

**SILVIA TEREZA AZÊDO LOUREIRO**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE  
SEDIMENTO DO MANGUEZAL BARRA DAS JANGADAS, JABOATÃO DOS  
GUARARAPES, PERNAMBUCO, BRASIL**

**RECIFE**

**FEVEREIRO/2007**

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

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE  
SEDIMENTO DO MANGUEZAL BARRA DAS JANGADAS, JABOATÃO DOS  
GUARARAPES, PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Orientadora: Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti

Co-Orientadores: Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Dr. José Zanon de Oliveira Passavante

**Loureiro, Silvia Tereza Azêdo**

**Potencial biotecnológico de leveduras isoladas de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil / Silvia Tereza Azêdo Loureiro. – Recife: O Autor, 2007.**

**56 folhas : il., fig., tab.**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2007.**

**Inclui bibliografia e anexo.**

**1. Leveduras 2. Manguezal 3. Potencial biotecnológico 4. Produção de aminoácidos I. Título.**

**582.282.23  
579.562**

**CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)**

**UFPE  
CCB – 2007-051**

***Dedico***

*Aos meus pais, à minha irmã e minha filha,  
as maiores riquezas da minha vida.*

*“Primeiro comece fazendo o necessário,  
depois o possível, logo estará fazendo o  
impossível”.*

*(São Francisco de Assis)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus pela saúde e por todas as coisas boas que têm concedido em minha vida.

Aos meus pais, SILVIO e TEREZINHA, à minha irmã DAYSE por todo amor, apoio e dedicação, à minha filha CAROLINA TEREZA pela compreensão e amor.

À Coordenação da Pós-Graduação em Biologia de Fungos pela disponibilidade dos laboratórios. A todos que fazem parte do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

À minha orientadora professora Dra. Auxiliadora Cavalcanti pela dedicação e ensinamentos, que tanto enriqueceram minha vida pessoal e acadêmica.

À professora Dra. Rejane Pereira Neves pela amizade, carinho e ajuda valiosa na identificação das leveduras.

À professora Dra. Ana Lúcia Porto, minha co-orientadora pelos ensinamentos, apoio e otimismo nas horas de aflição.

Ao professor Dr. José Zanon de Oliveira Passavante pela co-orientação e dedicação nas coletas.

Às minhas queridas amigas Daniela Gomes, Ana Paula, Michelline, Luciana, Cláudia, Priscila e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para meu enriquecimento pessoal e a concretização desta pesquisa.

Em especial à minha amiga fashion, Daniela Gomes, pela amizade e carinho que nos uniu ao longo desses anos.

À professora Dra. Galba Takaki da Universidade Católica de Pernambuco pela disponibilização do equipamento de cromatografia, sem o qual não seria possível a conclusão desta pesquisa.

Ao Dr. Ricardo Kenji Shiosaki pelo repasse dos conhecimentos, dedicação e paciência na análise das amostras.

A Felipe Reis e Túlio Andrade pela ajuda na tradução dos artigos a serem enviados para as revistas.

À Secretaria de Educação e Cultura do Estado de Pernambuco pelo afastamento concedido.

À CAPES pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	1
<b>LISTA DE TABELAS</b>	2
<b>RESUMO GERAL</b>	3
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	5
<b>1. Manguezal</b>	5
<b>Distribuição</b>	6
<b>Vegetação</b>	6
<b>Fauna</b>	7
<b>Sedimentos</b>	7
<b>Importância do ecossistema Manguezal</b>	7
<b>2. Leveduras</b>	7
<b>Leveduras em ambiente aquático</b>	8
<b>3. Aminoácidos</b>	9
<b>Produção de aminoácidos por fermentação</b>	11
<b>Técnicas de separação e quantificação de aminoácidos</b>	11
<b>4. Referências Bibliográficas</b>	12
<b>CAPITULO 1: “Leveduras Isoladas de Sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil”.</b>	17
<b>Abstract</b>	17
<b>Introdução</b>	18
<b>Área de Estudo</b>	19
<b>Material e Métodos</b>	20
<b>Resultados e Discussão</b>	22
<b>Resumo</b>	28
<b>Referências Bibliográficas</b>	29
<b>CAPÍTULO 2: “Seleção de Leveduras Isoladas de Sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil, para Produção de Aminoácidos”.</b>	34
<b>Abstract</b>	34
<b>Introdução</b>	35

<b>Material e Métodos</b>	36
<b>Resultados e discussão</b>	39
<b>Resumo</b>	41
<b>Referências Bibliográficas</b>	42
<b>CAPÍTULO 3: “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE para Quantificação dos Aminoácidos Lisina e Metionina em Culturas de Leveduras”.</b>	44
<b>Abstract</b>	44
<b>Introdução</b>	45
<b>Material e Métodos</b>	46
<b>Resultados e discussão</b>	48
<b>Resumo</b>	53
<b>Referências Bibliográficas</b>	54
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	56
<b>ANEXOS</b>	57

**Potencial biotecnológico de leveduras isoladas de sedimento do manguezal Barra das Jangadas,  
Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil**

SILVIA TEREZA AZEDO LOUREIRO

Comissão examinadora

**Membros titulares**

---

Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti (Depto. de Micologia – UFPE)

---

Dra. Norma Buarque de Gusmão ( Depto. de Antibióticos – UFPE)

---

Dra. Galba Takaki (Núcleo de Pesquisas e Ciências Ambientais – NPCIAMB/UNICAP-PE)

---

Dr. José Luiz de Lima Filho (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE)

---

Dr. Walderez Gambale (Instituto de Ciências Biomédicas – USP/SP)

**Membros suplentes**

---

Dra. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante (Depto. de Micologia – UFPE)

---

Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ UFPE)

## LISTA DE FIGURAS

Páginas

### Capítulo 1

Figura 1. Percentual de espécies de leveduras isoladas nos períodos de estiagem e chuvoso. 25

### Capítulo 2

Figura 1. Cromatograma dos filtrados de *Trichosporon cutaneum* (Tc), *Rhodotorula minuta* (Rm), *T. aquatile* (Ta) e *T. brassicae* (Tb). 40

### Capítulo 3

Figura 1. Cromatograma do filtrado da amostra de *Trichosporon cutaneum*. 49

Figura 2. Cromatograma do filtrado da amostra de *Trichosporon aquatile*. 50

Figura 3. Cromatograma do filtrado da amostra de *Trichosporon brassicae*. 51

Figura 4. Cromatograma do filtrado da amostra de *Rhodotorula minuta*. 52

## LISTA DE TABELAS

Páginas

### Capítulo 1

Tabela 1. Parâmetros hidrológicos, pH, temperatura e salinidade do sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brasil. 26

Tabela 2. Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de leveduras isoladas do sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pe, Brasil. 27

### Capítulo 2

Tabela 1. Amostras de Leveduras testadas para produção de aminoácidos. 37

Tabela 2. Fatores de retenção (Rfs) de *Trichosporon cutaneum*, *T. aquatile*, *T. brassicae*, *Rhodotorula minuta*. 40

### Capítulo 3

Tabela 1. Concentrações (mg/mL) dos aminoácidos lisina e metionina e dos filtrados das amostras de leveduras 11d<sub>1</sub>, 11d<sub>2</sub>, 18 e 29. 49

## Potencial Biotecnológico de Leveduras Isoladas de Sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil

### RESUMO GERAL

Com a finalidade de caracterizar o potencial biotecnológico de leveduras isoladas de sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, amostras de sedimento foram coletadas nos meses de março e abril/2004 e outubro/2005 (período de estiagem), junho e julho/2004 e julho/2005 (período chuvoso). Foram isoladas 32 espécies de leveduras distribuídas nos gêneros; *Candida* (25), *Trichosporon* (3), *Kluyveromyces* (2), *Rhodotorula* (1), *Debaryomyces* (1). Os isolados das leveduras em duplicata (64) foram testados para produção qualitativa e quantitativa dos aminoácidos lisina e metionina. As culturas foram inoculadas em meio líquido com 10g de glicose, 0,3g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,5g de extrato de levedura, 0,1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  acrescido de 15mg/L de vermelho de fenol sob rotação de 200rpm a 28°C. Após o período de 30h foi observado como resultado positivo a mudança da cor do meio como indicativo da atividade qualitativa de produção dos aminoácidos. Para confirmação da produção dos aminoácidos os filtrados das leveduras foram submetidos a cromatografia em camada delgada (CCD). As espécies que apresentaram resultado positivo foram *Trichosporon cutaneum*, *T. aquatile*, *T. brassicae* e *Rhodotorula minuta*. Estas foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar os aminoácidos lisina e metionina.

**Palavras-chave:** leveduras, manguezal, aminoácidos, lisina, metionina.

## ABSTRACT

With the purpose of characterize the potential biothechnology of yeasts isolated of sediment of mangrove Barra of Jangadas, samples of sediments were collected in the months of March and april/2004 and october/2005(dry period), june and july/2004 and july/2005 (rainy period) Were isolated 32 species of yeasts that can be distributed in these genera: *Candida* (25), *Trichosporon* (3), *Kluyveromyces* (2), *Rhodotorula* (1), *Debaryomyces* (1). The 64 samples yeasts in duplicate were tested for production's capacity of lysine and methionine. The yeasts culture were inoculated in medium liquid consisting of 10g of glucose, 0,3g of  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,5g of extract of yeasts, 0,1g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 of  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  added of 15mg/L of red of fenol by agitation of 200rpm by 28°C. After 30 hours was observed as a positive result the color's change of the medium as a quality production of amino acids. For the confirmation of the production's of amino acid, the samples of yeasts were subjected to chromatography in a thin layer (TLC). The species that showed positive results were *Trichosporon cutaneum*, *T. aquatile*, *T. brassicae* and *Rhodotorula minuta*. Those samples were subjected to a high efficiency liquid chromatography (HPLC) to quantify the lysine and methionine amino acids.

**Key- words:** yeasts, mangrove, amino acid, lysine, methionine.

# *Introdução Geral*

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Manguezal

O manguezal é um ecossistema extremamente complexo, constituído por vários elementos relacionados na zona de interface mar-terra. O ecossistema consiste de água, solo lamoso, flora, fauna e microbiota (Saenger et al., 1983). No Brasil, os manguezais são encontrados ao longo de quase todo o litoral, margeando estuários, lagunas e enseadas (Schaeffer-Novelli e Cintrón, 1986). O manguezal é um ambiente rico e complexo, quanto a sua estrutura, sendo bastante investigado pela sua flora e fauna, contudo pouco é conhecido quanto a sua microbiota. As alterações ambientais têm provocado transtornos nos processos de fluxo e na qualidade da água, impedindo assim, uma contínua incorporação e enriquecimento de nutrientes, essenciais para a manutenção de animais, vegetais e microrganismos. Com essas alterações ambientais, a população microbiana associada às condições de interface entre mar-terra e salinidade, demonstram principalmente, uma forma de resistência ao ambiente adverso (Schaeffer-Novelli, 1995).

O estuário é um ecossistema de elevada produtividade biológica, onde se incorpora uma teia de inter-relações bióticas de relevância para o equilíbrio de um sistema ecológico. Normalmente, um estuário se caracteriza como sendo um corpo d'água costeiro, semi fechado, no qual existe a transição entre os ecossistemas limnético e marinho e, em regiões tropicais e subtropicais, esses ambientes costeiros se caracterizam pela presença de uma vegetação típica, o mangue (Schaeffer-Novelli, 1995). Ecossistemas de manguezais são típicos de áreas estuarinas tropicais, e são importantes para a reprodução de muitas espécies marinhas inclusive como fonte de alimento, embora elas estejam seriamente ameaçadas pela atividade humana (Schaeffer-Novelli, 1995). Por definição o manguezal consiste de um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais, sujeito ao regime das marés. É constituído de espécies vegetais lenhosas típicas, além de micro e macro algas, adaptadas á flutuação de salinidade e caracterizadas por colonizarem sedimentos predominantemente lodosos, com baixos teores de oxigênio (Schaeffer-Novelli, 1995).

O Brasil possui de 10.000 a 25.000 Km<sup>2</sup> de manguezais, enquanto no mundo existem 162.000 Km<sup>2</sup>. Os manguezais apresentam maior desenvolvimento entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, e o desenvolvimento máximo ocorre próximo a linha do Equador. No Brasil os manguezais se estendem desde o Amapá até Santa Catarina (Schaeffer-Novelli, 1995). Embora o manguezal seja característico de regiões tropicais, também pode ocorrer em climas temperados, mas em menor proporção. As condições ideais para o desenvolvimento dos manguezais são: temperatura média acima de 20°C, média da temperatura mínima não inferior a 15°C, amplitude térmica anual menor que 5°C e precipitação pluvial acima de 1500mm/ano, sem prolongados períodos de seca (Schaeffer-Novelli, 1995).

O manguezal é composto por plantas lenhosas, chamadas de mangue. Nesse ambiente existem plantas herbáceas, epífitas, hemiparasitas e aquáticas típicas. Possuem, adaptações especiais, os pneumatóforos que auxiliam na sua oxigenação, e também na diminuição do impacto das ondas; adaptações fisiológicas para ultra-filtração e secreção ativa da água salobra; e reprodução por viviparidade (Schaeffer-Novelli, 1995). As árvores também se caracterizam por uma grande e permanente queda de folhas, produzindo uma rica serrapilheira, proporcionando ao ambiente condições favoráveis em matéria orgânica.

As florestas de mangue de todo litoral brasileiro são compostas de três gêneros: *Laguncularia*, *Avicennia* e *Rhizophora* podendo existir ainda representantes do gênero *Conocarpus*, que vivem nos bordos das florestas, sendo comuns no litoral norte. *Rhizophora*, também chamada de mangue-vermelho, apresenta casca lisa e clara; quando raspada tem cor vermelha. *Avicennia* ou siriúba possui casca lisa castanho-claro; *Laguncularia* ou mangue branco, é pequena, cujas folhas possuem pecíolo vermelho com duas glândulas na parte superior. Podem alcançar de 6m (*Laguncularia*) a 12m (*Rhizophora* e *Avicennia*) de altura (Schaeffer-Novelli, 1995).

A fauna dos manguezais é composta por vários animais, desde microscópicos a grandes peixes, aves, répteis e mamíferos. Esses animais têm origem nos ambientes terrestre, marinho e de água doce, podendo ser residentes ou semi-residentes. A maior parte da fauna vem do ambiente marinho, sendo encontrada grande quantidade de moluscos, crustáceos e peixes. Do ambiente terrestre provêm aves, anfíbios, mamíferos e alguns insetos (Schaeffer-Novelli, 1995).

