



JOSÉ EDUARDO ABRIL BONETT

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE CAVERNAS E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA FERMENTAR
HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS**

**LAVRAS-MG
2023**

JOSÉ EDUARDO ABRIL BONETT

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE CAVERNAS E AVALIAÇÃO DO SEU
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA FERMENTAR HIDROLISADOS
LIGNOCELULÓSICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Lopes Ferreira
Coorientador

LAVRAS-MG
2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Abril Bonett, José Eduardo.

Isolamento de leveduras de cavernas e avaliação do seu
potencial para fermentar hidrolisados lignocelulósicos / José
Eduardo Abril Bonett. - 2023.

79 p.

Orientador(a): Whasley Ferreira Duarte.

Coorientador(a): Rodrigo Lopes Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Cavernas. 2. Leveduras. 3. Hidrolisados lignocelulósicos. I.
Ferreira Duarte, Whasley. II. Lopes Ferreira, Rodrigo. III. Título.

JOSÉ EDUARDO ABRIL BONETT

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DE CAVERNAS E AVALIAÇÃO DO SEU
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA FERMENTAR HIDROLISADOS
LIGNOCELULÓSICOS**

**ISOLATION OF CAVE YEASTS AND EVALUATION OF ITS
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL TO FERMENT LIGNOCELLULOSIC
HYDROLYSATES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2023

Dr Eustáquio Souza Dias, UFLA

Dra Patrícia Gomes Cardoso, UFLA

Dr Marconi Souza Silva, UFLA

Dr Félix Gonçalves de Siqueira, Embrapa Agroenergia

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Lopes Ferreira
Coorientador

LAVRAS-MG
2023

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças para superar os momentos difíceis nesta trajetória. “Mas os que esperam em Jeová recuperarão as forças. Voarão alto como as águias. Correrão e não ficarão exaustos; Andarão e não se cansarão” (Isaías 40:31).

À minha mãe Mariela e meus irmãos Pedro, Nidia, Beatriz e Liliana por todo o apoio, incentivo e suporte.

Aos meus amigos e irmãos na fé Rodrigo, Josiane, Kênia, Izaira, Devair, Ismael e Rubens, por serem minha família em Lavras, sempre me apoiando nos momentos difíceis.

Aos meus colegas e amigos do programa, Rafael, Cidinha, Silvia e Cibele por sempre me apoiando e ajudando nos momentos desesperadores.

A meu orientador Whasley Ferreira pelos ensinamentos e sugestões transmitidas, contribuindo assim para meu crescimento profissional.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do doutorado.

Além disso, o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às demais agências de fomento pelo financiamento concedido à realização deste projeto.

Meu muito obrigado!

RESUMO

Pretendeu-se, neste trabalho, isolar, identificar e realizar uma avaliação biotecnológica de leveduras isoladas de 15 cavernas localizadas no estado de Minas Gerais. Para tal fim, usaram-se amostras de solo em distintas zonas das cavernas e, para o isolamento, realizaram-se plaqueamentos usando o meio Extrato Malte. Para a identificação das leveduras, utilizou-se a técnica de MALDI-TOF. A avaliação biotecnológica das leveduras foi realizada em relação à produção de xilitol, etanol, proteína e biomassa e, para isso aplicaram-se testes de fermentação de xilose e em hidrolisados de substratos lignocelulósicos de café. A produção de etanol foi avaliada pela técnica de HPLC, e a determinação de proteína, pelo método de Kjeldahl. A produção de biomassa foi calculada por meio de uma curva de calibração. Do isolamento, obtiveram-se 236 leveduras, analisadas por MALDI-TOF. Dessa análise, encontraram-se espécies ainda não relatadas para cavernas. Quanto à avaliação biotecnológica, foi encontrado que nenhuma cepa produziu xilitol e que algumas cepas foram capazes de produzir etanol. A respeito da produção de proteína, uma cepa identificada como *C. orthopsilosis* apresentou maior porcentagem de proteína (35,8%). Os resultados obtidos permitiram verificar que as cavernas não são ambientes totalmente isolados do meio externo. A estrutura da caverna, a sua interação com o meio externo e as alterações do meio circundante influenciam na entrada de matéria orgânica nas cavernas. Isso influencia na presença de leveduras nas diferentes zonas das cavernas. Além disso, este é o primeiro trabalho em que é realizada a caracterização biotecnológica de leveduras de caverna. Os resultados obtidos permitiram conhecer os parâmetros-chave para melhorar a produção de etanol, proteína e biomassa dessas leveduras em hidrolisados lignocelulósicos para futuros trabalhos.

Palavras-chave: Ambientes cavernícolas. MALDI-TOF. Avaliação biotecnológica. PVA

ABSTRACT

This work aimed to isolate, identify, and perform a biotechnological evaluation of yeasts isolated from 15 caves located in the state of Minas Gerais. For this purpose, soil samples from different areas of the caves were used, and for isolation, a plating was carried out using Malte Extract medium. Yeast identification was performed through MALDI-TOF. The yeast biotechnological potential was evaluated through their xylitol, ethanol, protein, and biomass production by performing xylose and coffee lignocellulosic hydrolysates fermentation tests. Ethanol and protein production was evaluated by HPLC and the Kjeldahl method, respectively. Biomass production was calculated using a calibration curve. A total of 236 yeasts were isolated and identified by MALDI-TOF, among the isolates there were species that were not reported in the literature found in caves. During the biotechnological evaluation no strain produced xylitol and a few strains produced ethanol. Regarding protein production, a strain identified as *C. orthopsilosis* presented the highest protein percentage with 35.8%. The results obtained showed that caves are not completely isolated environments from the external environment. The structure of the cave, its interaction with the external environment, and changes in the surrounding environment influences the entry of organic matter at the cave. Furthermore, this is the first work in which the yeasts biotechnological potential from caves is evaluated. The results demonstrated key parameters for ethanol, protein and biomass production of yeasts in lignocellulosic hydrolysates for future works.

Keywords: Caves. MALDI-TOF. Biotechnological evaluation. PVA

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 <i>Cavernas como habitat de microrganismos</i>	11
2.2 <i>Fatores que influenciam na presença de microrganismos em cavernas</i>	13
2.3 <i>Tipos de cavernas</i>	15
2.4 <i>Leveduras de cavernas</i>	17
REFERÊNCIAS	20
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	24
ARTIGO 1 - Isolamento e identificação de leveduras de caverna	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 METODOLOGIA	27
2.1 <i>Coleta das amostras e isolamento das leveduras</i>	27
2.2 <i>Identificação das leveduras por MALDI-TOF</i>	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 <i>Isolamento das leveduras</i>	30
3.2 <i>Identificação por MALDI-TOF</i>	40
4 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	51
ARTIGO 2 - Caracterização biotecnológica de leveduras isoladas de caverna, cultivadas em hidrolisados lignocelulósicos de café	58
1 INTRODUÇÃO	58
2 METODOLOGIA	60
2.1 <i>Teste de fermentação de xilose e celobiose</i>	60
2.2 <i>Teste de capacidade celulolítica com CMC 1%</i>	60
2.3 <i>Avaliação do crescimento em hidrolisados não detoxificados de substratos lignocelulósicos de café</i>	61
2.3.1 <i>Obtenção dos substratos lignocelulósicos e preparação dos hidrolisados</i>	61
2.3.2 <i>Análises de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	62
2.3.3 <i>Preparação dos inóculos e avaliação do crescimento no hidrolisado não detoxificado</i>	62
2.4 <i>Cultivo batch em 100 mL de hidrolisado não detoxificado</i>	63
2.4.1 <i>Construção da curva de calibração</i>	63
2.4.2 <i>Caracterização do cultivo em 100 mL de hidrolisado não detoxificado</i>	64

2.4.3 Análises estatísticas.....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1 Fermentação de xilose e celobiose.....	64
3.2 Teste de capacidade celulolítica com CMC 1%.....	66
3.3 Hidrólise dos substratos lignocelulósicos de café e caracterização dos hidrolisados	67
3.4 Avaliação do crescimento em hidrolisados de grãos de café pretos, verdes e ardidos (PVA)	68
3.5 Caracterização do cultivo batch no hidrolisado de PVA não detoxificado	69
3.5.1 Produção de etanol e de xilitol.....	69
3.5.2 Produção de proteína.....	73
4 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS	75

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A microbiologia de cavernas é uma área relativamente nova e sua importância está em constante crescimento. Esse crescimento se relaciona, em parte, com o interesse por entender a função dos microrganismos nos processos de espeleogênese (processos de formação e desenvolvimento das cavernas). Além disso, as pesquisas em microbiologia de cavernas também têm como interesse o descobrimento de novas espécies microbianas, o isolamento de microrganismos com potencial biotecnológico e a realização de estudos associados com pesquisas espaciais. Os ambientes cavernícolas são interessantes para tais objetivos devido às condições particulares de ausência de luminosidade, temperatura e umidade constantes e baixa disponibilidade de nutrientes das cavernas, que criam um ambiente seletivo e diferente do ambiente externo. Como consequência disso, podem ser encontrados microrganismos especializados aos ambientes cavernícolas, com características interessantes para os estudos em microbiologia.

Uma das características que tornam interessantes os microrganismos de cavernas é a capacidade de participarem dos processos de biomineralização, os quais estão associados com processos de espeleogênese. As bactérias e os fungos filamentosos são os microrganismos que geralmente estão mais envolvidas em tais processos. Por causa disso, têm potencial para serem usados no melhoramento de materiais de construção e na fabricação de cimento com capacidade de autorreparação. Além de participarem dos processos de biomineralização, as bactérias (especificamente as actinobactérias), têm a capacidade de sintetizar moléculas com ação antimicrobiana e, por isso, são estudadas para a fabricação de antibióticos.

Além disso, o estudo do microbioma de cavernas tem ajudado a análise da presença de vida microbiana em outros planetas. Por exemplo, as condições da superfície de Marte são inóspitas e recebem grandes doses de radiação ultravioleta (UV) e ionizante. No entanto, em Marte, há cavernas vulcânicas conhecidas como tubos de lava, cujo ambiente interno é diferente do ambiente externo e, portanto, pode favorecer a existência de vida microbiana extinta ou existente. Além disso, é provável que tais cavernas tenham depósitos de água congelada, os quais são um indício da possibilidade da existência de vida microbiana em Marte, visto que as cavernas de tubo de lava que existem na Terra têm características similares às das cavernas presentes em Marte, usadas como ambientes análogos para realização de pesquisas espaciais.

Nos estudos de microbiologia de cavernas, as bactérias e os fungos filamentosos têm tido maior protagonismo que as leveduras. No entanto, as leveduras de caverna possuem

características que as tornam atraentes desde o ponto de vista biotecnológico. Uma evidência disso são as leveduras encontradas em cavernas usadas como locais para a maturação de queijos e para a realização de processos de vinificação. Os estudos que existem sobre tais processos mostram que as leveduras presentes em cavernas têm uma participação importante na maturação de queijos, favorecendo as características organolépticas. Com relação aos processos de vinificação em cavernas, algumas espécies de leveduras de caverna produzem enzimas importantes nos processos de vinificação.

No entanto, até a presente data, na literatura, ainda não existem trabalhos sobre a exploração e o aproveitamento do potencial biotecnológico das leveduras de cavernas. Por essa razão, o objetivo deste trabalho é isolar e avaliar leveduras de caverna quanto a sua capacidade de crescimento em hidrolisados lignocelulósicos. Especificamente usaram-se hidrolisados de substratos lignocelulósicos de café, utilizados como meio de cultivo para o crescimento de leveduras isoladas de algumas cavernas de Minas Gerais. As leveduras cultivadas em tais hidrolisados foram caracterizadas quanto à produção de xilitol, etanol, proteína e biomassa.

Para atingir os objetivos deste trabalho, esta tese apresenta dois artigos. O primeiro trata do levantamento de leveduras isoladas de 15 cavernas de Minas Gerais, com o propósito de verificar que espécies de leveduras são encontradas e como a presença delas nas cavernas pode ser influenciada por fatores relacionados com a configuração da caverna e com a influência do ambiente externo. O objetivo do segundo artigo é realizar uma avaliação biotecnológica de leveduras de caverna cultivadas em hidrolisados de substratos de café. A avaliação foi realizada em relação à produção de xilitol, etanol, proteína e biomassa usando hidrolisados de substratos de café. Todavia, antes de apresentar os dois artigos, esta tese traz uma primeira parte, que consiste em um referencial teórico sobre cavernas e microbiologia de cavernas. A segunda parte da tese apresenta os dois artigos sobre o isolamento e a avaliação biotecnológica de leveduras de cavernas.

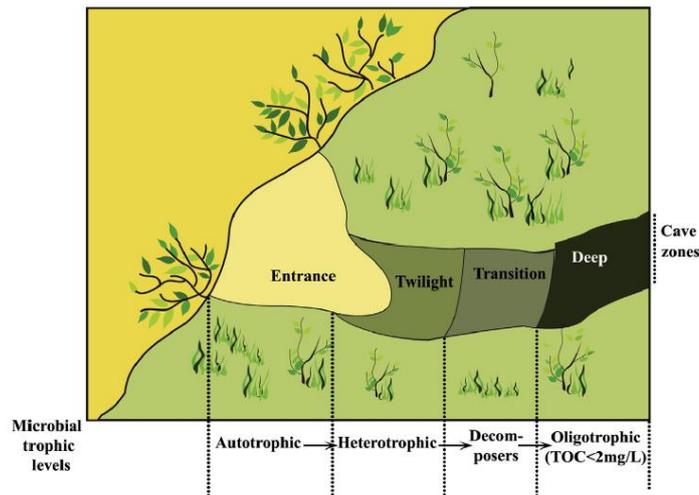
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Cavernas como habitat de microrganismos*

As cavernas são ambientes subterrâneos inseridos em relevos rochosos que apresentam uma grande diversidade de habitats (Silva et al., 2011). Em geral, são conhecidas por serem ambientes com pouca ou nenhuma disponibilidade de luz, temperatura relativamente constante, com níveis altos de umidade e limitados em nutrientes (Medellin et al., 2017; Groth et al., 1999). Visto que as condições ambientais dentro de uma caverna são diferentes das condições ambientais externas, as cavernas provêm condições únicas para o crescimento microbiano e, portanto, os microrganismos podem possuir características únicas (Léveillé & Datta, 2010).

Cada caverna é única quanto a características físicas, químicas, tróficas e biológicas. No entanto, em geral, as cavernas podem possuir zonas de luminosidade que apresentam características ecológicas diferentes entre si, que permitem o crescimento de diferentes tipos de microrganismos (Ghosh et al., 2017) (Figura 1): 1) A zona de entrada ou iluminada representa a interface entre ambientes epígeos e hipogeos. Nessa zona, a atividade autotrófica está presente, pois a luz, como fonte de energia, está disponível. 2) A zona crepuscular, que se encontra adjacente à zona de entrada, recebe luz refletida dela. Essa luz gradualmente se desvanece. Não há crescimento de plantas superiores além dessa zona, pois a disponibilidade de luz é menor. 3) A zona de transição tem disponibilidade de luz ainda menor. 4) A zona profunda, onde geralmente é completamente escuro, possui alta umidade e temperatura constante. Essa zona geralmente é caracterizada por ser oligotrófica, e os nutrientes presentes são alóctones, como, por exemplo, fósforo, nitrogênio e carbono provenientes de guano de morcegos que habitam temporária ou permanentemente na caverna (Cheeptham et al., 2012). Também, nessa zona, pode haver água subterrânea ou percolação de águas ricas em solutos, tais como sulfeto de hidrogênio, que possibilitam o crescimento de microrganismos quimiolitotróficos (Engel et al., 2004).

Figura 1 - Diferentes zonas encontradas em cavernas



Fonte: Ghosh et al. (2017).

A presença de microrganismos em cavernas pode ser evidenciada pela atividade microbiana, visualizada de diferentes formas. Por exemplo, a presença de colorações nas superfícies das rochas é evidência de formação de colônias de bactérias, fungos e algas (Figura 2). Isso acontece devido ao fato de os microrganismos poderem alterar a composição química da superfície durante o seu crescimento, levando a uma mudança na coloração da rocha. Os precipitados nas cavernas são outra evidência da atividade microbiana, pois os microrganismos podem mudar as propriedades químicas dos minerais, em função da utilização dos gradientes químicos para gerar energia. Essa atividade leva a uma mudança na solubilidade, dando, assim, origem à formação de precipitados. Isso acontece, por exemplo, em cavernas com presença de óxido de ferro e manganês (Barton, 2006).

Os resíduos de corrosão resultam da atividade metabólica microbiana envolvida na dissolução da rocha hospedeira, que geram resíduos macios, pulverulentos e brilhantes. As mudanças estruturais nas cavernas, causadas por microrganismos, são sutis, como a diminuição da densidade ou o amolecimento da rocha hospedeira. Os biofilmes são revestimentos compostos de comunidades microbianas, mantidas juntas por meio de polímeros que produzem uma variedade de estruturas, tais como revestimentos subaquosos escorregadios e gavinhas semelhantes a cabelos. Essas estruturas tendem a formar um polímero pegajoso que agrupa espécies bacterianas. Os biofilmes podem dar informação importante sobre as fontes de energia que sustentam a vida nas cavernas (Cheeptham et al., 2012; Lee et al., 2012; Barton, 2006).

Figura 2 - Evidências do crescimento microbiano em cavernas.



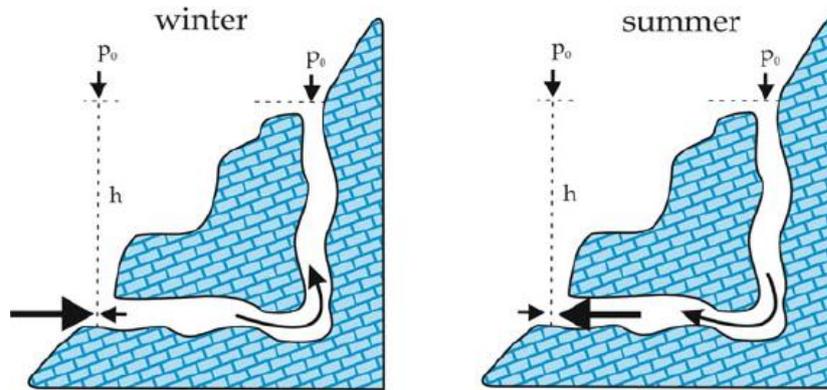
a) Colônias douradas e brancas de actinobactérias e outros tipos de bactéria. b) Formação de esnotites fúngicos. c) Crescimento de cianobactérias d) Formação de vermiculações. Fonte: Lee et al. (2012).

2.2 Fatores que influenciam na presença de microrganismos em cavernas

Os microrganismos presentes nas cavernas não são autóctones desses ambientes, mas sim alóctones, pois provêm do ambiente externo e são transportados por meio de fluxos de água, pelo ar, por animais e pela presença de humanos, como no caso das cavernas turísticas (Northrup & Lavoie, 2001). Além desses fatores, as condições de umidade dentro da caverna podem influenciar no crescimento de microrganismos. As bactérias são mais numerosas em cavernas com baixa umidade, enquanto os fungos são mais abundantes em cavernas com alta umidade (Vanderwolk et al., 2013).

A influência do vento na presença de microrganismos nas cavernas pode ser entendida de acordo com o princípio do efeito chaminé descrito por Wigley & Brown (1976). Segundo esse princípio, nas cavernas com mais de uma entrada, as diferenças de temperatura e umidade entre o interior e o exterior criam uma diferença de pressão que faz com que o ar flua para dentro ou para fora da caverna. Por exemplo, no inverno, a temperatura do ar da caverna é maior do que do ar do exterior; portanto, a densidade do ar fora da caverna é maior do que dentro. Essa diferença de densidade cria uma pressão originária na entrada inferior, que força a corrente de ar a sair pela entrada superior, o que é verdadeiro para cavernas pequenas. No verão, o fluxo de ar inverte-se. A Figura 3 ilustra o princípio do efeito chaminé.

Figura 3. Fluxo do ar nas cavernas de acordo com o princípio do efeito chaminé



Fonte: Wigley & Brown (1976).

As cavernas com uma única entrada podem reter ar frio e denso durante o inverno, de modo que preservam a baixa temperatura na parte interna no verão. No entanto, nessas cavernas, as variações da pressão atmosférica também podem controlar a ventilação. Dependendo do diâmetro da entrada e da rapidez com que acontecem as mudanças da pressão externa, podem acontecer ventos fortes. Esse fenômeno é chamado de “respiração da caverna”, pois a caverna, por assim dizer, expira e inala, ou seja, há um fluxo de ar que acontece de acordo com as mudanças de pressão no ambiente externo (Lauritzen, 2018).

Outro fator é a presença de animais nas cavernas, tais como insetos e morcegos. Os insetos podem introduzir fungos nas cavernas pelo transporte de esporos (Vanderwolf et al., 2013). Os morcegos contribuem com o enriquecimento do solo da caverna, pois o guano possui altas concentrações de amônia que permitem o crescimento de microrganismos heterótrofos. A presença de humanos também pode influenciar na diversidade das populações microbianas, como é o caso das cavernas com visitação (Cheeptham et al., 2012).

A presença de animais e de humanos traz como consequência a introdução de matéria orgânica que favorece o crescimento de microrganismos heterotróficos. Quando há pouca disponibilidade de matéria orgânica, os microrganismos podem utilizar compostos oxidados e reduzidos para obter energia. Alguns desses compostos são enxofre, ferro e manganês na forma reduzida, encontrados especialmente nas cavernas calcárias e basálticas (Northrup & Lavoie, 2001).

A proximidade das cavernas com seu entorno próximo também influencia no aporte de matéria orgânica para as cavernas. Por exemplo, uma característica das cavernas ferruginosas (ver apartado 2.3 sobre os tipos de caverna) é que elas são relativamente mais próximas do ambiente externo em comparação com outro tipo de cavernas (Ferreira et al., 2018). Essa

proximidade permite a entrada da biomassa vegetal que vem da vegetação do ambiente circundante, em níveis mais altos do que na maioria das cavernas carbonáticas (Aule et al., 2019). Tais níveis de matéria orgânica permitem o crescimento de microrganismos redutores de ferro, que podem contribuir nos processos de espeleogênese (Auler et al., 2019; Parker et al., 2018). Além disso, um tipo de caverna ferruginosa, chamada caverna de canga, forma uma extensa rede de pequenos poros interligados, com alto grau de permeabilidade, permitindo a penetração e a mobilidade da matéria orgânica (Aule et al., 2019).

