semi-arid region of Bahia, Mucugê, Ipirá and Paulo Afonso, in both dry and rainy period. Temperature and pH of soil samples were first determined before the isolation of the yeasts in YMA+C medium. For the identification, the classic method automatized by the VITEK® (BioMerieux), as well as bench tests, were used, considering morphophysiological profile of each isolate. All soil samples presented a weakly acid pH (mean = 5.31) and an mean temperature of 27°C. There was not statistically significant difference between the studied sites (ANOVA), however, soil samples from Mucugê presented the highest number of isolated taxa (31), followed by Ipirá (15) and Paulo Afonso (08). The main identified species were: *Brettanomyces bruxellensis*, *Bullera alba*, *Candida catenulata*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *Cryptococcus humicola*, *C. laurentii*, *C. luteolus*, *Rhodotorula minuta*, *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Trichosporon pullulans*. Until date, this work is the first inventory of soil yeasts in the Semi-arid region of the State of Bahia, Brazil.

Key words: diversity, yeasts, soil, Semi-arid region, Bahia.

RESUMO: O Semi-árido nordestino é representado por diferenciados ambientes, que, conseqüentemente, reúne uma rica e diversificada biota, da qual as leveduras são membros importantes em muitos ecossistemas. O presente trabalho teve como objetivo realizar um inventário sobre a diversidade de leveduras do solo em três localidades do semi-árido da Bahia. Foram realizadas coletas no período seco e chuvoso em três municípios do semi-árido baiano, Mucugê, Ipirá e Paulo Afonso. As amostras de solo foram analisadas quanto à temperatura e pH e posteriormente processados para o isolamento das leveduras em meio YMA+C. Para a identificação usou-se o método clássico automatizado pelo VITEK e de bancada, considerando o perfil morfofisiológico de cada isolado. Todas as amostras de solo apresentaram pH levemente ácido com média de 5.31 e temperatura média de 27°C. Estatisticamente não houve diferença significativa entre as áreas estudadas, porém Mucugê apresentou o maior número de táxons isolados (31), seguida por Ipirá (15) e Paulo Afonso (08). As principais espécies identificadas foram *Brettanomyces bruxellensis*, *Bullera alba*, *Candida catenulata*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *Cryptococcus humicola*, *C. laurentii*, *C. luteolus*, *Rhodotorula minuta*, *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Trichosporon pullulans*. Até o presente momento este se constitui no primeiro inventário de leveduras de solo na região semi-árida do estado da Bahia.

Palavras-chave: diversidade, leveduras, solo, Semi-árido, Bahia.

Introdução

O semi-árido nordestino é representado por diferenciados ambientes, que conseqüentemente reúne uma rica e diversificada biota. Alguns trabalhos estão sendo realizados com o objetivo de levantar dados sobre a biodiversidade dessa região, tais como os citados por SAMPAIO (1996) com informações de pesquisas com diferentes grupos taxonômicos, incluindo os fungos.

O interesse no estudo da diversidade biológica do semi-árido é crescente devido às variadas contribuições que este conhecimento pode proporcionar, principalmente para o campo da biotecnologia.

A diversidade microbiana, em virtude dos microrganismos estarem na base da cadeia trófica e intrinsecamente associados aos diversos processos ecológicos do solo, tem figurado como um importante indicador da qualidade do solo (TABATABAI, 1994). Numerosos estudos têm comparado comunidades microbianas entre solos de diferentes ecossistemas ou de longos períodos de manejos, assim como solos agricultáveis com solos de floresta ou sistemas nativos (MENDES, 1997; OVREAS & TORSVIK, 1998; STAHL *et al.*, 1999).

Estudos sobre a diversidade de leveduras associadas ao solo têm sido realizados em várias partes do mundo, revelando uma rica distribuição. (MENNA, 1965; MENNA, 1966; CASAS-CAMPILLO, 1967; CAPRIOTTI, 1967; COMBS *et al.*, 1971; SNELLER & SWATEK, 1974; SLAVIKOVA & VADKERTIOVA, 2000; POLIAKOVA *et al.*, 2001).

No Brasil são poucos os trabalhos feitos a partir do isolamento de leveduras do solo. Destaca-se o realizado por MOK *et al.* (1984) que identificaram 82 espécies de leveduras do solo da Amazônia.

Trabalhos sobre a diversidade de leveduras associadas ao solo no semi-árido da Bahia são, até o presente momento, desconhecidos.

O presente trabalho apresenta, pela primeira vez, um levantamento sobre a

diversidade de leveduras do solo na região do semi-árido da Bahia, fornecendo subsídios para estudos mais extensos e aplicados.

Material e Métodos

1. Localização das áreas estudadas

Foram investigados solos de três localidades do semi-árido da Bahia. A primeira no município de Mucugê, na Chapada Diamantina a 448Km da capital, Salvador, BA. Possui área de 2.491,80 Km² e altitude de 981m, nas coordenadas 13° 03' 0" S ; 41° 22' 0" W, com temperatura média de 20°C. A segunda no município de Ipirá, localizado a 202Km da capital, com área territorial de 3.035,40Km² e altitude de 328m, nas coordenadas de 12° 09' 0" S a 39° 44' 0" W e temperatura me de 26°C. A terceira em Paulo Afonso, município localizado a 450Km da capital, com área de 1.700,40Km² e altitude de 262m, nas coordenadas 09° 24' 0" S ; 38° 13' 0" W, e temperatura média de 29°C.

2. Coleta das amostras de solo

De cada localidade foram realizadas 02 coletas, uma no período chuvoso entre fevereiro e março/2005 e a outra no período seco entre agosto e setembro/2005. Nestas áreas foram fixados três pontos para coleta, obtendo-se um total de 18 amostras de solo, seis de cada localidade.

As amostras foram coletadas em perfil da superfície até 20 cm de, e acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia para análise. A determinação da temperatura do solo foi realizada in loco com termômetro digital e para a determinação do pH em H₂O, utilizou-se a base metodológica de MOK *et al.* (1984).

3. Isolamento e Identificação das leveduras

De cada uma das 18 amostras de solos coletadas foram pesadas 10 g e colocados em 90 mL de H₂O dest/esterilizada e posteriormente preparadas suspensões aquosas

na diluição de 10^{-2} . Esse procedimento foi feito em triplicata para cada solo.

Um volume de 0,2 mL da suspensão foi semeado em quadruplicata na superfície do meio ágar YMA+C (extrato de levedura e extrato de malte) acrescido de cloranfenicol, contido em placa de Petri e mantida a temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$. Todas as colônias macroscopicamente semelhantes a leveduras foram isoladas, purificadas e identificadas através da análise morfofisiológica realizada de acordo com LODDER (1970); KREGER VAN RIJ (1984); BARNETT *et al.* (1990) e YARROW (1998) e pelo sistema VITEK® da Biomérieux.

4. Tratamento Estatístico

Para a comparação de cada parâmetro, individualmente, entre os tratamentos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi ainda realizada uma análise de agrupamento utilizando o algoritmo de UPGMA e o índice de similaridade de Bray-Curtis para avaliar o grau de similaridade entre as áreas de coleta utilizando o programa PAST versão 1.3 (HAMMER *et al.*, 2001).

Resultados e Discussão

De um total de 18 amostras de solo analisadas, todas apresentaram um valor de pH relativamente baixo, variando entre 4,21 a 6,42. Quanto à temperatura, não houve uma diferença acentuada, variando de 24°C a 30°C , com média de 27°C (Tabela 1). CASAS-CAMPILLO (1967), em uma revisão sobre leveduras do solo, revelou que diversos estudos demonstravam que a temperatura e o pH são fatores limitantes para a propagação de leveduras no solo.