Os sedimentos dos manguezais possuem características variáveis, de acordo com a origem. Podem ser originados no próprio ambiente, pela decomposição de folhas, galhos, restos de animais, contendo produtos de decomposição de rochas de diferentes naturezas, associados a materiais

vulcânicos, graníticos, gnáissicos, ou sedimentares; associados a restos de plantas e animais trazidos de fora do ambiente por ondas, ventos, correntes litorâneas ou fluxo dos rios (Schaeffer-Novelli, 1995). O substrato do manguezal é lodo-arenoso, podendo, às vezes, chegar a semi-líquido; geralmente tem muita matéria orgânica, alto conteúdo de sal, é pouco consistente e apresenta cor cinza escuro (Schaeffer-Novelli, 1995). Condições ambientais como precipitação, marés, correntes, ondas, aporte de rios e ventos fortes, podem alterar suas características. Os manguezais alcançam melhor desenvolvimento em locais onde o substrato se apresenta menos consistente, com baixa declividade e granulometria fina. Devido á decomposição da matéria orgânica e á saturação com água, esses sedimentos são pobremente arejados e ricos em H<sub>2</sub>S sulfeto de hidrogênio e quando entram em contato com o ar ocorre redução, baixando ainda mais os valores de pH, o que pode resultar em condições extremamente ácidas quando há produção de ácido sulfúrico (Schaeffer-Novelli, 1995). Apesar da pouca diversidade, tanto animal quanto vegetal, encontrada no manguezal quando comparado com as Florestas Atlântica e Amazônica, este ecossistema é considerado um dos mais ricos do mundo, em termos de biomassa (Schaeffer-Novelli, 1995).

## 2. Leveduras

As leveduras são microrganismos reconhecidos pela sua diversidade morfológica e bioquímica. São definidas como fungos, cujo estado sexual não apresenta corpos de frutificação e o crescimento vegetativo ocorre por brotação ou fissão ou a interação de ambos. São microrganismos predominantemente unicelulares, não móveis, na sua maioria sapróbios e alguns parasitas oportunistas (Lachance e Starmer, 1998). Historicamente, as leveduras estão associadas a processos fermentativos que contenham açúcares. Entretanto, a habilidade das leveduras em assimilar grande número de compostos orgânicos, expande a sua capacidade de dispersão e de ocupação dos nichos ecológicos que contenham estes compostos (Phaff e Starmer, 1987). Leveduras são microrganismos encontrados em ecossistemas marinhos e de manguezais onde sua ocorrência pode está associada a animais marinhos e seus excretas (Hyde, 2002). As leveduras são comuns em ambientes subtropicais, água do mar, estuários e água doce, com prevalência das formas oxidativas, estando presentes em alto número em águas menos salgadas. As espécies encontradas onde ocorre poluição doméstica estão geralmente associadas com animais de sangue quente e o homem, enquanto outras espécies são associadas com madeira e solo (Woollett e Hendrick, 1970). Em locais onde ocorre poluição doméstica há uma prevalência de espécies fermentativas. Existe uma prevalência de leveduras

estritamente aeróbicas em águas não poluídas e de leveduras fermentativas em águas poluídas (Woollett e Hendrick, 1970). Espécies de leveduras são associadas a ambientes terrestres porém poucas associações têm sido relatadas como prevalentes de habitat marinho (Hagler e Ahearn, 1987). Entre elas estão *Pichia spartinae*, *Kluyveromyces aestuarii* e *K. drosophilorum*, isoladas de água salgada, estuário e sedimento de manguezal na Flórida, USA (Ahearn et al., 1968; Meyers e Ahearn, 1974), espécies de *Metschnikowia* com invertebrados marinhos, *Debaryomyces hansenii* com água do mar (Kohlmeyer e Kohlmeyer, 1979) e várias leveduras basidiomicéticas (Fell, 1974). As leveduras podem está envolvidas nos habitats marinhos na decomposição, na ciclagem de nutrientes, na biodegradação de compostos xenobióticos, como petróleo e seus derivados, e como parasitas (Meyers e Ahearn, 1974). O baixo nível de oxigênio acarreta alta proporção de leveduras fermentativas em águas poluídas por esgotos domésticos. As leveduras fermentativas podem ser bons indicadores de poluição doméstica e contaminação fecal principalmente *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* que são espécies isoladas com frequência de águas poluídas por esgotos domésticos e de fontes humana e animal (Woollett e Hendrick, 1970).

As leveduras com pigmento carotenóide foram utilizadas como indicadoras de poluição pela primeira vez por van Uden e Fell (1968). Embora, essas leveduras não pareçam ser representativas em outros estudos, pois as mesmas não são correlacionadas com nenhum fator de poluição. Leveduras basidiomicéticas que predominam em água doce e salgada na Flórida como *Rhodotorula* sp. e *Cryptococcus* sp. são encontradas em águas de estuário não poluído e sedimento de manguezal no Brasil (Fell et al., 1960; Hagler e Ahearn, 1987 e Pagnocca et al., 1989).

Hagler e Mendonça-Hagler (1981) relataram espécies de leveduras isoladas de estuário poluído do Rio de Janeiro e concluíram que a exigência de vitaminas como fator essencial de crescimento pode ser importante para o estabelecimento da poluição de águas marinhas. Em 1981, Hagler e Mendonça-Hagler relataram *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Trichosporon* como gêneros mais freqüentemente isolados de águas de estuário poluído no Rio de Janeiro.

Hagler et al. (1982) isolaram leveduras de sedimento de estuário poluído no Rio de Janeiro. Espécies de *Candida krusei* e *Pichia membranaefaciens* foram predominantes e *Rhodotorula rubra* esteve em menor frequência. A ocorrência de *Trichosporon* sp. em sedimento de estuário no Rio de Janeiro pode estar relacionada com a poluição (Hagler e Mendonça-Hagler, 1981). Espécies de *Debaryomyces hansenii*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula laryngis* e *Trichosporon mucoides* foram isoladas de ambiente hipersalino de água do mar na República Dominicana (Butinar et al., 2005).

Araújo et al. (1995) relatam que *Candida boidinii* e *C. famata* são espécies isoladas com frequência de ambiente de mangue. Leveduras basidiomicéticas como *Rhodotorula* spp. e

*Cryptococcus* spp. também foram isoladas de ambiente de mangue. *Kluyveromyces aestuarii* é citada por Ahearn et al. (1968) como associada a restos da alimentação de invertebrados, sedimento e vegetação de mangue.

As leveduras fermentativas (principalmente, *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*) podem ser bons indicadores de poluição doméstica e fecal, sendo freqüentemente isoladas de águas poluídas por esgotos domésticos (Woollett e Hendrick, 1970).

Hagler e Mendonça-Hagler (1981) referem que espécies de leveduras são encontradas em praias em menor proporção do que em águas de estuário poluído. Hagler e Mendonça-Hagler (1981) encontraram *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Debaryomyces* e *Trichosporon* como gêneros mais freqüentemente isolados em águas de estuário poluído, concordando com o que já existe na literatura. Estudos realizados com sedimentos do manguezal do rio Formoso-PE demonstraram pela primeira vez, a presença de leveduras, as quais ocorrem em ambiente ácido, sendo a maioria pertencente ao gênero *Candida*. No mesmo sedimento do manguezal foi evidenciado que no mês de março, período de estiagem, houve maior prevalência de leveduras do gênero *Candida*. Os resultados demonstraram ainda, que no período chuvoso a presença de leveduras diminuiu (Nascimento et al., 2000). São poucos os estudos sobre diversidade e ecologia de leveduras isoladas de sedimento de manguezais no Brasil.

### 3. Aminoácidos

Os aminoácidos são unidades estruturais das proteínas e importantes componentes de uma ampla variedade de substâncias como, alimentos e produtos industriais. Em particular, apresentam um considerável papel na área clínica, sendo várias doenças associadas com a deficiência no metabolismo de aminoácidos, e no campo farmacêutico como suplemento dietético (Sweetman, 2005). Este grupo de substâncias tem fundamental aplicação na indústria de produtos microbiológicos, especialmente na produção de aminoácidos essenciais. A indústria de aminoácidos tem ocupado um importante papel no mundo da indústria química (Wang et al., 2002). Os aminoácidos são conhecidos pela expressiva aplicação como constituintes das proteínas, agindo como precursores de outros compostos como os ácidos nucléicos, o grupo hemoglobina, hormônios e neurotransmissores (Rai, 2002). Sob o ponto de vista nutricional, o enriquecimento de alimentos e dietas com aminoácidos melhora a assimilação dos alimentos, intensifica o metabolismo de ácidos graxos e evita danos ao sistema nervoso central.

A metionina é um aminoácido essencial que faz parte da dieta de humanos e animais, por isso o grande interesse em desenvolver processos microbianos para a produção comercial de metionina (Pham et al., 1992). A deficiência em metionina pode levar ao desenvolvimento de várias doenças (Parcell, 2002). A metionina é extensivamente usada na indústria de ração para aves (Campbell, 2001). A produção industrial de metionina por fermentação requer um microrganismo com elevada capacidade de produção (Okamoto e Ikeda, 2000a). Os aminoácidos lisina e metionina são economicamente importantes, sendo empregados como fonte de alimento e suplemento alimentar. Esses aminoácidos não são sintetizados biologicamente pelo organismo, daí a necessidade de uma suplementação (Shah et al., 2002). Os aminoácidos utilizados em diversos produtos biotecnológicos são produzidos, principalmente, pelo processo de fermentação, utilizando materiais de origem naturais. A bactéria *Corynebacterium* tem sido empregada como principal fonte na indústria de fermentação de aminoácidos (Wang et al., 2002). O método de fermentação por *Corynebacterium* tem a vantagem de produção em massa a baixo custo o que impulsionou a expansão do mercado de aminoácidos (Ikeda, 2003). A produção industrial de aminoácidos tem ocupado importante papel no mundo da indústria química. A demanda anual de aminoácidos usada para a alimentação e indústria de produtos farmacêuticos é bastante expressiva. A maioria dos aminoácidos é produzida na China (Wang et al., 2002). O processo de produção industrial não tem sido capaz de formar alguns aminoácidos essenciais como L-triptofano, L-histidina e L-arginina, importantes na indústria de alimentos (Wang et al., 2002).

O método de fermentação é aplicado para a produção industrial da maioria dos aminoácidos. A determinação dos aminoácidos vem sendo usada há muito tempo na pesquisa bioquímica e, mais recentemente na área de ciência de alimentos. Sabendo-se que os aminoácidos são unidades estruturais básicas das proteínas, a quantificação e a qualificação dos mesmos tornam-se necessárias, uma vez que, o principal fator determinante da qualidade da proteína é a sua composição em aminoácidos (Kipp et al., 1996). O método de fermentação para produção de aminoácidos é um processo pelo qual os microrganismos convertem nutrientes orgânicos em componentes vitais necessários. Com o método de fermentação, matérias-primas como a glicose são adicionadas ao meio de cultura permitindo que os microrganismos cresçam e produzam aminoácidos. A produção de um determinado aminoácido depende da qualidade e da quantidade das enzimas. Há aumento na produção se as enzimas envolvidas estiverem presentes em grandes quantidades sob condições adequadas para suas atividades (Wang et al., 2002). As enzimas desempenham um papel importante nesta etapa. Várias reações consecutivas envolvendo cerca de 30 tipos de enzimas fazem parte do processo de fermentação, e diversos aminoácidos são produzidos como resultado destas reações. Para produção de aminoácidos com uso de microrganismos, é importante se obter um potencial elevado

para produção de aminoácidos, com isso, é necessário aumentar a capacidade do microrganismo conduzindo técnicas que melhor aproveitem essa capacidade (Wang et al., 2002). De acordo com (Kinoshita et al. (2004) vários aminoácidos produzidos por microrganismos podem apresentar bom rendimento dependendo das fontes de carbono e nitrogênio empregadas.

Pesquisas estão sendo realizadas com a utilização de amostras selvagens de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos acumulando aminoácidos em cultura contendo uma fonte suplementar de nitrogênio. A seleção de microrganismos mais complexos como lactobacilos e leveduras têm evoluído na produção de metionina e lisina (Odunfa et al., 2001). Muitos esforços têm sido feitos no sentido de se desenvolver técnicas de produção microbiana de aminoácidos (Aida, 1972). Vários métodos têm sido desenvolvidos para liberar os componentes celulares dos microrganismos, incluindo hidrólise alcalina e ácida, tratamento com enzimas quebrando a parede celular, métodos físicos e o uso de solventes orgânicos. Esses métodos não são aplicados em grande escala, tendo em vista a baixa produção, toxicidade, destruição de vários aminoácidos e alto custo. A autólise é um processo natural causado pelo envelhecimento do microrganismo e ocorre quando os microrganismos completam seu ciclo de vida iniciando a fase estacionária. A autólise de leveduras é caracterizada por um período latente durante o qual as células de leveduras sofrem ativa fermentação. Quando a glicose é esgotada, ocorre mudança irreversível no citoplasma da célula então começa a proteólise, iniciando a acumulação de peptídeos e aminoácidos (Vosti e Joslyn, 1953). A técnica de determinação de aminoácidos foi iniciada por (Moore et al., 1958), empregando resina sulfonatada de troca iônica, sendo que, a detecção dos aminoácidos era realizada por colorimetria, após a reação pós-coluna, com ninhidrina. Posteriormente, introduziu-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um equipamento mais econômico e versátil (Kan e Shipe, 1981). Esta técnica tem por objetivo a separação e purificação de compostos como ácidos nucleicos, aminoácidos e outros compostos polares (Alpert, 1990). Nesta técnica, os solutos são eluídos de acordo com o aumento de sua hidrofiliidade e, ainda, podem ser associados á fase móvel reagentes como o ácido ortofosfórico, capazes de aumentar a hidrofiliidade (Alpert, 1990). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido um método viável na separação e quantificação de aminoácidos, fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis; a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, contida em uma coluna. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada (Ciola, 1998). A escolha de uma técnica adequada para a determinação e quantificação de aminoácidos vai proporcionar um melhor resultado, a depender das amostras a serem analisadas (Larson et al., 2002).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahearn, D. G., Roth, F. J., Meyers, S. P. Ecology and characterization of yeasts from aquatic regions of South Florida. **Mar. Biol.** 1: 291-308, 1968.

Aida K. Brief history of research In: Yamada K., Kinoshita S., Tsunda T., Aida K. (eds). *The microbial production of amino acids*. Kodansha, Tokyo. 1972, p. 23.

Alpert, A. J. Hydrophilic – interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, v. 499, n. 2, p. 177-196, 1990.

Araújo, F. V., Soares, C. A. G., Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L. C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Ant. Leeuwenh.** 68, 91-99, 1995.

Butinar, L Santos, S. Spencer-Martins, I., Oren, A., Gunde-Cimerman, N. Yeasts diversity in hypersaline habitats. *FEMS. Microbiology Letters*. 244, 229-234, 2005.

Campbell, K. C. M. Therapeutic Use of D-methionine to reduce the toxicity of platinum- containing anti- tumor compounds and other compounds, US Patent 6187817, 2001.

Ciola, R. *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC*. 1 (ed). São Paulo: Edgard Bulcher, 1998.

Fell, J. W., D. G. Ahearn, S. P. Meyers, F. J. Roth, JR. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida and adjacent benthic areas. **Limnol. Oceanogr.** 5: 366-371, 1960.

Fell, J. W. Distribution of yeasts in the water masses of the southern oceans. In: Colwell RR & Morita (eds) *Effects of the Ocean Environments on Microbial Activities*. University Park Press, Baltimore. 1974, pp 510-523.

Hagler, A. N. L. C. Mendonça-Hagler. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 41 n. (1), p. 173-178, 1981.

Hagler, A. N., Oliveira, R. B., Mendonça-Hagler, L. C. Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brazil. **Ant. Leeuwenh**, 48. p. 53-56, 1982.