Nas cavernas em geral, o aumento de matéria orgânica leva a um aumento de populações de microrganismos dentro delas (Paula et al., 2020). Ao mesmo tempo, o aumento de matéria orgânica nas cavernas depende de agentes que permitem a sua entrada desde o ambiente externo, tais como rios, córregos e escoamentos, até a percolação através de fraturas no teto ou nas paredes das cavernas (Silva et al., 2011). Tais agentes permitem a conexão dos ambientes subterrâneos com o ambiente externo. Isso torna possível que mudanças no clima do ambiente externo influenciem na entrada de matéria orgânica nas cavernas. Por exemplo, Paula et al. (2020) estudaram a relação entre o aumento da biomassa de microrganismos e a disponibilidade de nutrientes (carbono e nitrogênio) no ambiente externo, em quatro cavernas do Parque Estadual Terra Ronca, no estado de Goiás. Os autores relatam que, na estação seca, houve diminuição de microrganismos, pois houve mineralização de carbono e nitrogênio nas cavernas, enquanto que, na estação chuvosa, houve imobilização de carbono e nitrogênio expressa em um aumento de microrganismos nas cavernas.

2.3 Tipos de cavernas

As cavernas podem ser classificadas em primárias ou em secundárias, de acordo com o que acontece no seu processo de formação em relação à rocha hospedeira. As cavernas primárias originam-se junto com o processo de formação da rocha em que estão inseridas, e as cavernas secundárias originam-se depois da formação da rocha (Kempe, 2019a; Gradziński et al., 2018). Geralmente, as cavernas primárias são cavernas vulcânicas e glaciais.

As cavernas vulcânicas, também conhecidas como tubos de lava, são formadas a partir do escoamento da lava de vulcões ativos (Kempe, 2019b). Quando se inicia o resfriamento da superfície de um fluxo de lava, este se solidifica e forma a rocha, embora lava líquida ainda flua por baixo da rocha recém-formada. Uma vez que a lava cesse de fluir, são formados túneis de rocha ígnea, chamados tubos de lava (Kempe, 2019b; Oromí, 2018). No entanto, nem sempre as cavernas vulcânicas são cavernas primárias. De acordo com Kempe (2019b), as cavernas

vulcânicas também podem ser formadas tectonicamente, por colapso ou por erosão, depois que a lava foi depositada e esfriada.

Em contrapartida, as cavernas glaciais são túneis de gelo com pisos de rocha e paredes e tetos de gelo (White & Culver, 2019). Essas cavernas são formadas quando acontecem derretimentos nas geleiras e, por isso, desenvolvem-se melhor em geleiras de montanha do que em geleiras polares, devido, em parte, às temperaturas sazonais mais quentes. Também são comuns em geleiras com vulcões, devido ao calor geotérmico e às saídas de vapor (Guley & Fountain, 2019; Smart, 2003).

As cavernas secundárias originam-se depois da formação da rocha hospedeira por meio de diferentes processos geológicos. Segundo Engel (2010), dentre tais processos, estão a solubilização, a erosão diferencial, a erosão mecânica, o tectonismo, o vulcanismo e a formação de gelo. Dentre as cavernas secundárias, as mais conhecidas são as cavernas de calcário. As cavernas de calcário são formadas pela água que dissolve gradualmente as rochas, geralmente carbonáticas (calcário e dolomita), de tal forma que seu tamanho está em constante crescimento (Girihagama et al., 2015; Silva et al., 2011; Jouves et al., 2017).

As cavernas de calcário podem ser hipogênicas ou epigênicas, dependendo da origem dos fluidos que dissolvem as rochas e que moldam a caverna. As cavernas hipogênicas são cavernas de calcário cuja rocha é dissolvida por fluidos ascendentes de águas profundas (Palmer, 2011). Esses fluidos ou podem ser águas termais ou agentes corrosivos das rochas, ou podem estar associados a fluidos corrosivos, tais como gases e soluções ácidas (Sendra et al., 2014; Klimchouk, 2009). Por exemplo, no processo espeleogênese, pode acontecer a solubilização da rocha induzida pelo ácido sulfúrico (Palmer & Hill, 2019). O ácido sulfúrico é gerado quando o aumento da água rica em ácido sulfídrico (H_2S) entra em contato com água rica em oxigênio no lençol freático ou próximo a ele (Palmer & Hill, 2019). Já as cavernas epigênicas são originadas por fluxos de águas meteóricas, ou seja, de chuva ou de rios superficiais (Palmer, 2011).

Outro tipo de caverna secundária são as cavernas ferruginosas. No Brasil, as cavernas ferruginosas são especialmente encontradas na Serra dos Carajás (estado do Pará) e no Quadrilátero Ferrífero (estado de Minas Gerais) (Piló et al., 2015). Essas cavernas são formadas a partir de formações ferríferas, conhecidas como formações ferríferas bandadas, ferricretes e cangas (Ferreira et al., 2018). As cavernas ferruginosas podem estar inseridas entre as formações ferríferas bandadas e a canga ou podem estar inseridas exclusivamente na canga, nas formações ferríferas bandadas e em ferricretes (Auler et al., 2014). As formações ferríferas bandadas são rochas que possuem, de forma alternada, camadas milimétricas de silicite e de

minerais de ferro, como hematita e magnetita (Hagemann et al., 2016). Os ferricretes são crostas endurecidas formadas por formações ferríferas bandadas, óxidos e hidróxidos de ferro e cimentos ferruginosos (dos Santos & Bacellar, 2021). As cangas são formações superficiais ou couraças de ferro compostas por fragmentos de rochas adjacentes, cimentadas por limonita e hematita (Souza & Carmo, 2015).

À diferença das cavernas inseridas em ferricretes, as cavernas inseridas em cangas possuem pequenos espaços interconectados, conhecidos como vazios. Esses espaços permitem a entrada de água e de raízes da vegetação do ambiente externo ou epígeo (Ferreira et al., 2018). Isso permite a entrada de matéria orgânica e, conseqüentemente, de microrganismos. As cavernas ferruginosas apresentam um ambiente seletivo para os microrganismos, devido ao caráter pouco solúvel dos óxidos de ferro. Participam da formação de cavernas ferruginosas microrganismos capazes de solubilizar as rochas de ferro (Piló et al., 2015). Tais microrganismos participam dos processos de oxidação e de redução do ferro e, junto com o fluxo de águas subterrâneas, permitem o alargamento e a formação de cavernas (Parker et al., 2013).

2.4 Leveduras de cavernas

Um dos primeiros trabalhos sobre leveduras de cavernas é o de Martini (1963), onde foram isoladas leveduras de amostras de solo coletadas tanto da parte externa, como da interna de duas cavernas da Itália. Esse trabalho mostrou que as leveduras presentes em cavernas são alóctones, introduzidas por meio de morcegos e insetos. O trabalho de Vaughan-Martini et al., (2000) também confirma a mesma ideia. Nesse estudo, foram isoladas leveduras de três cavernas da Itália, uma delas com visitação aberta (400,000 visitantes por ano) e as outras duas com visitação limitada a um pequeno número de pesquisadores. Foi encontrado que a caverna com maior visitação foi a que apresentou maior diversidade de leveduras. Segundo os resultados obtidos, a maioria das cepas estão associadas com patologia humanas. Além disso, o crescimento de leveduras foi menor do que o crescimento apresentado por bactérias e fungos filamentosos. Jurado et al. (2010) e Vanderwolf et al. (2013) também confirmam que as populações de leveduras se encontram em menor número em comparação com as bactérias e fungos filamentosos. Em um estudo posterior, Nouri et al. (2018) isolaram de solo de caverna uma nova espécie de levedura, denominada *Blastobotrys persicus sp.* Além dessa nova espécie, os autores isolaram de amostras de solo outras leveduras, como *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula lactosa*, *Candida albicans*, *Candida powellii*, *Candida restingae* e *Candida tropicalis*.

O isolamento de leveduras de caverna não é feito apenas a partir do solo, mas também por meio de outros tipos de amostras: ar (Bercea et al., 2018), rochas (Ogórek et al., 2013), pele de morcego (Cunha et al., 2020) e guano de morcego (Sugita et al., 2005). Geralmente, a literatura mostra que há maior quantidade de leveduras no guano que nos outros tipos de amostras (Emerson & Roark, 2007; Vanderwolf et al., 2013). Independentemente do tipo de amostra, todos os estudos consultados neste trabalho mostram que, em geral, o objetivo é isolar e identificar leveduras para entender a dinâmica das suas populações. Nesses trabalhos, são levados em conta fatores, como a influência das atividades de humanos (como, por exemplo, as cavernas turísticas) e a entrada de animais e de matéria orgânica nas cavernas.

Por enquanto, não existem trabalhos sobre exploração do potencial biotecnológico de leveduras de cavernas. A exploração biotecnológica está focada principalmente em bactérias e actinobactérias (Ghosht et al., 2017). No entanto, nas cavernas, podem existir leveduras com um potencial biotecnológico passível de ser explorado. Uma evidência dessa possibilidade é o crescimento de leveduras associadas a processos de vinificação e maturação de queijo realizados em cavernas. Tais cavernas, geralmente de calcário, são conhecidas como cavernas de vinho e cavernas de queijo, respectivamente.

Por exemplo, Cailhol et al. (2020) realizaram um processo de vinificação na caverna Saint-Clement, caverna de calcário localizada na França. Os autores relatam o isolamento da levedura *Guehomyces pullulans* das paredes da caverna. Tal levedura é usada na clarificação de suco de uvas no processo de elaboração de vinhos. Em contrapartida, Budak et al. (2016) realizaram um processo de maturação de queijo na caverna Divle, na Turquia, onde foi possível o isolamento de 27 leveduras de cinco espécies. *Debaryomyces hansenii* foi a espécie de levedura mais frequente. Tais leveduras foram isoladas tanto da parte externa, como da parte interna dos queijos.

As leveduras isoladas em ambos os trabalhos provinham dos processos de vinificação e elaboração de queijos e não se pode dizer que são autóctones de tais cavernas. No entanto, mostram que as condições das cavernas (temperatura, umidade e nutrientes) permitem o crescimento de leveduras que podem ter potencial biotecnológico. Em cavernas não destinadas à elaboração de vinho e queijo, as leveduras podem vir por meio de insetos e morcegos, capazes de interagir com plantas (Benoit et al, 2004; Sritongchuay et al., 2016). Ao entrarem na caverna durante um ciclo de sua vida, eles podem introduzir as leveduras por meio do excremento ou por meio do seu corpo (Vanderwolf et al., 2013; Cunha et al., 2020). Ao mesmo tempo, restos de vegetais (folhas, troncos e raízes) podem ser introduzidas por meio de chuvas (Silva et al.,

2013). Tais restos vegetais podem ter leveduras com capacidade fermentativa (Morais et al., 2013).

É de notar que, mesmo nos ambientes fora das cavernas, as leveduras têm sido pouco estudadas quanto à biodiversidade (Yurkov et al., 2012). No caso das cavernas, ainda menos se conhece sobre biodiversidade de leveduras. Portanto, há muito por explorar quanto à biodiversidade e à prospecção biotecnológica de leveduras de cavernas.

REFERÊNCIAS

- Auler, A. S. et al. Iron formation caves: genesis and ecology. In: **Encyclopedia of Caves** (pp. 559-566). Academic Press, 2019.
- Auler, A. S. et al. Hypogene cave patterns in iron ore caves: convergence of forms or processes? **Karst Waters Institute Special Publication**, 18, 2014.
- Barton, H. A. Introduction to cave microbiology: a review for the non-specialist. **Journal of cave and karst studies**, 68(2), 43-54, 2006.
- Benoit, J.B. et al. Mycoflora of a troglonec cave cricket, *Hadenoeus cumberlandicus* (Orthoptera: Rhaphidophoridae), from two small caves in Northeastern Kentucky. **Ann. Entomol. Soc. Am.** **97**, 989–993, 2004. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[0989:MOATCC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[0989:MOATCC]2.0.CO;2)
- Bercea, S. et al. Novel approach to microbiological air monitoring in show caves. **Aerobiologia** (Bologna). 34, 445–468, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10453-018-9523-9>
- Budak, O.S. et al. The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. **Int. Dairy J.** **58**, 50–53, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.09.011>
- Cailhol, D. et al. Fungal and bacterial outbreak in the wine vinification area in the Saint-Marcel show cave. **Sci. Total Environ.** **733**, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138756>, 2020.
- Cunha, A.O.B. et al. Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity. **PLoS One** **15**, 1–24, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243494>
- Cheeptham, N. **Cave microbiomes: A novel resource for drug discovery (Vol. 1)**. Springer Science & Business Media, 2012.
- dos Santos Dias, J. C.; Bacellar, L. D. A hydrogeological conceptual model for the groundwater dynamics in the ferricretes of Capão Xavier, Iron Quadrangle, Southeastern Brazil. **Catena**, 207, 105663, 2021.
- Emerson, J.K.; Roark, A.M. Composition of guano produced by frugivorous, sanguivorous, and insectivorous bats. **Acta Chiropterologica** **9**, 261–267., 2007. [https://doi.org/10.3161/1733-5329\(2007\)9\[261:COGPBF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3161/1733-5329(2007)9[261:COGPBF]2.0.CO;2)
- Engel, A.S. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “*Epsilonproteobacteria*”, **FEMS Microbiology Ecology** **51** 31-53, 2004.
- Engel, A.S. Microbial diversity of cave ecosystem - Barton LL et al (eds) **Geomicrobiology: molecular and environmental perspective**. Springer Science and Business Media B.V, The Netherlands, 219-238, 2010.
- Ferreira, R. L.; de Oliveira, M. P. A.; Silva, M. S. Subterranean biodiversity in ferruginous landscapes. **Cave ecology**, 435-447, 2018.

- Ghosh, S.; Kuisiene, N.; Cheeptham, N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? **Biochem. Pharmacol.** 134, 18–34, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>
- Girihagama, L.; Nof, D.; Hancock, C. Bubble-Induced Cave Collapse, **PloS ONE** 10 1-14, 2015.
- Groth, I. et al. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo), **Journal of Microbial Methods** 36 115-122, 1999.
- Gulley, J. D.; Fountain, A. Glacier caves. In: **Encyclopedia of Caves** (pp. 468-473). Academic Press, 2019.
- Hagemann, S. G. et al. BIF-hosted iron mineral system: a review. **Ore Geology Reviews**, 76, 317-359, 2016.
- Jouves, J. et al. **Geomorphology** 298 86-106, 2017.
- Jurado, V. et al. Fungal outbreak in a show cave. **Sci. Total Environ.** 408, 3632–3638. 2020,
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.057>
- Klimchouk A.B. Morphogenesis of hypogenic caves. **Geomorphology**, 106: 100-117, 2009.
- Lauritzen, S.E. Physiography of the Caves. In: **Cave Ecology**, Ecological Studies 235, Springer, pp. 15-16, 2018.
- Lee, N.M. et al. **Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival**, Elanor M. Bell editor, Scottish Institute for Marine Science, Dunbeng Argyll, United Kingdom, 320-342, 2012.
- Léveillé, R.J.; Datta. Lava tubes and basaltic caves as astrobiological targets on Earth and Mars: A review, **Planetary and Space Science** 58 592-598, 2010.
- Martini, A., 1963. Yeast in Cavern Environments, **Archiv fur Mikrobiologie** 45, 111-114.
- Medellin, R.A.; Wiederholt, R.; Lopez-Hoffman, L. Conservation relevance of bat caves for biodiversity and ecosystem services, **Biological Conservation** 211 45-50, 2017.
- Morais, C.G. et al. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genet. Biol.** 60, 19–28, 2013,
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.003>
- Northrup, D.E.; Lavoie, K.H. Geomicrobiology of Caves: A Review, **Geomicrobiology Journal**, 18 199-222, 2001.
- Nouri, H. et al. *Blastobotrys persicus* sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from cave soil. Antonie van Leeuwenhoek, **Int. J. Gen. Mol. Microbiol.** 111, 517–524, 2018,
<https://doi.org/10.1007/s10482-017-0972-x>
- Ogórek R.; Lejman A.; Matkowski K. Fungi isolated from Niedźwiedzia Cave in Kletno (Lower Silesia, Poland). **International Journal of Speleology**, 42 (2), 161-166. Tampa, FL (USA) ISSN 0392-6672, 2013, <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.42.2.9>
- Palmer, AN. Distinction between epigenic and hypogenic caves. **Geomorphology** 134: 9–22, 2011.

Palmer, A.N.; Hill, C. A. Sulfuric acid caves. In: **Encyclopedia of caves** (pp. 1053-1062). Academic Press, 2019.

Parker, C. W. et al. Fe (III) reducing microorganisms from iron ore caves demonstrate fermentative Fe (III) reduction and promote cave formation. **Geomicrobiology journal**, **35**(4), 311-322, 2018.

Parker, C.W. et al. Microbial iron cycling and biospeleogenesis: cave development in the Carajás Formation, Brazil. **ICS Proceedings**, Prague, 442-446, 2013.

Paula, C. C. P. D.; Bichuette, M. E.; Selegim, M. H. R. Nutrient availability in tropical caves influences the dynamics of microbial biomass. **Microbiology Open**, 9(7), e1044, 2020.

Piló, L. B.; Coelho, A., Reino.; J. C. R. Geoespeleologia em rochas ferríferas: Cenário atual e conservação. CARMO, FF; KAMINO, LHY **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais**. Belo Horizonte: 3i Editora, 125-148, 2015.

Sendra, A. et al. Hypogenic versus epigenic subterranean ecosystem: lessons from eastern Iberian Peninsula. **International Journal of Speleology**, 43(3), 2, 2014.

Silva, M.S.; Martins, R.P.; Ferreira, R.L. Cave lithology determining the structure of the invertebrate communities in the Brazilian Atlantic Rain Forest, **Biodivers Conserv.** 201713-1729, 2011.

Silva, M.S.; Rezende, R.K.S.; Ferreira, R.L. Detritus processing in lentic cave habitats in the neotropics. **Subterr. Biol.** 11, 3–14, 2013, <https://doi.org/10.3897/subtbiol.11.5107>

Smart, C. Glacier caves and glacier pseudokarst: in Gunn, J., ed., **Encyclopedia of Caves and Karst Science**, Routledge, London, p. 385–387, 2003.

Souza, C. R., & Carmo, F. D. **Geossistemas ferruginosos no Brasil**. Geossistemas ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais. Belo Horizonte, 31, 47-76, 2015.

Sritongchuay, T.; Kremen, C.; Bumrungsri. Effects of forest and cave proximity on fruit set of tree crops in tropical orchards in Southern Thailand. **Journal of Tropical Ecology**, 32, pp 269-279, 2016, doi:10.1017/S0266467416000353

Sugita, T. et al. Trichosporon species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 7626–7629, 2005, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7626-7629.2005>

Vanderwolf, K.J. et al. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. **Int. J. Speleol.** 42, 77–96, 2013, <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.9>

Vaughan-Martini, A.; Angelini, P.; Zacchi, L. The influence of human and animal visitation on the yeast ecology of three Italian caverns. **Ann. Microbiol.** 50, 133–140, 2000.

White, W. B.; Culver, D. C. Cave, definition of. In: **Encyclopedia of caves** (pp. 255-259). Academic Press, 2019.

Wigley, T.M.L.; Brown, M.C. The physics of caves. In: Ford TD, Cullingford CHD (eds) **The science of speleology**. Academic, London, pp 329–358, 1976.

Yurkov, A.M.; Kemler, M.; Begerow, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes, **Fungal Ecology**, 5 24-35, 2012.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - Isolamento e identificação de leveduras em ambientes de cavernas

Artigo redigido conforme norma para publicação da revista *Science of the Total Environment*.

RESUMO

Dentre os microrganismos de caverna, as leveduras são um dos grupos microbianos menos estudados. Geralmente, relaciona-se a presença de leveduras em cavernas a atividades antrópicas, como, por exemplo, o turismo. Não há estudos que analisem a influência de outros fatores, tais como a estrutura da caverna, a sua interação com o meio externo e as alterações do meio circundante na presença de leveduras em cavernas. Além disso, os estudos quase sempre são de cavernas de calcário e não analisam cavernas de outras litologias. Neste trabalho, o objetivo foi isolar e fazer um levantamento de leveduras de 15 cavernas localizadas em Minas Gerais, tanto de calcário, como de ferruginosas. Foram isoladas 236 leveduras de amostras de terra coletadas de diferentes zonas das cavernas: zona externa da caverna, entrada, meio e fundo. As populações de leveduras foram maiores no fundo das cavernas, contrário ao que é relatado nos estudos existentes. Isso se deve à estrutura das cavernas, à sua interação com o meio externo e às alterações do meio circundante. Foi possível obter a identificação, por MALDI-TOF, das seguintes espécies: *Kazachstania exigua*, *Geotrichum silvicola*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida orthopsilosis*, *Candida palmioleophila*, *Candida carpophila*, *Lachancea thermotolerans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Algumas dessas espécies não são relatadas como encontradas em cavernas, como, por exemplo, *K. exigua*, *G. silvicola*, *C. carpophila* e *L. thermotolerans*. A maioria das espécies encontradas são de interesse biotecnológico, de acordo com a literatura. Por exemplo, *C. laurentii* possui atividade antifúngica, *Candida palmioleophila* possui atividade lipolítica e *R. mucilaginosa* tem capacidade para produzir carotenoides. *L. thermotolerans* possui importância na indústria vinícola, pois pode produzir ácido lático durante a fermentação alcoólica. *K. exigua* apresenta atividade inibitória contra fungos e bactérias patogênicas. As informações obtidas permitem ter um conhecimento de quais espécies são encontradas sem a influência intensa de seres humanos. Além disso, este trabalho lança as bases para uma futura prospecção biotecnológica das leveduras encontradas.

Palavras-chave: Ambientes cavernícolas. Microrganismos. MALDI-TOF. Agrupamento hierárquico.