Nas análises das tabelas 2, 3 e 4 observou-se que houve uma tendência bem marcada, em relação ao número de isolados e táxons para as amostras de solo 4, 5 e 6, todas coletadas no período seco, das áreas de Mucugê, Ipirá e Paulo Afonso, quando comparadas com as análises de pH e

temperatura. Constatou-se que, quanto mais baixo o valor de pH maior foi o número de isolados e táxons, sugerindo que as leveduras estão mais bem adaptadas a ambientes ácidos. Dados semelhantes foram observados por MOK *et al.* (1984) em solos da Amazônia.

Da região de Mucugê obteve-se maior número de isolados e de táxons em relação a Ipirá e Paulo Afonso (Tabela 1). Embora o número total de isolados e de táxons identificados terem sido maiores em Mucugê, não foi observada, pela análise estatística (ANOVA), uma diferença estatisticamente significativa entre as três áreas. O teste F mostrou que a probabilidade das áreas serem iguais é bem superior a 0,05 (0,3958). Resultado similar foi obtido pela comparação do teste de Tukey.

Mesmo sem diferença estatisticamente significativa, pôde-se observar pela análise de agrupamento, que as áreas de Ipirá e Paulo Afonso são mais similares entre si do que a área de Mucugê, como pode ser visto na Figura 1. Provavelmente essa relação esteja diretamente ligada ao fator clima e temperatura destas áreas, que são mais semelhantes entre si do que o encontrado na área de Mucugê.

Foram isoladas 100 colônias de leveduras, 67 no período seco e 33 no período chuvoso, representadas por 54 táxons. *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. glutinis*, *Candida parapsilosis*, *C. catenulata*, *R. minuta* e *Cryptococcus laurentii* foram as espécies com maior frequência de ocorrência, tendo sido isoladas nos dois períodos. Além destas espécies citadas, mais duas foram isoladas nos dois períodos, *Cryptococcus luteolus* e *Trichosporon pullulans*, ambas com baixa frequência de ocorrência. (Tabela 5).

No período chuvoso apenas quatro táxons foram isolados com exclusividade, *Candida insectorum*, *C. robusta*, *Cryptococcus terreus* e *Rhodotorula* sp, enquanto que no período seco 20 táxons foram isolados, tendo *Candida sake*, *C. zeylanoides*, *C. glabrata*, *Sporobolomyces roseus*, *Trichosporon dulcitum* e levedura negra, como as mais frequentes.

Mucugê apresentou o maior número de táxons, 31 no total. As espécies *Candida catenulata*, *C. zeylanoides*, *C. sake* foram

isoladas apenas no período seco enquanto que *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichosporum pullulans* foram isolados em ambos os períodos. Essas espécies já foram citadas por CAPRIOTTI (1967) em solos dos Estados Unidos; MOK *et al.* (1984) em solos da Amazônia; SLAVIKOVA & VADKERTIOVA (2000) em solos de florestas na Slovakia; POLIAKOVA *et al.* (2001) em solos da Sibéria em regiões de Tundra, que comprovam a presença delas em solos de diferentes áreas, com clima e tipos de solo distintos.

Alguns táxons como *Aureobasidium pullulans*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Bullera alba*, *Cryptococcus humicola*, *C. luteolus*, *Hormonema schizolunatum*, levedura negra “black-yeast”, *Pichia ohmeri*, *Sporobolomyces salmonicolor* e *Schizosaccharomyces sp.* foram isolados apenas em Mucugê. *Candida guilliermondii* e *Cryptococcus terreus* foram encontradas apenas em solo do município de Ipirá. Não foi detectada a ocorrência de espécies exclusivas de Paulo Afonso, entretanto *Candida robusta*, *Cryptococcus laurentii* e *Trichosporum dulcitum* foram as espécies mais frequentes. (Tabela 5).

Algumas das espécies isoladas são reconhecidas como agentes de infecções micóticas, causando desde uma dermatomicose a graves infecções invasivas. Segundo LEVY (2004) as espécies do gênero *Candida* estão entre os principais agentes de infecções hospitalares, sendo o sexto patógeno nosocomial e o quarto em causas de fungemia. As espécies isoladas do solo neste trabalho

como a *Candida parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. famata* estão implicadas em quadros clínicos de fungemia, meningite, peritonite, endocardite, otite externa, artrite, endoftalmite, onicomioses e candidose cutâneo-mucosa (LACAZ 2002; SIDRIM, 2004).

Do total de espécies de *Cryptococcus* isoladas, duas já foram citadas como passíveis, porém raras, causadoras de quadros profundos de micoses. *Cryptococcus albidus* nos casos de meningites, fungemia e infecções pulmonares e *C. laurentii*, causando abscesso pulmonar e fungemia. (BAVA & NEGRONI, 1992; BRÜCKER, 1992; MITCHELL *et al.*, 1995).

As espécies *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa* estão envolvidas em casos de infecção cutânea, pulmonar, endocárdio, entre outras. *Trichosporon pullulans* já foi citado anteriormente como causador de infecções invasivas e disseminadas, fungemia, otomicoses, peritonite e endocardite (LACAZ 2002; SIDRIM, 2004).

Este trabalho se constitui no primeiro levantamento taxonômico de leveduras de solo em áreas da região semi-árida do estado da Bahia, Brasil. Um total de 32 táxons de leveduras foram registrados (excetuando as “leveduras negras”), dos quais 28 ao nível específico. Espera-se que, com o progresso do Programa de Pesquisa em Biodiversidade do Semi-árido (QUEIROZ *et al.*, 2006), o conhecimento sobre a diversidade de leveduras da região semi-árida brasileira seja suficientemente ampliado.

Referências bibliográficas

- BARNETT J.A.; PAYNE R.W.; YARROW D. 1990. **Yeasts, characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1139p.
- BAVA, A. J.; NEGRONI, R. 1992. Características epidemiológicas de 105 casos de criptococosis diagnosticados em la República Argentina entre 1981-1990. Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo. 34: (4), 335-340.
- BRÜCKER, G. 1992. Micosis oportunistes nosocomiales: épidémiologie et prévention. Paris: Doin Éditeurs.
- CAPRIOTTI, A. 1967. Yeasts from U.S.A. soils. Arch Mikrobiol. 6;57(4):406-13.
- CASAS-CAMPILLO, C. 1967. Soil yeasts. Rev Latinoam Microbiol Parasitol (Mex). Apr-Dec. 9(2):91-7.
- COMBS, T.J.; MURCHELANO, R.A.; JURGEN, F. 1971. Yeasts isolated from Long Island Sound. Mycologia. 63(1):178-81. Jan-Feb.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T & RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4(1).

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 1984. **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1082 p.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. 2002. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 695p.

LEVY, C. E. 2004. Manual de Microbiologia clínica para controle de infecção em serviço de saúde públic. Anvisa-Ministério da Saúde, 1 ed. Disponível:http://www.ccih.med.br/mod_7_2004.pdf. Acesso em 20/03/2006.

LODDER, J. 1970. **The Yeast: a taxonomic study**. Oxford: North Holland Publishing Company. 1395p.

MENDES, B.V. 1997. Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável do Semi-árido. In: Mendes, B. V. SEMACE. Fortaleza. p. 210.

MENNA, M. DI. 1965. Yeasts in New Zealand soils. Soil Bureau, Department of Scientific and Industrial Research, Lower Hut. Sept.

MENNA, M. DI. 1966. Yeasts in Antarctic soils. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 32(1):29-38.