Hagler, A. N.; Ahearn, D. G. The ecology of aquatic yeasts. *In The yeasts*. Vol.1. Biology of yeasts. Edited by A.H.Rose and J. S. Harrison. Academic Press, New York. 1987, pp. 181-205.

Hyde K. D. ***Fungi in marine environments***. Fungal Diversity Press, Hong Kong. 2002.

Ikeda, M. Amino acid production processes. Biotechnological manufacture of lysine. In . Scheper, T(ed.), **Advances in Biochemical Engineering** , vol. 79. Springer, Berlin. 2003, pp. 1-36.

Kan, T. A.; Shipe, N. F. Modification an evaluation of a reversed phase high performance liquid chromatographic method for amino acid analysis. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, p. 337-341, 1981.

Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. Studies on the amino acid fermentation. Part. I. Production of L- glutamic acid by various microorganisms. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50 (6): 331-343, 2004.

Kipp, B; Belitz, H. D; Seilmeier, W; Wieser, H. Comparative studies of high Mr. Subunits of rye and wheat. I. Isolation and biochemical characterization and effects on gluten extensibility. **Journal of Cereal Science**, v. 23, n. 3, p. 227-234, 1996.

Kolhmeyer J. e Kolhmeyer E. *Marine Mycology: The Higher Fungi*. Academic Press, New York. 1979.

Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam, 1998, p. 1055.

Lachance, M. A.; Starmer, W. T. Ecology and yeasts. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (ed). *The Yeasts – A Taxonomy Study*. 4 ed. Amsterdan: Elsevier Science. 1998, p. 21-30.

Larson, T. M., Gawlitzek, M., Evans, H., Albers, U., Cacia, J. Chemometric Evaluation of On- Line High- Pressure Liquid Chromatography in Mammalian Cell Cultures: Analysis of Amino Acid and Glucose. **Biotech. Bioeng.** 2002, 77, 553-563.

Meyers, S. P.; Ahearn, D. G. Implication of yeasts and yeast like fungus in marine processes. Veroeff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven Suppl. 5, 321-338, 1974.

Meyers S.P., Ahearn, D.G., Alexander S., Cook, W. *Pichia spartinae*, a dominant yeast of the Spartina salt marsh. Developments in Industrial Microbiology. 16: 262-267, 1975.

Moore, S., Spackman, D. H., Stein, N. H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1185- 1190, 1958.

Nascimento, R. M. L.; Pimentel, A. C. M. ; Araújo, S. F. S.; Okada, K. ; Nascimento, A. E. ; Alves da Silva, C. A. ; Campos Takaki, G. M. *Ocorrência de leveduras em sedimento de mangue*. Revista Symposium. 4. p. 56-59, 2000.

Odunfa, S.A, Adeniran, S.A, Teniola, O. D, Nordstorm, J. Evaluation of lysine and methionine production in some lactobacilli and yeasts from Ogi. **Int J Food Microbiol** ; 63: 159-163, 2001.

Okamoto, K. Ikeda, M. Development of industrially stable process for L- threonine fermentation by an L- methionine auxotrophic mutant of *Escherichia coli*. **J. Biosci Bioeng.** 2000a ; 89: 87- 89.

Pagnocca, F. C., Mendonça-Hagler, L. C., Hagler, A. N. Yeasts associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Yeast*, 5: S479-S483, 1989.

Parcell, S. Sulfur in human nutrition and application in medicine. **Altern. Med. Rev.** 2002, 7: 22-44.

Phaff, H. J.; Starmer, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soils. In: Rose AH & Harrison JS (eds) **The Yeasts**. Vol. 1- Biology of the Yeasts. 2<sup>nd</sup> edn. Academic Press, New York. 1987, pp 123- 180.

Pham, C.B., Galvez, C.F., Padolina, W.G. Methionine fermentation by bath fermentation from various carbohydrates. **ASEAN Food J**; 7: 34-37, 1992.

Rai, V. K. Role of amino acids in plant responses to stresses. **Biol. Plant**. 2002, 45: 461-7.

Robbs, P. G., Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L. C. Yeasts associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil. **Yeast**. 5: 485-489, 1989.

Saenger, P.; Hegery, E.J.; Davie, J. D. S. *Global status of mangroves ecosystems*. {s. I.} : IUCN Publication, Inglaterra, p. 88, 1983.

Schaeffer-Novelli, Y.; Cintron, G. *Guia para o estudo de Áreas Manguais*: Estrutura, função e flora. São Paulo: Caribbean Ecological Research, São Paulo, Brasil, 150p.1986.

Schaeffer-Novelli - Manguezal: Ecosistema entre a terra e o mar, *Caribbean Ecological Research*., Universidade de São Paulo, 65p. 1995.

Shah, A.H., Hameed, A., Khan, G.M. Fermentative production by s-2 Aminoethyl-L-cysteine and a-Amino – b- hydroxyvaleric resistant mutants of *Brevibacterium lactofermentum*. **Agric. Biol. Chem**. 2002. 42: 745-752.

Soares, C. A. G., Maury, M., Pagnocca, F. C., Araújo, F. V.; Mendonça-Hagler, L. C. Ascomycetous yeast from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries. **J. Gen. Appl. Microbiol**. 43, 265-272, 1997.

Sweetman, S. C. Martindale. The Complete Drug Reference. 34th (ed). Pharmaceuticals Press. London, 2005.

van Uden, N.; Fell, J. W. *Marine yeasts*. Adv. Microbiol. Sea 1, 167-201, 1968.

Vosti, D.C., Joslyn, M. A. Autolysis of baker's yeast. **Appl. Microbiol**. 70 -6, 1953.

Wang, Y.U., Zhang, Yingzi, Ding, Jiuyuan, Liu, Yangian, Wang, Jiang, Y.U. Zihua. Cloning Sequence Analysis of Imidase Gene from *Alcaligenes eutrophus* and Its Expression in *E. coli*. **Acta Microbiol Sin.** 42 (2): 153-162 2002.

Woollett, L.; L.; L.; R. Hendrick. Ecology of yeasts in polluted water. **Ant. van Leeuwenh.** J. Microbiol. Serol. 36: 427- 435, 1970.

# *Capítulo 1*

**Leveduras isoladas de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil**

Artigo a ser submetido para publicação na Brazilian Journal of Microbiology.

## LEVEDURAS ISOLADAS DE SEDIMENTO DO MANGUEZAL BARRA DAS JANGADAS, JABOATÃO DOS GUARARAPES, PERNAMBUCO, BRASIL

Silvia Tereza Azedo Loureiro <sup>1</sup>; Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti <sup>1</sup>; José Zanon de Oliveira Passavante <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; <sup>2</sup>Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

### ABSTRACT

The mangrove constitute ecosystem of transition between the land and aquatic environments characterized by physical and chemical unique properties influencing the local biotic. To get species that can be used in a biotechnology process were isolated and identified yeasts of this ecosystem. Samples of sediments were collected in the months of march and april/2004 and october/2005 (dry period), june and july/2004 and july/2005 (rainy period). 25g were used in each one of the sediments samples suspend in 225mL of sterilized water; 10mL of this suspended were added at 990mL of sterilized water, and from this 1mL was scattered by the surface of the Sabouraud added by extract of yeast and cloranfenicol, in the plates of Petri. The plates were incubated temperature of 28°C. Were isolated 32 species of yeasts can be distributed in these kinds: *Candida* (25) *Trichosporon* (3), *Kluyveromyces* (2), *Rhodotorula* (1), *Debaryomyces* (1).

**Key-words:** mangrove, sediment, yeasts.

## 1. INTRODUÇÃO

O manguezal desenvolve-se na zona de contato das águas marinhas e fluviais, onde ocorre grande instabilidade ecológica. São ambientes importantes para criação, alimentação, proteção, reprodução e desova de várias espécies animais. Devido ao escoamento dos rios de forma represada ou liberada pela maré, ocorre a deposição de sedimentos finos. Portanto, os manguezais são ecossistemas de transição entre os ambientes terrestre e marinho, caracterizados por propriedades físico-químicas únicas, as quais influenciam a biota local (1). As leveduras são fungos unicelulares que ocorrem em grande variedade de habitat, incluindo ambientes aquáticos e terrestres, sapróbias em sua maioria, algumas espécies parasitas oportunistas (25). Ocorrem em ambientes úmidos que apresentam elevado aporte de nutrientes como carboidratos e aminoácidos, sendo utilizadas em vários processos biotecnológicos como na indústria de panificação, produção de enzimas, proteínas, aminoácidos e fármacos (38).

A alta densidade de leveduras é encontrada em sedimento marinho, com a maior parte da população a poucos centímetros da superfície (14,31). Os isolados que predominam em sedimentos da Flórida e das Bahamas têm sido principalmente de leveduras oxidativas, incluindo *Rhodotorula* e *Cryptococcus*, encontradas em água salgada (14,43). As leveduras são encontradas em pântano salgado e ecossistema de manguezal onde apresentam importante papel na cadeia alimentar (33,19). A maioria dos estudos sobre ecologia de leveduras de regiões tropicais tem sido feito em ambientes terrestres, porém sedimentos aquáticos podem apresentar concentrações relativamente altas de nutrientes e populações de leveduras (15,17). Diante da escassez de trabalhos da ocorrência de fungos em manguezais torna-se importante o isolamento de espécies de leveduras visando ampliar os conhecimentos e determinar a diversidade desses microrganismos em sedimento de manguezais no Brasil.

## 2. ÁREA DE ESTUDO

O sistema estuarino de Barra das Jangadas é formado pela junção dos rios Pirapama e Jaboatão e por seus afluentes. Localiza-se no município de Jaboatão dos Guararapes a 20km ao sul da cidade do Recife. Apresenta-se na forma de um “S” alongado, é pouco profundo, com largura que varia entre 200m a 250m, e comprimento em linha reta de 300m, aproximadamente. Estes rios, juntos, drenam cerca de 1002km até a desembocadura no Oceano Atlântico, recebendo os despejos industriais e domésticos das localidades por eles percorridas, atravessando um total de 7 cidades. O atual grau de poluição de suas águas é elevado, ocasionando transtornos em alguns locais, além de comprometerem seriamente a qualidade da água da praia de Barra das Jangadas (8).

O clima desta região é tropical quente e úmido, do tipo As', com chuvas de outono-inverno segundo Köppen, caracterizando-se por apresentar temperatura anual elevada de aproximadamente 25,5°C e precipitação anual superior a 2000 mm, com duas estações distintas: seca, determinada pela evaporação superior á precipitação e chuvosa, onde a evaporação é inferior á precipitação (8). A atividade econômica predominante neste estuário é caracterizada pela pesca artesanal de peixes e moluscos. Na zona litorânea o domínio terrestre está representado pela vegetação das dunas e restingas, que demonstram ter sofrido ação antrópica e no domínio marítimo são encontrados vegetais dos manguezais, correspondentes á zona fitogeográfica do litoral, pertencentes ás espécies *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho), *Conocarpus erectus* L. (mangue-de-botão), *Laguncularia racemosa* Goert (mangue branco) e *Avicennia schaueriana* Jacq (mangue siriúba) (11).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coletas**

Foram coletadas 24 amostras de sedimento no Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE, doze nos meses de Março e Abril/2004 e Outubro/ 2005 (período de estiagem), e doze em Junho, Julho/2004 e Julho/2005 (período chuvoso). O sedimento foi coletado em quatro pontos onde a vegetação característica de mangue era predominante, com o auxílio de uma pá de jardinagem e acondicionado em sacos plásticos, e em seguida, transportado para o Laboratório do Departamento de Micologia da UFPE para o processamento. Os pontos 1 e 3 localizados ao longo do Rio Jaboatão recebem despejos de esgotos domésticos e industriais, e os pontos 2 e 4 localizados ao longo do Rio Pirapama, que apesar de não serem tão poluído quanto o Rio Jaboatão recebem despejos de resíduos industriais dos municípios vizinhos. A temperatura da água e do sedimento foi medida com um termômetro digital Hanna, o pH do sedimento em pH metro digital Hanna, e a salinidade da água determinada em refratômetro manual de marca ATAGO.

#### **3.2. Isolamento e purificação das leveduras**

Para o isolamento, o sedimento foi diluído e plaqueado segundo o método de Clark (9) modificado, com o seguinte procedimento: 25g de cada amostra do sedimento foi diluída em 225mL de água destilada esterilizada (diluição 1:10). Desta suspensão 10mL foi adicionado a 990mL de água destilada esterilizada (diluição 1:1000) da qual 1mL foi espalhado na superfície do meio Ágar Sabouraud extrato de levedura e cloranfenicol (100mg/L) contido em placas de Petri em triplicata. As placas permaneceram a temperatura ambiente (TA 28°C+/-1°C) e o crescimento das colônias acompanhado até 72h. Para purificação das amostras de leveduras, foram preparadas suspensões em 2ml de água destilada esterilizada (ADE), contendo 50mg de cloranfenicol/L. De cada suspensão, 0,2mL foram semeados por esgotamento na superfície do meio. As colônias surgidas isoladamente foram repicadas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura.

#### **3.3. Identificação das leveduras**

A identificação das espécies foi efetuada através da observação das características macroscópicas (cor, aspecto) e microscópicas, sendo utilizados os meios de cultura específicos para as provas fisiológicas e bioquímicas e bibliografias específicas (3,22,33).

### **3.4. Parâmetros hidrológicos, pH, temperatura e salinidade do sedimento**

As amostras de sedimento foram coletadas durante as baixa-marés baseadas nas tábuas de marés, (6), para o porto do Recife. A salinidade do sedimento foi determinada através de um refratômetro manual de marca ATAGO. O pH (potencial Hidrogeniônico) do sedimento foi obtido através de um pHmetro digital Hanna e a temperatura do sedimento registrada em termômetro digital Hanna .

### **3.5. Análises estatísticas**

#### **3.5.1. Abundância das espécies**

A abundância das espécies foi calculada de acordo com Schnitler e Stephenson (40) empregando-se a fórmula  $D_i = n_i \times 100 / N$ .  $D_i$  = distribuição da espécie  $i$ ;  $n_i$  = número de amostras da espécie  $i$ ;  $N$  = número total de amostras. As espécies foram também enquadradas em categorias: ( $< 0,5\%$ ) = rara; ( $\geq 0,5 < 1,5\%$ ) = ocasional; ( $\geq 1,5 < 3\%$ ) = comum; e ( $\geq 3\%$ ) = abundante.