1. Introdução

Ambientes de cavernas apresentam condições de temperatura, luminosidade e umidade, além de disponibilidade de nutrientes, diferentes daquelas do ambiente epígeo (Ghosh et al., 2017). Todas essas características particulares promovem um ambiente seletivo para a existência de fungos, bactérias, actinobactérias, leveduras e, inclusive, microalgas (Engel, 2019a; Pfendler et al., 2018). Tais microrganismos (que conseguem se estabelecer) se tornam especializados aos ambientes cavernícolas (Bontemps et al., 2022; Schabereiter-Gurtner et al., 2004) e participam de processos geoquímicos relacionados com a formação de cavernas (Boston et al., 2009). Além disso, seu metabolismo se condiciona ao ambiente da caverna (Engel, 2019). Também, alguns microrganismos de cavernas, como, por exemplo, as actinobactérias, têm capacidade de sintetizar moléculas com ação antimicrobiana e, por isso, são estudados para a fabricação de antibióticos (Rangseekeaw & Pathom-Aree, 2019).

Em contrapartida, o estudo do microbioma de certas cavernas tem ajudado a analisar a presença de vida microbiana em outros planetas (Sauro et al., 2021). Por exemplo, em Marte, há cavernas vulcânicas, conhecidas como tubos de lava, cujo ambiente interno pode favorecer a existência de vida microbiana extinta ou existente. Visto que as cavernas de tubo de lava que existem na Terra apresentam características similares às das cavernas presentes em Marte, são usadas como ambientes análogos para a realização de pesquisas espaciais (O'Connor et al., 2021). Portanto, em cavernas, podem ser encontrados microrganismos com características interessantes para pesquisas em microbiologia.

A maioria das pesquisas sobre microbiologia de cavernas está focada principalmente em bactérias e fungos filamentosos, os quais são os grupos microbianos predominantes. Tais trabalhos estão focados na análise da abundância, da diversidade e da função de tais grupos microbianos nos ecossistemas cavernícolas (Engel, 2019a; Sallstedt et al., 2014; Saiz-jimenez, 2012). Além disso, há pesquisas focadas em actinobactérias, com o objetivo de isolar cepas

com capacidade para produzir moléculas com ação antimicrobiana (Paun et al., 2021; Rangseekaew & Pathom-Aree, 2019).

No entanto, as leveduras são menos estudadas e a escassez de estudos sobre estas talvez se deva ao fato de que esse grupo microbiano é minoritário em cavernas (Vanderwolf et al., 2013). Mas isso não significa que seu estudo não seja importante, pois podem ser encontradas novas espécies em ambientes cavernícolas. Por exemplo, Nouri et al., (2018) identificaram uma nova espécie de levedura, *Blastobotrys persicus* sp nov, isolada de amostras de solo de cavernas do Irã. Além disso, existem evidências da importância ecológica das leveduras em cavernas. Por exemplo, as leveduras podem cumprir a função de decompor a matéria orgânica em cavernas, como o guano, pois é sabido que, nesse substrato, podem crescer em altas populações (Sugita et al., 2005). Dessa forma, contribuem para a ciclagem de carbono e nitrogênio que acontece em cavernas (Engel, 2019b). Outra função ecológica das leveduras de caverna é servir como fonte de nutrientes para invertebrados (Ferreira et al., 2000).

Até a presente data, estudos sobre leveduras de caverna relacionam-se principalmente à sua origem em ambientes cavernícolas. Por exemplo, o trabalho de Martini (1963) mostrou que as leveduras presentes em cavernas são alóctones, introduzidas por vetores, como, por exemplo, morcegos e insetos. Vaughan-Martini et al. (2000) mostraram que a presença de humanos também contribui para o aumento das populações de leveduras em cavernas. Em anos posteriores, o estudo de Connell & Staudigel (2013) também confirmou isso, pois encontraram que a presença de pesquisadores influenciou no aparecimento de leveduras na caverna vulcânica Warren, localizada no monte Erebus, da Antártica.

No entanto, nos trabalhos sobre leveduras de caverna, geralmente, o isolamento é realizado somente em uma zona da caverna, sem o objetivo de isolar leveduras de forma exaustiva em cada uma das zonas (zona externa, entrada, zona média e fundo). Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi isolar e fazer um levantamento de leveduras de cavernas,

localizadas em Minas Gerais, com a finalidade de saber quais espécies são encontradas em cada uma das zonas. A grande maioria das cavernas analisadas não são turísticas. Algumas estão localizadas em unidades de conservação ambiental, e outras são cavernas não visitadas, que não estão localizadas em unidades de conservação. Portanto, as informações obtidas permitem ter um conhecimento de quais espécies são encontradas sem a influência intensa de seres humanos. Ao mesmo tempo, este estudo permitirá analisar como o ambiente externo influencia na presença das leveduras, podendo servir como base para uma futura prospecção biotecnológica das leveduras encontradas.

2. Metodologia

2.1 Coleta das amostras e isolamento das leveduras

Foram coletadas amostras de solo de 15 cavernas localizadas nos seguintes municípios do estado de Minas Gerais: Pains, Rio Pardo, Montes Claros, Itacarambi, Nova Lima, Sete Lagoas e Cordisburgo. Pains: Brega (20°25'4.22"S, 45°46'20.15"O), São Lourenço (20°19'36.50"S, 45°41'31.83"O), Abutre (20°24'8.50"S, 45°34'42.78"O) e A452 (20°19'12.76"S, 45°41'7.00"O). Rio Pardo: Caverna do Lago (16°4'56.42"S, 42°43'21.07"O) e Mocaroró (16°0'36.84"S, 42°12.52"O). Montes Claros: Lapa da Santa (16°40'53.80"S, 43°59'32.33"O), Lapa D'água (15°0'46.88"S, 44°7'13.43"O) e Lapa Grande (16°42'24.31"S, 43°56'34.78"O). Itacarambi: Volta da Serra (14°58'2.72"S, 44°4'25.95"O). Nova Lima: RM01 (20°3'26.62"S, 44°0'34."O), RM33 (20°2'5.87"S, 43°59'40.77."O) e RM39 (20°0'55.95"S, 43°58'38.26"O). Sete Lagoas: Rei do Mato (19°29'44.68"S, 44°16'55.33"O). Cordisburgo: Maquiné (19°7'30.79"S, 44°21'6.90"O).

As cavernas são de duas litologias diferentes: calcário e ferruginosas. Das 15 cavernas analisadas, duas são turísticas. As demais não são de visitação, e algumas estão localizadas em unidades de conservação ambiental. Essas informações podem ser vistas na Tabela 1.

Tabela 1

Informações gerais sobre as cavernas analisadas neste estudo

Caverna	Litologia	Unidade de conservação	Caverna não turística	Caverna turística
Brega	Calcário	Não	Sim	Não
São Lourenço	Calcário	Não	Sim	Não
Abutre	Calcário	Não	Sim	Não
A452	Calcário	Não	Sim	Não
Lapa da Santa	Calcário	Não	Sim	Não
Lapa D'água	Calcário	Parque Estadual da Lapa Grande	Sim	Não
Lapa Grande	Calcário	Parque Estadual da Lapa Grande	Sim	Não
Rei do Mato	Calcário	Não	Não	Sim
Maquiné	Calcário	Não	Não	Sim
Volta da Serra	Calcário	Parque Nacional do Peruaçu	Sim	Não
Caverna do Lago	Ferruginosa	Não	Sim	Não
Mocororó	Ferruginosa	Não	Sim	Não
RM01	Ferruginosa	Parque Estadual Rola Moça	Sim	Não
RM33	Ferruginosa	Parque Estadual Rola Moça	Sim	Não
RM39	Ferruginosa	Parque Estadual Rola Moça	Sim	Não

A coleta foi realizada no fundo, no meio, na entrada e na área externa adjacente a cada caverna. Para a maioria das cavernas, foi feita uma coleta a 45 m da entrada, uma a 150 m e uma a 300 m, tanto dentro, quanto fora. Devido ao fato de as cavernas RM01, RM33 e RM39 serem de tamanho menor que as outras, foi coletada uma amostra na entrada, uma no meio e uma no fundo. Já do lado de fora, para essas cavernas, seguiu-se o mesmo esquema que o realizado nas outras (uma coleta a 45 m, uma a 150 m e uma a 300 m do lado de fora da entrada). Em cada uma dessas zonas, foram coletadas amostras compostas. Cada amostra foi depositada em tubos falcon de 50 mL, também previamente autoclavados com o auxílio de espátulas autoclavadas. As amostras foram conservadas em refrigeração até serem transportadas ao laboratório para a realização do plaqueamento.

Para realizar o isolamento a partir das amostras de solo, 5 gramas de cada amostra foram diluídas em solução salina 0,9% nas seguintes proporções: 1:1, 1:5 e 1:10 (Yurkov et al., 2016),

das quais foram espalhados 100 μ L de alíquota nos meios de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Foram usados dois meios de cultura: MEA Rico (ágar extrato malte 2%) e MEA Pobre (ágar extrato malte 0,3% de acordo com Wickerham, 1951). Ambos os meios foram suplementados com 100 mg/L de cloranfenicol para evitar o crescimento de bactérias (Dhami et al., 2017; Selbmann et al., 2014). Foram usados o MEA Rico e o MEA Pobre para possibilitar o isolamento de leveduras que podem crescer melhor em altas concentrações de nutrientes e de leveduras que podem crescer melhor em baixas concentrações de nutrientes.

Todas as placas foram incubadas a 28 °C, e o crescimento foi observado diariamente até a formação de colônias. Após isso, foi realizada a contagem e a caracterização morfológica das colônias. A purificação das colônias foi feita por meio de sucessivas estrias compostas usando placas com YEPG. Após obter culturas axênicas dos isolados, a morfologia microscópica foi caracterizada de acordo com Kurtzman et al. (2011). Cada isolado foi crioconservado usando 500 μ L de meio YEPG e 500 mL de glicerol 40%.

2.2 Identificação das leveduras por MALDI-TOF

Para a realização da análise de MALDI-TOF, foi feita uma extração das proteínas pelo método de ácido fórmico, de acordo com Amorim et al. (2016). Cada isolado foi analisado em triplicata, onde 1 μ L de sobrenadante foi adicionado na placa de aço inoxidável do aparelho de MALDI-TOF, e seco, a temperatura ambiente. Após, cada amostra foi coberta com 1 μ L de solução matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL). A análise foi realizada, usando-se um espectrômetro Microflex LT (Bruker) e o *software* FlexControl (versão 3.0). A identificação das leveduras foi realizada usando a biblioteca Biotyper do aparelho de MALDI-TOF. Todos os espectros brutos (três espectros para cada isolado) foram exportados como formato .XML, usando-se o *software* FlexAnalysis (versão 3.3 Bruker Daltonics®), e importados ao *software* mMass (versão 5.5.5 Open Source Mass Spectrometry Tool) para a correção da linha base, a suavização dos espectros e a obtenção do espectro médio de cada

isolado. Após esse processo, foi obtida uma lista de picos m/z para cada espectro médio no *software* mMass (Strolham et al., 2010). Os picos de todos os isolados foram alinhados no *software* Speclust (disponível em <http://co.bmc.lu.se/speclust/common.pl>), gerando uma lista de consenso (Alm et al., 2006). A lista de consenso de picos foi usada para a análise de cluster no *software* XLSTAT (versão 2022.4.1.1363), com a finalidade de gerar dendrogramas de dissimilaridade, usando-se o índice de dissimilaridade de Spearman. O método de médias ponderadas (Weighted Pair-Group Average) foi usado como método de aglomeração.

3. Resultados e discussão

3.1 Isolamento das leveduras

Foi isolado um total de 236 leveduras das 15 cavernas estudadas (Tabela 2), usando os meios MEA 2% e MEA 0,3%. Após realizado o processo de isolamento e purificação dos isolados, foi realizada a contagem de leveduras, encontradas em cada uma das zonas das 15 cavernas analisadas (Tabela 2). Além disso, a Tabela 3 mostra a origem das leveduras isoladas e especifica a morfologia celular de cada uma delas. A caracterização da morfologia celular de cada levedura foi realizada de acordo com Kurtzman et al. (2011).

Tabela 2

Quantidade de leveduras isoladas em cada uma das zonas das cavernas analisadas neste estudo.

CAVERNA	ZONA DA CAVERNA				Total de isolados por caverna
	Externo	Entrada	Meio	Fundo	
Brega		4	5	7	16
A452		2		31	33
São Lourenço		5		2	7
Abutre				3	3
Caverna do Lago				16	16
Volta da Serra				20	20
Lapa da Santa	8			4	12
Mocororó				6	6
Lapa d'água	8			4	12
Lapa Grande	6			6	12
RM01	13		4	18	35
RM33		4		16	20
RM39		12	8	20	40
Rei do Mato				2	2
Maquiné				2	2
Total					236

Tabela 3

Origem das leveduras isoladas, caracterização das suas colônias e morfologia celular.

ISOLADO	CAVERNA	ZONA DA CAVERNA	COR DA COLÔNIA	MORFOLOGIA CELULAR
Brega-1	Brega	Fundo	Creme	Ovoide
<i>C. orthopsilosis</i> Brega-2	Brega	Fundo	Branco	Ovoide
Brega-3	Brega	Fundo	Creme	Ovoide
Brega-4	Brega	Fundo	Creme	Ovoide
Brega-5	Brega	Fundo	Creme	Pseudohifa
Brega-6	Brega	Fundo	Creme	Pseudohifa
Brega-7	Brega	Fundo	Creme	Pseudohifa
Brega-8	Brega	Meio	Creme	Pseudohifa
Brega-9	Brega	Meio	Creme	Pseudohifa
Brega-10	Brega	Entrada	Creme	Pseudohifa
Brega-11	Brega	Entrada	Creme	Pseudohifa
Brega-12	A452	Meio	Creme	Pseudohifa
Brega-13	A452	Meio	Creme	Pseudohifa
Brega-14	A452	Meio	Bege	Pseudohifa
Brega-15	A452	Entrada	Bege	Pseudohifa
Brega-16	A452	Entrada	Bege	Pseudohifa
<i>C. laurentii</i> A452- 1	A452	Fundo	Creme	Globosa
<i>C. laurentii</i> A452- 2	A452-2	Fundo	Creme	Globosa
A452-3	A452	Fundo	Creme claro	Globosa
A452-4	A452	Fundo	Bege	Pseudohifa
A452-5	A452	Fundo	Bege	Pseudohifa
A452-6	A452	Fundo	Bege	Pseudohifa
<i>K. exígua</i> A452-7	A452	Fundo	Creme	Ovoide
A452-8	A452	Fundo	Bege	Pseudohifa
A452-9	A452	Fundo	Bege	Pseudohifa
A452-10	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa
A452-11	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa
A452-12	A452	Entrada	Bege	Pseudohifa
A452-13	A452	Entrada	Bege	Pseudohifa
A452-14	A452	Fundo	Bege	Pseudohifa
A452-15	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa
A452-16	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa
A452-17	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa

A452-18	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa
A452-19	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa
A452-20	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa
A452-21	A452	Fundo (guano)	Bege	Pseudohifa
A452-22	A452	Fundo (guano)	Bege, cotonoso	Hifas septadas com blastocónídios
A452-23	A452	Fundo (guano)	Bege, cotonoso	Hifas septadas com blastocónídios
A452-24	A452	Fundo (guano)	Bege, cotonoso	Hifas septadas com blastocónídios
A452-25	A452	Fundo (guano)	Bege, cotonoso	Hifas septadas com blastocónídios
A452-26	A452	Fundo (guano)	Bege, cotonoso	Hifa septadas com blastocónídios
A452-27	A452	Fundo (guano)	Bege, cotonoso	Hifas septadas com blastocónídios
A452-28	A452	Fundo (guano)	Bege, cotonoso	Hifas septadas com blastocónídios
A452-29	A452	Fundo (guano)	Bege, cotonoso	Hifas septadas com blastocónídios
A452-30	A452	Fundo (guano)	Creme claro	Ovoide
A452-31	A452	Fundo (guano)	Creme claro	Ovoide
A452-32	A452	Fundo (guano)	Creme claro	Ovoide
A452-33	A452	Fundo (guano)	Creme claro	Ovoide
A452-34	A452	Fundo (guano)	Creme claro	Ovoide
SL-1	São Lourenço	Entrada	Branca	Globosa
SL-2	São Lourenço	Entrada	Branca	Globosa
SL-3	São Lourenço	Entrada	Branca	Globosa
SL-4	São Lourenço	Entrada	Branca	Globosa
SL-5	São Lourenço	Entrada	Branca	Globosa
SL-6	São Lourenço	Fundo	Creme	Globosa
<i>C. palmioleophila</i> SL-7	São Lourenço	Fundo	Creme claro	Globosa
AB-1	Abutre	Fundo	Bege	Artroconídios
AB-2	Abutre	Fundo	Bege	Artroconídios
AB-3	Abutre	Fundo	Bege	Artroconídios

CL-1	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-2	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-3	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-4	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-5	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-6	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-7	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-8	Caverna do Lago	Fundo	Cor creme	Ovoide
CL-9	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-10	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-11	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-12	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-13	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-14	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-15	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
CL-16	Caverna do Lago	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Pseudohifa
<i>R. mucilaginosa</i> CL-17	Caverna do Lago	Fundo	Vermelho-laranja, brilhante	Ovoide
VS-1	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-2	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-3	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-4	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-5	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-6	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-7	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-8	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-9	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-10	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide

VS-11	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-12	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-13	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-14	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-15	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-16	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-17	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-18	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-19	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
VS-20	Volta da Serra	Fundo	Creme claro	Ovoide
LS-1	Lapa da Santa	Fundo	Bege, polvilhada	Elipsoide
<i>C. carpophila</i> LS-2	Lapa da Santa	Externo	Creme claro	Ovoide
LS-3	Lapa da Santa	Externo	Bege	Pseudohifa
LS-4	Lapa da Santa	Externo	Bege	Pseudohifa
LS-5	Lapa da Santa	Externo	Bege	Pseudohifa
LS-6	Lapa da Santa	Externo	Bege	Pseudohifa
LS-7	Lapa da Santa	Externo	Bege	Pseudohifa
LS-8	Lapa da Santa	Externo	Bege	Pseudohifa
LS-9	Lapa da Santa	Externo	Bege	Pseudohifa
LS-10	Lapa da Santa	Fundo	Bege	Pseudohifa
LS-11	Lapa da Santa	Fundo	Creme claro	Ovoide
LS-12	Lapa da Santa	Fundo	Creme claro	Ovoide
Mocororó-1	Mocororó	Fundo	Creme	Ovoide
<i>C. palmioleophila</i> Mocororó-2	Mocororó	Fundo	Creme	Ovoide
Mocororó-3	Mocororó	Fundo	Creme	Ovoide
Mocororó-4	Mocororó	Fundo	Creme	Ovoide
Mocororó-5	Mocororó	Fundo	Creme	Ovoide
Mocororó-6	Mocororó	Fundo	Creme	Ovoide
LA-1	Lapa d'água	Externo	Bege	Artroconídios
LA-2	Lapa d'água	Externo	Creme	Globosa
LA-3	Lapa d'água	Externo	Bege	Artroconídios

LA-4	Lapa d'água	Externo	Creme	Globosa
LA-5	Lapa d'água	Externo	Bege	Artroconídios
LA-6	Lapa d'água	Externo	Creme	Ovoide
LA-7	Lapa d'água	Externo	Creme	Ovoide
LA-8	Lapa d'água	Externo	Creme	Ovoide
LA-9	Lapa d'água	Fundo	Creme	Globosa
LA-10	Lapa d'água	Fundo	Creme	Globosa
LA-11	Lapa d'água	Fundo	Creme	Globosa
LA-12	Lapa d'água	Fundo	Creme	Globosa
<i>G. silvicola</i> LG-1	Lapa Grande	Externo	Aparência cotonosa branca, macia, cremosa	Artroconídios
LG-2	Lapa Grande	Externo	Creme	Elipsoide
<i>G. silvicola</i> LG-3	Lapa Grande	Externo	Aparência cotonosa, branca, macia, cremosa	Artroconídios
<i>G. silvicola</i> LG-4	Lapa Grande	Externo	Aparência cotonosa, branca, macia, cremosa	Artroconídios
LG-5	Lapa Grande	Externo	Creme	Elipsoide
LG-6	Lapa Grande	Fundo	Bege	Artroconídios
LG-7	Lapa Grande	Fundo	Bege	Artroconídios
LG-8	Lapa Grande	Fundo	Creme	Elipsoide
LG-9	Lapa Grande	Fundo	Creme	Elipsoide, alongada
LG-10	Lapa Grande	Fundo	Creme	Elipsoide, alongada
LG-11	Lapa Grande	Fundo	Creme	Elipsoide, alongada
<i>G. silvicola</i> LG-12	Lapa Grande	Externo	Aparência cotonosa, branca, macia, cremosa	Artroconídios
<i>K. exigua</i> RM01-1	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-2	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-3	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-4	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-5	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-6	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-7	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-8	RM01	Externo	Creme	Ovoide
<i>K. exigua</i> RM01-9	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-10	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-11	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-12	RM01	Externo	Creme	Ovoide
RM01-13	RM01	Externo	Creme	Ovoide
<i>C. othopsilosis</i> RM01-14	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
<i>K. exigua</i> RM01-15	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-16	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-17	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-18	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
<i>K. exigua</i> RM01-19	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-20	RM01	Fundo	Creme	Ovoide

<i>K. exigua</i> RM01-21	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-22	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-23	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-24	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-25	RM01	Meio	Bege, aparência cotonosa	Hifas septadas com ramos laterais com blastoconídios
<i>K. exigua</i> RM01-26	RM01	Meio	Creme	Ovoide
RM01-27	RM01	Meio	Bege, aparência cotonosa	Hifas septadas com ramos laterais com blastoconídios
RM01-28	RM01	Meio	Bege, aparência cotonosa	Hifas septadas com ramos laterais com blastoconídios
RM01-29	RM01	Fundo	Bege	Pseudohifa com endoconídios
RM01-30	RM01	Fundo	Bege	Pseudohifa com endoconídios
RM01-31	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-32	RM01	Fundo	Bege, aparência cotonosa	Hifas septadas com ramos laterais com blastoconídios
RM01-33	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM01-34	RM01	Fundo	Bege	Pseudohifa
RM01-35	RM01	Fundo	Creme	Ovoide
RM33-1	RM33	Entrada	Bege	Pseudohifa
RM33-2	RM33	Entrada	Bege	Pseudohifa
RM33-3	RM33	Entrada	Bege	Pseudohifa
<i>K. exigua</i> RM33-4	RM33	Entrada	Creme	Ovoide
RM33-5	RM33	Fundo esquerdo	Bege	Pseudohifa
RM33-6	RM33	Fundo esquerdo	Creme	Ovoide
RM33-7	RM33	Fundo esquerdo	Creme	Ovoide
RM33-8	RM33	Fundo	Creme	Ovoide
RM33-9	RM33	Fundo	Creme	Ovoide
RM33-10	RM33	Fundo esquerdo	Bege	Pseudohifa
RM33-11	RM33	Fundo	Creme	Ovoide
RM33-12	RM33	Fundo	Creme	Ovoide
<i>C. laurentii</i> RM33-13	RM33	Fundo esquerdo	Creme	Ovoide
RM33-14	RM33	Fundo	Bege	Pseudohifa com endoconídios
RM33-15	RM33	Fundo	Bege	Pseudohifa com endoconídios
RM33-16	RM33	Fundo	Bege	Pseudohifa com endoconídios
RM33-17	RM33	Fundo esquerdo	Bege	Pseudohifa com endoconídios