MITCHELL, D. H.; SORRELL, T. C.; ALLWORTH, A. M.; HEALTH, C. H.; MCGREGOR, A. R.; PAPANAOUM, K.; RICHARDS, M. J.; GOTTLIEB, T. 1995. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin. Infect. Dis.* 20:(3). 611-616.

MOK, W. Y.; LUIZAO, R. C. C.; SILVA, M. S. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; MUNIZ, E. G. 1984. Ecology of Pathogenic Yeasts in Amazonian Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 390-394.

OVREAS, L. & TORSVIK, V. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36:303-315.

POLIAKOVA, A. V.; CHERNOV, I. I. U.; PANIKOV, N. S. 2001. Yeast biodiversity in hydromorphic soils with reference to grass-sphagnum swamp in western Siberia and the Hammocky tundra region (Barrow, Alaska). *Mikrobiologiya*. Sep-Oct;70(5):714-20.

QUEIROZ, L. P. DE; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. (eds.). 2006. Towards greater knowledge of the Brazilian Semi-arid biodiversity. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT).

SAMPAIO, E. V. S. B. 1996. Overview of the Brazilian caatinga. In: Burlock, S. H.; Mooney, H. A.; Medina, E. (eds.). *Seasonaly dry tropical forest*. Cambridge University Press. p. 35-63.

SIDRIM, J. J. C., MOREIRA, J. L. B. 2004. **Micologia Médica a Luz de autores contemporâneos**. . 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Keogan, 287p.

SLAVIKOVA, E. & VADKERTIOVA, R. 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. *J Basic Microbiol.*;40(3):207-12.

SNELLER, M.R. & SWATEK, F.W. 1974. .Distribution of the genus *Cryptococcus* in Southern California soils. *Sabouraudia*. 12(1):46-53. Mar.

STAHL P. D.; PARKIN T. B.; CHRISTENSEN M. 1999. Fungal presence in paired cultivated and uncultivated soils in central Iowa, USA. *Biol Fertil Soils* 29: 92-97.

TABATABAI, A. 1994. Soil enzymes. In: Waver, R.W, Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analyses, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*, 2

ed. Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI, USA.
p.775-833.

YARROW, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds.) **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science. p. 77-100.

Tabela 1. Número de isolados e táxons de leveduras e fungos semelhantes a leveduras do solo das localidades de Mucugê, Ipirá e Paulo Afonso do semi-árido da Bahia.

Locais	Nº. Amostras Solo	Leveduras		Análise do Solo	
		Nº. de isolados	Nº. Táxons	pH/H ₂ O	T °C
Mucugê	06	52	31	5,22±1,01	26,5±2,5
Ipirá	06	31	15	5,12±0,69	26,5±1,5
Paulo Afonso	06	17	08	5,57±0,85	27,5±2,5
Total	18	100	54	-	-

Tabela 2. Amostras de solos analisadas de Mucugê mostrando os números de isolados, táxons e os valores de pH e temperatura.

Amostras/Solo Mucugê	Períodos de coleta	Leveduras		Análises	
		N. de isolados	N. de táxons	pH/H ₂ O	T °C
MSolo 1	Período chuvoso	06	05	5,48	25
MSolo 2		03	03	6,23	24
MSolo 3		04	04	5,58	24
MSolo 4		08	07	4,95	29
MSolo 5	Período seco	14	12	4,62	28
MSolo 6		17	14	4,21	28

Tabela 3. Amostras de solos analisadas de Ipirá mostrando os números de isolados, táxons e os valores de pH e temperatura.

Amostras/Solo Ipirá	Períodos de coleta	Leveduras		Análises	
		N. de isolados	N. de táxons	pH/H ₂ O	T °C
ISolo 1	Período chuvoso	02	01	5,81	26
ISolo 2		03	02	5,52	26
ISolo 3		03	02	5,36	25
ISolo 4		11	07	4,43	28
ISolo 5	Período seco	07	05	4,86	27
ISolo 6		05	03	4,78	28

Tabela 4. Amostras de solos analisadas de Paulo Afonso mostrando os números de isolados, táxons e os valores de pH e temperatura.

Amostras/Solo Paulo Afonso	Períodos de coleta	Leveduras		Análises	
		N. de isolados	N. de táxons	pH/H ₂ O	T °C
PSolo 1	Período chuvoso	00	00	6,42	25
PSolo 2		05	04	5,03	27
PSolo 3		01	01	6,18	26
PSolo 4		04	02	4,97	29
PSolo 5	Período seco	05	03	4,72	29
PSolo 6		02	02	5,10	30

Tabela 5. Leveduras e fungos semelhantes a leveduras isoladas do solo das três localidades do semi-árido da Bahia, Mucugê, Ipirá e Paulo Afonso, nos período seco e chuvoso.

Leveduras	Período Chuvoso			Período Seco			Total
	Mucugê	Ipirá	P. Afonso	Mucugê	Ipirá	P. Afonso	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	-	-	-	02	-	-	02
<i>Brettanomyces sp.</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>Bullera alba</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>Candida sp.</i>	01	-	-	01	-	-	02
<i>C. catenulata</i>	-	-	02	03	02	-	07
<i>C. colliculosa</i>	-	-	-	01	01	-	02
<i>C. famata</i>	-	-	-	01	01	-	02
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	01	-	02	03
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	-	-	01	-	01
<i>C. parapsilosis</i>	02	03	-	03	-	-	08
<i>C. zeylanoides</i>	-	-	-	02	01	01	04
<i>C. insectorum</i>	01	01	-	-	-	-	02
<i>C. robusta</i>	01	-	02	-	-	-	03
<i>C. sake</i>	-	-	-	02	02	-	04
<i>Cryptococcus sp.</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>C. albidus</i>	-	-	-	01	01	-	02
<i>C. humicola</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>C. laurentii</i>	01	-	-	02	-	03	06
<i>C. luteolus</i>	01	-	-	01	-	-	02
<i>C. terreus</i>	-	01	-	-	-	-	01
<i>Hormonema schizolunatum</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>Levedura negra "black-yeast"</i>	-	-	-	03	-	-	03
<i>Pichia ohmeri</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>Rhodotorula sp.</i>	01	-	-	-	-	-	01
<i>R. glutinis</i>	01	03	-	01	02	01	08
<i>R. minuta</i>	01	02	-	01	03	-	07
<i>R. mucilaginoso</i>	02	03	02	02	01	02	12
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>S. roseus</i>	-	-	-	01	02	-	03
<i>Schizosaccharomyces sp.</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>Trichosporon pullulans</i>	01	01	-	01	-	-	03
<i>T. dulcitum</i>	-	-	-	01	-	02	03
Total	13	14	06	39	17	11	-
Total Geral		33			67		100

ARTIGO 2

DIVERSIDADE E FILOGENIA DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO DO MUNICÍPIO DE MUCUGÊ, SEMI-ÁRIDO DA BAHIA, BRASIL.

Elaborado conforme normas da Revista ao qual será submetido:

“Brazilian Journal of Microbiology”

DIVERSIDADE E FILOGENIA DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO DO MUNICÍPIO DE MUCUGÊ, SEMI-ÁRIDO DA BAHIA, BRASIL.

Misael Silva Ferreira Costa¹; Lusinete Aciole de Queiroz¹; Aristóteles Góes Neto²; Ana Paula Trovatti Uetanabaro².

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, Brasil.