#### **3.5.2. Índice de Diversidade**

Para analisar a diversidade de espécies foi utilizado o índice de Shannon -Wiener e aplicado o teste t utilizando o software Systat 10.0,  $t = H_1 - H_2 / s H_1 - H_2$ , para verificar se houve diferença significativa na diversidade entre os períodos de estiagem e chuvoso e os pontos de coleta 1, 2, 3 e 4 entre os períodos de estiagem e chuvoso. O nível de significância crítico admitido para rejeição da hipótese nula adotado foi de uma possibilidade máxima de erro de 1% ( $p < 0,01$ ) e 5% ( $p < 0,05$ ), a depender do caso (21).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parâmetros Hidrológicos, pH, Temperatura e Salinidade do Sedimento do Manguezal Barra das Jangadas

Os valores médios da salinidade variaram de 3 a 32‰ para as amostras de sedimento nos períodos de coletas. No período chuvoso a salinidade do sedimento variou de 3 a 10‰ e no período de estiagem de 25 a 32‰. A temperatura do sedimento oscilou de 26°C a 29°C no período de estiagem e no período chuvoso de 23°C a 24°C. O pH de 6,5 a 7,8 no período de estiagem e no período chuvoso de 6,7 a 7,85, não havendo mudança significativa nos valores de pH para os períodos de coleta (Tabela 1). Esses resultados podem está relacionados com a interferência dos Rios Jaboatão e Pirapama que banham todo o manguezal. Algumas leveduras são reconhecidas pela capacidade de tolerância a altas concentrações de açúcares enquanto outras são mais tolerantes a altas concentrações de sais. Algumas são mais tolerantes a valores mais alcalinos de pH, enquanto outras se adaptam melhor em condições mais ácidas (34). *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula rubra* e *Pichia etchelsii* são capazes de crescer em ambientes contendo valores acima de 15% de NaCl (29). Kurtzman e Fell (23) referem a baixa ocorrência e diversidade de leveduras em águas de ambiente hipersalino. As populações de leveduras são mais escassas na água do mar do que em água doce, e diminuem com a profundidade e a distância da superfície (43). A baixa frequência de leveduras ascomicéticas e a prevalência de espécies de *Candida* encontradas estão de acordo com os achados em uma região costeira do Rio de Janeiro (41). Essa baixa frequência de leveduras ascomicéticas no manguezal Barra das Jangadas pode está relacionada a baixa resistência dessas leveduras a temperaturas mais elevadas. Os locais mais sombreados dos ecossistemas de mangue, aparentemente, apresentam um número mais elevado de leveduras ascomicéticas, menos tolerantes a altas temperaturas do que as basidiomicéticas (16).

### Isolamento de Leveduras

Das 24 amostras de sedimento coletadas foram isoladas 32 espécies de leveduras correspondentes aos gêneros *Candida* 25 espécies, *Debaryomyces* 1, *Kluyveromyces* 2, *Trichosporon* 3, e *Rhodotorula* 1, obtendo-se um total de 328 UFC/mL (Tabela 2). Maior percentual de isolamento ocorreu no período chuvoso (Figura 1). O número de leveduras encontrado mostrou a habilidade dos

substratos de mangue para suportar uma densidade microbiana de comunidades heterotróficas, provavelmente refletindo o nível de nutrientes encontrado nos sedimentos.

*Candida* foi o gênero isolado com maior diversidade de espécies 25 (Tabela 2), em comparação com os demais gêneros isolados. Hagler et al (16) referem que *Candida* é o gênero mais isolado de ambiente aquático e floresta tropical, incluindo substratos de mangue. Espécies de *Candida* são também referidas por Hagler e Mendonça-Hagler (14) como dominantes em ambiente marinho na Flórida. Hagler et al. (16) referem que espécies de *Candida* encontradas em sedimentos poluídos de um estuário do Rio de Janeiro são prevalentes de águas poluídas e esgotos domésticos. Esses resultados estão de acordo com os achados nesta pesquisa. *Candida krusei* e *C. parapsilosis* destacaram-se por apresentar maior número de UFC, 30 e 33 respectivamente, durante o período chuvoso ao longo dos rios Jaboatão e Pirapama. *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* são referidas em sedimento de estuário poluído por Hagler et al. (15). Estas espécies também foram isoladas nesta pesquisa em sedimento de manguezal poluído. (19), Esses achados estão relacionados com a contaminação fecal por fontes humanas e de animais incluindo pássaros, encontrados em ambiente de mangue e estuários (19). Foi relativamente alto o número de leveduras fermentativas, principalmente *C. melibiosica*, *C. haemulonii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *Candida krusei* encontradas no sedimento do manguezal Barra das Jangadas. *Candida krusei* não é uma espécie bem adaptada às condições marinhas, entretanto poluição doméstica pode favorecer o aparecimento desta espécie em sedimento de manguezal (31). *Candida*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* e *Trichosporon* são os gêneros mais frequentemente isolados em águas de estuário poluído (14).

*Trichosporon* esteve representado com três espécies: *Trichosporon aquatile*, *T. cutaneum* e *T. brassicae*. Espécies de *Trichosporon* apresentam baixa adaptação a ambiente marinho ocorrendo preferencialmente em ambiente de água doce poluído (34). Espécies desse gênero ocorrem também em substratos como madeira, solo, areia de praia e água salgada (18).

O uso de leveduras com pigmento carotenóide como indicador de poluição foi sugerido pela primeira vez por van Uden e Fell (42), embora, essas leveduras não pareçam ser representativas em outros estudos por não estarem correlacionadas com nenhum fator de poluição. *Rhodotorula* ocorreu com uma espécie no período chuvoso no local mais poluído, corroborando com outros autores (13,42) que afirmam que sedimentos de manguezais poluídos não são ambientes favoráveis para leveduras estritamente oxidativas. Espécies de *Rhodotorula* ocorreram em sedimento de manguezais menos poluído (31, 16).

*Kluyveromyces aestuarii* foi isolada do sedimento de estuário na Flórida, U. S. A. (13). Sua presença parece estar relacionada mais especificamente á sedimento e organismos que se alimentam de detritos em ecossistema de mangue. A ocorrência de *Kluyveromyces* pode estar associada á

invertebrados de manguezal (2). *Kluyveromyces aestuarii* e *K. waltii* foram encontradas nesta pesquisa em locais menos poluídos nos períodos de estiagem e chuvoso, respectivamente (Tabela 2).

*Debaryomyces hansenii* teleomorfo de *Candida famata* ocorreu no ponto 3 no período chuvoso ao longo do Rio Jaboatão. Esta espécie foi encontrada em estuário poluído e água do mar no Rio de Janeiro, sugerindo os autores que a mesma é um habitante da água do mar capaz de sobreviver em ambiente poluído (14). No ponto 3 no período chuvoso ao longo do Rio Jaboatão que recebe despejos de esgotos domésticos e industriais, ocorreu maior diversidade de leveduras (17 espécies) e maior número de UFC/mL 138. Pode-se considerar que sedimento de manguezal poluído apresenta potencial elevado de leveduras.

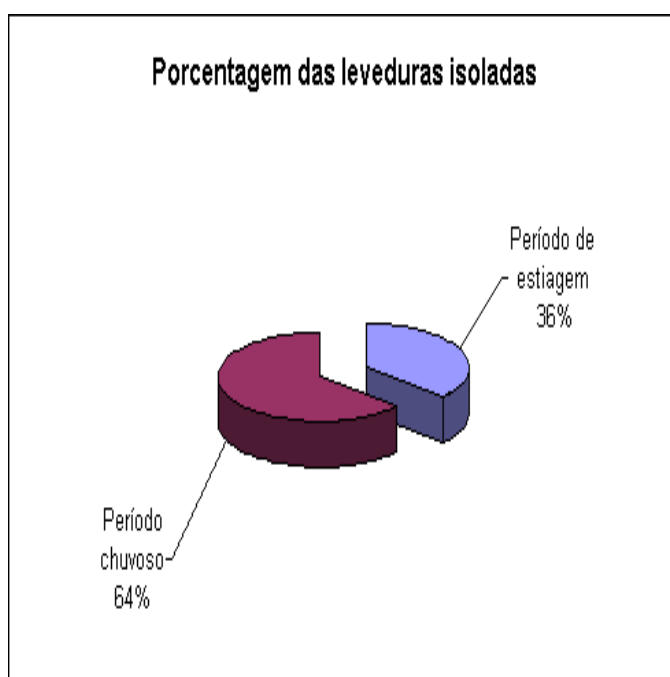
### Abundância das Espécies de Leveduras Isoladas

*Candida parapsilosis* ocorreu em 10,06 %, seguida por *C. krusei* com 9,14%, *C. haemulonii* com 7,92%, *C. melibiosica* com 7,92%, *C. glabrata* com 5,79 %, *C. boidinii* com 5,18 %, *C. castellii* com 4,87%, *C. rugopelliculosa* com 3,65 %, consideradas abundantes. *C. membranaefaciens* com 3,65 %. *C. diddensiae* com 2,74 %, *Kluyveromyces aestuarii* com 2,74 %, *C. sake* com 2,43 %, *C. geochares* com 2,43 %, *C. fennica* com 2,43%, *C. bombi* com 2,13%, *C. albicans* com 1,82%, *C. famata* com 1,52%, *C. kefyri* com 1,52%, *C. milleri* com 1,52%, *Debaryomyces hansenii* com 1,52%, *Kluyveromyces waltii* com 1,52% e *Trichosporon cutaneum* com 1,52% consideradas de abundância comum. *Candida catenulata* com 1,21%, *C. blankii* com 1,21%, *C. etchellsii* com 0,91%, *C. butyri* com 0,91%, *Trichosporon aquatile* com 0,91%, *T. brassicae* com 0,91%, *Candida dendronema* com 0,60% e *Rhodotorula minuta* com 0,60%, consideradas de frequência ocasional. Foram de ocorrência comum nos pontos de coletas ao longo dos Rios Jaboatão e Pirapama nos períodos de estiagem e chuvoso, *Candida boidinii*, *C. castellii*, *C. diddensiae*, *C. fennica*, *C. glabrata*, *C. haemulonii*, *C. insectamans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Hagler et al.; Hagler e Mendonça-Hagler, (18,14) referem que essas espécies são prevalentes em ambiente aquático poluído, sugerindo sua utilização como indicadoras de poluição em ambiente aquático.

## Índice de Diversidade

Os índices de diversidade de espécies entre os locais de coleta no período chuvoso foram:  $H1 = 1,11$  decs/ indivíduo para o ponto 3 e  $H2 = 0,87$  decs/ indivíduo para o ponto 4, e de acordo com o teste t houve diferença significativa ( $t_c = 6,70 > t_t = 1,654$ ); para os locais de coleta no período de estiagem os índices foram  $H1 = 0,68$  decs/ indivíduo para o ponto 1 e  $H2 = 0,70$  decs/ indivíduo para o ponto 2 revelando que não houve diferença significativa ( $t_c = 0,40 < t_t = 1,659$ ); entre os pontos de coleta 1 e 3 nos períodos de estiagem e chuvoso os índices foram  $H1 = 0,78$  decs/ indivíduo e  $H2 = 1,11$  decs/ indivíduo respectivamente, indicando que houve diferença significativa ( $t_c = 7,55 > t_t = 1,657$ ); para os pontos de coleta 2 e 4 nos períodos de estiagem e chuvoso os índices foram  $H1 = 0,80$  decs/ indivíduo e  $H2 = 0,82$  decs/ indivíduo respectivamente, indicando que não houve diferença significativa ( $t_c = 0,59 < t_t = 1,659$ ).

Esses resultados demonstraram que no ponto 3 no período chuvoso ao longo do Rio Jaboatão ocorreu maior número de isolamentos e maior diversidade de espécies, provavelmente devido a quantidade de matéria orgânica depositada no sedimento, facilitada pelas chuvas e fluxo das marés ( Figura 1).



**Figura 1.** Percentual de espécies de leveduras isoladas de sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brasil.

**Tabela 1** - Parâmetros hidrológicos, pH, temperatura (T) e salinidade (S) do sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brasil.

MANGUEZAIS	MARE´ (m)	Ponto (1)			Ponto (2)			Ponto (3)			Ponto (4)		
		ESTIAGEM			ESTIAGEM			CHUVOSO			CHUVOSO		
		pH	T (°C)	S (‰)	pH	T (°C)	S (‰)	pH	T (°C)	S (‰)	pH	T (°C)	S (‰)
09/03/04	0,1	6,44	27,4	25,0	7,72	28,40	32,0	-	-	-	-	-	-
05/04/04	0,1	6,50	28,4	30,0	7,80	26,50	30,0	-	-	-	-	-	-
30/06/04	0,0	-	-	-	-	-	-	7,50	23,2	3,0	7,41	23,44	9,0
29/07/04	0,1	-	-	-	-	-	-	6,70	23,8	7,0	7,82	23,00	7,0
25/07/05	0,1	-	-	-	-	-	-	7,94	23,90	10,0	7,85	24,30	7,0
03/10/05	0,2	7,02	29,0	25,0	7,83	25,90	29,0	-	-	-	-	-	-

**Tabela 2** - Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de leveduras isoladas do sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brasil.

GÊNERO/ESPÉCIES	ESTIAGEM Ponto 1 (JABOATÃO)	ESTIAGEM Ponto 2 (PIRAPAMA)	CHUVOSO Ponto 3 (JABOATÃO)	CHUVOSO Ponto 4 (PIRAPAMA)	TOTAL de UFC
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout	0	0	6	0	6
<i>C. bombi</i> Montrocher	0	0	7	0	7
<i>C. boidinii</i> Ramirez	0	5	12	0	17
<i>C. blankii</i> Buckley & van Uden	4	0	0	0	4
<i>C. butyri</i> Nakase	0	0	0	3	3
<i>C. castellii</i> Meyer & Yarrow	0	0	6	10	16
<i>C. catenulata</i> Diddens & Lodder	4	0	0	0	4
<i>C. dendronema</i> van der Walt	2	0	0	0	2
<i>C. diddensiae</i> (Phaff et al.) Fell & Meyer	0	0	7	2	9
<i>C. etchellsii</i> (Lodder & Kreger- van Rij)	0	0	3	0	3
<i>C. famata</i> (Harrison) Meyer & Yarrow	0	5	0	0	5
<i>C. fennica</i> Meyer & Ahearn	0	0	3	5	8
<i>C. geochares</i> Meyer & Yarrow	0	0	8	0	8
<i>C. glabrata</i> (Annderson) Meyer & Yarrow	14	5	0	0	19
<i>C. haemulonii</i> (van Uden & Kolipinski)	22	0	4	0	26
<i>C. insectamans</i> Scott et al.	6	8	0	0	14
<i>C. kefyi</i> (Beijerinck) van Uden & Buckley	0	0	0	5	5
<i>C. krusei</i> (Cast.) Berkhout	0	0	21	9	30
<i>C. melibiosica</i> Buckley & van Uden	0	15	0	11	26
<i>C. membranaefaciens</i> Lodder & kreger- van Rij	12	0	0	0	12
<i>C. milleri</i> Yarrow	0	5	0	0	5
<i>C. parapsilosis</i> Langeron & Talice	0	0	23	10	33
<i>C. rugopelliculosa</i> Nadase	0	0	12	0	12
<i>C. sake</i> Saito & Ota	0	0	0	8	8
<i>C. tropicalis</i> (Castellani) Berkhout	0	0	14	0	14
<i>Debaryomyces hansenii</i> Lodder & Kreger van Rij	0	0	5	0	5
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> van der Walt	0	9	0	0	9
<i>K. waltii</i> Kodama	0	0	0	5	5
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) Harrison	0	0	2	0	2
<i>Trichosporon aquatile</i> Hedrick & Dupont	0	0	3	0	3
<i>T. cutaneum</i> (De Beurm. Gongerot Et Vaucher)	3	0	2	0	5
<i>T. brassicae</i> Nakase	0	0	0	3	3
<b>TOTAL (UFC)</b>	67	52	138	71	328

## RESUMO

### **Leveduras Isoladas de Sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil.**

Os manguezais constituem ecossistemas de transição entre os ambientes terrestre e marinho caracterizados por propriedades físico químicas únicas, influenciando a biota local. Para obter espécies que poderão ser utilizadas em processos biotecnológicos foram isoladas e identificadas leveduras desse ecossistema. Amostras de sedimento foram coletadas nos meses de março e abril/2004 e outubro/2005 (período de estiagem), junho e julho/2004 e julho/2005 (período chuvoso). Utilizou-se 25g de cada amostra do sedimento suspensa em 225mL de água destilada esterilizada; desta suspensão 10mL foi adicionada a 990mL de água destilada esterilizada, da qual 1mL foi espalhado na superfície do meio Sabouraud acrescido de extrato de levedura e cloranfenicol, contido em placas de Petri em triplicata. As placas foram incubadas a 28°C. Foram isoladas 32 espécies de leveduras distribuídas nos gêneros; *Candida* (25), *Trichosporon* (3), *Kluyveromyces* (2), *Rhodotorula* (1), *Debaryomyces* (1).