RM33-18	RM33	Fundo esquerdo	Bege	Pseudohifa com endoconídios
RM33-19	RM33	Fundo	Bege	Pseudohifa
RM33-20	RM33	Fundo	Bege	Pseudohifa
<i>C. laurentii</i> RM39-1	RM39	Entrada	Creme	Globosa
RM39-2	RM39	Entrada	Creme	Globosa
<i>K. exigua</i> RM39-3	RM39	Entrada	Creme	Ovoide
RM39-4	RM39	Entrada	Creme	Globosa
RM39-5	RM39	Entrada	Creme	Globosa
RM39-6	RM39	Entrada	Creme	Globosa
RM39-7	RM39	Entrada	Creme	Globosa
RM39-8	RM39	Entrada	Creme	Ovoide
RM39-9	RM39	Entrada	Creme	Ovoide
RM39-10	RM39	Entrada	Creme	Ovoide
RM39-11	RM39	Entrada	Creme	Ovoide
RM39-12	RM39	Entrada	Creme	Ovoide
RM39-13	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
RM39-14	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
RM39-15	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
RM39-16	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
RM39-17	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
<i>K. exigua</i> RM39-18	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
RM39-19	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
RM39-20	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
RM39-21	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
<i>K. exigua</i> RM39-22	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
RM39-23	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
RM39-24	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
RM39-25	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
RM39-26	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
RM39-27	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
<i>K. exigua</i> RM39-28	RM39	Fundo direito	Creme	Ovoide
RM39-29	RM39	Fundo direito	Bege	Pseudohifa
RM39-30	RM39	Fundo direito	Bege	Pseudohifa
RM39-31	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
RM39-32	RM39	Fundo direito	Creme	Globosa
RM39-33	RM39	Meio	Bege	Pseudohifa
RM39-34	RM39	Meio	Bege	Pseudohifa
RM39-35	RM39	Meio	Creme	Globosa
RM39-36	RM39	Meio	Creme	Globosa
RM39-37	RM39	Meio	Creme	Globosa
RM39-38	RM39	Meio	Bege	Pseudohifa
RM39-39	RM39	Meio	Bege	Pseudohifa
RM39-40	RM39	Meio	Bege	Pseudohifa
<i>K. exigua</i> RM-1	Rei do Mato	Fundo	Creme	Ovoide
RM-2	Rei do Mato	Fundo	Creme	Ovoide
Maquiné-1	Maquiné	Fundo	Creme	Elipsoide alongada
Maquiné-2	Maquiné	Fundo	Creme	Elipsoide alongada

De acordo com a contagem de isolados apresentada na Tabela 2, pode-se observar que, de forma geral, na maioria das cavernas, houve maior quantidade de leveduras no fundo. Esse resultado contrasta com o apresentado por Pohl et al. (2007), que mostraram que não houve presença de leveduras na zona mais profunda de uma mina de ouro. Os autores consideram que, devido ao fato de as atividades antrópicas serem mais intensas na zona externa próxima da mina, as leveduras foram encontradas em maior quantidade nas áreas mais afastadas da zona mais profunda da mina. Portanto, a presença de humanos contribui para o aumento de matéria orgânica e, conseqüentemente, o aumento de populações de leveduras. Em consonância com isso, Vaughan-Martini et al. (2000) e Martini (1963) mostraram que o aumento ou a diminuição de populações de leveduras está relacionado com a disponibilidade de matéria orgânica.

Neste estudo, a disponibilidade de matéria orgânica nas cavernas analisadas foi mediada por fatores, como: presença de morcegos, características da paisagem do entorno e interação da caverna com o meio externo. Geralmente, os morcegos procuram abrigo no fundo das cavernas. Como consequência disso, ocorrem depósitos de guano no fundo e, portanto, há maiores populações de leveduras, pois esses microrganismos podem ser encontrados associados ao guano. Isso tem sido comprovado por Sugita et al. (2005), que isolaram 700 leveduras de amostras de guano de 20 cavernas do Japão. Além disso, o guano é rico em macronutrientes importantes para o crescimento microbiano, tais como o nitrogênio e o fósforo (Emerson & Roark, 2007; Pellegrini & Ferreira, 2013). Neste trabalho, especificamente num compartimento do fundo da caverna A452, foram coletadas amostras de terra da área circundante de um depósito de guano. Nessas amostras, houve maior número de leveduras isoladas em comparação com as outras zonas dessa caverna (Tabela 3).

O aumento de matéria orgânica dentro da caverna também pode estar determinado pelas características e alterações da paisagem do entorno e pela interação da caverna com o meio epígeo ou externo. Por exemplo, o entorno onde está localizada a caverna Brega é alterado por

atividades antrópicas, tais como pastagem, criação de gado e desmatamento. A interação dessa caverna com o meio externo ajuda na transferência de matéria orgânica, procedente de tais atividades antrópicas, para o interior da caverna. Essa interação está mediada pela configuração da caverna e por fluxos de água. A configuração da caverna Brega está caracterizada pela presença de duas entradas opostas (Figura 1). Na segunda entrada, o fundo é acessado por um rio perene. Em períodos de enchente, parte do fundo é inundado. Dessa forma, acontece, com certa frequência, a entrada direta de matéria orgânica, como folhas, troncos e fezes de bovino na caverna (Souza-Silva et al., 2012).

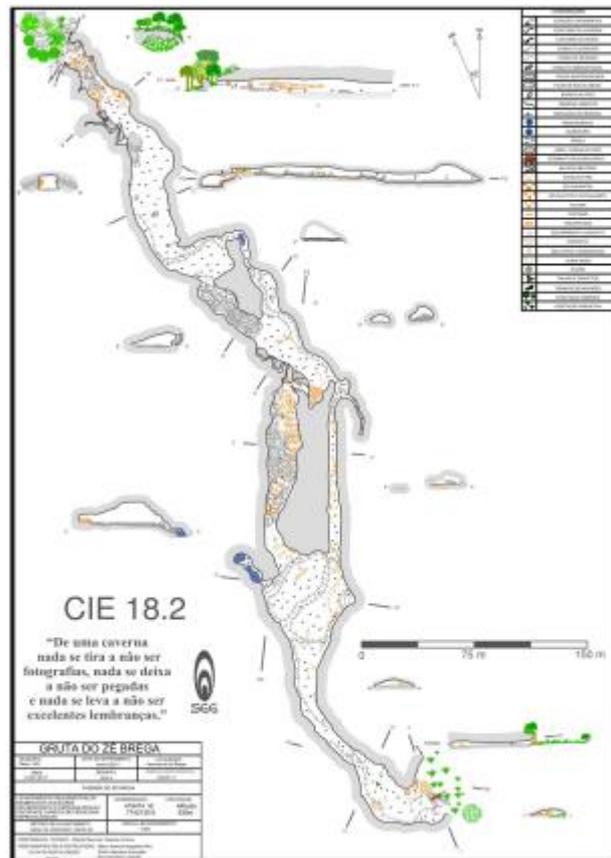


Fig. 1. Mapa da caverna Brega. Essa caverna possui duas entradas opostas: entrada principal (parte superior da imagem) e segunda entrada (parte inferior da imagem). Imagem tomada de Yoshizumi et al. (2019).

Cabe observar que a litologia da caverna pode determinar a forma como esta interage com o meio circundante. Por exemplo, uma característica exclusiva das cavernas ferruginosas é que elas estão interconectadas por canalículos ou galerias que permitem a entrada de matéria

orgânica do ambiente externo (Ferreira, 2005). Por exemplo, as raízes provenientes da vegetação externa atravessam os interstícios das rochas ferruginosas e alcançam as galerias de interconexão das cavernas. Dessa forma, as raízes fornecem nutrientes para insetos fitófagos (Ferreira et al., 2015; Ferreira, 2005). Essas galerias podem conectar-se a ambientes de serrapilheira (Ferreira et al., 2015).

Os resultados deste trabalho mostram que, além da presença de guano, outros fatores, como a estrutura da caverna, a sua interação com o meio externo e as alterações do meio circundante influenciam na presença de leveduras no fundo das cavernas. Isso mostra que o fundo das cavernas não é necessariamente zona muito limitada de nutrientes. A grande maioria das cavernas analisadas neste estudo não é turística e, portanto, foi observado que a presença de seres humanos não é o único fator que contribui para o aumento das populações das leveduras, como geralmente é relatado nos poucos estudos encontrados na literatura sobre leveduras de caverna.

3.2 Identificação por MALDI-TOF

Dos 236 isolados, foi possível obter a identificação de 30 isolados por MALDI-TOF, pertencentes às seguintes espécies: *Kazachstania exigua* (15 isolados), *Geotrichum silvicola* (4 isolados), *Cryptococcus laurentii* (4 isolados), *Candida orthopsilosis* (2 isolados), *Candida palmioleophila* (2 isolados) *Candida carpophila* (1 isolado), *Lachancea thermotolerans* (1 isolado) e *Rhodotorula mucilaginosa* (1 isolado). Foi realizado um agrupamento das espécies identificadas, representado por meio de um dendrograma de dissimilaridade, usando o índice de dissimilaridade de Spearman (Figura 2). Também foi realizado um agrupamento de dissimilaridade dos isolados cuja identificação por MALDI-TOF não foi possível, usando-se também o índice de dissimilaridade de Spearman (Figura 3). Os códigos de cada isolado estão na Tabela 3.

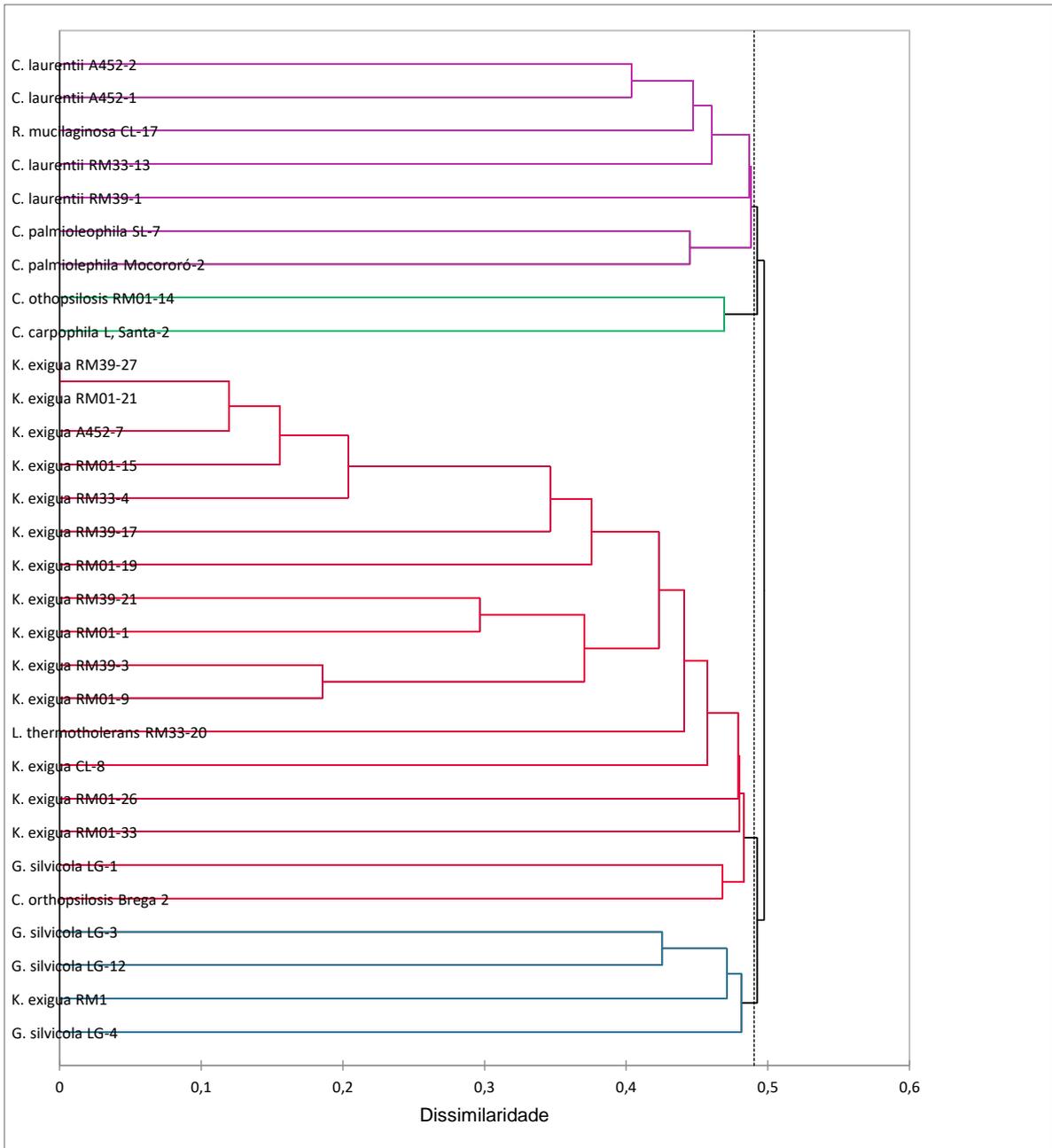


Fig. 2. Agrupamento das leveduras identificadas por MALDI-TOF, de acordo com a sua dissimilaridade.

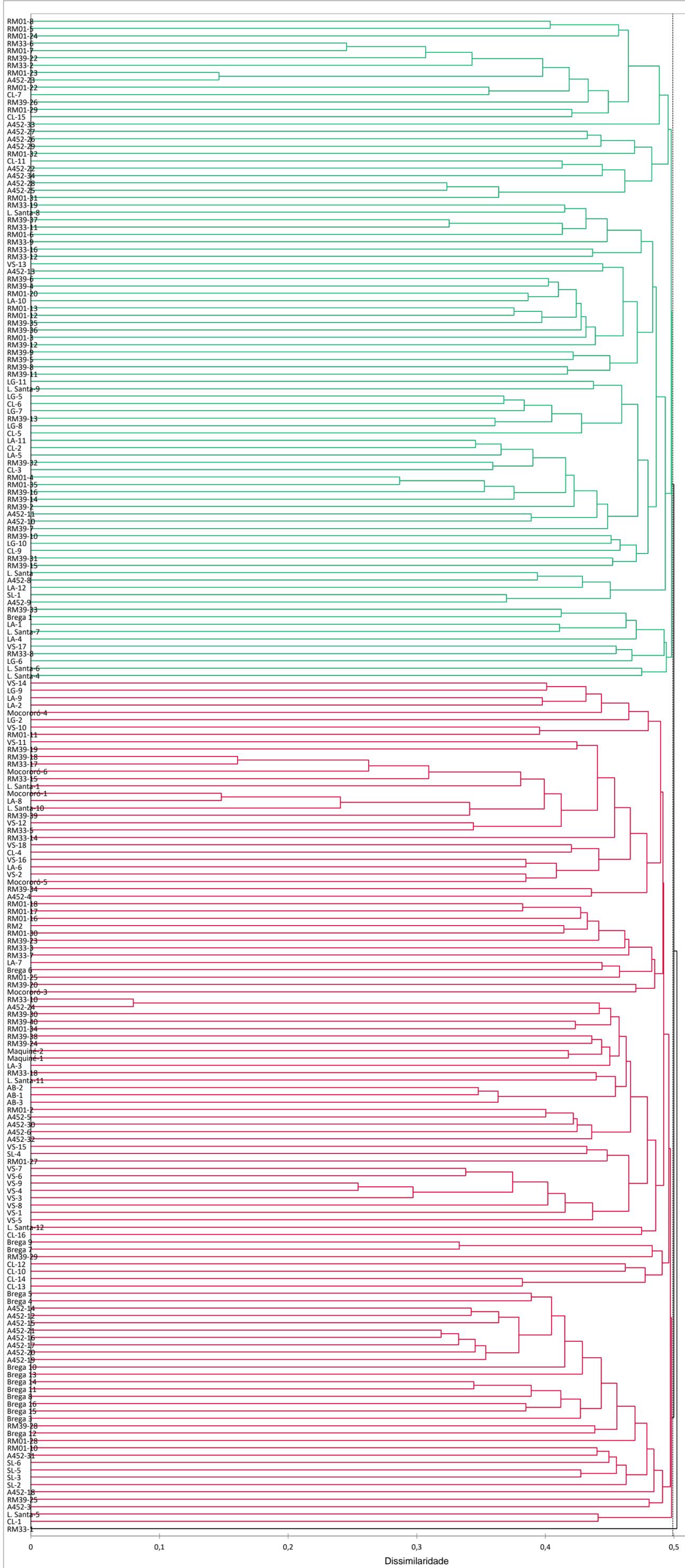


Fig. 3. Agrupamento das leveduras cuja identificação por MALDI-TOF não foi possível obter, de acordo com a sua dissimilaridade

Dentre as espécies identificadas, *C. laurentii* e *K. exigua* foram agrupadas em clusters diferentes (Figura 2). O primeiro cluster (cor roxo) agrupa todas as cepas identificadas como *C. laurentii* em um mesmo subcluster, junto com *Rh. mucilaginoso*. Dessa forma, as espécies do filo Basidiomycota encontradas neste trabalho (*C. laurentii* e *Rh. mucilaginoso*) estão agrupadas em um mesmo cluster. À diferença do primeiro subcluster, no segundo subcluster do primeiro cluster, estão agrupadas cepas do filo Ascomycota, identificadas como *C. palmioleophila*. O segundo cluster (cor verde) está constituído por cepas do gênero *Candida* (*C. orthopsilosis* e *C. carpophila*). No terceiro cluster (cor vermelho), estão agrupadas quase todas as cepas identificadas com *K. exigua*. No terceiro cluster, também está agrupada a espécie *L. thermotolerans*, no entanto, filogeneticamente, é próxima de *K. exigua*, pois ambas são do filo Ascomycota e da família Saccharomycetaceae.

No terceiro e quarto cluster, houve agrupamento de espécies diferentes. No entanto, filogeneticamente, são da mesma classe. Por exemplo, no segundo subcluster do terceiro cluster, estão agrupadas *G. silvicola* e *C. orthopsilosis*, que são da classe Saccharomycetales. No quarto cluster, também estão agrupadas cepas da classe Saccharomycetales (*G. silvicola* e *K. exigua*). Esse tipo de resultados também tem sido relatado em outros trabalhos. Por exemplo, Fernandes et al. (2019) realizaram um agrupamento com base nos espectros de MALDI-TOF de leveduras isoladas de fluido ruminal. Em tal trabalho, espécies diferentes e até de diferentes filos estiveram agrupadas em um mesmo cluster. Por exemplo, *Rh. dairenensis* e *C. rugosa* estiveram em um mesmo cluster. He et al. (2022) agruparam leveduras isoladas do Ártico e da Antártida, também com base em seus espectros de MALDI-TOF, e encontraram que as leveduras não formaram clusters coerentes com a sua proximidade filogenética. Os autores explicam que o agrupamento baseado em espectros de MALDI-TOF não é adequado para uma análise filogenética, pois usa valores m/z de proteínas ribossomais e não sequências de proteínas.

É possível que os valores m/z apresentem variações devido ao fato de as cepas poderem mostrar variações na expressão de proteínas ribossomais (Agustini et al., 2014). Tal variação é refletida no perfil dos picos dos espectros, dando agrupamentos considerados como incoerentes, como o agrupamento de espécies diferentes (Zhang et al., 2020). Isso pode ajudar a entender por que, neste trabalho, espécies diferentes e não relacionadas filogeneticamente estiveram agrupadas em um mesmo cluster. Existem vários fatores que influenciam na expressão das proteínas ribossomais e no perfil dos espectros e, conseqüentemente, no agrupamento das leveduras. Entre tais fatores, estão o método de extração de proteínas, a idade de cultivo das cepas e o meio de cultivo usado (Zhang et al., 2021). Neste trabalho, houve isolados cujo espectro o aparelho de MALDI-TOF não detectou. Para tais isolados, foi realizada uma variação no método de extração de proteínas, a fim de se obter a sua identificação ou, pelo menos, seu espectro. Tal variação consistiu em um passo de sonicação por 5 min na fase de extração das proteínas com etanol (Carvalho et al., 2017). Provavelmente, essa variação no método influenciou no perfil dos picos dos espectros das leveduras analisadas neste estudo e, conseqüentemente, no agrupamento.

Outro aspecto a ser considerado é que a base de dados do aparelho de MALDI-TOF possui espectros de referência principalmente de microrganismos de importância clínica e alimentar (Freitas et al., 2022; Kraková et al., 2018). No caso de microrganismos de amostras ambientais, às vezes, a identificação não é precisa ou não é possível obter a identificação, pois os microrganismos de amostras ambientais são mais diversos que os de ambientes clínicos (Santos et al., 2016). Neste estudo, por exemplo, de 236 isolados foi possível identificar 29. Outros estudos sobre identificação de microrganismos de amostras ambientais coincidem no pensamento de que é necessário complementar a base de dados com mais espectros, a fim de haver uma livreria mais robusta (Ahsfaq et al., 2022; Freitas et al., 2022; He et al., 2022). Para

tal fim, é necessário complementar a técnica de MALDI-TOF com técnicas moleculares para melhorar a identificação de microrganismos de cavernas (Mudgil et al., 2022).