RESUMO

O estudo foi realizado no município de Mucugê, região do semi-árido da Bahia. As coletas do solo foram realizadas em período seco (agosto/setembro) e chuvoso (fev/março). Um total de 82 leveduras foram isoladas e submetidas à caracterização fenotípica. Do total de isolados analisados 52 foram identificadas pelos testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos e 30 foram submetidas à identificação molecular, seguida de análise filogenética. As espécies com maior frequência de ocorrência foram *Brettanomyces bruxellensis*, *Bullera alba*, *Candida catenulata*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus laurentii*, *C. luteolus*, *Rhodotorula mucilaginosa*., *R. glutinis*, *Sporobolomyces roseus* e *Trichosporon pullulans*. Dos 30 isolados submetidos à caracterização molecular, foram obtidas 22 seqüências da região D1/D2 do gene codificador do rRNA 26S. Um total de 12 grupos foram reconhecidos após a comparação com seqüências depositadas no GenBank. Os táxons *Rhodospiridium diobovatum* (100%), *Hortaea werneckii* (98%), *Cryptococcus podzolicus* (98%), *Pseudozyma aphidis* (97%), *Rhodotorula slooffiae* (97%) e *Rhodotorula laryngis* (97%), apresentaram a maior porcentagem de similaridade com as seqüências estudadas. O grau de significância (valor E) para todas as seqüências estudadas foi extremamente baixo, sugerindo confiabilidade nas análises de similaridade. Na análise filogenética foram evidenciados 20 grupos, a maioria apresentando suporte estatístico (valor de *bootstrap*) superior a 90%, corroborando os grupos formados.

Palavras-chave: levedura, diversidade, filogenia, semi-árido, Bahia.

ABSTRACT

The study it was carried out in the municipality of Mucugê, localities of the Semi-arid region of the State of Bahia, Brazil. Collections were performed in both dry (August/September) and rainy (February/March) period. A total of 82 isolates were phenofenotipically characterized. 52 isolates were identified by the morphological, biochemical and physiological tests and 30 isolates were identified by molecular characterization, including a phylogenetic analysis. The main identified species were *Brettanomyces bruxellensis*, *Bullera alba*, *Candida catenulata*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus laurentii*, *C. luteolus*, *Rhodotorula mucilaginosa*., *R. glutinis*, *Sporobolomyces roseus* and *Trichosporon pullulans*. 22 sequences of D1/D2 region rRNA 26S gene were obtained from the 30 isolates. A total of 12 groups were recognized comparing the obtained sequences with deposited sequences in GenBank. *Rhodospiridium diobovatum* (100%), *Hortaea werneckii* (98%), *Cryptococcus podzolicus* (98%), *Pseudozyma aphidis* (97%), *Rhodotorula slooffiae* (97%) and *Rhodotorula laryngis* (97%) exhibited the highest similarity percentage with the sample sequences. Significance (E value) for all the studied sequences were extremely low, suggesting high confiability in the similarity analyses. In the phylogenetical analysis 20 groups were retrieved, most of them with 90% or higher bootstrap values superior 90%, corroborating the groups formed in the tree.

Key words: yeast, diversity, phylogeny, semi-arid, Bahia

INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente complexo e dinâmico em que a atividade biológica é governada na maior parte por microrganismos. O papel dos fungos no solo é extremamente complexo e fundamental ao ecossistema do solo, desempenhando um papel importante na ciclagem de nutrientes, no desenvolvimento e saúde de plantas (2).

As leveduras são membros importantes em muitos ecossistemas contribuindo de forma significativa para a biodiversidade (7). O solo é um reservatório crucial para a conservação e desenvolvimento de determinadas espécies de leveduras (19).

Estudos sobre a diversidade de leveduras associadas ao solo têm sido realizados em várias partes do mundo, revelando uma rica distribuição (4,3,6,14,15,23,22,20).

No Brasil são poucos os trabalhos realizados sobre diversidade de leveduras do solo. Destaca-se o realizado por Mok *et al.* (17) que isolaram 82 espécies do solo da Amazônia, tendo como gêneros mais freqüentes a *Candida*, *Rhodotorula*, e *Trichosporon*.

Estudos sobre a diversidade de leveduras associadas ao solo no semi-árido da Bahia não são conhecidos. O interesse no estudo da diversidade do semi-árido é crescente, já que pode gerar produtos no campo da biotecnologia.

Devido as limitações das técnicas tradicionais para identificação das leveduras, métodos moleculares têm sido empregados, facilitando significativamente a identificação desses fungos (2,8,27).

A taxonomia convencional de leveduras nem sempre resulta em uma identificação correta, não somente ao nível de espécie, mas, freqüentemente, também ao nível de gênero. Por esse motivo a biologia molecular tem sido cada vez mais usada como uma importante ferramenta auxiliar na identificação de leveduras, principalmente de espécies com difícil visualização de características micromorfológicas essenciais para identificação. Além disso, é uma ferramenta indispensável na análise filogenética de leveduras (11).

A região D1/D2 do 26S rDNA de grande parte das leveduras conhecidas já se encontra seqüenciada e observa-se que essa região é capaz de diferenciar quase todas as espécies de leveduras testadas, visando estudos de taxonomia (11).

O presente trabalho apresenta dados inéditos sobre a diversidade e filogenia de alguns grupos de leveduras do solo de Mucugê, município do semi-árido da Bahia, fornecendo subsídios para estudos mais extensos e aplicados.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e coleta das amostras de solo

O município de Mucugê localizado na Chapada Diamantina a 448Km da capital, Salvador, BA. Possui área de 2.491,80 Km² e altitude de 981m, nas coordenadas entre 13° 21' S e 41° 22' W. A vegetação é composta de savanas gramíneo-lenhosas com florestas de galeria e refúgios ecológicos montanos. O clima é tropical semi-úmido com temperaturas médias mínima de 14° C e máxima de 27° C.

Foram realizadas duas coletas na região, uma no período chuvoso (março/2005) e a outra no período seco (setembro/2005), obtendo-se um total de seis amostras de solo.

As amostras de solo foram coletadas em perfil da superfície a uma profundidade de 20 cm, e posteriormente acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da UEFS-BA. A determinação da temperatura do solo foi realizada in loco através de termômetro digital e a do pH utilizando-se a base metodológica de Mok *et al.* (17).

Isolamento e identificação clássica das leveduras

De cada amostra foram pesados 10g do solo em triplicatas e colocados em 90 mL de H₂O destilada/esterilizada e posteriormente foram preparadas suspensões aquosas na diluição de 10⁻². Para obtenção de cultura, 0,2 mL da suspensão foi semeada em quadruplicatas na superfície do meio ágar YMA (extrato de levedura e extrato de malte) acrescido de cloranfenicol contidos em placa de Petri, e mantidas a temperatura de 27 °C±1. As amostras obtidas foram purificadas e identificadas de acordo com Lodder, (12); Kreger Van Rij., (10); Barnett *et al.*, (1) e Yarrow, (28) e através do sistema VITEK® da Biomérieux. As amostras que não foram identificadas pela forma clássica foram submetidas à identificação molecular.