**Palavras-chave:** manguezal, sedimento, leveduras.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aksornkoe, S. *Ecology and management of mangroves*. IUCN publication. 176 p, 1993.
2. Araújo, F.V.; Soares, C.A.G.; Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L.C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Ant. Leeuwenh.**, 68: 91-99, 1995.
3. Barnett, J.A.; Paine, R.W.; Yarrow, D. *YEASTS: characteristics and Identification*. 3 ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2000, 1139p.
4. Bennett, J.W.; Heller, F.; Case, C.L. Bio-tech-nol-o-gy, in.: the many definitions of biotechnology. **Soc. Indust. Microbiol.** 47: 240-243, 1997.
5. Branco, E.S. *Aspectos ecológicos da comunidade fitoplanctônica no sistema Estuarino de Barra das Jangadas (Jaboatão dos Guararapes-Pernambuco-Brasil)*. Recife, 2001,147p. Dissertação Mestrado. Departamento de Oceanografia. UFPE.
6. Brasil-Diretoria de Hidrografia e Navegação. *Tábuas de marés para 1999*. Niterói, 1999, 194p.
7. Butinar, L.; Santos, S.; Spencer-Martins, I.; Oren, A.; Gunde-Cimerman, N. Yeasts diversity in hypersaline habitats. *FEMS. Microbiology Letters*, 244: 229-234, 2005.
8. Carneiro, O.; Coelho, P.A. Estudo ecológico da Barra das Jangadas. Nota Prévia. *Trabalhos do Instituto de Biologia Marinha e Oceanografia*, 2(1): 237-248, 1960.
9. Clark, F.E. Agar-plate method for total microbial count. In: Black, C.A.; Evans, D.D.; White, J.L.; Ensminger, L.E.; Clarck, F.E.; Dinauer, R.C. (eds), *methods of soil analysis, Part 2 – chemical and microbiological properties*. New York, Madson Inc., 1965, p.1460-1466.
10. Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração dos Recursos Hídricos (CPRH). *Relatório da Bacia Hidrográfica dos rios Pirapama e Jaboaão*. Recife, 1999, 21p.

11. Couto, L.M.; M.R. *Ciclo reprodutivo e influência da salinidade sobre a gametogênese de **Iphigenia brasiliana** (Lamarck, 1818) (Mollusca: Bivalvia: Donacidae), no estuário da Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco*. Recife, 1988,198p. Dissertação Mestrado, Departamento de Oceanografia, UFPE.
12. Fell, J.W.; Ahearn, D.G.; Meyers, S.P.; Roth, F.J.; JR. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida and adjacent benthic areas. **Limnol. Oceanogr.** 5: 366-371, 1960.
13. Fell, J.W.; van Uden, N. Yeasts in marine environments in: Oppenheimer, C. H. – **Symposium on Marine Microbiology**. Springfield, Charles C. Thomas, p. 329-340, 1963.
14. Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, 41 (1):173-178, 1981.
15. Hagler, A.N.; Oliveira, R.B.; Mendonça-Hagler, L.C. Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brazil. **Ant. Leeuwenh.**, 48: 53-56, 1982.
16. Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C.; Santos, E.A., Farage, S.; Silva Filho, J.B.; Schrank, A. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. **Sci. Total Environ.**, 58: 151-160, 1986.
17. Hagler, A.N.; Ahearn, D.G. The ecology of aquatic yeasts. **In The yeasts**. Vol.1. Biology of yeasts. Rose, A.H.; Harrison, J. S. (eds.) Academic Press, New York, 1987, p.181-205.
18. Hagler, A.N.; Rosa, C.A.; Morais, P.B.; Mendonça-Hagler, L.C.; Franco, G.M.O.; Araújo, F.V.; Soares, C. A.G. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Can. J. Microbiol.** , 39: 973-977, 1993.
19. Hurley, R.; Louvois, J.D.E.; Mulhall, A. Yeasts as human and animal pathogens. *In*: Rose A. H. & Harrison J. S. (eds). *The Yeasts* Second Edition. Academic Press, London, 1987, p 207-281.

20. Hyde, K. D. *Fungi in marine environments*. Fungal Diversity Press, Hong Kong, 2002.
21. Krebs, C. J. *Ecological methodology*. 2ª ed. Addison Wesley Longman. Inc., New York, 1999.
22. Kreger van Rij, N.J.W. *The yeast: a taxonomic study*. 3 ed. Elsevier Sci. Publi, Amsterdam, 1984, 1091p.
23. Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam, 1998, p. 1055.
24. Kurtzman C.P.; Robnett, C.J. Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* 3: 417-432, 2003.
25. Lacaz, C.S.; Porto, C.; Martins, J.E.C. Hlins –Vaccari, E.M.; Melo, N.K. *Tratado de Micologia Médica*. 9ªed. Sarvier, São Paulo, 2002, 1104p.
26. Lachance, M.A.; Starmer, W.T. Evolutionary significance of physiological relationships among yeast communities associated with trees. *Can. J. Bot.* 60: 285-293, 1982.
27. Lachance, M.A.; Starmer, W.T. Ecology and yeasts. *In*: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (eds.). *The Yeasts – A Taxonomy Study*. 4 ed. Elsevier Science, Amsterdam, 1998, p. 21-30.
28. Lages, F.; Silva-Graça, M.; Lucas, A. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiol*, 145: 2577- 2585, 1999.
29. Lazarus, C.R.; Koburger, J.A. Identification of yeasts from the Suwannee River Florida estuary. *Appl. Microbiol.*, 27: 1108-1111, 1974.
30. Lodder, J. *The Yeast: a taxonomic study*. North Holland Publishing Company, Oxford: 1970, 1385p.

31. Meyers, S.P.; Ahearn, D.G. Implication of yeasts and yeast like fungus in marine processes. Veroeff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven Suppl., 5:321-338, 1974.
32. Meyers, S.P.; Ahearn, D.G.; Alexander, S.; Cook, W. *Pichia spartinae*, a dominant yeast of the Spartina salt marsh. Development. Ind. Microbiol., 16: 262-267, 1975.
33. Nagahama, T.; Hamamoto, M.; Nakase, T.; Takami, H.; Horikoshi, K. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. **Ant. Leeuwenh.** 80:101-110, 2001.
34. Paula, C.R.; Purchio, A.; Gambale, W. Yeasts from beaches in the Southem Area of São Paulo state. "Baixada Santista", Brasil. **Rev. Microbiol.**, 14 (2): 136-143,1983.
35. Parcell, S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. **Altem Med Rev.**, 7: 22-44, 2002.
36. Pinto, I.M. de A.; Cavalcanti, M.A.Q.; Passavante, J. Z., de O. Fungos filamentosos do solo e da água da praia de Boa Viagem, Recife-PE. **Boletim Micológico**, 7 (1-2): 39-45, 1992.
37. Praphailong, W.; Fleet, G.H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. **Food Microbiol.**, 14: 459-468, 1997.
38. Ratledge, C. The industrial potential of microbial lipids. **J. Gen. Microbiol.**, 68: 23-24, 1982.
39. Robbs, P.G.; Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L. C. Yeasts associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil. **Yeast.**, 5: 485-489, 1989.
40. Schnitler, M.; Stephenson, S.L. Myxomycetes biodiversity in four different forest types in Costa Rica. **Bol.Soc. Brot.**, 67: 5-22. 2000.
41. Soares, C.A.G.; Maury, M.; Pagnocca, F.C.; Araújo, F.V.; Mendonça-Hagler, L.C. Ascomycetous yeast from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 43: 265-272, 1997.

42. van Uden, N.; Fell, J.W. Marine yeasts. **Adv. Microbiol. Sea**, 1: 167-201, 1968.
43. Volz, P.A.; Jerger, D.E.; Worzburger, A.J.L. A preliminary survey of yeasts isolated from marine habitats at Abaco Island, the Bahamas. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, 54: 313-316, 1974.

# *Capítulo 2*

**Seleção de leveduras isoladas de sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil para produção de aminoácidos**

Artigo a ser submetido para publicação na Electronic Journal of Biotechnology.

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE SEDIMENTO DO MANGUEZAL  
BARRA DAS JANGADAS, JABOATÃO DOS GUARARAPES,  
PERNAMBUCO, BRASIL PARA PRODUÇÃO DE AMINOÁCIDOS**

**SILVIA TEREZA AZEDO LOUREIRO 1; MARIA AUXILIADORA DE QUEIROZ  
CAVALCANTI 1; ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO 2,3**

1Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil; 2 Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, LIKA- UFPE; 3 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, UFRPE, PE.

**ABSTRACT**

Sixty four samples of yeasts isolated of mangrove's sediments were tested on the production of the amino acids Lysine and Methionine, important protein compounds keepers of the integrity of the living being's cell system and used on the animal's diet. The yeasts culture were kept in Sabouraud yeasts extract for forty eight hours and inoculated in Erlenmeyer's bottles of 250ml with 20ml of medium with 5g of glucose, 0,3g of  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,5g of extract of yeasts, 0,1g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 of  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 15g of red of fenol/L by agitation of 200rpm by 28°C. The pH was adjusted to 6,0. For the tests with positives urease yeasts was added 0,5g of urea. For the tests with negative urease yeasts the medium was supplemented with 0,5g of corn steep liquor. After 30 and 24 hours respectively was observed as a positive result the color's change of the medium as a quality production of amino acids. For the confirmation of the production's activity of amino acid, the samples of yeasts were subjected to chromatography in a thin layer (TLC). The species that showed positive results were *Trichosporon cutaneum*, *T. aquatile*, *T. brassicae* and *Rhodotorla minuta*.

**Key- words:** yeasts, mangrove, amino acid, lysine, methionin

## 1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas de transição entre ambiente terrestre e marinho, caracterizados por propriedades físico-químicas únicas, as quais influenciam a biota local (Aksornkoe, 1993). As leveduras são microrganismos conhecidos pela sua diversidade morfológica e bioquímica, são predominantemente unicelulares, sapróbias em sua maioria, algumas espécies parasitas oportunistas, ocorrendo tanto em ambiente terrestre, quanto aquático (Lachance e Starmer, 1998). Ocorrem em ambientes úmidos que apresentam elevado aporte de nutrientes como carboidratos e aminoácidos (Lachance e Starmer, 1998), sendo utilizadas em vários processos biotecnológicos como na indústria de panificação, produção de enzimas, proteínas, aminoácidos e fármacos. O papel dos microrganismos no meio ambiente é fundamental no estabelecimento de política ambiental, contribuindo com a produção de produtos microbianos, sendo mais explorados na biotecnologia (Ratledge, 1982). Esses microrganismos têm sido empregados pelas suas atividades metabólicas, como produtores de enzimas e na síntese de metabólitos úteis, constituindo uma importante parcela para a biotecnologia moderna (Bennet et al., 1997). Tão importante quanto a utilização de plantas e animais pela indústria de alimentos é o emprego de microrganismos considerados totalmente seguros para o homem e para os animais, assim como os insumos por eles produzidos, que são amplamente empregados em diversos processos industriais. Dentre os compostos produzidos por microrganismos e utilizados na transformação ou produção de alimentos podemos citar os aminoácidos essenciais. Os aminoácidos podem ser produzidos através de quatro métodos: extração de proteínas hidrolisadas, síntese química, síntese enzimática ou fermentação (Ikeda, 2003). Os aminoácidos usados em diversos produtos são fabricados principalmente pelo processo de fermentação, utilizando materiais de origem naturais. O método de fermentação para a produção de aminoácidos é um processo pelo qual os microrganismos convertem os nutrientes em vários componentes vitais necessários (Ikeda, 2003). Com o método de fermentação, matérias primas como a glicose e fontes de nitrogênio são adicionadas ao meio de cultura, permitindo que os microrganismos produzam aminoácidos. O método de fermentação tem a vantagem de produção em massa a baixo custo, que impulsionou a expansão do mercado de aminoácidos (Ikeda, 2003).

Existe um interesse em caracterizar a composição dos aminoácidos através do processo de fermentação, porque a presença ou ausência de aminoácidos específicos pode ter um impacto significativo no produto desejado. Os aminoácidos essenciais arginina, histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina, todos que o organismo humano não tem capacidade de sintetizar como outros aminoácidos e carboidratos, devem ser obtidos através de meios e suplementos. Além disso, quando outras fontes de carbono são indisponíveis os aminoácidos são

utilizados para produção de energia através do ciclo da uréia e da glicose. Deficiências em nutrientes ou acumulação de produtos como uréia e amônia, em cultura de célula podem reduzir o produto desejado ou alterar a qualidade do produto final (Larson et al., 2002). Os aminoácidos essenciais lisina e metionina são importantes mantenedores da integridade celular dos seres vivos e largamente utilizados na da dieta de humanos e animais (Newman e Sands, 1984; Odunfa et al., 2001). Este trabalho teve como objetivo selecionar leveduras isoladas de sedimento de manguezal para produção de aminoácidos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Microrganismos**

Foram testadas 32 espécies de leveduras (2 isolados de cada espécie), obtidas de sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, distribuídas nos seguintes gêneros: *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Leveduras isoladas de sedimento de manguezal e testadas para produção qualitativa de aminoácidos.