Das espécies que foram identificadas neste trabalho, *Rh. mucilaginosa* é a mais relatada em solo de caverna, de acordo com a literatura. Por exemplo, Vaughan-Martini et al. (2000) isolaram leveduras de lama de caverna com pouca visitação e, dentre elas, foi identificada *Rh. mucilaginosa*. Jurado et al. (2010) identificaram *Rh. mucilaginosa* em amostras de sedimentos de caverna, e Nouri et al. (2018) isolaram a mesma espécie de levedura em amostras de solo de caverna. *Rh. mucilaginosa* é considerada como uma espécie ubíqua, devido a sua ampla distribuição em habitats terrestres e aquáticos e por sua capacidade para se adaptar a diversos substratos e ambientes extremos (Babič et al., 2016). Isso poderia facilitar o seu contato com vetores, como morcegos e insetos, que permitiriam introduzir essa espécie em cavernas.

Em contrapartida, algumas espécies encontradas neste trabalho têm sido isoladas de cavernas, mas não especificamente de amostras de solo. Por exemplo, *C. palmioleophila* e *C. laurentii* são relatadas como leveduras isoladas de guano de morcego (Sugita et al., 2005), e *C. palmioleophila*, de morcegos mortos (Vanderwolf et al., 2016). Quanto a *C. orthopsilosis*, é uma levedura que já foi isolada de morcegos (cavidade oral, pelo e membrana da asa) na caverna Meu Rei, localizada no Parque Nacional Catimbau, no estado de Pernambuco (Cunha et al., 2020). No entanto, neste trabalho, todas essas espécies foram isoladas de solo de caverna. Portanto, é a primeira vez que essas espécies são relatadas como encontradas em solo de caverna.

Espécies, como *C. orthopsilosis* e *C. palmioleophila*, são encontradas em ambientes terrestres e em restos vegetais (Morais et al., 2013). Provavelmente, a entrada de matéria orgânica como restos vegetais em cavernas pode permitir a entrada dessas espécies. *C. orthopsilosis* também tem sido encontrada em excremento de insetos associados a plantas (Suh et al., 2007). Essa característica provavelmente, faz com que esta espécie possa entrar nas

cavernas por meio de insetos, como, por exemplo, os grilos de caverna (Benoit et al., 2004). No caso de *C. laurentii*, que é uma levedura encontrada em frutas e que possui atividade antifúngica (Bautista-Rosales et al., 2014), provavelmente pode ser introduzida por meio do guano de morcegos frugívoros.

As espécies *L. thermotolerans*, *K. exigua*, *G. silvícola* e *C. carpophila*, até a presente data, não são relatadas na literatura como encontradas em cavernas. Geralmente, essas espécies podem ser encontradas em frutas ou em processos fermentativos, exceto *C. carpophila*. Especificamente, *L. thermotolerans* tem sido mais associada com frutas e com o processo de fermentação do vinho. Essa levedura se constitui como a única espécie do gênero *Lachancea* comercializada para uso na indústria vinícola (Porter et al., 2019), pois tem a capacidade de produzir ácido lático durante a fermentação alcoólica, permitindo melhorar o sabor e o aroma do vinho (Hranilovic et al., 2021).

No entanto, *L. thermotolerans* apresenta uma ampla presença em diversos ecossistemas (Hranilovic et al., 2017). Em parte, isso pode ser explicado pelo fato de essa espécie apresentar uma relação mutualística com insetos. Por exemplo, *L. lachancea* apresenta uma relação mutualística com drosofilídeos (*Drosophila*), que tem contato com frutas, geralmente em decomposição. Essa levedura se associa à superfície externa dos drosofilídeos, proporcionando nutrientes, tais como proteínas e vitaminas, enquanto os drosofilídeos a dispersam entre os diferentes habitats (Barata et al., 2012). Também *L. thermotolerans* tem sido encontrada no trato intestinal de insetos do gênero *Corydalus*, contribuindo para sua dispersão em diversos ecossistemas (Nguyen et al., 2007).

No caso da cepa identificada como *L. thermotolerans*, especificamente, ela foi isolada do fundo da caverna ferruginosa RM33, onde há presença de guano. Nessa caverna, há presença não só de drosofilídeos atraídos pelo guano, assim como de insetos (Asenjo et al., 2018). É provável que os drosofilídeos e os insetos presentes na caverna RM33 introduzam as leveduras

associadas com eles, como, por exemplo, *L. thermotolerans*. Outra possibilidade são os morcegos frugívoros que depositam restos de frutos no fundo das cavernas. Esses frutos são capazes de carregar leveduras que podem passar da sua superfície para a superfície do solo da caverna. Além disso, o guano desses morcegos pode transportar partes ou sementes de frutos que até podem germinar no fundo da caverna onde são depositados. Esses dois processos de entrada de matéria orgânica mediados por morcegos acontecem em cavernas ferruginosas de Minas Gerais (Ferreira et al., 2015).

Provavelmente, por meio desses dois processos de transferência de matéria orgânica, também foi introduzida a espécie *K. exigua* nas cavernas ferruginosas RM01, RM33, RM39 e Caverna do Lago (Tabela 3). Essa espécie pode ser encontrada em frutos, mas geralmente é descrita na literatura como uma espécie associada com a massa lêveda usada na fermentação natural do pão (De Vuyst et al., 2014). *K. exigua* também pode ser encontrada em solo, em manguezais, em produtos fermentados, como kimchi e kefir, e também em laticínios (Carbonetto et al., 2018). Essa capacidade de adaptação a diferentes substratos e às variações das condições do ambiente, provavelmente, permite que essa espécie consiga se adaptar também aos ambientes cavernícolas. Além disso, pode ser que, em ambientes cavernícolas, *K. exigua* possua estratégias de sobrevivência, tais como inibir bactérias e fungos e se associar com outros microrganismos. Por exemplo, Perez et al. (2016) mostraram que *K. exigua* possui atividade inibitória contra fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas. Zhao et al. (2022) encontraram que *K. exigua* possui a capacidade de cooperar com outros microrganismos no processo de decomposição de matéria orgânica. Além disso, essa espécie pode crescer em solos com valores de pH baixos (Buzzini et al., 2018). Portanto, *K. exigua* consegue se adaptar ao pH do solo das cavernas ferruginosas, que geralmente é ligeiramente ácido (Schaefer et al., 2008).

Outra espécie encontrada neste trabalho é *G. silvicola*, anteriormente classificada na literatura como pertencente ao gênero *Galactomyces*. Foi descrita como uma nova espécie do

gênero *Geotrichum* por Pimenta et al. (2005), que analisaram cepas isoladas de moscas e do bicho-da-seda. Posteriormente, Xiong et al. (2021) mostraram a importância biotecnológica dessa espécie, ao isolarem, a partir de amostras de solo, uma cepa de *G. silvicola* capaz de produzir etanol quiral.

Da caverna Lapa Grande, foram identificadas 4 leveduras, identificadas como *G. silvicola*, isoladas da área externa da caverna (Tabela 3). A área externa dessa caverna possui uma cobertura vegetal, principalmente de folhas velhas e restos da vegetação circundante. De acordo com de Hoog & Smith, 2011, espécies do gênero *Geotrichum* podem ser encontradas em frutos ou no trato intestinal de besouros (Coleoptera). Então, as cepas de *G. silvicola* isoladas da área externa da caverna Lapa Grande, provavelmente, são provenientes de besouros que participaram na decomposição dos restos vegetais.

C. carpophila também foi isolada da área externa de uma caverna, especificamente da caverna Lapa da Santa. Espécie ainda não descrita na literatura como encontrada em solo de caverna ou em ambientes relacionados com cavernas, é mais conhecida por ser de interesse clínico (Yang et al., 2021; Simões-Silva et al., 2017). Também tem sido encontrada em algumas bebidas e alimentos. Por exemplo, *C. carpophila* foi encontrada em um substrato preparado à base de arroz, usado como inoculante para a preparação de cerveja na Índia (Boro et al., 2022). Lhomme et al. (2016) identificaram *C. carpophila* no processo de panificação de pães orgânicos, mas em populações muito baixas. Giraldo et al. (2022) encontraram essa espécie em formigas-cortadeiras da espécie *Atta cephalotes*. Talvez, por meio dessas formigas, essa espécie foi encontrada na área externa da caverna Lapa da Santa.

Apesar de a maioria dos isolados não terem sido identificados, o agrupamento dos espectros de MALDI-TOF (Figura 3) permitiu observar que, dentro dos clusters, há padrões de agrupamento diferentes. Por exemplo, no primeiro cluster, o agrupamento das leveduras está dado pela localização geográfica e não pela litologia das cavernas. No dendrograma (Figura 3)

pode-se observar que isolados tanto de cavernas ferruginosas, como de cavernas de calcário, estão agrupados, formando um subcluster. O que há em comum entre a maioria de tais isolados é que são de cavernas da mesorregião do norte de Minas Gerais: Caverna do Lago (região de Rio Pardo), Lapa d'Água, Lapa Grande, Lapa da Santa (as três localizadas na região de Montes Claros) e Volta da Serra (região de Itacarambi). Já os isolados das cavernas ferruginosas RM01, RM33 e RM39, que são da mesorregião metropolitana de Belo Horizonte (região de Nova Lima), formam um subcluster separado.

Também se pode observar que, no segundo cluster (Figura 3), cavernas da mesma litologia, porém de regiões distantes entre si, estão separadas em subclusters. Os isolados da caverna Volta da Serra formam um subcluster separado dos subclusters constituídos por isolados das cavernas A452, Brega e Abutre (Figura 3). Tais cavernas são de calcário, porém de regiões diferentes. As cavernas A452, Brega e Abutre estão localizadas na região de Pains (Oeste de Minas Gerais), e a caverna Volta da Serra está localizada na região de Itacarambi (Norte de Minas Gerais). A região de Itacarambi, em comparação com as regiões das outras cavernas analisadas, é a mais distante geograficamente. Portanto, a distância geográfica provavelmente influenciou na dissimilaridade de leveduras de cavernas da mesma litologia. Isso provavelmente pode estar relacionado com as diferenças das condições ambientais entre as regiões onde estão localizadas as cavernas.

A distância entre a região de Pains e a região de Itacarambi é de 786.1 Km e, além disso, ambas as regiões apresentam diferenças climáticas. Na região de Itacarambi, chove menos, e as temperaturas são maiores. Já a região de Pains se caracteriza por verões quentes e úmidos e invernos secos, com temperaturas que variam de 16,3 °C (mínima média) a 23,3 °C (máxima média) e precipitação média anual de 1344 mm (Menegasse et al., 2002). Entretanto, na região de Itacarambi, o inverno é seco e o verão, chuvoso, com temperaturas que variam de 17 °C (mínima média) a 35 °C (máxima média) e precipitação média anual de 800 mm (Alvares et

al., 2014). Todas essas diferenças climáticas podem ter levado as leveduras da caverna Volta da Serra a serem diferentes das leveduras das cavernas A452, Brega e Abutre, mesmo sendo cavernas da mesma litologia.

Visto que a fonte de isolamento, neste trabalho, são as cavernas, provavelmente a heterogeneidade que apresentam os ambientes das cavernas analisadas foi refletida na heterogeneidade do agrupamento dos espectros de MALDI-TOF. Por exemplo, Zhang et al. (2021) usaram a técnica de MALDI-TOF para analisarem leveduras envolvidas na fermentação de vinhos. Os autores encontraram que a análise de agrupamento dos perfis dos espectros de MALDI-TOF se correlaciona com a fonte de isolamento. No caso dos ambientes cavernícolas, as condições de temperatura, luminosidade e de nutrientes são variáveis em uma mesma caverna (Ghosh et al., 2017). No agrupamento, não houve uma separação dos isolados de acordo com um padrão específico, como, por exemplo, a litologia das cavernas.

Neste estudo, um exemplo da heterogeneidade dos ambientes de caverna é a caverna A452. O fundo dessa caverna consiste em compartimentos estreitos separados entre si por condutos estreitos, com solos que apresentam características diferentes. Um compartimento do fundo consiste em um conduto estreito de argila úmida, de onde foram isoladas as cepas *C. laurentii* A452-1 e *C. laurentii* A452-2. Em outro compartimento do fundo, havia um depósito de guano e, em outro compartimento, havia presença de restos vegetais. Essa heterogeneidade do ambiente interno da caverna A452 foi refletida na presença de isolados da caverna A452, agrupados em todos os clusters do dendrograma (Figura 3). Portanto, além das diferenças das condições ambientais entre as regiões onde estão localizadas as cavernas, outro fator a ser levado em conta, e que provavelmente pode influenciar no agrupamento das leveduras, é a estrutura de cada caverna, a disponibilidade de nutrientes e as características do solo de cada uma delas. Cada caverna possui uma conformação particular e, junto com a disponibilidade de

nutrientes, pode criar um ambiente interno que a diferencia das outras (Northup & Cheeptham, 2013).

4. Conclusões

Foi possível isolar 236 leveduras a partir de amostras de solo de caverna, das quais foi possível obter a identificação de 30 leveduras por MALDI-TOF. A grande maioria das cavernas analisadas neste estudo não são turísticas e, portanto, foi observado que a presença de seres humanos não é o único fator que contribui para o aumento das populações das leveduras, como geralmente é encontrado na maioria das pesquisas sobre leveduras de caverna.

Além disso, neste trabalho, foram identificadas espécies que não são relatadas como encontradas em cavernas. Algumas dessas espécies são de interesse biotecnológico, como, por exemplo, *L. thermotolerans* e *K. exigua*. Portanto, este trabalho é a base para uma futura exploração biotecnológica dessas espécies. Ao mesmo tempo, futuros trabalhos serão necessários para aprofundar a função ecológica que realizam as leveduras isoladas neste estudo, nas cavernas em que foram encontradas.

Referências

- Agustini, B. C., Silva, L. P., Bloch, C., Bonfim, T., & da Silva, G. A. 2014. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12), 5645-5654.
- Alm, R., Johansson, P., Hjernø, K., Emanuelsson, C., Ringnér, M., Häkkinen, J., 2006. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. *Journal of Proteome Research*.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., De Moraes Gonçalves, J.L., Sparovek, G., 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Zeitschrift* 22, 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/050>
- Amorim, J.C., Schwan, R.F., Duarte, W.F., 2016. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. *Food Res. Int.* 85, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.014>
- Asenjo, A., Zampaulo, R. D. A., & Ferreira, R. L. 2018. Two new troglobitic species of *Oxarthrus* Reitter (Coleoptera, Staphylinidae, Pselaphinae) from Brazil. *Zootaxa*, 4462(3), 404-414.

- Ashfaq, M. Y., Da'na, D. A., & Al-Ghouti, M. A. 2022. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 305, 114359.
- Babič, M. N., Zalar, P., Ženko, B., Džeroski, S., & Gunde-Cimerman, N. 2016. Yeasts and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. *Fungal Ecology*, 20, 30-39.
- Barata, A., & Santos, S. C. 2012. New Insights into the Ecological Interaction Between Grape Berry Microorganisms and Drosophila Flies During the Development of Sour Rot. 416–430. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0041-y>
- Bautista-Rosales, P.U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N.A., Vázquez-Juárez, R., Ragazzo-Sánchez, J.A., 2014. Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. *Crop Prot.* 65, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.019>
- Benoit, J.B., Yoder, J.A., Zettler, L.W., Hobbs, H.H., 2004. Mycoflora of a troglonecric cave cricket, *Hadenocercus cumberlandicus* (Orthoptera: Rhaphidophoridae), from two small caves in Northeastern Kentucky. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97, 989–993. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[0989:MOATCC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[0989:MOATCC]2.0.CO;2)
- Bontemps, Z., Alonso, L., Pommier, T., Hugoni, M., & Moëgne-locco, Y. 2022. Science of the Total Environment Microbial ecology of tourist Paleolithic caves. 816.
- Boro, N., Borah, A., Sarma, R. L., & Narzary, D. 2022. Beer production potentiality of some non - *Saccharomyces* yeast obtained from a traditional beer starter emao. 0123456789.
- Boston, P. J., Spilde, M. N., Northup, D. E., Curry, M. D., Melim, L. A., & Rosales-Lagarde, L. (2009). Microorganisms as speleogenetic agents: geochemical diversity but geomicrobial unity. *Hypogene Speleogenesis and Karst Hydrogeology of Artesian Basins. Ukrainian Institute of Speleology and Karstology, Special Paper, 1.*
- Buzzini, P., Turchetti, B., & Yurkov, A. 2018. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? March, 1–11. <https://doi.org/10.1002/yea.3314>
- Carbonetto, B., Sicard, D., Ramsayer, J., & Legrand, J. 2018. Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. March, 1–13. <https://doi.org/10.1002/yea.3350>
- Carvalho, B. F., Ávila, C. L. S., Bernardes, T. F., Pereira, M. N., Santos, C., & Schwan, R. F. 2017. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), 589-600.
- Connell, L., & Staudigel, H. 2013. Fungal diversity in a dark oligotrophic volcanic ecosystem (DOVE) on Mount Erebus, Antarctica. *Biology*, 2(2), 798-809.
- Cunha, A.O.B., Bezerra, J.D.P., Oliveira, T.G.L., Barbier, E., Bernard, E., Machado, A.R., Souza-Motta, C.M., 2020. Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity. *PLoS One* 15, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243494>
- de Hoog, G. S., & Smith, M. T. (2011). *Geotrichum Link: Fries (1832)*. In *The Yeasts* (pp. 1279-1286). Elsevier. Pages 1279-1286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00091-4>.

- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., & Weckx, S. 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform?. *Food microbiology*, 37, 11-29.
- Dhami, N.K., Quirin, M.E.C., Mukherjee, A., 2017. Carbonate biomineralization and heavy metal remediation by calcifying fungi isolated from karstic caves. *Ecol. Eng.* 103, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.03.007>
- Emerson, J.K., Roark, A.M., 2007. Composition of guano produced by frugivorous, sanguivorous, and insectivorous bats. *Acta Chiropterologica* 9, 261–267. [https://doi.org/10.3161/1733-5329\(2007\)9\[261:COGPBF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3161/1733-5329(2007)9[261:COGPBF]2.0.CO;2)
- Engel, A. S. 2019a. Microbes. In *Encyclopedia of caves* (pp. 691-697). Academic Press.
- Engel, A. S. 2019b. Chemolithoautotrophy. In *Encyclopedia of Caves* (pp. 267-276). Academic Press.
- Fernandes, T., Carvalho, B. F., Mantovani, H. C., Schwan, R. F., & Ávila, C. L. S. 2019. Identification and characterization of yeasts from bovine rumen for potential use as probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 127(3), 845-855.
- Ferreira, R. L., Oliveira, M. P. A., & Silva, M. S. 2015. Biodiversidade subterrânea em geossistemas ferruginosos. *Geossistemas Ferruginosos do Brasil*. (Eds FF do Carmo and LHY Kamino.) pp, 195-231.
- Ferreira, R.L. 2005. A vida subterrânea nos campos ferruginosos. *O Carste*, 3(17): 106-115.
- Ferreira, R. L., Nonaka, E., & Rosa, C. 2000. Riqueza e abundância de fungos associados a guano de morcegos na gruta da Lavoura. *O Carste*, 12(1), 46-51.
- Freitas, J., Perestrelo, R., Vaz-Pires, P., & Câmara, J. S. 2022. Bacterial diversity analysis of coastal superficial seawaters near aquaculture facilities, using MALDI-TOF approach and Ribopeaks database. *Aquaculture*, 556, 738263.
- Ghosh, S., Kuisiene, N., Cheeptham, N., 2017. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochem. Pharmacol.* 134, 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>
- Giraldo, C., Chaves, C., Rosanna, L., Roberto, T., Andre, A., Lerma, J. M., & Giraldo, C. 2022. Yeasts associated with the worker caste of the leaf - cutting ant *Atta cephalotes* under experimental conditions in Colombia. *Archives of Microbiology*, 204(5), 1-10.
- He, C., Feng, J., Su, J., Zhang, T., & Yu, L. 2022. Application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Rapid Identification of Yeast Species From Polar Regions. *Frontiers in microbiology*, 13, 832893-832893.
- Hranilovic, A., Albertin, W., Liacopoulos, D., Gallo, A., Grbin, P. R., Danner, L., Bastian, S. E. P., Masneuf-pomarede, I., Coulon, J., Bely, M., & Jiranek, V. 2021. Impact of *Lachancea* thermotolerans on chemical composition and sensory profiles of Merlot wines. 349 (December 2020).
- Hranilovic, A., Bely, M., Masneuf-pomarede, I., Jiranek, V., & Albertin, W. 2017. The evolution of *Lachancea* thermotolerans is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. 1–17.

Jurado, V., Porca, E., Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., 2010. Fungal outbreak in a show cave. *Sci. Total Environ.* 408, 3632–3638. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.057>

Kraková, L., Šoltys, K., Otlewska, A., Pietrzak, K., Purkrťová, S., Savická, D., ... & Pangallo, D. 2018. Comparison of methods for identification of microbial communities in book collections: Culture-dependent (sequencing and MALDI-TOF MS) and culture-independent (Illumina MiSeq). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 131, 51-59.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V., 2011. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In: Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.), *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, pp. 87-96

Lemes, C. G., Cordeiro, I. F., De Paula, C. H., Silva, A. K., Do Carmo, F. F., Kamino, L. H., ... & Moreira, L. M. 2021. Potential bioinoculants for sustainable agriculture prospected from ferruginous caves of the iron Quadrangle/Brazil. *Sustainability*, 13(16), 9354.

Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., & Sicard, D. 2016. Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology*, 53, 41–50.

Martini, A., 1963. Yeast in Cavern Environments, *Archiv fur Mikrobiologie* 45, 111-114.

Menegasse, L. N., Gonçalves, J. M., & Fantinel, L. M. 2002. Disponibilidades hídricas na Província Cárstica de Arcos-Pains-Doresópolis, Alto São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Águas Subterrâneas*, 16(1).

Morais, C.G., Cadete, R.M., Uetanabaro, A.P.T., Rosa, L.H., Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2013. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. *Fungal Genet. Biol.* 60, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.003>.

Mudgil, D., Paul, D., Baskar, S., Baskar, R., & Shouche, Y. S. 2022. Cultivable microbial diversity in speleothems using MALDI-TOF spectrometry and DNA sequencing from Krem Soitan, Krem Lawbah, Krem Mawpun, Khasi Hills, Meghalaya, India. *Archives of microbiology*, 204(8), 1-15.