Tratamento Estatístico

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Identificação Molecular

Extração do DNA das leveduras

As amostras não identificadas fenotipicamente foram cultivadas em 10 mL de ágar Yeast Peptona Dextrose (YPD) a 27°C por 12 horas a 250 rpm em shaker. Foi transferido 1 mL desse cultivo para microtubo de 2 mL. Com auxílio de um bastão de vidro o material foi macerado e pulverizado em contato com nitrogênio líquido. Após esse processo, adicionou-se 1 mL de tampão CTAB [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; 2% PVP-40] e 4 µl de β-mercaptoetanol, pré-aquecido a 65°C, e homogeneizado. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho-maria a 60-65°C por 20-30 minutos, sendo agitados periodicamente mantendo o extrato ressuspensionado. Adicionou-se aos tubos clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v/v) e estes foram mantidos sob agitação por 60 minutos, centrifugados à temperatura ambiente por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido para um novo microtubo de 2 mL. Adicionou-se então o mesmo volume de isopropanol ou 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C e misturou-se suavemente até a formação de um precipitado. Essa amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (*pellet*) foi lavado com 1 mL de etanol 70% duas vezes e posto para secar ao ar em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensionado em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM) e incubado a 4°C por meia hora. A suspensão foi conservada a -20°C até o uso. A verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada através de corrida eletroforética em 0,7% (w/v) gel de agarose em tampão TBE (Tris-borato 0,045 M, EDTA 0,001 M, pH 8), a 80 V por 60 minutos.

Reação de PCR – Amplificação dos fragmentos alvo

As reações em cadeia da polimerase (PCR) simétricas (21) foram executadas em um termociclador Mastercycler - Eppendorf. As reações foram realizadas em um volume reacional total de 50 µL, contendo os seguintes componentes: 50 ng de DNA molde, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP; 3,75 mM de MgCl₂; 5,0 U de

Taq DNA polimerase em 50 mM KCl e 20 mM Tris - HCl, pH 8,4. Os seguintes iniciadores (*primers*) foram utilizados para a amplificação LR0R (5'–ACCCGCTGAACTTAAGC-3') e LR5 (5'–TCCTGAGGGAACTTCG-3'). (15) Em geral, 3µL de cada amostra amplificada foi submetida à eletroforese em gel de agarose (1%) e comparada a um padrão de DNA com bandas variando de 100 a 2000 pb (Mass Lader Invitrogen). Após a amplificação os produtos de PCR (amplicons) foram purificados e as amostras armazenadas a 20°C para seqüenciamento.

Seqüenciamento e análise dos dados

A reação de seqüenciamento foi realizada usando para cada amostra 2 µL de tampão (save money), 2 µL de Big Dye terminator, 1 µL de *primer* (3,2 pmol/µL), 2 µL do produto do PCR e 5 µL de água ultrapura, completando o volume final de 12 µL. Após a preparação do mix, as amostras foram colocadas no termociclador para a reação do seqüenciamento. A reação foi iniciada com uma desnaturação a 94 °C por 4 min, seguindo 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 10 seg (anelamento) e 60 °C por 4 min (extensão enzimática).

Após a reação os produtos de seqüenciamento foram purificados completando-se o volume para 20 µL (acrescentando 8 µL aos 12 µL). Posteriormente foram adicionados 2 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,6 e 50 µL de etanol 95%. As amostras foram agitadas suavemente em vórtex e deixadas precipitando durante 15 min a temperatura ambiente (no escuro). Em seguida foram centrifugadas durante 30 min a 14000 rpm, os sobrenadantes foram descartados, e os *pellets* lavados com 100 µL de etanol a 70%. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 14000 rpm, descartados os sobrenadantes, e então secos à temperatura ambiente por 30 min. Ao final foram adicionados 18 µL de formamida + EDTA (misturando-se bem para ressuspender o *pellet*) e, desta solução, transferidos 9 µL para placa de seqüenciamento. As amostras foram levadas ao seqüenciador SCE 2410 (Spectrummedix LLC) para eletroforese capilar.

Os eletroferogramas foram analisados visualmente e editaram-se as seqüências utilizando o programa FinchTV 1.4. (Geospiza Inc.). As seqüências resultantes foram submetidas a o programa BLASTn do NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov), alinhadas utilizando o programa Clustral X (24) e posteriormente ajustadas manualmente com as seqüências obtidas no Genbank (submissão direta).

Análise Filogenética

A análise filogenética foi efetuada com o programa PAUP versão 4.0b10 (24), utilizando-se o método da parcimônia sem pesagem, atribuindo-se pesos iguais a todos os tipos de substituições nucleotídicas. Utilizou-se uma sequência homóloga do *Schizosaccharomyces pombe* como grupo externo.

Avaliou-se a robustez dos clados usando o índice de *bootstrap* (5), com 1000 pseudoreplicações. A árvore de consenso estrito gerada foi editada utilizando-se o programa TreeView versão 1.6.6 (18).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento, purificação e identificação das leveduras do solo.

Um total de 82 amostras de leveduras e fungos semelhantes a leveduras (leveduróides) de diferentes morfotipos macroscópicos, foram selecionadas e purificadas pela técnica do esgotamento em placas de Petri contendo ágar YEPG. Das 82 sepas, 52 foram identificadas pelo método clássico e 30 submetidas à identificação molecular.

Das 52 amostras de leveduras identificadas, 25 apresentaram afinidades basidiomicéticas e 23 ascomicéticas, distribuídas em 30 espécies; e 04 fungos semelhantes a leveduras (leveduróides), que, na sua maioria, corresponderam às leveduras negras ou “black-yeasts”. Na tabela 01 estão representadas as espécies de acordo com o período de coleta, seco ou chuvoso, suas afinidades basidiomicéticas, ascomicéticas ou leveduroides - “black-yeasts”. Alguns isolados foram identificados apenas ao nível de gênero, significando que a identificação pelos métodos convencionais não foi possível, podendo representar possíveis biótipos ou, até espécies novas.

As espécies mais com maior frequência de ocorrência estão entre os gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, com de 10, 05 e 04 espécies, respectivamente (Tabela 01). As espécies mais frequentes foram *Candida parapsilosis*, *C. catenulata*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Cryptococcus laurentii*. Algumas dessas espécies foram citadas em trabalhos como de Mok (17) e Vital *et al.*, (27) em solos da Amazônia;

Loureiro (13) em solos de praias de Olinda, Pernambuco e Slavikova (22) em solos de florestas.

No período seco foi predominante o número de isolados e também de espécies, em relação ao período chuvoso (Tabela 2). Os valores de pH das amostras de solo do período seco foram razoavelmente ácidos entre 4,21 e 4,95 e a temperatura de 28°C a 29°C (Tabela 3). Esses valores sugerem o favorecimento da sobrevivência das leveduras neste período, e estão em conformidade com o trabalho de MOK *et al.* (17) em solos da Amazônia, que considerou a natureza razoavelmente ácida do solo um fator importante para a presença das leveduras. Vale salientar que desde 1967 CASAS-CAMPILLO (4) revelou que diversos estudos demonstravam que a temperatura e o pH são fatores limitantes para a propagação de leveduras no solo.

Caracterização Molecular

Os fragmentos amplificados pelos *primers* LR0R e LR5 apresentaram um tamanho médio de 550 pb, conforme já descrito na literatura (9).

Dos 30 isolados submetidos à caracterização molecular, foram obtidas 22 seqüências da região D1/D2 do gene codificador do rRNA 26S. Um total de 12 grupos foram reconhecidos depois de submetidos à comparação com as seqüências do GenBank através do BLAST (NCBI). Os táxons colocados na Tabela 4 foram os que apresentaram a maior porcentagem de similaridade com as seqüências estudadas. O grau de significância (valor de E) para todas as seqüências estudadas foi muito baixo, sugerindo confiabilidade nas análises de similaridade.

A maioria dos isolados (Grupos I, III, V, VIII, IX, X, XII) apresentou similaridade com as seqüências do GenBank acima de 95%, porém os demais (Grupos II, IV, VI, VII, XI) demonstraram similaridade inferior a 94% (Tabela 4). Foram obtidos os seguintes grupos: *Hortaea werneckii* (I), *Pichia guilliermondii* (II), *Candida parapsilosis* (III), *Rhodotorula glutinis* (IV), *Rhodotorula laryngis* (V), *Rhodotorula phylloplana* (VI), *Rhodotorula bacarum* (VII), *Rhodotorula slooffiae* (VIII), *Rhodotorula minuta* (IX), *Pseudozyma aphidis* (X), *Cryptococcus podzolicus* (XI) e *Rhodospiridium diobovatum* (XII).