GÊNEROS/ESPÉCIES	Número de amostras testadas
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout	2
<i>C. bombi</i> Montrocher	2
<i>C. boidinii</i> Ramirez	2
<i>C. blankii</i> Buckley & van Uden	2
<i>C. butyri</i> Nakase	2
<i>C. castellii</i> Meyer & Yarrow	2
<i>C. catenulata</i> Diddens & Lodder	2
<i>C. dendronema</i> van der Walt	2
<i>C. diddensiae</i> (Phaff et al.) Fell & Meyer	2
<i>C. etchellsii</i> (Lodder & Kreger- van Rij)	2
<i>C. famata</i> (Harrison) Meyer & Yarrow	2
<i>C. fennica</i> Meyer & Ahearn	2
<i>C. geochares</i> Meyer & Yarrow	2
<i>C. glabrata</i> (Anderson) Meyer & Yarrow	2
<i>C. haemulonii</i> (van Uden & Kolipinski)	2
<i>C. insectamans</i> Scott et al.	2
<i>C. kefyri</i> (Beijerinck) van Uden & Buckley	2
<i>C. krusei</i> (Cast.) Berkhout	2
<i>C. melibiosica</i> Buckley & van Uden	2
<i>C. membranaefaciens</i> Lodder & kreger- van Rij	2
<i>C. milleri</i> Yarrow	2
<i>C. parapsilosis</i> Langeron & Talice	2
<i>C. rugopelliculosa</i> Nadase	2
<i>C. sake</i> Saito & Ota	2
<i>C. tropicalis</i> (Castellani) Berkhout	2
<i>Debaryomyces hansenii</i> Lodder & Kreger van Rij	2
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> van der Walt	2
<i>K. waltii</i> Kodama	2
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) Harrison	2
<i>Trichosporon aquatile</i> Hedrick & Dupont	2
<i>T. cutaneum</i> (De Beurm. Gongerot Et Vaucher)	2
<i>T. brassicae</i> Nakase	2
<b>Total</b>	<b>64</b>

## 2.2. Seleção de leveduras para produção de aminoácidos

As culturas de leveduras foram mantidas em meio Sabouraud extrato de levedura por 48h e inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250mL com 20mL de meio de cultura contendo 5g de glicose, 0,3g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,5g de extrato de levedura, 0,1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 15mg/L de vermelho de fenol sob agitação de 200rpm por 30h a temperatura de 28°C. A atividade de urease foi testada em meio contendo 1,0g de glicose, 0,5g de uréia, 0,2g de peptona, 0,5g de extrato de levedura, 0,1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  com pH 6,0. Para os testes com as amostras de leveduras urease positivas o meio foi suplementado com 0,5g de uréia, e para as leveduras urease negativas o meio foi suplementado com 0,5g de corn steep liquor um suplemento de aminoácidos. O pH dos meios foi ajustado para 6,0. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Após o período de incubação, as culturas foram inoculadas em meio de fermentação (Kinoshita et al., 1957).

## 2.3. Teste qualitativo para produção de aminoácidos

Para a produção dos aminoácidos lisina e metionina foi utilizado o meio contendo 10g de glicose, 0,3g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,5g de extrato de levedura, 0,1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 15mg/L de vermelho de fenol. As culturas de leveduras foram mantidas em meio contendo 2g de glicose, 0,5g de peptona, 0,1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , o pH foi ajustado para 6,0, sob agitação de 200rpm á temperatura de 28°C ~30°C. Utilizou-se frascos de Erlenmeyer de 250mL com 20mL do meio onde foram inoculados com 10mL dos extratos das culturas. O resultado positivo é observado pela mudança da cor do meio (Kinoshita et al., 1957).

## 2.4. Determinação dos aminoácidos

Para a determinação dos aminoácidos presentes nas culturas foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD). Foram colocados em placas de sílica 4 $\mu\text{L}$  dos filtrados das culturas de leveduras e 2 $\mu\text{L}$  das soluções padrão de aminoácidos. As soluções padrão de aminoácidos continham 0,015 g/mL de lisina e metionina diluídas em água e completado o volume final para 5mL com água deionizada. Para a eluição das placas foi utilizado um sistema de solvente com uma mistura de 4mL

de n-butanol, 1mL de ácido acético e 5mL de água (4: 1:5). Após 24h a temperatura ambiente as placas foram reveladas com uma solução de 0,15mg/100mL de nindrina butanol (Kinoshita et al., 1957).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 32 espécies de leveduras testadas a maioria foi de espécies urease negativa; *Trichosporon aquatile*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon brassicae* e *Rhodotorula minuta* foram as espécies que apresentaram resultado positivo para produção de aminoácidos.

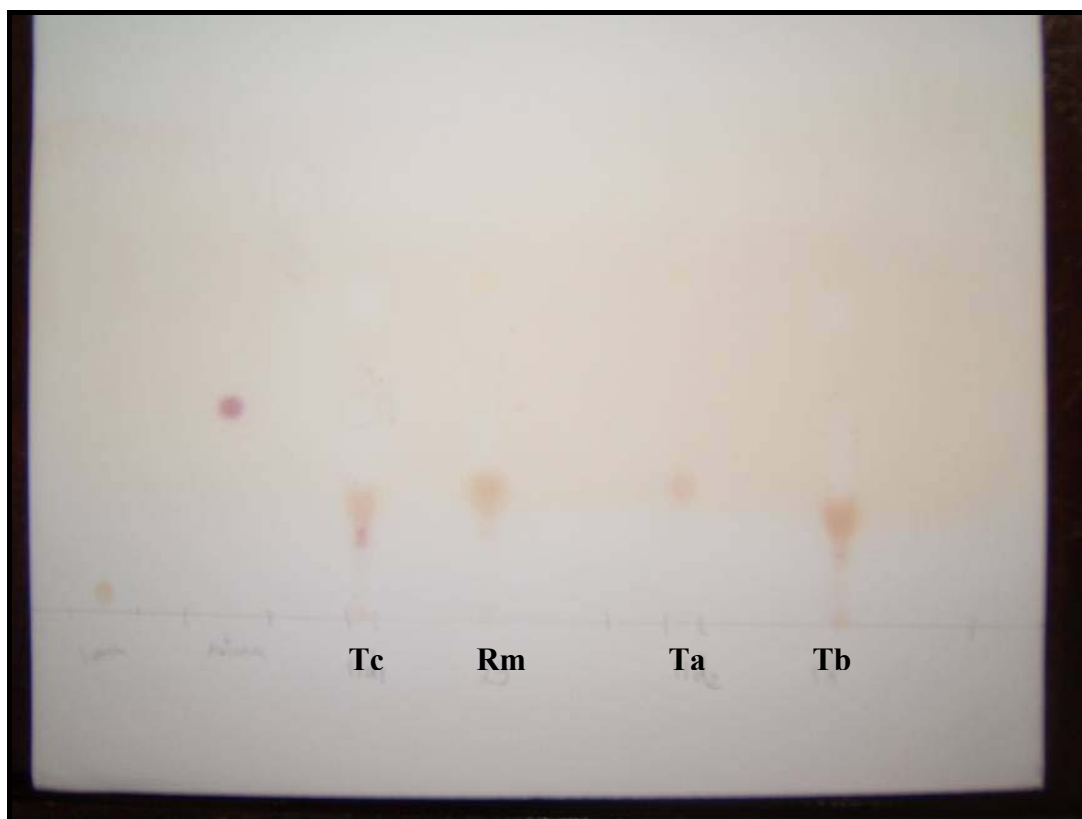
Kinoshita et al. (1957) testaram 370 amostras de leveduras urease negativa, cerca de 40 amostras produziram aminoácidos. Nesta pesquisa das 64 amostras testadas 56 não apresentaram positividade para o teste de urease, bem como não mostraram banda em cromatografia de camada delgada (CCD) para produção de lisina e metionina. As amostras de leveduras urease positivas apresentaram manchas em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Figura 1) e (Tabela 2).

Kinoshita et al. (1957) relataram que o emprego de microrganismos para produção de aminoácidos utilizando fontes de carboidratos e sais de amônia são largamente utilizados por vários gêneros de microrganismos e a habilidade para acumular aminoácidos é um caráter fisiológico dos microrganismos, entretanto, a acumulação de certos aminoácidos em grande quantidade pelos microrganismos é rara. Os aminoácidos produzidos por espécies de leveduras como, *Torulopsis utilis*, podem ser obtidos através de produtos de autólise (Asai et al., 1957). A importância das condições de cultura e a especificidade dos microrganismos para a produção de aminoácidos é fundamental (Kinoshita et al., 2004). Kinoshita et al. (1957) referem que as leveduras anamórficas são melhores produtoras de aminoácidos do que as ascospóreas.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces salmonicolor* e *Torulopsis utilis* produziram ácido glutâmico por fermentação (Kinossshita et al. 2004). Nesta pesquisa as leveduras ascomicéticas não apresentaram resultado positivo quanto atividade qualitativa de produção de lisina e metionina. *Rhodotorula minuta* apresentou resultado positivo quanto a atividade qualitativa de produção de aminoácidos estando de acordo com os achados de Kinoshita et al. (2004) que obtiveram resultados significativos com amostras de *Rhodotorula*. Uma característica importante para produção de aminoácidos por fermentação é a influência dos nutrientes orgânicos e fontes de amônia adicionados ao meio de cultura (Kinoshita et al., 2004). Robinett e Herber, (1994) referem que a composição do meio de cultura tem grande efeito na produção de ácido glutâmico e outros

aminoácidos. A adição de nutrientes orgânicos para melhor crescimento dos microrganismos é geralmente efetiva para processo de produção de aminoácidos.

Os resultados desta pesquisa mostraram que as espécies de leveduras que não apresentaram crescimento no meio líquido para testar a atividade de produção de aminoácidos podem não ter respondido ao aporte de nutrientes do meio utilizado, embora a suplementação estivesse de acordo com as referidas na literatura.



**Figura 1.** Cromatograma de *Trichosporon cutaneum* (Tc), *Rhodotorula minuta* (Rm), *T. aquatile* (Ta) e *T. brassicae* (Tb).

**Tabela 2.** Fatores de retenção (Rfs) dos filtrados das amostras de *Trichosporon cutaneum* (11d<sub>1</sub>), *T. aquatile* (11d<sub>2</sub>), *T. brassicae* (18) e *Rhodotorula minuta* (29).

Aminoácidos	11d <sub>1</sub>	11d <sub>2</sub>	18	29
Lisina	0,13	-	-	-
Metionina	0,53	0,6	0,53	0,6

**Rf** = Fator de retenção obtido pelo cálculo das distâncias das manchas sobre as distâncias do solvente.

## RESUMO

### **Seleção de Leveduras Isoladas de Sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil para Produção de Aminoácidos**

64 isolados de leveduras foram testados para produção dos aminoácidos lisina e metionina, importantes compostos protéicos mantenedores da integridade do sistema celular dos seres vivos e utilizados na dieta de animais. As culturas de leveduras foram mantidas em meio Sabouraud com extrato de levedura por 48h e inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250mL com 20mL de meio de cultura, contendo 10g de glicose, 0,3g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,5g de extrato de levedura, 0,1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 15mg/L de vermelho de fenol sob agitação de 200rpm a 28°C. O pH foi ajustado para 6,0. Para os testes com as leveduras urease positiva foi acrescentado ao meio 0,5g de uréia. Para os testes com as leveduras urease negativa o meio foi suplementado com 0,5g de corn steep liquor. Após o período de 30h foi observado como resultado positivo a mudança da cor do meio como indicativo da produção qualitativa de aminoácidos. Para confirmação da atividade de produção dos aminoácidos as amostras de leveduras foram submetidas a cromatografia em camada delgada (CCD). As espécies que apresentaram resultado positivo foram *Trichosporon cutaneum*, *T. aquatile*, *T. brassicae* e *Rhodotorula minuta*.

**Palavras-chave:** Leveduras, manguezal, aminoácidos, lisina, metionina.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksornkoae, S. *Ecology and manegament of mangroves*. IUCN publication. 1993, 176 p.

Asai, T. K.; Aida, K.; Oishi. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, 134, 1957.

Bennett, J.W., Heller, F., Case, C.L. Bio-tech-nol-o-gy, In.:The many definitions of biotechnology. **Soc. Indust. Microbiol. News.** 47: 240-243, 1997.

Ikeda, M. Amino acid production processes. Biotechnological manufacture of lysine. In . Scheper, T.(ed.), **Advances in Biochemical Engineering** , vol. 79. Springer, Berlin. 2003, pp. 1-36.

Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. Studies on the amino acid fermentation. Part. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 3, 193-205, 1957.

Kinoshita, S.; Udaka, S.; Shimono, M. Studies on the amino acid fermentation. Part. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50 (6): 331-43, 2004.

Kumagai, H. Microbial production of amino acids in Japan. In: Scheper, T (ed) **Advances in Biochemical Engineering**, vol. 69. Springer, Berlin, Germany, 2000, pp.71-85.

Lachance, M. A.; Starmer, W. T. Ecology and yeasts. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W., ( ed). *The Yeasts – A Taxonomy Study*. 4 (ed). Amsterdan: Elsevier Science. 1998, p. 21-30.

Larson, T. M., Gawlitzek, M., Evans, H., Albers, U., Cacia, J. Chemometric Evaluation of On- Line High- Pressure Liquid Chromatography in Mammalian Cell Cultures: Analysis of Amino Acid and Glucose. **Biotech. Bioeng.** 2002, 77, 553-563.

Newman, R.K., Sands, D.C. Nutritional value of com fermented with lysine excreting lactobacilli. *Nutrition reports. Int.* 30, 1287-1293, 1984.

Odunfa, S.A, Adeniran, S.A, Teniola, O. D, Nordstorm, J. Evaluation of lysine and methionine production in some lactobacilli and yeasts from Ogi. *Int J Food Microbiol* ; 63: 159-163, 2001.

Pham, C.B, Galvez, C.F, Padolina, W.G. Methionine fermentation by bath fermentation from various carbohydrates. *ASEAN Food J*; 7: 34-37, 1992.

Ratledge, C. *The industrial potential of microbial lipids*. *Journal of General Microbiology*., 68: 23-24, 1982.

Robinett, R. S. R., Herber, W. K. Analysis of Substrates and Metabolites in Fermentation Broth by Ion Chromatography. *J. Chromatogr.* 1994, 671, 315-322.

# *Capítulo 3*

**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE para quantificação dos aminoácidos lisina e metionina em culturas de leveduras**

Artigo a ser submetido para publicação na Bioresource Technology.

## **CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS LISINA E METIONINA EM CULTURAS DE LEVEDURAS**

**SILVIA TEREZA AZÊDO LOUREIRO<sup>1</sup>; MARIA AUXILIADORA DE QUEIROZ CAVALCANTI<sup>1</sup>; ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO<sup>2,3</sup>; RICARDO KENJI SHIOSAKI<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil; <sup>2</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, LIKA- UFPE; <sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, UFRPE, PE; <sup>4</sup> Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, NPCIAMB, UNICAP

### **ABSTRACT**

Eight samples of yeasts urease positive to submit at chromatography (HPLC) for production's capacity of lysine and methionine, amino acids. Some techniques were tested, as the composition of the mobile phase and the flow's speed. Was determined, still, the limit of the qualification and repeatability of the technique. Was used as chromatographic conditions one mobile phase constituted by 10mmoles/L of trietilamina (TEA), (70:30, v/v). The injection of the sample (10uL) was handily effected, and the detection happened by 270nm. The chromatographic separation was realized in a constant flow of 1mL/min, in the temperature of 25°C. The results indicated the vantages, of the methodology in terms of time, economy and simplicity, when compared to others techniques for determination of amino acids that dispense the derivation pre-colun and permit to work in a isocratic way

**Key -words:** amino acid, lysine, methionine, chromatography (HPLC).

## 1. INTRODUÇÃO

A técnica de determinação de aminoácidos foi iniciada por Moore et al. (1958), empregando uma resina sulfonada de troca iônica, sendo que, a detecção dos aminoácidos era realizada por colorimetria, após a reação pós-coluna com ninhidrina. Posteriormente, introduziu-se a cromatografia líquida de alta eficiência CLAE, utilizando um equipamento mais econômico e versátil (Kan e Shipe, 1981). Assim, várias técnicas de cromatografia líquida de fase reversa, empregando gradiente de eluição, diferentes tipos de coluna e detectores, seguida de derivação das amostras com reagentes variados, estão sendo utilizadas para determinação de aminoácidos (Carisano, 1985; Alaiz et al., 1992). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se caracteriza por apresentar na fase móvel um solvente capaz de dissolver a amostra sem qualquer interação química entre eles. É um método utilizado para separação de espécies iônicas ou macromoléculas e compostos termolábeis (Ciola, 1998).