Nguyen, N. H., Suh, S. O., & Blackwell, M. (2007). Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia*, 99(6), 842-858.

Northup, M.L.N., Cheeptham, N.D.E., 2013. *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery*, Thompson Rivers University, Kamloops, BC, Canada.

Nouri, H., Moghimi, H., Geranpayeh Vaghei, M., Nasr, S., 2018. *Blastobotrys persicus* sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from cave soil. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 111, 517–524. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0972-x>

O'Connor, B. R., Fernández-Martínez, M. Á., Léveillé, R. J., & Whyte, L. G. (2021). Taxonomic characterization and microbial activity determination of cold-adapted microbial communities in Lava Tube Ice Caves from Lava Beds National Monument, a high-fidelity Mars analogue environment. *Astrobiology*, 21(5), 613-627.

- Parisutham, V., Chandran, S., Mukhopadhyay, A., Kuk, S., Keasling, J.D., 2017. Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. *Bioresource Technology* 239, 496–506.
- Paun, V. I., Lavin, P., Chifiriuc, M. C., & Purcarea, C. 2021. First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13, 000 - year old cave ice core. 0123456789, 1–15.
- Pellegrini, T. G., & Ferreira, R. L. 2013. Structure and interactions in a cave guano–soil continuum community. *European journal of soil biology*, 57, 19-26.
- Perez, M. F., Contreras, L., Garnica, N. M., Fernández-Zenoff, M. V., Farías, M. E., Sepulveda, M., ... & Dib, J. R. 2016. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *PloS one*, 11(10), e0165590.
- Pfendler, S., Karimi, B., Maron, P., Ciadamidaro, L., Valot, B., Bousta, F., Alaoui-sosse, L., & Alaoui-sosse, B. 2018. Science of the Total Environment Bio film biodiversity in French and Swiss show caves using the metabarcoding approach : First data. 615, 1207–1217.
- Pimenta, R. S., Alves, P. D. D., Corre, A., Prasad, G. S., Sinha, B. R. R. P., Rosa, C. A., & Rosa, C. A. 2005. *Geotrichum silvicola* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. 497–501. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63187-0>
- Pohl, C. H., Kriel, W., Venter, P., Heerden, E. Van, & Albertyn, J. 2007. The diversity of culturable airborne fungi in an active South African gold mine. August.
- Porter, T. J., Divol, B., & Setati, M. E. 2019. Lachancea yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. 119(January), 378–389.
- Rangseekaew, P., & Pathom-Aree, W. 2019. Cave actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 10, 387.
- Saiz-Jimenez, C., 2012. Microbiological and environmental issues in show caves. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2453–2464. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1070-x>
- Sallstedt, T., Ivarsson, M., Lundberg, J., Sjöberg, R., Ramón, J., & Romaní, V. 2014. Speleothem and biofilm formation in a. 43(September), 305–313.
- Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. 2016. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, 141(10), 2827-2837.
- Sauro, F., De Waele, J., Payler, S. J., Vattano, M., Sauro, F. M., Turchi, L., & Bessone, L. (2021). Speleology as an analogue to space exploration: The ESA CAVES training programme. *Acta Astronautica*, 184, 150-166.
- Schabereiter-gurtner, C., Saiz-jimenez, C., Pin, G., Lubitz, W., & Ro, S. 2004. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma) Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma) (Llon |. 6496(November 2017). [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00280-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00280-0).
- Schaefer, C.E.G.R.; Mendonça, B.A.F. & Ribeiro, A.S. 2008. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. In: Jacobi, C.M. Simpósio Afloramentos Ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero: Biodiversidade, Conservação e Perspectivas de

Sustentabilidade. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Biológicas

Selbmann, L., Zucconi, L., Onofri, S., Cecchini, C., Isola, D., Turchetti, B., Buzzini, P., 2014. Taxonomic and phenotypic characterization of yeasts isolated from worldwide cold rock-associated habitats. *Fungal Biol.* 118, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.11.002>

Silva, M. S., Liria, C. C. S., Sampaio, F. A. C., & Ferreira, R. L. 2012. Transitory aquatic taxocenosis in two neotropical limestone caves. *Revista Brasileira de Espeleologia*, 1(2), 29–41.

Simões-silva, L., Silva, S., Santos-araujo, C., Sousa, J., Pestana, M., Araujo, R., Soares-silva, I., & Sampaio-maia, B. 2017. Oral Yeast Colonization and Fungal Infections in Peritoneal Dialysis Patients : A Pilot Study. 2017.

Strohalm, M., Kavan, D., Novák, P., Volný, M., Havlíček, V., 2010. MMass 3: A cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Anal. Chem.* 82, 4648–4651. <https://doi.org/10.1021/ac100818g>

Sugita, T., Kikuchi, K., Makimura, K., Urata, K., Someya, T., Kamei, K., Niimi, M., Uehara, Y., 2005. Trichosporon species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7626–7629. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7626-7629.2005>

Suh, S.O., Nguyen, N.H., Blackwell, M., 2008. Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: Seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 8, 88–102. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00320.x>

Vanderwolf, K.J., Malloch, D., McAlpine, D.F., 2016. Fungi on white-nose infected bats (*Myotis* spp.) in Eastern Canada show no decline in diversity associated with *Pseudogymnoascus destructans* (Ascomycota: Pseudeurotiaceae). *Int. J. Speleol.* 45, 43–50. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.45.1.1946>

Vanderwolf, K.J., Malloch, D., McAlpine, D.F., Forbes, G.J., 2013. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *Int. J. Speleol.* 42, 77–96. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.9>

Vaughan-Martini, A., Angelini, P., Zacchi, L., 2000. The influence of human and animal visitation on the yeast ecology of three Italian caverns. *Ann. Microbiol.* 50, 133–140.

Wickerham, L. J., 1951. Taxonomy of yeasts (No. 1029). US Department of Agriculture.

Xiong, L., Kong, X., Liu, H., & Wang, P. 2021. Bioresource Technology Efficient biosynthesis of (S) -1- [2- (trifluoromethyl) phenyl] ethanol by a novel isolate *Geotrichum silvicola* ZJPH1811 in deep eutectic solvent / cyclodextrin-containing system. 329(February).

Yang, Z. H., Song, Y. G., & Li, R. Y. 2021. A ten-year retrospective study of invasive candidiasis in a tertiary hospital in Beijing. *Biomedical and Environmental Sciences*, 34(10), 773-788.

Yoshizumi, W. T. 2019. Geoespeleologia da gruta do Zé Brega, Pains-MG/Brasil.

Yurkov, A.M., Röhl, O., Pontes, A., Carvalho, C., Maldonado, C., Sampaio, J.P., 2016. Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in mediterranean forests, woodlands and scrub biome. *FEMS Yeast Res.* 16, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov103>

Zhang, J., Plowman, J. E., Tian, B., Clerens, S., & On, S. L. 2021. The influence of growth conditions on MALDI-TOF MS spectra of winemaking yeast: Implications for industry applications. *Journal of Microbiological Methods*, 188, 106280.

Zhang, J., Plowman, J. E., Tian, B., Clerens, S., & On, S. L. 2020. An improved method for MALDI-TOF analysis of wine-associated yeasts. *Journal of microbiological methods*, 172, 105904

Zhao, Y., Cai, J., Zhang, P., Qin, W., Lou, Y., Liu, Z., & Hu, B. 2022. Environmental Science and Ecotechnology Core fungal species strengthen microbial cooperation in a food-waste composting process. 12.

ARTIGO 2 - Caracterização biotecnológica de leveduras isoladas de caverna, cultivadas em hidrolisados lignocelulósicos de café

Artigo redigido conforme norma para publicação da revista **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**.

Resumo

Nas cavernas, podem ser encontradas leveduras com capacidade para consumir e fermentar açúcares de substratos lignocelulósicos. Neste estudo, foram caracterizadas 236 leveduras de cavernas quanto à fermentação de xilose e celobiose e também quanto à atividade celulolítica. *C. orthopsilosis* Brega-2 apresentou capacidade para fermentar celobiose, além de xilose, e também demonstrou capacidade celulolítica. Outras cepas não fermentaram xilose, mas foram capazes de crescer usando xilose como fonte de carbono. Além disso, foram preparados hidrolisados de dois substratos lignocelulósicos de café: casca e grãos verdes, pretos e ardidos (PVA). O hidrolisado de PVA apresentou maior quantidade de xilose e foi usado para cultivar as cepas selecionadas nos testes de fermentação de xilose e celobiose e de atividade celulolítica. *C. orthopsilosis* Brega-2, RM01-31 e RM33-12 foram avaliadas quanto à produção de etanol, xilitol e proteína unicelular no hidrolisado de PVA. *C. orthopsilosis* Brega-2 apresentou maior porcentagem de proteína (35,8%). Todas essas cepas foram capazes de produzir etanol e nenhuma produziu xilitol. Este é o primeiro trabalho sobre caracterização biotecnológica de leveduras de caverna. Os resultados obtidos permitiram conhecer os parâmetros-chave para a exploração biotecnológica dessas leveduras em hidrolisados lignocelulósicos para futuros trabalhos.

Palavras-chave: PVA. Xilose. Etanol. Proteína. Biomassa.

1. Introdução

Existem indícios de que é possível encontrar leveduras com potencial biotecnológico em ambientes cavernícolas. Especificamente, existem evidências de leveduras de caverna envolvidas em processos de vinificação e de maturação de queijos. Por exemplo, Cailhol et al. (2020) realizaram um processo de vinificação na caverna Saint-Clement, na França. Nesse trabalho, foi isolada a levedura *Guehomyces pullulans* das paredes da caverna. Os mesmos autores especificam que se trata de uma espécie usada na clarificação de suco de uvas no processo de elaboração de vinhos. Budak et al. (2016) estudaram a diversidade e a evolução da microbiota de um processo de maturação de queijo realizado por 120 dias dentro da caverna Divle, localizada na Turquia. *Debaromyces hansenii* foi detectada a partir dos 60 dias de maturação e foi a espécie predominante dentre as leveduras isoladas do queijo. Provavelmente, essa levedura é do mesmo ambiente cavernoso, pois, de acordo com Kirtil et al. (2021) e Ozturkoglu-Budak et al. (2016), o processo de maturação do queijo na caverna Divle é influenciado por microrganismos presentes em tal caverna.

Além disso, pode ser que, em ambientes cavernícolas, sejam encontradas leveduras com potencial para fermentar açúcares de materiais lignocelulósicos. O que se leva a pensar nessa possibilidade é que existem leveduras associadas a restos vegetais capazes de fermentar xilose (Morais et al., 2013). É provável que tais leveduras sejam encontradas em cavernas, pois as chuvas ou fluxos de água permitem a entrada de biomassa vegetal ou detritos vegetais (Silva et al., 2013). Isso mostraria que as leveduras de cavernas apresentam uma diversidade metabólica que vai além de processos de vinificação e de maturação de queijos. Ao mesmo tempo, abriria a possibilidade de usar tais leveduras em processos em que sejam aproveitados subprodutos lignocelulósicos, para obtenção de produtos, tais como etanol, xilitol e proteína unicelular.

As práticas agroindustriais geram substratos lignocelulósicos, e a agroindústria do café é uma das que mais gera tais substratos (Singh et al., 2022; Nair et al., 2022). Dentre os materiais lignocelulósicos do café, estão a casca, o pergaminho, a película prateada (endocarpo) e a borra, todos eles compostos por celulose, hemicelulose e lignina (Corrêa et al., 2021; Niglio et al 2019). Os grãos de café pretos, verdes e ardidos (conhecidos como PVA) também são compostos por celulose, hemicelulose e lignina. Por essa razão, existem trabalhos onde o PVA é aproveitado para a obtenção de hidrochar (Santana et al., 2020; Santos et al., 2020). No entanto, ainda não existem trabalhos sobre o aproveitamento do PVA para a obtenção de hidrolisados para o cultivo de leveduras capazes de consumir e fermentar xilose.

Minas Gerais, um dos maiores produtores de café no Brasil, é um dos estados que possui a maioria das cavernas no país (Anuário Estatístico do Patrimônio Espeleológico Brasileiro, 2021). Portanto, aproveitando essas condições, este trabalho tem como objetivo caracterizar leveduras de algumas cavernas de Minas Gerais, quanto a sua habilidade para fermentar hidrolisados de substratos lignocelulósicos de café. As leveduras foram avaliadas quanto à produção de etanol, xilitol, proteína unicelular e produção de biomassa. Neste estudo, foram usados dois substratos lignocelulósicos de café: casca e PVA.

2. Metodologia

2.1 Obtenção das leveduras testadas

Foram testadas 236 leveduras isoladas de 15 cavernas do estado de Minas Gerais. Inicialmente, foi realizado um teste de fermentação de xilose e celobiose para selecionar as leveduras fermentadoras ou aquelas que crescem na presença de xilose e celobiose. Posteriormente, as leveduras selecionadas foram testadas em hidrolisados de substratos lignocelulósicos de café.

2.2 Teste de fermentação de xilose e celobiose

Para a realização desse teste, foram usados tubos de Durham, contendo o meio basal de fermentação com a seguinte composição: 4,5 g/L de extrato levedura, 7,5 g/L de peptona e azul de bromotimol como indicador (50 mg/75 mL), com 2% do açúcar a ser testado (Wickerham, 1951). As soluções dos açúcares foram previamente filtradas em membranas de 0,2 μm . A capacidade fermentativa foi visualizada por meio do acúmulo de gás dentro do tubo de Durham. A capacidade fermentativa foi com o acúmulo de CO_2 dentro do tubo. No caso das cepas que não fermentaram, mas que consumiram o açúcar, a coloração do meio mudou de verde para amarelo. No caso das cepas que não fermentaram nem consumiram o açúcar, a coloração do meio mudou de verde para azul.

A fim de se evitarem falsos positivos nesse teste, foi feito o esgotamento de nutrientes. Para isso, para cada isolado, uma alçada de colônia foi transferida para microtubos com 1 mL de água destilada estéril, os quais foram mantidos por 24h a 28 °C. Após isso, cada suspensão foi centrifugada (6000 rpm, 5 min, 4 °C), descartando-se o sobrenadante. A inoculação foi realizada em 5mL de meio basal de fermentação em cada tubo. Os isolados foram cultivados a 28 °C por triplicata.

As leveduras que fermentaram e algumas que não fermentaram, mas que conseguiram crescer na presença de xilose, foram selecionadas para o teste em hidrolisados lignocelulósicos. Além desse teste, foi realizado o teste de fermentação de celobiose exclusivamente para as leveduras que fermentaram xilose. As leveduras que fermentaram celobiose foram selecionadas para o teste de capacidade celulolítica com CMC 1%.

2.3 Teste de capacidade celulolítica com CMC 1%

Os isolados selecionados na etapa de assimilação e fermentação de xilose e celobiose foram avaliados quanto à capacidade celulolítica, usando o meio YEPG com carboximetilcelulase (CMC) como fonte de carbono, ao invés de glicose. A composição do

meio de cultura usado nesse teste foi a seguinte: CMC 1%, extrato de levedura 1%, peptona 2% e ágar 2%.

Para confirmar a atividade celulolítica, as placas foram cobertas com solução aquosa de vermelho congo por 15 min. Após esse tempo, foi retirado o excesso, e as placas foram também cobertas com NaCl 1 M por 15 min (Teather & Wood, 1982). A presença de halo no redor da colônia indica atividade celulolítica. O teste foi realizado por triplicata. As leveduras que apresentaram capacidade celulolítica, assim como as que foram selecionadas no teste descrito na seção 2.1, foram testadas quanto a sua capacidade de fermentação em hidrolisados de casca e de grãos secos de café.

2.4 Avaliação do crescimento em hidrolisados não detoxificados de substratos lignocelulósicos de café

2.4.1 Obtenção dos substratos lignocelulósicos e preparação dos hidrolisados

Os substratos lignocelulósicos usados neste trabalho foram casca e grãos de café. A casca de café conilon (*Coffea canephora*) foi obtida da Agência de Inovação do Café (InovaCafé), da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Os grãos usados foram grãos defeituosos pretos, verdes e ardidos (PVA) de café arábica (*Coffea arabica* L.), que sobraram de uma fermentação alcoólica realizada com 10% de PVA em água com glicose (8 brix). No final dessa fermentação, o mosto foi separado dos grãos. Os grãos foram secos a 50 °C por 24h. Esses grãos foram usados neste trabalho como matéria-prima para a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos.

A casca de café conilon e os grãos de PVA foram moídos com o auxílio de um moinho analítico IKA A11. Foram preparados hidrolisados a partir desses dois substratos, com diferentes proporções de substrato-ácido (massa/volume): 1:50, 1:40, 1:30, 1:20 e 1:10. Inicialmente, as condições da hidrólise foram H₂SO₄ 1.5% (w/v) a 120 °C por 20 min em autoclave (Xavier et al., 2017), com a finalidade de definir qual é o melhor substrato e qual é a melhor proporção de substrato-ácido para o processo de hidrólise. Esses hidrolisados foram ajustados a um pH de 6.0 (Unrean & Ketsub, 2018) para serem analisados por HPLC para se conhecer a sua composição de açúcares.

Posteriormente, foram testadas diferentes concentrações de H₂SO₄ e diferentes tempos de hidrólise: H₂SO₄ 1.5% w/v a 20 min (H1); H₂SO₄ 1.5% w/v a 30 min (H2); H₂SO₄ 2.5% w/v a 20 min (H3) e H₂SO₄ 2.5% w/v a 30 min (H4). Os hidrolisados foram separados do resíduo sólido por filtração, e o pH, ajustado a 6 (Unrean & Ketsub, 2018). Esses hidrolisados (H1, H2, H3 e H4) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O substrato selecionado foi analisado quanto a sua composição de hemicelulose e lignina. A análise foi realizada pelo laboratório 3rLab, da cidade de Lavras, MG.

2.4.2 Análises de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os hidrolisados foram caracterizados quanto a sua composição de xilose, glicose e arabinose por HPLC. Previamente, as amostras foram centrifugadas a 9500 rpm por 10 min até se reduzir a presença de resíduos, para depois filtrá-las com filtros de 0.2 μm (Shankar et al., 2020). Foi usado um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Corp. Japan) equipado com detector UV-Vis (SPD-10Ai) e com detector de índice de refração (RID-10A). Foi usada uma coluna Supelcogel 8H (7,8 mm x 30 cm) e ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel em um fluxo de 0,5 mL/min a 30 °C (Lopes et al., 2020).

A caracterização de açúcares dos hidrolisados foi realizada com a finalidade de selecionar as melhores condições de hidrolise e, portanto, selecionar o hidrolisado para avaliar o crescimento das leveduras selecionadas nos testes de fermentação de xilose e celobiose e de capacidade celulolítica com CMC 1%.

2.4.3 Preparação dos inóculos e avaliação do crescimento no hidrolisado não detoxificado

O hidrolisado selecionado foi ajustado a um pH de 6.0 e centrifugado a 9500 rpm por 10 min até retirar o máximo possível de resíduos (Shankar et al., 2020). Após isso, foi realizada uma suplementação com extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em uma proporção de 1:4 (g/L), e com 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zhang et al., 2019). O hidrolisado foi autoclavado por 15 min para ser esterilizado e utilizado como meio de cultura para as leveduras, sem realização de um processo de detoxificação.

Antes de se realizar a inoculação no hidrolisado, as leveduras selecionadas foram cultivadas previamente em 10 mL de YEPX (peptona 2%, extrato de levedura 1%, xilose 2%) a 28 °C, pH 7,0 por 48h por duplicata. Após esse tempo de cultivo, o inóculo foi transferido a 90 mL de YEPX, para realizar um cultivo em 100 mL de YEPX por duplicata, a 30 °C por 48h, com a finalidade de atingir uma população entre 10^7 e 10^8 . Para calcular a população, foi realizado um plaqueamento para fazer a contagem de unidades formadoras de colônias.

Atingida a população de células, a biomassa das leveduras foi lavada com água destilada estéril, a 7000 rpm, 4 °C, antes da inoculação no hidrolisado. Foram transferidos 10 mL de alíquota de cada cultivo de levedura para tubos de 50 mL com 10 mL de hidrolisado. O cultivo foi realizado por duplicata, a 30 °C, por 72h. No final do cultivo, a contagem da população foi realizada por contagem em placa de unidades formadoras de colônias. Ao mesmo tempo, foram coletadas amostras do hidrolisado inoculado, para a determinação de consumo de açúcares e de

produção de xilitol, a fim de se avaliar se as cepas são produtoras desse metabolito, de acordo com a metodologia mencionada na seção 2.3.2. Previamente, as amostras foram centrifugadas a 9500 rpm, por 10 min, para a retirada da a biomassa, e, depois, foram centrifugadas até a retirada do máximo possível dos resíduos do hidrolisado.

Após esse cultivo em 10 mL de hidrolisado, foram selecionadas as leveduras que apresentaram maior consumo de xilose e maior crescimento, para um cultivo em 100 mL de hidrolisado. Isso foi feito com a finalidade de se realizar uma avaliação quanto à produção de proteína unicelular e, dependendo da caracterização por HPLC, do cultivo, em 10 mL, de xilitol ou etanol.

2.5 Cultivo em batelada em 100 mL de hidrolisado não detoxificado

2.5.1 Construção da curva de calibração

Previamente ao cultivo em 100 mL de hidrolisado não detoxificado, foi seguida a metodologia de Palladino et al. (2021) para a construção de uma curva de calibração das leveduras selecionadas na etapa anterior, com o propósito de ser usada para estimar a biomassa seca no cultivo em 100 mL de hidrolisado. Para tal finalidade, as leveduras foram cultivadas por duplicata em 100 mL de YM (10 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de extrato de malte) em frascos de 250 mL, por 24h, a 30 °C, em agitador horizontal a 200 rpm. No final do cultivo, foram coletados 10 mL de cada frasco e centrifugados a 7000 rpm, 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e a biomassa foi ressuspensa em 10 mL de solução salina (0,85%). Dessa suspensão, foram realizadas diluições de 1:5, 1:7, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 e 1:60. Foi medida a absorbância de cada diluição em espectrofotômetro a 600 nm.