Três grupos pertencem as leveduras ascomicéticas, *Hortaea werneckii* (I), *Pichia guilliermondii* (II), *Candida parapsilosis* (III) e as demais são basidiomicéticas. Algumas seqüências apresentaram porcentagem de similaridade relativamente baixa

como, por exemplo, o grupo II (*P. guilliermondii*) com similaridade de apenas 84%, e o número de pares de bases alinhados também foi pequeno (238 pb), o que sugere que este isolado provavelmente seja uma nova espécie de levedura.

Dentro do Grupo IX, puderam ser observadas diferenças na identidade das seqüências. Embora todas as seqüências estudadas terem apresentado maior similaridade com a espécie *Rhodotorula minuta*, duas delas MC56 e MC80 apresentaram similaridade acima de 95% com as seqüências desta espécie, enquanto que os outros dois isolados MC60 e MC75 demonstraram similaridade mais baixa 87% e 89%, respectivamente. Além disso, o número de pares de bases alinhados também foi pequeno 385 pb e 287 pb, respectivamente. O mesmo pode ser observado com o Grupo XI, onde dois dos isolados MC61 e MC82 apresentaram elevada similaridade 98% e 96%, respectivamente com a espécie *Cryptococcus podzolicus*, enquanto que o isolado MC59 apresentou somente 88% de similaridade com essa seqüência. Também se evidencia no Grupo XII, com dois isolados MC72 e MC63, a mesma situação. O isolado MC72 demonstrou 100% de similaridade com a seqüência de *Rhodospiridium diobovatum*, e o isolado MC63 apresentou uma porcentagem de similaridade de 91%, além de um pequeno número de pb alinhados (200 pb).

Os dados acima descritos sugerem que estes isolados (MC60, MC75, MC59 e MC63) também possam pertencer a novas espécies de leveduras.

Análise filogenética

Na árvore de consenso estrito são evidenciados 20 grupos de **A a U**. A maioria apresentando suporte estatístico superior a 90% na análise de *bootstrap*, o que sugere uma grande confiabilidade em relação ao táxons agrupados (Figura 1).

O grupo **U**, com valor de *bootstrap* de 100% corresponde a todas as leveduras basidiomicéticas. Um dos subgrupos deste grupo, o grupo **E** inclui as amostras MC59, MC61 e MC82 e seqüências de *Cryptococcus podzolicus* com um suporte de 100%, sugerindo que estas amostras correspondem a este táxon. No grupo **H**, também suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, são agrupadas as MC54, MC55 e MC70 com seqüências de *Pseudozyma aphidis*, sugerindo que estas amostras pertençam a esta espécie.

O grupo **I** com valor de *bootstrap* de 95% inclui as amostras MC80, MC56, MC73, MC60, MC75, MC79, MC58, MC66, MC72, MC76 e MC63 do presente estudo

e seqüências de *Rhodoturula* spp. e *Rhosdosporidium diobovatum*. Diferentemente do grupo **J** com valor de *bootstrap* de 100% que compreende somente as amostras MC80, MC56, MC73, MC60, MC75, MC79, MC58 e MC66 e seqüências de *Rhodoturula minuta*, *R. sloffiae* e *R. laryngis*, o grupo **L** inclui seqüências de *Rhosdosporidium diobovatum* e *Rhodoturula glutinis*, sugerindo que estas espécies estão mais próximas entre si do que as demais espécies de *Rhodoturula* utilizadas neste estudo, ao menos com base no fragmento gênico utilizado. O grupo **N** com valor de *bootstrap* de 100% é constituído pela amostra MC66 e pelas seqüências de *Rhodoturula laryngis*, indicando que esta amostra pertence a esta espécie. No entanto diversas amostras identificadas por similaridade via BLAST como *Rhodoturula minuta* e *R. sloffiae*, embora próximas aos grupos **O** e **P**, que correspondem respectivamente a seqüências de *R. minuta* e *R. sloffiae* não estão incluídas nestes grupos. Pelo perfil fisiológico pode-se contatar que as amostras MC80, MC56, MC75, MC60, MC73, MC79, MC58, correspondente as espécies *R. minuta* e *R. sloffiae* estão muito próximas.

O grupo **B** com valor de *bootstrap* de 100% é formado por dois grupos também com suporte estatístico de 100%, o grupo **C** que inclui a amostra MC64 e seqüências de *Pichia guilliermondii* e grupo **D** com amostra MC71 e *Candida parapsilosis*, ambas com 100% de suporte estatístico, sugerindo a confirmação que estas amostras pertencem as respectivas espécies. O grupo **A** inclui a amostra MC22 e seqüências de *Hortaea werneckii*, também suportado por um valor máximo de *bootstrap*, o que também indica que esta amostra pertence a este táxon.

Tabela 1. Táxons de leveduras com afinidades basidiomicéticas, ascomicéticas e “black-yeasts” isoladas de amostras de solo de Mucugê – BA, nos períodos chuvoso e seco, 2005.

Leveduras	N. de ordem	Basidiomicéticas		Ascomicéticas		Leveduroides “black-yeasts”		Total
		P.S.	P.C.	P.S.	P.C.	P.S.	P.C.	
<i>Aureobasidium pullulans</i> .	MC11			x				01
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	MC19	x						02
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	MC43	x						
<i>Brettanomyces sp.</i>	MC21	x						01
<i>Bullera alba</i>	MC26			x				01
<i>Candida sp.</i>	MC03			x				02
<i>Candida sp.</i>	MC37				x			
<i>Candida catenulata</i>	MC04			x				
<i>Candida catenulata</i>	MC33			x				03
<i>Candida catenulata</i>	MC45			x				
<i>Candida colliculosa</i>	MC07			x				01
<i>Candida famata</i>	MC09			x				01
<i>Candida glabrata</i>	MC13			x				01
<i>Candida parapsilosis</i>	MC01			x				
<i>Candida parapsilosis</i>	MC35			x				
<i>Candida parapsilosis</i>	MC37				x			05
<i>Candida parapsilosis</i>	MC39				x			
<i>Candida parapsilosis</i>	MC14			x				
<i>Candida zeylanoides</i>	MC02			x				02
<i>Candida zeylanoides</i>	MC35			x				
<i>Candida insectorum</i>	MC49				x			01
<i>Candida robusta</i>	MC51				x			01
<i>Candida sake</i>	MC16			x				02
<i>Candida sake</i>	MC44			x				
<i>Cryptococcus sp.</i>	MC05	x						01
<i>Cryptococcus albidus</i>	MC24	x						01
<i>Cryptococcus humicola</i>	MC20	x						01
<i>Cryptococcus laurentii</i>	MC08	x						
<i>Cryptococcus laurentii</i>	MC17	x						03
<i>Cryptococcus laurentii</i>	MC52		x					
<i>Cryptococcus luteolus</i>	MC18	x						02
<i>Cryptococcus luteolus</i>	MC50		x					
<i>Hormonema schizolunatum</i>	MC28					x		01
<i>Levedura negra “black-yeasts”</i>	MC22					x		
<i>Levedura negra “black-yeasts”</i>	MC23					x		03
<i>Levedura negra “black-yeasts”</i>	MC27					x		
<i>Pichia ohmeri</i>	MC12			x				01
<i>Rhodotorula sp.</i>	MC48		x					01
<i>Rhodotorula glutinis</i>	MC30	x						02
<i>Rhodotorula glutinis</i>	MC47		x					
<i>Rhodotorula minuta</i>	MC34	x						02
<i>Rhodotorula minuta</i>	MC46		x					
<i>Rhodothorula mucilaginosa</i>	MC36	x						
<i>Rhodothorula mucilaginosa</i>	MC06	x						
<i>Rhodothorula mucilaginosa</i>	MC40		x					04
<i>Rhodothorula mucilaginosa</i>	MC42		x					
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	MC29	X						01
<i>Sporobolomyces roseus</i>	MC15	X						01
<i>Schizosaccharomyces sp.</i>	MC41			x				01
<i>Trichosporon pullulans</i>	MC10	X						02
<i>Trichosporon pullulans</i>	MC38		x					
<i>Trichosporon dulcitum</i>	MC32	X						01
TOTAL		17	08	18	05	04	00	52