A determinação de aminoácidos vem sendo usada há muito tempo na pesquisa bioquímica e, mais recentemente na área da ciência de alimentos, com o intuito de melhor se conhecer a composição das proteínas. Sabendo-se que os aminoácidos são unidades estruturais básicas das proteínas, a quantificação e qualificação dos mesmos tornam-se necessárias (Kipp et al. 1996). O emprego de microrganismos através do processo de fermentação tem crescido nos últimos anos, e levado ao aprimoramento de técnicas que viabilizem o emprego de microrganismos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é utilizada para separação e quantificação de substâncias como peptídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos essenciais e outros compostos polares (Kipp, et al. 1996). A (CLAE) tem sido um método viável na separação e quantificação de aminoácidos, fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis; a fase móvel, líquida, e a fase estacionária contida em uma coluna. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada (Ciola, 1998). A escolha de uma técnica adequada para a determinação e quantificação de aminoácidos vai proporcionar um melhor resultado, a depender das amostras a serem analisadas (Larson et al. 2002).

A caracterização química, biológica e estrutural de substâncias protéicas muito polares como aminoácidos requer a utilização de métodos adequados de extração e purificação que permitam a obtenção de produtos com elevado grau de pureza (Collins et al. 1990). Esta pesquisa teve como

objetivo utilizar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar os aminoácidos lisina e metionina presentes em 4 espécies de leveduras isoladas de sedimento de manguezal.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Microrganismos**

Foram testados 8 isolados de leveduras urease positivas, *Trichosporon cutaneum*, *T.aquatile*, *T. brassicae* e *Rhodotorula minuta*, obtidos de sedimento do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco.

### **2.2. Equipamento**

O sistema CLAE consiste de uma bomba isocrática, módulo solvente (VARIAN – PRO STAR 210), um detector UV-VIS (VARIAN – PRO STAR, Modelo 320) acoplado a um computador com software (Workstation-VARIAN). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se a coluna C18 (MICROSORB TM–100 A°).

### **2.3. Reagentes**

O kit de L-aminoácidos foi adquirido da Vetec. A acetonitrila, grau CLAE, foi adquirida da Merck. A água para uso no cromatógrafo foi purificada, e as soluções foram filtradas, empregando-se uma membrana de 0,45µm em um sistema de filtração (Millipore, Bedford, EUA). Todos os solventes usados no cromatógrafo foram desgaseificados no banho de ultra-som, antes do uso.

## **2.4. Preparo dos Padrões de Aminoácidos**

As soluções padrão contendo os dois aminoácidos Lisina e Metionina foram preparadas pesando-se quantidades variáveis de cada aminoácido, de maneira a obter uma concentração final entre 1mmol/mL e 55 $\mu$ mol/mL de fase móvel. A fase móvel foi constituída de 4,15mL de TEA (Trietilamina), completado o volume para 300mL mais 700mL de Acetonitrila (Alpert, 1990).

## **2.5. Condições Cromatográficas**

Utilizou-se um sistema de CLAE, em modo isocrático, para determinação de aminoácidos essenciais. A fase móvel empregada consistiu de acetonitrila/ trietilamina (TEA, 10mmol/L), (70: 30 v/v). A injeção da amostra (10 $\mu$ L) foi efetuada manualmente, e a detecção ocorreu a 270nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1mL/min, á uma temperatura de 25°C (Alpert,1990).

## **2.6. Preparo das Amostras**

Os aminoácidos Lisina e Metionina obtidos de isolados de leveduras, foram dissolvidos em 1000 $\mu$ L de fase móvel, filtrados em membrana Millipore de 0,45 $\mu$ m e injetados no sistema cromatográfico, segundo (Alaiz et al. 1992).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das condições cromatográficas descritas o processo ocorreu em modo isocrático, utilizando uma fase móvel constituída de 10mmoles/L de Trietilamina (TEA), (70:30, v/v) e 80% de Acetonitrila. As condições cromatográficas utilizadas revelaram as vantagens da metodologia empregada em termos de tempo, economia e simplicidade do método.

O tempo de retenção ocorreu em 18 min, podendo haver uma relação com a fase móvel composta de Trietilamina-TEA e Acetonitrila. Estes testes levaram á definição de uma fase móvel que permitiu a identificação dos aminoácidos em um tempo total de eluição de 30 min, com 16min o tempo que a lisina foi detectada e a metionina detectada nos 4 primeiros minutos (Figuras 1, 2, 3 e 4).

As quantidades utilizadas e as áreas dos picos obtidas revelaram para os aminoácidos estudados, uma boa linearidade na faixa de 50nmol a 500nmoles. Por outro lado, ao empregar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Feste (1992) conseguiu idêntica linearidade trabalhando com quantidades menores de aminoácidos, 200pmol - 400pmol.

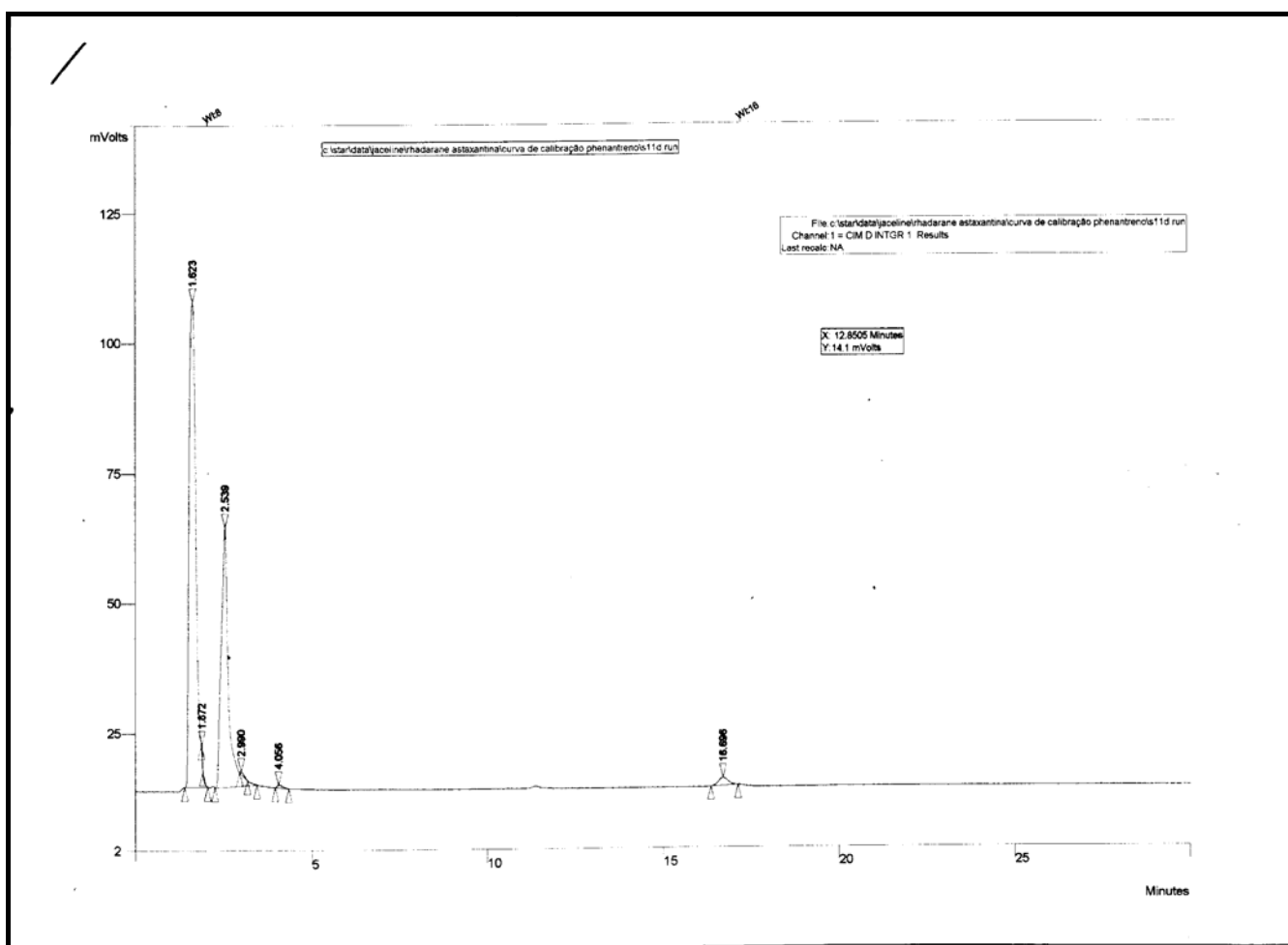
De acordo com Szepesi (1990) a adição de um reagente de pareamento iônico, (um contra-íon) de carga oposta a da amostra a ser analisada, formará complexos mais polares que o composto original, proporcionando melhor tempo de corrida. O sistema de solvente utilizado Trietilamina-TEA e Acetonitrila mostrou-se eficiente no que se refere á resolução dos componentes polares. A interação do reagente com os compostos permitiu uma separação relativamente rápida dos compostos, em uma única corrida cromatográfica, sem derivatização da amostra.

Todos os isolados testados produziram metionina, no entanto *Trichosporon cutaneum* (2 isolados) também foi capaz de produzir lisina, empregando-se as mesmas condições de análise (Tabela 1).

Após o ajuste de algumas condições analíticas, o emprego da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), através da coluna C18, revelou-se eficiente para identificação e quantificação dos aminoácidos lisina e metionina de isolados de leveduras. Esta técnica apresentou boa linearidade e precisão. Concluímos que, a metodologia utilizada mostrou-se eficiente para a análise dos aminoácidos estudados.

**Tabela 1.** Concentrações (mg/mL) de lisina e metionina, nos filtrados das amostras 11d<sub>1</sub> *Trichosporon cutaneum*, 11d<sub>2</sub> *T. aquatile*, 18 *T. brassicae* e 29 *Rhodotorula minuta*.

Aminoácidos	11d <sub>1</sub>	11d <sub>2</sub>	18	29
Lisina	0,211	-	-	-
Metionina	0,004	0,042	0,071	0,222



**Figura 1.** Cromatograma do filtrado da amostra de *Trichosporon cutaneum* (11d1).

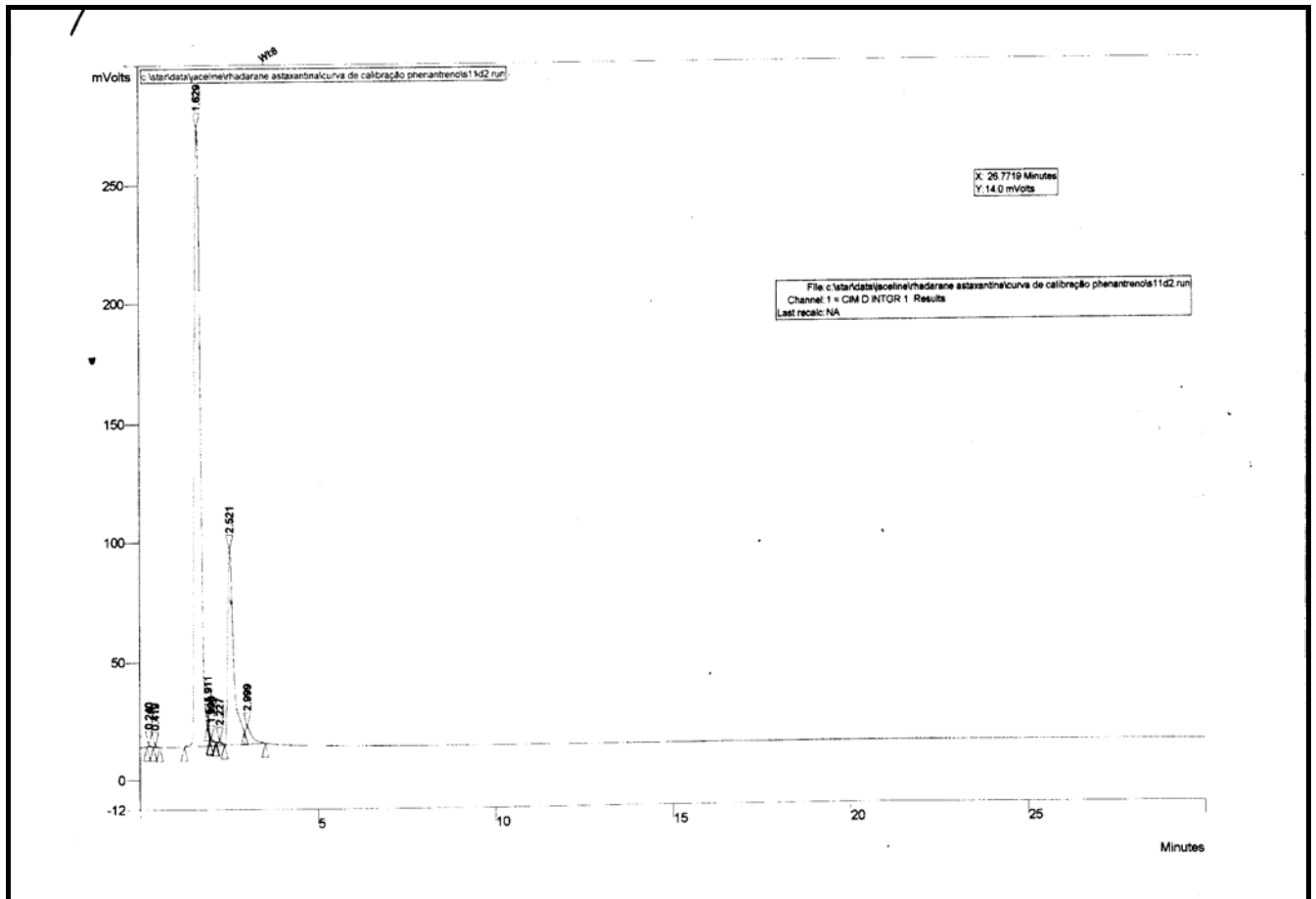


Figura 2. Cromatograma do filtrado da amostra de *Trichosporon aquatile* (11d2).