Paralelamente, 5 mL de cada cultivo em YM foram centrifugados, e o sobrenadante, descartado. A biomassa foi lavada com água destilada estéril por centrifugação a 7000 rpm, 4 °C, por 5 min. Após isso, a biomassa de cada levedura foi ressuspensa em água destilada e foram vertidos 5 mL de alíquota por triplicata em pequenos recipientes de alumínio previamente pesados. Os recipientes foram colocados em estufa a 60 °C, por 48h. Após, os recipientes foram pesados e foi feita a diferença de peso para o cálculo do peso da biomassa seca. Os dados de DO e o peso seco foram usados para obtenção da equação de correlação entre os dois parâmetros.

2.5.2 Avaliação do cultivo em 100 mL de hidrolisado não detoxificado

As leveduras selecionadas para essa etapa foram previamente cultivadas em 100 mL de YM (10 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de extrato de malte) em frascos de 250 mL, por 24h, a 30 °C, em agitador horizontal a 200 rpm. Os cultivos foram realizados em triplicata (Palladino et al., 2021). Os inóculos foram padronizados a uma população de 10^7 células/mL. Atingida essa população, a biomassa foi centrifugada e lavada com água destilada estéril e transferida a frascos de 250 mL com 100 mL de hidrolisado. Esse cultivo foi realizado por triplicata para cada levedura, a 30 °C, em agitador horizontal a 200 rpm, por 96h. Foram coletadas amostras a cada dia para medir absorbância, a fim de se calcular a biomassa seca por meio da curva de calibração. Ao mesmo tempo, também foram coletadas amostras para análise por HPLC, para se conhecer o consumo de açúcares e a produção de metabólitos (xilitol ou etanol) de cada levedura.

No final do cultivo, a biomassa de cada levedura foi retirada do hidrolisado por meio de centrifugação e lavada com água destilada estéril. A biomassa de cada cultivo foi seca a 60 °C na estufa, para, posteriormente, se realizar a análise de proteína unicelular pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005).

2.5.3 Análises estatísticas

Os dados de crescimento das leveduras foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativas pelo teste F ($p < 0,05$), as médias foram submetidas ao teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

3. Resultados e discussão

3.1 Fermentação de xilose e celobiose

De todas as 236 leveduras, quatro apresentaram capacidade fermentativa: Brega-1 *C. orthopsilosis*, Brega-2, Brega-4 e Brega-8. Dessas leveduras, três fermentaram tanto xilose, como celobiose: Brega-1, *C. orthopsilosis* Brega-2 e Brega-4. O isolado Brega-8 fermentou somente xilose. Em menos de 12h, os quatro isolados estavam consumindo os açúcares (coloração amarela nos tubos) e, após 36h de inoculação, foi observado que os quatro isolados estavam fermentando. Todas essas leveduras foram isoladas da entrada oposta da caverna Brega (caverna de calcário localizada na região de Pains, MG). Somente 5 leveduras não usaram a xilose como fonte de carbono, deixando o meio com coloração azul: 3 isolados da caverna A452 (A452-12, A452-15, A452-18), um isolado da caverna Abutre (AB-3) e um isolado da caverna

Lapa da Santa (L. Santa-12). As demais leveduras conseguiram consumir a xilose, deixando o meio com coloração amarela.

É interessante que *C. orthopsilosis* (cepa *C. orthopsilosis* RM01-14) também foi encontrada na caverna RM01 (caverna ferruginosa localizada na região de Nova Lima, MG), embora não tenha fermentado xilose. Isso mostra que leveduras da mesma espécie podem mostrar diferenças fisiológicas, dependendo da fonte de isolamento. Nesse caso, são duas leveduras da mesma espécie, mas de duas cavernas com duas litologias diferentes e de regiões diferentes. Alguns estudos já demonstraram que fatores, como a fonte do isolamento e a distância geográfica, podem influenciar na variação da sequência de aminoácidos (Zhang et al., 2020; Zhang et al., 2015). Essas diferenças entre leveduras da mesma espécie podem ser manifestadas em diferenças na capacidade de fermentar açúcares (Zhang et al., 2020; Usbeck et al., 2014). Fatores, como as alterações do meio circundante e a forma como a caverna apresenta conexões com o meio externo, podem fazer com que cada caverna crie um ambiente particular para o crescimento das leveduras e, provavelmente, isso influencie na variação intraespecífica da espécie *C. orthopsilosis* encontrada neste estudo.

As conexões que a caverna Brega apresenta com o ambiente externo podem ter contribuído para a presença de leveduras fermentadoras de xilose em tal caverna. A entrada oposta da caverna Brega é acessada por um rio perene que permite a entrada de restos vegetais do meio externo, principalmente quando acontecem precipitações. Isso está constatado para esta caverna por Silva et al. (2013). Dessa forma, é provável que a cepa *C. orthopsilosis* tenha sido introduzida na caverna Brega, pois essa espécie é frequentemente associada com madeira podre e restos vegetais em diferentes ecossistemas (Samarasinghe et al., 2021; Opulente et al., 2019). É de notar que as leveduras isoladas do meio, da entrada principal e da saída da caverna Brega não apresentaram capacidade para fermentar xilose. Isso é um indício de que as condições nas diferentes zonas de uma mesma caverna são diferentes, o que influencia na presença de leveduras com comportamentos fisiológicos diferentes.

Uma das características que confere importância biotecnológica às leveduras é a sua capacidade fermentativa. A fermentação de hexoses e de pentoses de biomassa lignocelulósica permite a obtenção de produtos de interesse comercial. A xilose é a pentose presente em maior proporção na hemicelulose (Su et al., 2020). Por isso, é importante a seleção de cepas com capacidade de fermentar xilose para o aproveitamento de hidrolisados de biomassa lignocelulósica, e esse seria o primeiro reporte da avaliação da capacidade fermentativa de xilose de leveduras de cavernas.

Neste estudo, as leveduras que fermentaram xilose foram selecionadas para serem avaliadas quanto à fermentação de celobiose. Como já mencionado, os isolados Brega-1, *C. orthopsilosis* Brega-2 e Brega-4 fermentaram celobiose além de xilose. A utilização de leveduras fermentadoras de celobiose representa uma vantagem no aproveitamento da celulose. Uma das dificuldades no aproveitamento da celulose é a repressão metabólica induzida pela presença de moléculas de celobiose, que resultam da clivagem da celulose pelas enzimas β -1,4-endoglucanase e exoglucanase no processo de sacarificação. Essa repressão acontece quando a levedura não possui a enzima β -glucosidase que permite a clivagem da celobiose em glicose (Resch et al., 2013). Além disso, uma levedura capaz de fermentar celobiose também é capaz de consumir os monômeros de glicose (Parisutham et al., 2017). Portanto, uma levedura com essas características talvez possua o potencial para ser usada na sacarificação completa da celulose presente na fração sólida, resultante do processo da hidrólise de substratos lignocelulósicos.

No entanto, para explorar o potencial da levedura para realização da sacarificação completa da celulose, é importante que seja ela avaliada quanto a sua capacidade celulolítica. Por essa razão, os isolados Brega-1, *C. orthopsilosis* Brega-2 e Brega-4 foram selecionados para o teste de atividade celulolítica com CMC 1%.

3.2 Teste de capacidade celulolítica com CMC 1%

De todos os isolados testados, *C. orthopsilosis* Brega-2 apresentou halos definidos, no teste com CMC 1% (Figura 1). Então, esse isolado pode ter a capacidade de produzir enzimas extracelulares que permitem sacarificar a celulose. Provavelmente, essa levedura poderia ter o potencial para fermentar o material sólido resultante da hidrólise química de biomassa lignocelulósica. Isso permitiria a realização de um bioprocessamento constituído por uma fermentação do hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) e um processo simultâneo de sacarificação e fermentação do resíduo sólido. Nessa etapa de sacarificação e fermentação simultânea, seriam usadas as enzimas de *C. orthopsilosis* Brega-2 para sacarificar a celulose do resíduo sólido. Visto que essa cepa também fermenta celobiose, pode ser que, no processo de sacarificação, não se apresentaria a repressão metabólica induzida pela presença de moléculas de celobiose.

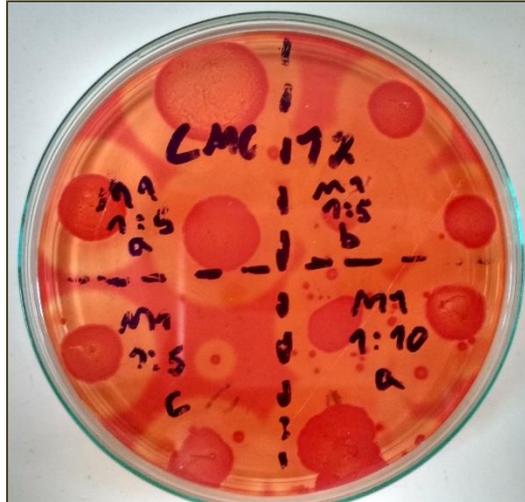


Fig. 1. Teste de atividade celulolítica com CMC 1%. Presença de halos, indicando atividade celulolítica.

Neste estudo, *C. orthopsilosis* Brega-2, assim como alguns que apresentaram capacidade para crescer em xilose, foram selecionados para serem avaliados quanto a sua capacidade fermentativa em hidrolisados de subprodutos lignocelulósicos de café. Antes da realização dessa avaliação, foi realizada uma hidrólise dos substratos lignocelulósicos de café, assim como sua caracterização quanto a sua concentração de açúcares, para seleção do hidrolisado usado como meio de cultivo.

3.3 Hidrólise dos substratos lignocelulósicos de café e caracterização dos hidrolisados

Foi realizada a hidrólise ácida da casca seca e dos grãos de café pretos, verdes e ardidos (PVA), assim como a caracterização de concentração de xilose, arabinose e glicose nos hidrolisados. Como pode ser visto na Tabela 1, em todos os hidrolisados, a xilose foi o açúcar presente em maior concentração. Especificamente, os hidrolisados de grãos de café (PVA) apresentaram maior concentração desse açúcar.

Tabela 1

Caracterização por HPLC dos hidrolisados de PVA e casca.

Substrato	Proporção substrato-ácido	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Arabinose (g/L)
PVA	1:10	9,78	0,76	0,50
	1:20	5,19	0,34	0,32
	1:30	3,95	0,23	0,27
	1:40	2,84	0,18	0,23
	1:50	2,33	0,14	0,23
Casca	1:10	4,12	0,98	0,01
	1:20	1,29	0,37	0,12
	1:30	1,63	0,47	0,00
	1:40	1,19	0,31	0,00
	1:50	0,90	0,24	0,00

A partir deste resultado, foi selecionado o PVA como substrato para a preparação de hidrolisados. De acordo com a análise química, esse substrato apresenta 20,98% de hemicelulose e 1,66% de lignina. Com a finalidade de aumentar a concentração de xilose, foi aumentada a quantidade de substrato em uma proporção substrato-ácido de 1:5, na preparação dos hidrolisados. Além disso, foram testadas diferentes concentrações de H₂SO₄ em diferentes tempos de hidrólise: H₂SO₄ 1.5% w/v a 20 min (H1); H₂SO₄ 1.5% w/v a 30 min (H2); H₂SO₄ 2.5% w/v a 20 min (H3) e H₂SO₄ 2.5% w/v a 30 min (H4). Cada um destes hidrolisados foi caracterizado quanto à concentração de xilose, arabinose e glicose, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2

Caracterização por HPLC dos hidrolisados de PVA a diferentes concentrações de H₂SO₄ e diferentes tempos de hidrólise. H1: H₂SO₄ 1.5% w/v a 20 min; H2: H₂SO₄ 1.5% w/v a 30 min; H3: H₂SO₄ 2.5% w/v a 20 min; H4: H₂SO₄ 2.5% w/v a 30 min.

Hidrolisado	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)
H1	1,95	4,70	0,29
H2	3,48	4,77	0,57
H3	8,65	5,24	0,86
H4	26,14	5,31	1,27

3.4 Avaliação do crescimento em hidrolisados de grãos de café pretos, verdes e ardidados (PVA)

Para esse teste, foi usado o hidrolisado H4, enriquecido de acordo com o mencionado na seção 2.3.3. Dos testes de fermentação de xilose e celobiose e de atividade celulolítica, foram selecionados 12 isolados, os quais foram cultivados em 10 mL de hidrolisado por 72h. Após

esse tempo de cultivo, foram caracterizados quanto a seu crescimento, consumo de açúcares e produção de xilitol (Tabela 3).

Tabela 3

Crescimento das leveduras no hidrolisado H4 por 72h. As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$).

Isolados	Variáveis				
	População final (log UFC)	Consumo de xilose (g/l)	Consumo de arabinose (g/l)	Consumo de glicose (g/l)	Produção de Xilitol (g/l)
RM01-31	8,95 A	18,44 A	0,11 D	1,27 A	1,72 D
<i>C. orthopsilosis</i> Brega-2	8,00 A	14,88 B	0,32 D	1,27 A	2,96 A
RM33-12	7,23 A	13,05 C	1,79 A	1,27 A	1,44 E
<i>C. palmiophila</i> SL-7	3,60 B	9,20 D	1,41 B	1,27 A	2,37 B
VS-8	7,93 A	8,87 D	0,60 C	1,27 A	2,21 B
VS-4	7,41 A	8,76 D	0,69 C	1,27 A	1,89 C
VS-7	7,50 A	7,85 D	1,99 A	1,27 A	2,24 B
VS-8	7,59 A	7,84 D	0,10 D	1,27 A	2,23 B
VS-5	8,19 A	4,65 E	1,09 B	1,04 B	2,81 A
Brega-8	0,00 C	1,67 F	0,89 C	0,70 C	2,17 B
<i>C. laurentii</i> A452-1	7,05 A	1,58 F	0,34 D	0,27 E	2,37 B
<i>R. mucilaginosa</i> CL-7	7,16 A	0,89 F	0,02 D	0,38 D	2,79 A

Os isolados RM01-31, *C. orthopsilosis* Brega-2 e RM33-12, além de apresentarem uma alta população, foram os que consumiram mais xilose dentre todos os isolados (Tabela 3). Portanto, esses isolados foram selecionados para o cultivo batch em 100 mL de hidrolisado não detoxificado de PVA e foram caracterizados quanto a sua produção de biomassa, proteína unicelular e etanol.

3.5 Caracterização do cultivo batch no hidrolisado de PVA não detoxificado

3.5.1 Produção de etanol e de xilitol

Como pode ser observado na Figura 2, todas as leveduras consumiram completamente a glicose, em 24 h de cultivo. Também pode se observar que, uma vez esgotada a glicose, a xilose foi usada por todas as cepas como fonte de carbono e foi esgotada em 48h. A partir das 48h, não há diferença entre as cepas quanto à produção de etanol, mas, quanto à produção de biomassa, foram diferentes entre si (Figura 2). O cultivo foi realizado em anaerobiose, pois não houve injeção de ar por meio de um sistema de aeração. Na medida em que o oxigênio disponível no início foi esgotado, pode ter sido induzida uma condição de anaerobiose que fez com que as leveduras apresentassem diferenças quanto à produção de biomassa (Figura 3).

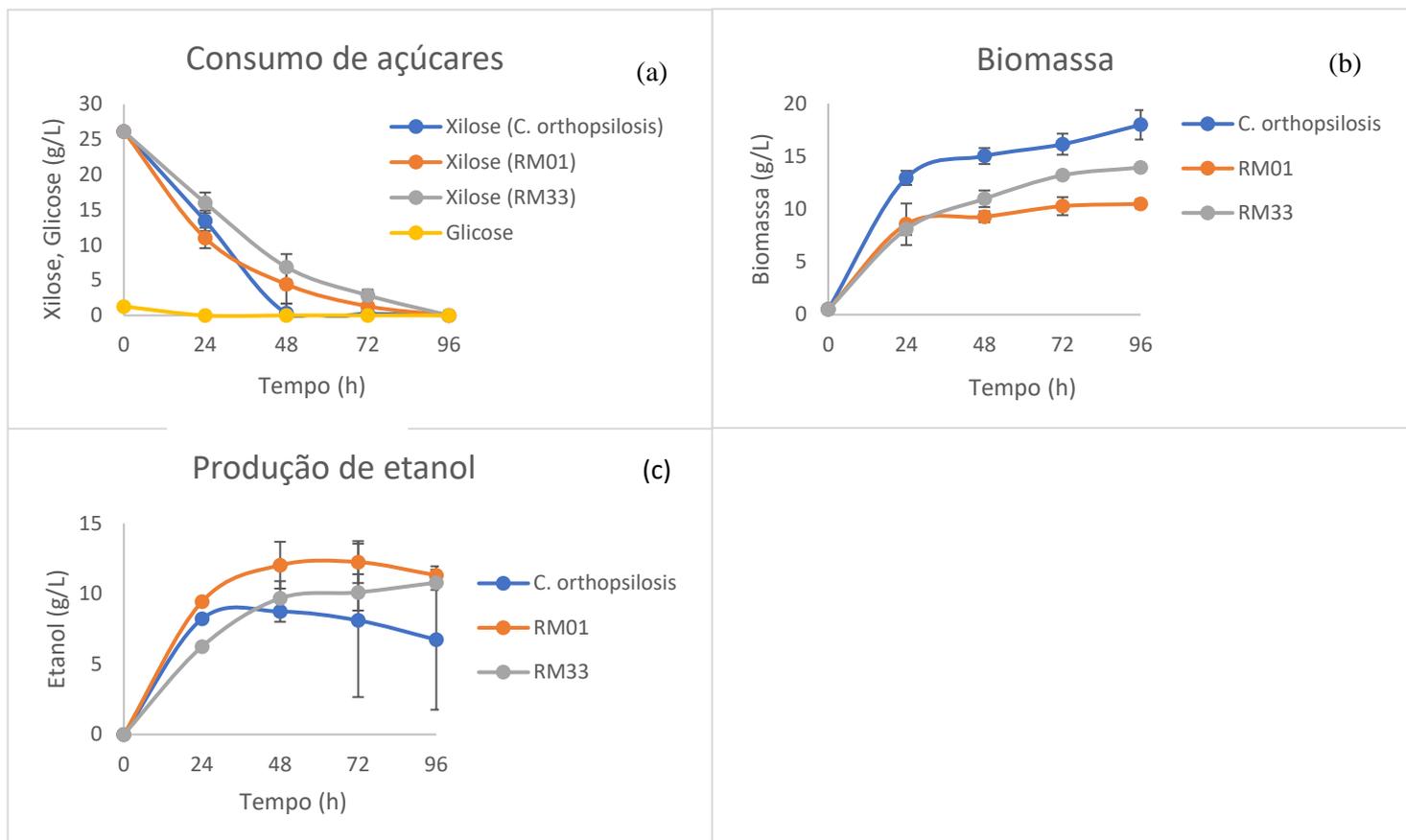


Fig. 2. Comparação do consumo de açúcares (a), produção de biomassa (b) e produção de etanol (c) entre as cepas *C. orthopsilosis* Brega-2, RM01-31 e RM33-12.

As leveduras testadas apresentaram mecanismos de regulação do catabolismo em anaerobiose que influenciaram na produção de biomassa e etanol. Por exemplo, no caso da cepa *C. orthopsilosis* Brega-2, a produção de biomassa foi favorecida sobre a produção de etanol (Figura 3). Provavelmente, essa levedura apresentou o efeito Custers, ou seja, a síntese de etanol diminui ou é inibida em condições anaeróbias, e a produção de biomassa é favorecida (Colomer et al., 2019; Barnet & Entian 2005). Provavelmente, o oxigênio presente no início do cultivo permitiu a produção de etanol por *C. orthopsilosis* Brega-2. Após ser esgotado o oxigênio, foi favorecida a produção de biomassa sobre a produção de etanol em anaerobiose. Esse comportamento tem sido observado em leveduras do gênero *Brettanomyces* (Wijsman et al., 1984). A cepa RM33-12 apresenta uma tendência parecida, pois, a partir das 48h, a produção de biomassa é favorecida sobre a produção de etanol (Figura 3).

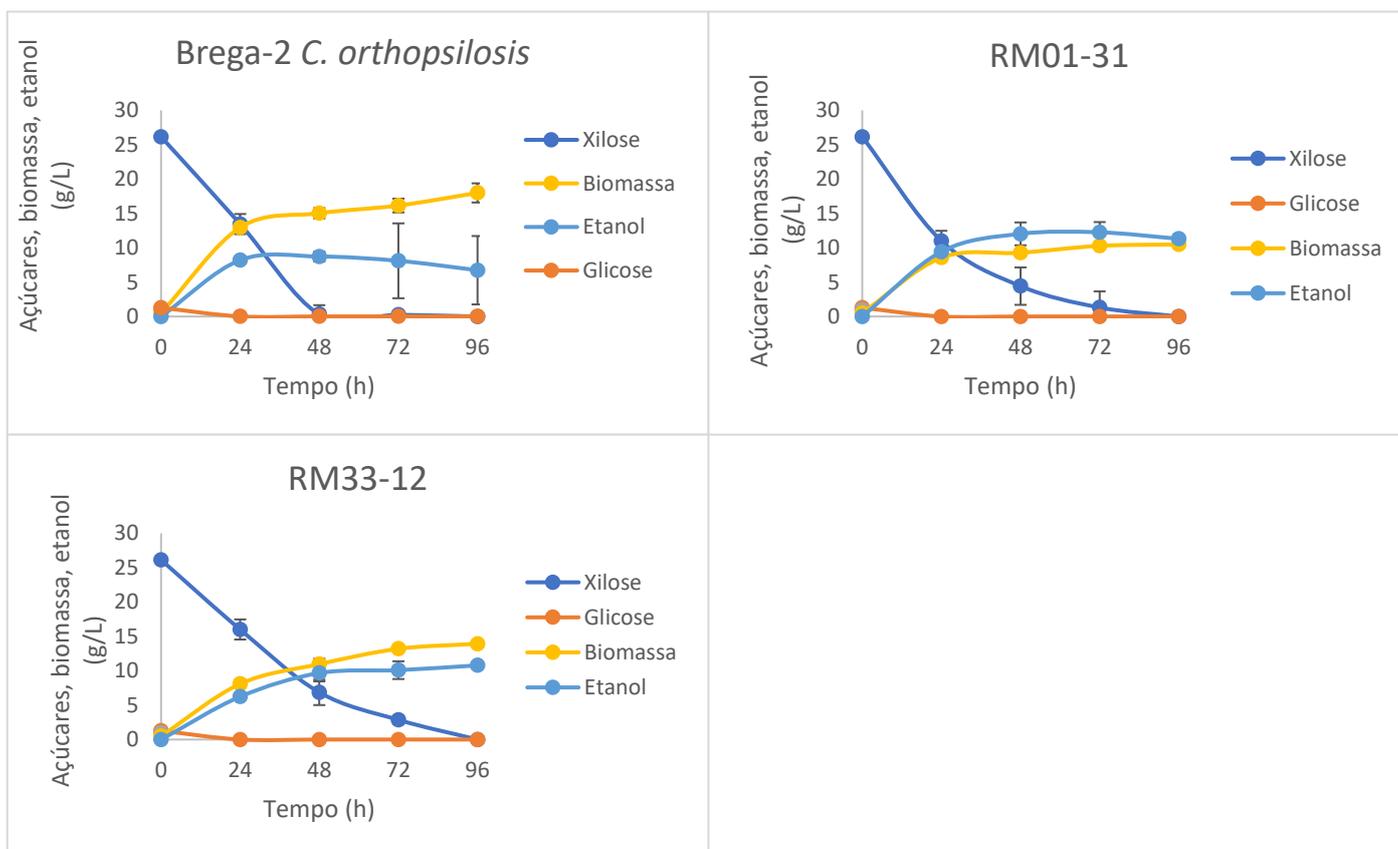


Fig. 3. Cinética de consumo de açúcares, produção de biomassa e etanol de Brega-2 *C. orthopsilosis* (a) RM01-31 (b) e RM33-12 (RM33-12) (c) cultivados em 100 mL de hidrolisado não detoxificado de PVA por 96 h.