P.S. = Período seco

P.C. = Período chuvoso

Tabela 2. Leveduras isoladas de amostras de solo de Mucugê, semi-árido da Bahia nos períodos chuvoso e seco e respectivos valores de pH e temperatura dos solos.

Leveduras	Período Chuvoso						Período Seco					
	MSolo 1		MSolo 2		MSolo 3		MSolo 4		MSolo 5		MSolo 6	
	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C
	H ₂ O		H ₂ O		H ₂ O		H ₂ O		H ₂ O		H ₂ O	
	5,48	25	6,23	24	5,87	24	4,95	29	4,62	28	4,21	28
<i>Aureobasidium pullulans</i> .												x
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>												x
<i>B. bruxellensis</i>												x
<i>Brettanomyces sp.</i>												x
<i>Bullera alba</i>												x
<i>Candida sp.</i>							x					
<i>Candida sp.</i>			X									
<i>C. catenulata</i>									x			
<i>C. catenulata</i>												x
<i>C. catenulata</i>									x			
<i>C. colliculosa</i>												x
<i>C. famata</i>												x
<i>C. glabrata</i>												x
<i>C. parapsilosis</i>												x
<i>C. parapsilosis</i>									x			
<i>C. parapsilosis</i>					x							
<i>C. parapsilosis</i>	x											
<i>C. parapsilosis</i>							x					
<i>C. zeylanoides</i>							x					
<i>C. zeylanoides</i>							x					
<i>C. insectorum</i>			X									
<i>C. robusta</i>					x							
<i>C. sake</i>									x			
<i>C. sake</i>									x			
<i>Cryptococcus sp.</i>									x			
<i>C. albidus</i>									x			
<i>C. humicola</i>							x					
<i>C. laurentii</i>							x					
<i>C. laurentii</i>									x			
<i>C. laurentii</i>					x							
<i>C. luteolus</i>					x							
<i>C. luteolus</i>												x
<i>Hormonema schizolunatum</i>												x
<i>Levedura negra "black-yeasts"</i>												x
<i>Levedura negra "black-yeasts"</i>												x
<i>Levedura negra "black-yeasts"</i>												x
<i>Pichia ohmeri</i>									x			
<i>Rhodotorula sp.</i>			X									
<i>R. glutinis</i>	x											
<i>R. glutinis</i>									x			
<i>R.. minuta</i>							x					
<i>R.. minuta</i>	x											
<i>R.mucilaginoso</i>	x											
<i>R.mucilaginoso</i>	x											
<i>R..mucilaginoso</i>									x			
<i>R.mucilaginoso</i>												x
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>									x			
<i>S. roseus</i>									x			
<i>Schizosaccharomyces sp.</i>												x
<i>Trichosporon pullulans</i>	x											
<i>T.pullulans</i>									x			
<i>T.dulciturum</i>							x					
Total	06		03		04		08		14		17	

Tabela 3. Amostras de solo de Mucugê, semi-árido da Bahia, com numero de isolados e táxons de leveduras e análise do pH e Temperatura.

Amostras/Solo Mucugê	Períodos de coleta	Leveduras		Análises	
		N. de isolados	N. de táxons	pH/H ₂ O	T °C
MSolo 1	Período chuvoso	06	05	5,48	25
MSolo 2		03	03	6,23	24
MSolo 3		04	04	5,58	24
MSolo 4		08	07	4,95	29
MSolo 5	Período seco	14	12	4,62	28
MSolo 6		17	14	4,21	28

Tabela 4. Dados obtidos das comparações das seqüências D1/D2 do rDNA 26S das leveduras isoladas com as disponíveis no banco de dados (GenBank).

Grupos	Táxon(s)	N. pb alinhados (Score)	Grau de significância (Valor E)	Identidade seqüência (%)	N. Isolados
I	<i>Hortaea werneckii</i>	922	0.0	98%	MC22
II	<i>Pichia guilliermondii</i>	238	4e ⁻⁶¹	84%	MC64
III	<i>Candida parapsilosis</i>	781	0.0	96%	MC71
IV	<i>Rhodotorula glutinis</i>	805	0.0	94%	MC76
V	<i>Rhodotorula laryngis</i>	821	0.0	97%	MC66
VI	<i>Rhodotorula phylloplana</i>	603	7e ⁻¹⁷¹	91%	MC62
VII	<i>Rhodotorula bacarum</i>	636	0.0	93%	MC57
VIII	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	856	0.0	96%	MC73
	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	813	0.0	97%	MC79
	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	823	0.0	96%	MC58
IX	<i>Rhodotorula minuta</i>	716	0.0	96%	MC80
	<i>Rhodotorula minuta</i>	841	0.0	95%	MC56
	<i>Rhodotorula minuta</i>	287	7e ⁻⁷⁵	89%	MC75
	<i>Rhodotorula minuta</i>	385	3e ⁻¹⁰⁵	87%	MC60
X	<i>Pseudozyma aphidis</i>	795	0.0	97%	MC54
	<i>Pseudozyma aphidis</i>	797	0.0	96%	MC55
	<i>Pseudozyma aphidis</i>	597	4e ⁻⁶⁹	92%	MC70
XI	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	496	1e ⁻³⁸	88%	MC59
	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	892	0.0	98%	MC61
	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	844	0.0	96%	MC82
XII	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	771	0.0	100%	MC72
	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	200	1e ⁻⁴⁹	91%	MC63