No caso da cepa RM01-31, houve uma tendência de aumento na produção de etanol a partir das 24h até as 48h (Figura 3). Até as 48h, a cepa RM01-31 foi a que produziu mais etanol e, durante todo o cultivo, foi a que apresentou menor produção de biomassa (Figura 2). Pode ser que essa cepa tenha apresentado o efeito Pasteur, pois, ao diminuir a disponibilidade de oxigênio, foi favorecida a produção de etanol sobre a produção de biomassa.

Em nenhuma das leveduras testadas, houve produção de xilitol. Isso pode ser entendido ao se levar em conta que nem todas as leveduras que metabolizam xilose são produtoras de xilitol, senão que o produto do seu metabolismo é o etanol. Isso depende de quais cofatores a enzima xilose redutase utiliza para sua atividade. A produção de etanol acontece quando a enzima xilose redutase, encarregada da redução da xilose a xilitol, utiliza principalmente o NADH e não o NADPH. Dessa forma, é possível a disponibilidade do NAD⁺, que é necessário para a atividade da xilitol desidrogenase, a qual permite a oxidação do xilitol a xilulose. Posteriormente, a xilulose é fosforilizada e convertida em frutose-6-fosfato e em gliceraldeído-3-fosfato na via das pentoses-fosfato. Esses produtos entram na via da glicólise e são

transformados em piruvato, que, em anaerobiose ou em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, é convertido em etanol (Ochoa-Chacón et al., 2022; Patiño et al., 2019). Portanto, os isolados *C. orthopsilosis* Brega-2, RM01-31 e RM33-12 expressam a enzima xilose redutase com preferência ao cofator NADH, pois as condições de disponibilidade de oxigênio foram limitadas. Se a xilose redutase dessas leveduras mostrasse preferência pelo NADPH, elas seriam produtoras de xilitol, em vez de etanol.

Existem leveduras capazes de sintetizar xilose sem precisar de um suprimento constante de oxigênio para seu cultivo. Por exemplo, Palladino et al. (2021) mostraram que *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis* foram capazes de produzir xilitol com agitação a 200 rpm, sem injeção de ar, por meio de um sistema de aeração. Os autores explicam que, nessas condições, tais leveduras expressam a enzima xilose redutase com preferência ao cofator NADPH. Portanto, é provável que um fator a ser levado em conta são os sais usados para o fornecimento de micronutrientes, pois é sabido que a presença de tais sais influencia no balanço redox em processos metabólicos, tais como a produção de etanol e glicerol (Martiniano et al., 2020; Van Dijken & Scheffers, 1986). No hidrolisado de PVA usado neste estudo, foi adicionado 0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ como fonte de Mg. Esse micronutriente participa da regulação no balanço redox nas células (Zhang et al., 2021). No estudo de Zhang et al. (2019), favoreceu a síntese de xilitol em *Candida tropicalis*. É provável que o Mg presente no hidrolisado de PVA tenha como efeito, na xilose redutase das leveduras cultivadas, a preferência pelo NADH em vez do NADPH.

Para ser possível a produção de xilitol e de etanol no mesmo processo fermentativo, nas cepas usadas neste estudo, é necessário que haja uma adequada concentração de glicose e uma adequada disponibilidade de oxigênio por meio de uma aeração constante e controlada (Bonan et al., 2022). Em condições aeróbias, o piruvato produzido na via glicolítica é oxidado no ciclo do ácido tricarbóxico, permitindo a disponibilidade de NADPH. No entanto, para que seja favorecida a produção de xilitol, a glicose deve estar em certa quantidade que permita que menos xilitol seja menos consumido para ser transformado em xilulose. Dessa forma, a glicose seria destinada para a produção de etanol, e a xilose, para a síntese de xilitol. Por exemplo, Wannawilai et al. (2017) e Tochampa et al. (2015) verificaram que o uso de uma proporção de glicose para xilose de 1:10 melhorou a produção de xilitol, utilizando-se *Candida magnoliae* TISTR 5663 e *Candida mogii* ATCC 18364, respectivamente, com agitação e em condições de aeração constante e controlada.

3.5.2 Produção de proteína

De acordo com a Tabela 4, mesmo que a cepa RM01-31 apresentasse a maior porcentagem de proteína, atingiu menor rendimento de proteína, pois, em comparação com as outras cepas, apresentou menor quantidade de biomassa. Já a cepa *C. orthopsilosis* Brega-2, mesmo tendo uma porcentagem de proteína menor que a cepa RM01-31, apresentou maior rendimento de proteína que todas as cepas testadas. Isso mostra a necessidade de favorecer o incremento de biomassa na cepa RM01-31, para, assim, se obter uma maior quantidade de proteína. Um suprimento constante e controlado de oxigênio provavelmente permitiria que essa cepa aumentasse sua biomassa e, ao mesmo tempo, a quantidade de proteína unicelular, pois, como já foi comentado, por causa da diminuição de oxigênio que pode ter acontecido ao longo do cultivo, a quantidade de biomassa no final do cultivo foi menor em comparação com as outras cepas. A importância do oxigênio na produção de proteína unicelular é exemplificada pelo estudo de Bertasini et al. (2022), onde as quantidades de proteína unicelular de *Saccharomyces cerevisiae* foram maiores em condições aeróbias que em condições anaeróbias, pois foram também atingidas maiores quantidades de biomassa.

Tabela 4

Produção de biomassa e de rendimento de proteína total após 72h de cultivo. Foi usado o método de Kejdahl para a determinação de proteína total usando 0,1 g de biomassa seca.

Isolado	Porcentagem de proteína	Biomassa (g/L)	Rendimento de proteína (g/L)
RM01-31	35,8%	11,31	4,04
<i>C. orthopsilosis</i> Brega-2	31,5%	17,98	5,66
RM33-12	29,7%	13,93	4,13

Outro fator a ser considerado para favorecer o aumento de biomassa e de proteína unicelular é a concentração da fonte de nitrogênio. Wang et al. (2020) testaram diferentes fontes de nitrogênio e verificaram que, com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, foi estimulado o incremento de biomassa e de proteína unicelular em *Sporidiobolus pararoseus*. Especificamente com uma concentração de 50 g/L, foi possível aumentar a proteína unicelular de *S. pararoseus* a 33,1 g/L em um cultivo *feed-batch*. Os autores relatam que, com o aumento da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, também houve aumento da biomassa, e o rendimento de proteína unicelular foi positivamente correlacionado com o acúmulo de biomassa. Neste trabalho, também foi usado o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mas em uma concentração de 4 g/L. Mesmo sendo usada essa concentração, foi possível obter uma quantidade de proteína unicelular na cepa *C. orthopsilosis* Brega-2 próxima da obtida por

Wang et al. (2020) usando *S. pararoseus* em um cultivo batch (5,66 g/L e $5.7 \pm 0,2$ g/L respectivamente). No caso da cepa RM01-31, concentrações maiores de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ serão necessárias para estimular o aumento de biomassa e proteína unicelular.

Embora as quantidades de proteína e de etanol de RM01-31 sejam baixas em comparação com as relatadas na literatura, os resultados deste trabalho mostram o potencial biotecnológico de leveduras de caverna. Por exemplo, a cepa RM01-31 apresenta duas características interessantes: maior produção de etanol e maior porcentagem de proteína. Portanto, esses resultados podem ser levados em conta para melhorar as condições de cultivo em futuros trabalhos a fim de aproveitar seu potencial biotecnológico. Por exemplo, RM01-31 pode ser cultivada em um processo conduzido em dois estágios: um, com fornecimento constante de oxigênio dissolvido para promover o crescimento celular e aumentar o rendimento de proteína unicelular; outro, em condições anaeróbias, para estimular a produção de etanol. Futuros trabalhos são necessários para comprovar isso.

Coimbra et al. (2021) cultivaram *Candida parapsilosis* em vinhaça, obtendo uma porcentagem de proteína de 26,93%. Essa espécie é geneticamente próxima de *C. orthopsilosis*, e a cepa usada neste trabalho (*C. orthopsilosis* Brega-2) apresentou uma porcentagem de proteína maior (31,5%). Essa porcentagem de proteína está na faixa recomendada para alimentação animal (Ritala et al., 2017). Portanto, *C. orthopsilosis* Brega-2 apresenta potencial para ser usada como fonte de proteína unicelular. No entanto, considerando que essa espécie é relatada como patogênica (Lockhart et al., 2008), o uso biotecnológico dessa levedura pode ser direcionado quanto à produção de etanol, pois, como já foi discutido anteriormente, apresentou capacidade para fermentar xilose e celobiose, além de possuir atividade celulolítica. De acordo com os resultados deste trabalho, a produção de etanol dessa levedura diminuiu com a diminuição de oxigênio dissolvido, o que pode ter acontecido no decorrer do cultivo, provavelmente devido ao efeito Custers (Figura 4). Portanto, para estimular a produção de etanol em *C. orthopsilosis* Brega-2, é necessário que haja um fornecimento constante de oxigênio dissolvido.

A cepa RM33-12 possui uma porcentagem de proteína, que está dentro da faixa recomendada para alimentação animal (Ritala et al., 2017). Além disso, à diferença das outras cepas testadas, continuou aumentando a sua biomassa e a sua produção de etanol, na fase final do cultivo, já quando, provavelmente, a disponibilidade de oxigênio foi menor. Esse potencial para produzir etanol, biomassa e, conseqüentemente, proteína unicelular pode ser aproveitado por meio de uma fase de pré-cultivo aeróbico ou por uma breve fase de aeração intensiva, para permitir que as células construam e armazenem fatores de crescimento anaeróbio. Isso

provavelmente permitiria aumentar a produção de etanol e de proteína unicelular durante a fase anaeróbica do cultivo. Essa prática é realizada na indústria para o cultivo de *S. cerevisiae* (Mooiman et al., 2021).

4. Conclusões

Este estudo mostrou a capacidade de leveduras de caverna na produção de etanol e de proteína unicelular a partir de hidrolisados de PVA. Mesmo que esses metabolitos tenham sido produzidos em quantidades menores que as encontradas na literatura, os resultados obtidos permitem ter um diagnóstico do comportamento fisiológico das leveduras testadas. Os resultados deste trabalho podem ser usados como base para futuros estudos, a fim de melhorar as condições de cultivo para aumentar a produção de biomassa, proteína, etanol e xilitol.

Podem ser realizados experimentos que permitam conhecer o fornecimento adequado de oxigênio para aumentar a produção de biomassa, proteína unicelular e etanol. Com a finalidade de estimular a produção de xilitol, podem ser testados diferentes micronutrientes em diferentes concentrações para induzir um balanço redox na enzima xilose redutase que favoreça a síntese de xilitol. Com a finalidade de favorecer a produção simultânea de xilitol e de etanol, é importante testar diferentes proporções de xilose e glicose no hidrolisado, para que a glicose seja metabolizada em etanol, e a xilose, em xilitol.

A cepa *C. orthopsilosis* Brega-2 apresenta um potencial interessante quanto à produção de etanol, pois, além de fermentar xilose, fermenta celobiose e possui atividade celulolítica. Isso permitiria usar essa levedura para a produção de etanol a partir não só da fração líquida, como também da fração sólida, o que resulta da hidrólise termoquímica do PVA ou de outros substratos lignocelulósicos. No entanto, serão necessários futuros trabalhos para quantificar, nessa cepa, as enzimas envolvidas na atividade celulolítica para confirmar a sua utilização no processo de sacarificação da celulose.

Referências

Anuário Estatístico do Patrimônio Espeleológico Brasileiro 2021. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/downloads/Anuario/CECAV__Anuario_estatistico_espeleol%C3%B3gico_2021.pdf

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International (18th ed.). Washington: AOAC

Barnett, J.A. and Entian, K.-D. 2005. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast*, 22: 835-894. <https://doi.org/10.1002/yea.1249>

- Bertasini, D., Binati, R. L., Bolzonella, D., & Battista, F. 2022. Single Cell Proteins production from food processing effluents and digestate. *Chemosphere*, 296, 134076.
- Bonan, C. I., Tramontina, R., dos Santos, M. W., Biazi, L. E., Soares, L. B., Pereira, I. O., ... & Ienczak, J. L. 2021. Biorefinery platform for *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in the production of ethanol, xylitol, and single cell protein from sugarcane bagasse. *BioEnergy Research*, 1-13.
- Budak, O.S., Figge, M.J., Houbraeken, J., de Vries, R.P., 2016. The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 58, 50–53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.09.011>
- Cailhol, D., Ciadamidaro, L., Dupuy, D., Allegra, S., Girardot, F., Pfindler, S., 2020. Fungal and bacterial outbreak in the wine vinification area in the Saint-Marcel show cave. *Sci. Total Environ.* 733. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138756>
- Coimbra, J. M., Cristina dos Reis, K., Schwan, R. F., & Silva, C. F. 2021. Effect of the strategy of molasses supplementation in vinasse to high SCP production and rose flavor compound. *Waste and Biomass Valorization*, 12(1), 359-369.
- Colomer, M. S., Funch, B., & Forster, J. 2019. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 30-35.
- Corrêa, C. L., Penha, E. M., Freitas-Silva, O., Luna, A. S., & Gottschalk, L. M. 2021. Enzymatic technology application on Coffee co-products: a review. *Waste and Biomass Valorization*, 12(7), 3521-3540.
- Kirtil, H. E., Metin, B., & Arici, M. 2021. Identification of filamentous fungi in turkish mold-ripened cheeses and screening of mycotoxin genes of *penicillium roqueforti* isolates. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 10(4), 657-662.
- Lockhart, S. R., Messer, S. A., Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. 2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *Journal of clinical microbiology*, 46(8), 2659-2664.
- Lopes, A.C.A., Andrade, R.P., de Oliveira, L.C.C., Lima, L.M.Z., Santiago, W.D., de Resende, M.L.V., das Graças Cardoso, M., Duarte, W.F., 2020. Production and characterization of a new distillate obtained from fermentation of wet processing coffee by-products. *J. Food Sci. Technol.* 57, 4481–4491. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04485-4>
- Martiniano, S. E., Philippini, R. R., Franco-Marcelino, P. R., & da Silva, S. S. 2020. Effect of selenium uptake on growth metabolism in yeasts for the production of enriched single-cell protein using agro-industrial by-products. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-9.
- Mooiman, C., Bouwknecht, J., Dekker, W. J., Wiersma, S. J., Ortiz-Merino, R. A., De Hulster, E., & Pronk, J. T. 2021. Critical parameters and procedures for anaerobic cultivation of yeasts in bioreactors and anaerobic chambers. *FEMS yeast research*, 21(5), foab035.
- Morais, C.G., Cadete, R.M., Uetanabaro, A.P.T., Rosa, L.H., Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2013. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. *Fungal Genet. Biol.* 60, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.003>

- Nair, L. G., Agrawal, K., & Verma, P. 2022. An overview of sustainable approaches for bioenergy production from agro-industrial wastes. *Energy Nexus*, 100086.
- Niglio, S., Procentese, A., Russo, M. E., Sannia, G., & Marzocchella, A. 2019. Investigation of enzymatic hydrolysis of coffee silverskin aimed at the production of butanol and succinic acid by fermentative processes. *BioEnergy Research*, 12(2), 312-324.
- Ochoa-Chacón, A., Martínez, A., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Ramos-Valdivia, A. C., & Ponce-Noyola, T. 2022. Xylose Metabolism in Bioethanol Production: *Saccharomyces cerevisiae* vs Non-Saccharomyces Yeasts. *Bioenergy Research*, 15(2), 905–923. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10340-x>
- Opulente, D. A., Langdon, Q. K., Buh, K. V., Haase, M. A., Sylvester, K., Moriarty, R. V., ... & Hittinger, C. T. 2019. Pathogenic budding yeasts isolated outside of clinical settings. *FEMS yeast research*, 19(3), foz032.
- Ozturkoglu-Budak, S., Gursoy, A., Aykas, D. P., Koçak, C., Dönmez, S., De Vries, R. P., & Bron, P. A. 2016. Volatile compound profiling of Turkish Divle Cave cheese during production and ripening. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5120-5131.
- Palladino, F., Rodrigues, R. C., Cadete, R. M., Barros, K. O., & Rosa, C. A. 2021. Novel potential yeast strains for the biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(3), 690-702.
- Parisutham, V., Chandran, S. P., Mukhopadhyay, A., Lee, S. K., & Keasling, J. D. 2017. Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. *Bioresource technology*, 239, 496-506.
- Patiño, M. A., Ortiz, J. P., Velásquez, M., & Stambuk, B. U. 2019. D - Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae*: A review. April, 541–556. <https://doi.org/10.1002/yea.3429>
- Resch, M.G., Donohoe, B.S., Baker, J.O., Decker, S.R., Bayer, E.A., De, G.T.B., Himmel, M.E., 2013. Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction. *Energy Environ. Sci.* 6, 1858. <https://doi.org/10.1039/c3ee00019b>
- Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. 2017. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Frontiers in microbiology*, 8, 2009.
- Samarasinghe, H., Lu, Y., Aljohani, R., Al-Amad, A., Yoell, H., & Xu, J. 2021. Global patterns in culturable soil yeast diversity. *IScience*, 24(10), 103098.
- Santana, M. S., Alves, R. P., da Silva Borges, W. M., Francisquini, E., & Guerreiro, M. C. 2020. Hydrochar production from defective coffee beans by hydrothermal carbonization. *Bioresource technology*, 300, 122653.
- Santos, C. M., de Oliveira, L. S., Rocha, E. P. A., & Franca, A. S. 2020. Thermal conversion of defective coffee beans for energy purposes: Characterization and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 147, 1275-1291.
- Shankar, K., Kulkarni, N. S., Sajjanshetty, R., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. 2020. Industrial Crops & Products Co-production of xylitol and ethanol by the fermentation of the

lignocellulosic hydrolysates of banana and water hyacinth leaves by individual yeast strains. 155(August).

Silva, M.S., Rezende, R.K.S., Ferreira, R.L., 2013. Detritus processing in lentic cave habitats in the neotropics. *Subterr. Biol.* 11, 3–14. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.11.5107>

Singh, A., Singhania, R. R., Soam, S., Chen, C. W., Haldar, D., Varjani, S., ... & Patel, A. K. 2022. Production of bioethanol from food waste: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 127651.

Su, T., Zhao, D., Khodadadi, M., Len, C., 2020. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 24, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.005>

Teather, R.M., Wood, P.J., 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 777–780. <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>

Tochampa, W., Sirisansaneeyakul, S., Vanichsriratana, W., Srinophakun, P., Bakker, H. H. C., Wannawilai, S., & Chisti, Y. (2015). Optimal control of feeding in fed-batch production of xylitol. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 54(7), 1992–2000. <https://doi.org/10.1021/ie5032937>

Unrean, P., Ketsub, N., 2018. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. *Ind. Crops Prod.* 123, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.071>

Usbeck, J. C., Wilde, C., Bertrand, D., Behr, J., & Vogel, R. F. 2014. Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3737–3752. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5586-x>

Van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology reviews*, 1(3-4), 199-224.

Wang, H., Hu, B., Liu, J., Qian, H., Xu, J., & Zhang, W. 2020. Co-production of lipid, exopolysaccharide and single-cell protein by *Sporidiobolus pararoseus* under ammonia nitrogen-limited conditions. *Bioprocess and biosystems engineering*, 43(8), 1403-1414.

Wannawilai, S., Lee, W. C., Chisti, Y., & Sirisansaneeyakul, S. 2017. Furfural and glucose can enhance conversion of xylose to xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663. *Journal of biotechnology*, 241, 147-157.

Wickerham, L. J., 1951. Taxonomy of yeasts (No. 1029). US Department of Agriculture.

Wijsman, M. R., van Dijken, J. P., van Kleeff, B. H., & Scheffers, W. A. 1984. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 50(2), 183-192.

Xavier, M.C.A., Coradini, A.L.V., Deckmann, A.C., Franco, T.T., 2017. Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochem. Eng. J.* 118, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.007>

Zhang, L., Zhou, P., Chen, Y. C., Cao, Q., Liu, X. F., & Li, D. 2021. The production of single cell protein from biogas slurry with high ammonia-nitrogen content by screened *Nectaromyces rattus*. *Poultry Science*, 100(9), 101334

Zhang, J., Plowman, E., Tian, B., Clerens, S., On, S.L.W., 2020. An improved method for MALDI-TOF analysis of wine-associated yeasts 172.

Zhang, C., Qin, J., Dai, Y., Mu, W., & Zhang, T. 2019. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis enables xylitol over-production with yeast *Candida tropicalis*. *Journal of Biotechnology*, 296(March), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.026>

Zhang, L., Vranckx, K., Janssens, K., & Sandrin, T. R. 2015. Use of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom database to characterize bacteria indigenous to a unique cave environment (Kartchner Caverns, AZ, USA). *Journal of Visualized Experiments*, 95. <https://doi.org/10.3791/52064>