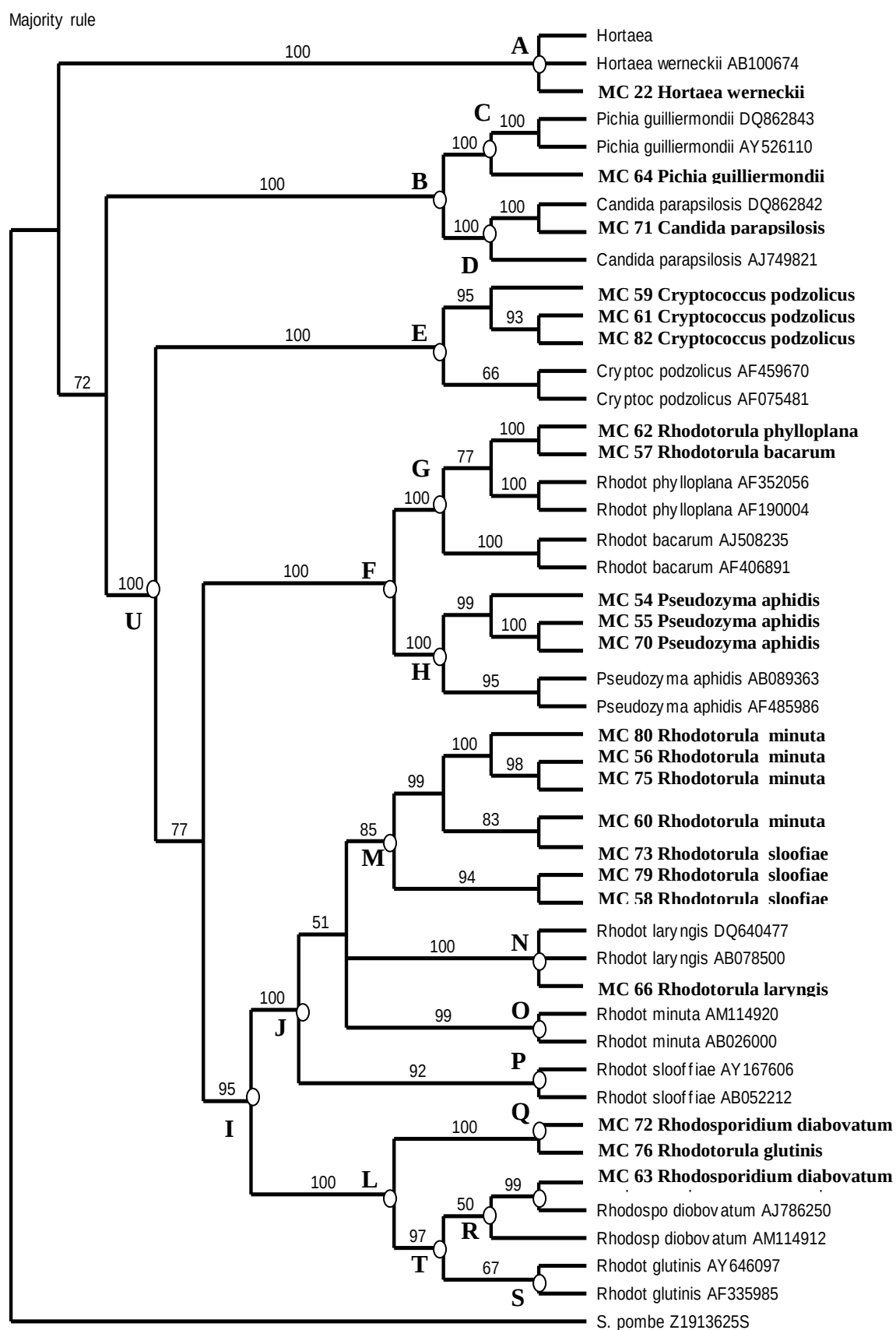


Figura 1. Arvore de consenso estrito da análise filogenética pelo critério de parcimônia sem pesagem. Os números acima dos ramos correspondem aos valores percentuais de *bootstrap*.

REFERÊNCIAS

1. Barnett J.A.; Payne R.W.; Yarrow D. Yeasts, characteristics and identification. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1139p. 1990.
2. Bridge, P.; Spooner, B. Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil* 232:147–154. 2001.
3. Capriotti, A. Yeasts from U.S.A. soils. *Arch. Mikrobiol.* 6;57(4):406-13. 1967.
4. Casas-Campillo, C. Soil yeasts. *Rev Latinoam Microbiol Parasitol (Mex)*. 9(2):91-7. Apr-Dec. 1967.
5. Felsenstein, J., Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, p.783-91. 1985.
6. Combs, T.J.; Murchelano, R.A.; Jurgen, F. Yeasts isolated from Long Island Sound. *Mycologia*. 63(1):178-81. Jan-Feb. 1971.
7. Fleet G. H. Yeasts in natural habitats. Food Tech-degrading *Pseudoaminobacter* sp. isolated from Cananol. *Biotechnol.* 36, 285-289. 1998.
8. Gomes, N. C. M.; Fagbola, O.; Costa, R.; Rumjanek, N. G.; Buchner, A.; Mendona-Hagler, L.; Smalla, K. Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, N. 7. Vol. 69. p. 3758–3766. July 2003.
9. Hinrikson, H. P.; Hurst, S. F.; Lott, T. J.; Warnock, D. W.; Morrison, C. J. 2005. Assessment of Ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1, and Internal Transcribed Spacer 2 Regions as Targets for Molecular Identification of Medically Important *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43 (5):2092–2103.
10. Kreger-Van Rij, N.J.W. The yeasts, a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1082 p. 1984.
11. Kurtzman, C. P.; Robnett, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73:331-371. 1998.
12. Lodder, J. The Yeast: a taxonomic study. Oxford: North Holland Publishing Company. 1395p. 1970.

13. Loureiro, S.T. A.; Cavalcanti, M. A. Q.; Neves, R. P.; Passavante, J. Z. O. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 36:333-337. 2005.
14. Menna, M. Di. Yeasts in Antarctic soils. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 32(1):29-38. 1966.
15. Menna, M. Di. Yeasts in New Zealand soils. Soil Bureau, Department of Scientific and Industrial Research, Lower Hut. Sept. 1965
16. Moncalvo, J-M.; Lutzoni, F. M.; Rehner, S. A.; Johnson, J.; Vilgalys, R. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, v.49, p.278-305. 2000.
17. Mok, W. Y.; Luizao, R. C. C.; Silva, M. S. B.; Teixeira, M. F. S.; Muniz, E. G. Ecology of Pathogenic Yeasts in Amazonian Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 390-394. 1984.
18. Page, R. D. M. *NEXUS Data Editor version 0.4.9*. 2001.
19. Phaff, H. J.; Starmer, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: *The Yeasts* (A. H. Rose and J. S. Harrison, eds.). Academic Press, London, Vol. 1, pp. 123-180. 1987.
20. Poliakova, A. V.; Chernov, I. I. U.; Panikov, N. S. Yeast biodiversity in hydromorphic soils with reference to grass-sphagnum swamp in western Siberia and the Hammocky tundra region (Barrow, Alaska). *Mikrobiologiya*. Sep-Oct;70(5):714-20. 2001.
21. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, n.4839, p.487-91. 1988.
22. Slavikova, E.; Vadkertiova, R. The occurrence of yeasts in the forest soils. *J Basic Microbiol.*;40(3):207-12. 2000.
23. Sneller, M.R.; Swatek, F.W. .Distribution of the genus *Cryptococcus* in Southern California soils. *Sabouraudia*. 12(1):46-53. Mar. 1974.
24. Swofford, D. L., *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods*, version 4.0b6. Sunderland: Sinauer. 1998.
25. Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The clustal – Windows interface: flexible strategies for multiple sequence

- alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research*, v. 24, p. 4876-4882. 1997.
26. Tomé-Júnior, J. B. Interpretação dos resultados. *In* Manual para interpretação de análise do solo. (J.B. Tomé Júnior, ed.). Agropecuária, Guaíba, p.89-107. 1997
27. Vital, M. J. S.; Abranches, J.; Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L. C. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33:230-235. 2002.
28. Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds.) *The yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science. p. 77-100.

4. CONCLUSÕES GERAIS

1. No solo do semi-árido da Bahia ocorre diversidade de táxons de leveduras;
2. Existe variabilidade de táxons entre as localidades analisadas;
3. Na localidade de Mucugê ocorre maior número e diversidade de táxons de leveduras;
4. O pH levemente ácido do solo pode favorecer a ocorrência de leveduras;
5. A temperatura do solo pode não influenciar na ocorrência de leveduras;
6. O período seco foi mais favorável à ocorrência de leveduras no solo;
7. O método molecular é uma ferramenta auxiliar na identificação de leveduras;