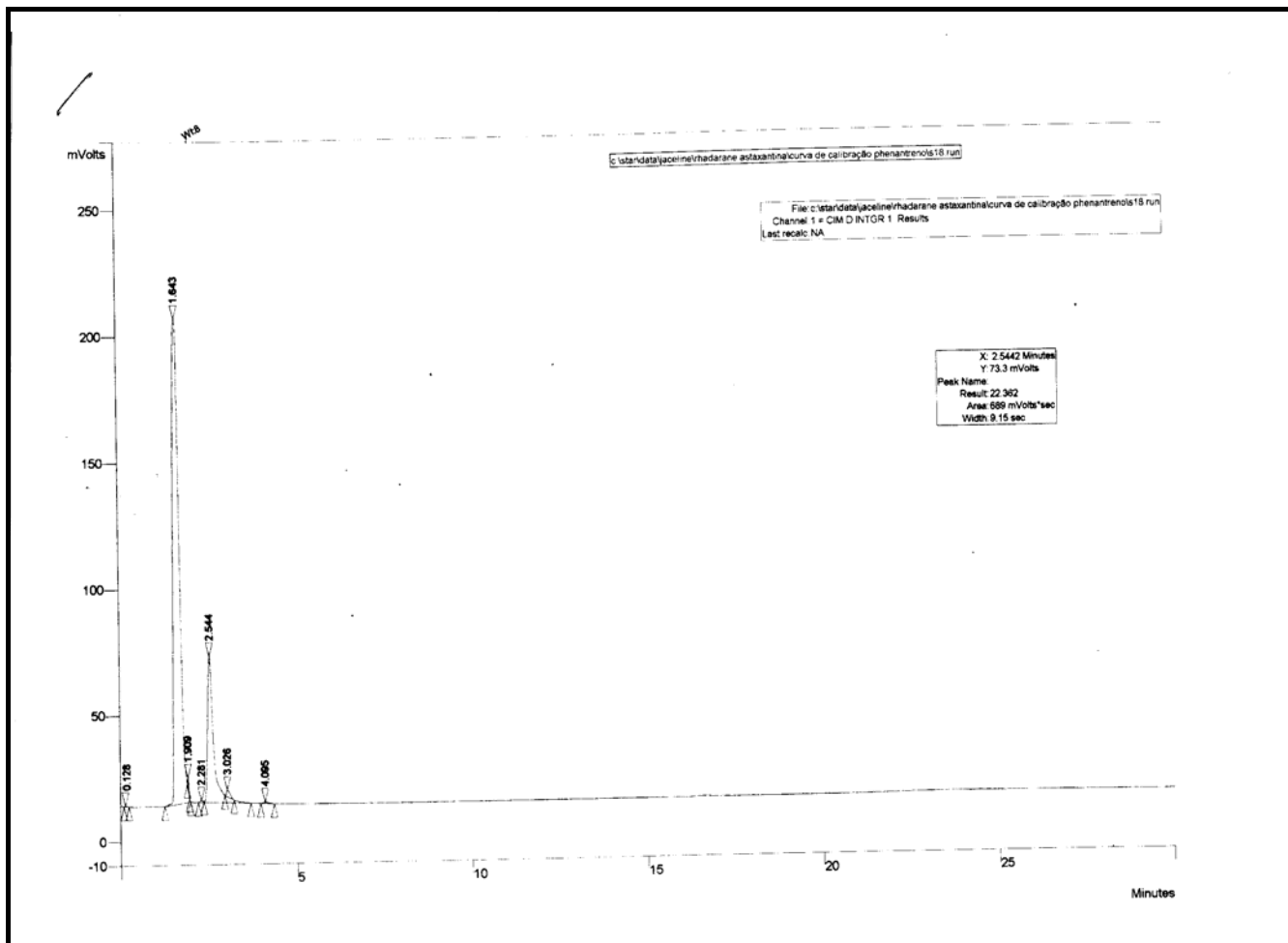


Figura 3. Cromatograma do filtrado da amostra de *Trichosporon brassicae* (18).

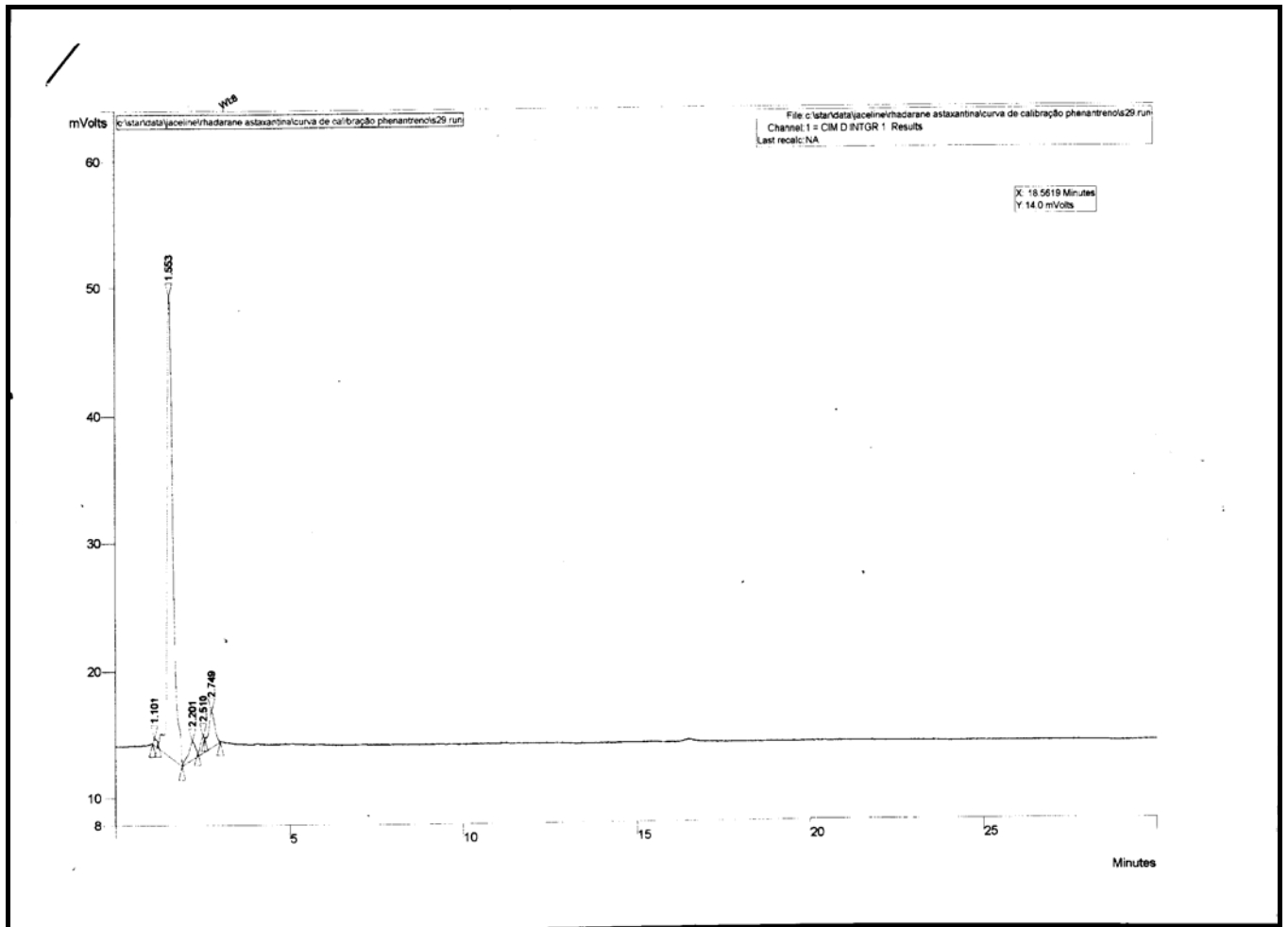


Figura 4. Cromatograma do filtrado da amostra de *Rhodotorula minuta* (29).

## RESUMO

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE para Quantificação dos Aminoácidos Lisina e Metionina em Isolados de Leveduras**

8 isolados de leveduras urease positivas foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar os aminoácidos lisina e metionina. Alguns parâmetros foram testados, tais como a composição da fase móvel e a velocidade do fluxo. Determinou-se, ainda, o limite de quantificação e a repetibilidade da técnica. Foi utilizada como condições cromatográficas uma fase móvel constituída de 10mmoles/L de trietilamina (TEA), (70:30, v/v). A injeção da amostra (10 $\mu$ L) foi efetuada manualmente, e a detecção ocorreu a 270nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1mL/min, à temperatura de 25°C. Os resultados obtidos indicaram as vantagens da metodologia em termos de tempo, economia e simplicidade, quando comparada a outras técnicas de determinação de aminoácidos, uma vez que dispensa a derivação pré-coluna e permite trabalhar em modo isocrático.

**Palavras-chave:** aminoácidos, lisina, metionina, cromatografia de camada delgada (CLAE).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaiz, M., Navarro, J. L., Giron, J., Vioque, E. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 591, n. 1, p. 181- 186, 1992.

Alpert, A. J. Hydrophilic – interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, v. 499, n. 2, p. 177-196, 1990.

Carisano, A. Rapid and sensitive method for the determination of praline by reversed- phase high performance liquid chromatography with automated pre-column fluorescence derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 318, n. 1, 132-138,1985.

Ciola, R. *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC*. 1. Ed. São Paulo: Edgard Bulcher, 1998.

Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*, 4 ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1990, p. 185-238.

Draper, N., Smith, H. *Applied regression analysis*. Second Edition. John Wiley & Sons, INC, EUA, 1981, 709 p.

Feste, A. S. Reversed-phase chromatography of phenylthiocarbamyl amino acid derivatives of physiological amino acids: an evaluation and a comparison with analysis by ion- exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 574, n.1, p. 23-34, 1992.

Kan, T. A., Shipe, N. F. Modification an evaluation of a reversed phase high performance liquid chromatographic method for amino acid analysis. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, p. 337-341, 1981.

Kipp, B., Belitz, H. D., Seilmeier, W., Wieser, H. Comparative studies of high Mr. Subunits of rye and wheat. I. Isolation and biochemical characterization and effects on gluten extensibility. **Journal of Cereal Science**, v. 23, n. 3, p. 227-234, 1996.

Larson, T. M., Gawlitzek, M., Evans, H., Albers, U., Cacia, J. Chemometric Evaluation of On- Line High- Pressure Liquid Chromatography in Mammalian Cell Cultures: Analysis of Amino Acid and Glucose. **Biotech. Bioeng.** 2002, 77, 553-563.

Moore, S., Spackman, D. H., Stein, N. H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1185- 1190, 1958.

Szepesi, G. *HPLC in pharmaceutical analysis*. Boston: CRC Press, (1), p. 49-65, 1990.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Maior diversidade de espécies e maior número de unidades formadoras de colônias ocorreu no local mais poluído no período chuvoso;
- *Candida* apresentou-se com maior número de espécies isoladas;
- As espécies de ocorrência abundante e comum são referidas na literatura como prevalentes em ambiente aquático poluído;
- Sedimento de manguezal poluído apresenta um potencial elevado de leveduras;
- As espécies de leveduras urease positivas apresentaram resultado positivo para as análises qualitativas de produção de aminoácidos;
- *Rhodotorula minuta*, *Trichosporon cutaneum*, *T. aquatile* e *T. brassicae* foram as espécies que apresentaram resultado na Cromatografia de Camada Delgada (CCD);
- As leveduras ascomicéticas não apresentaram atividade qualitativa para produção de lisina e metionina;
- As leveduras anamórficas apresentam maior produção de aminoácidos;
- *Trichosporon cutaneum* mostrou-se eficiente na produção de lisina e metionina.

*Anexos*

Normas gerais para publicação de artigos na **Brazilian Journal of Microbiology**:

A **Brazilian Journal of Microbiology** destina-se à publicação de trabalhos de pesquisa originais, notas breves e, ocasionalmente, revisões, envolvendo todos os aspectos da microbiologia. Os textos submetidos à publicação devem ser redigidos em inglês, e conter Título, Resumo e Palavras-chave também em português. A **Brazilian Journal of Microbiology** tem uma política muito severa de avaliação dos trabalhos submetidos à publicação, sendo cada manuscrito avaliado por pelo menos dois revisores criteriosamente selecionados.

## **Publicação de um manuscrito**

Manuscritos são aceitos para publicação somente após criticamente revisados. Os trabalhos são avaliados por revisores indicados pelo Editores. Após a revisão, os manuscritos são devolvidos para o autor indicado, para as correções sugeridas pelos revisores, quando necessárias. Os autores devem retornar o novo texto para os Editores. O autor indicado recebe uma notificação sobre o recebimento, a aceitação ou a recusa de um trabalho submetido à publicação.

Quando um manuscrito é aceito, o autor indicado é avisado sobre a necessidade de envio de um disquete de computador contendo o texto. O autor indicado receberá provas tipográficas para correção, que deverão ser cuidadosamente revisadas de acordo

com as instruções enviadas e devolvidas no prazo de 5 dias.

## **Preparação do texto**

### **Geral**

1. Todos os manuscritos devem ser datilografados em espaço duplo, com amplas margens, com as páginas numeradas em seqüência. Trabalhos de pesquisa devem ter no máximo 15 páginas impressas, incluindo figuras e tabelas. Notas breves devem ter no máximo 6 páginas.

2. Todos os manuscritos devem ser redigidos em inglês. Os Editores recomendam que, antes de ser submetido, o texto seja cuidadosamente revisado por alguém fluente em inglês. Manuscritos em inglês precário não serão aceitos.

3. O texto deve ser organizado em tópicos, conforme descrito no próximo parágrafo. O nome dos tópicos deve ser digitado em letras maiúsculas (ABSTRACT, INTRODUCTION etc.). A citação de tabelas e de figuras deve iniciar com maiúsculas (as shown in Table 1..., as presented in Fig. 2..., etc.).

4. A abreviação de palavras e de símbolos deve seguir as recomendações da IUPAC-IUB Commission. O Sistema Métrico deve ser adotado em todo o texto.

5. Como regra, as referências devem ser citadas por seus números. Excepcionalmente, quando autores são mencionados no texto, a menção deve ser feita de acordo com os seguintes exemplos: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that... Não utilizar letras maiúsculas.

6. Aos autores dos trabalhos aceitos para publicação será solicitado o envio de um disquete de 3 1/2" contendo o trabalho digitado em um processador de texto adequado para PC. Esse material pode ser enviado também por correio eletrônico.

## Organização

**Página de título:** Uma página separada deve conter o título do trabalho, o nome completo (inclusive o primeiro nome e as iniciais intermediárias) e a afiliação de cada autor. Um asterisco deve indicar o autor para correspondência. Os números de telefone e fax e o endereço eletrônico, quando disponível, devem ser assinalados no pé da página. A página de título não deve ter nenhum texto. O título deve ser o mais conciso possível e indicar claramente o objetivo do trabalho, não devendo conter abreviações. Expressões do tipo "Effects of...", "Influence of...", "Study on..." etc. devem ser evitadas. O título deve ser preparado com muito cuidado pois ele é utilizado nos sistemas de busca.

**Abstract:** Deve ser apresentado em uma página separada, limitando-se a no máximo 250 palavras. Ele deve resumir o conteúdo básico do trabalho, devendo ser compreensível mesmo sem a consulta do texto completo. Um *abstract* não deve conter referências, tabelas ou abreviações incomuns. *Abstracts* devem ser preparados com

muito cuidado pois são publicados em textos de referência e lidos por pessoas que não têm acesso ao trabalho completo. Três a cinco *keywords* também devem ser apresentados.

**Resumo:** *Resumo* é o *abstract* redigido em português. Sua preparação deve seguir as recomendações para a preparação do *abstract* em inglês. O *resumo* deve ter também um título em português. As regras para o título em português são as mesmas para o título em inglês (ver acima). Três a cinco *palavras-chave* também devem ser apresentadas. O *resumo* e o título em português também devem ser apresentados em página separada.

**Introdução:** Deve iniciar em página nova e fornecer ao leitor informações suficientes para que os resultados relatados no trabalho possam ser avaliados sem consulta à literatura. Entretanto, a *introduction* não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve também dar subsídios para a compreensão dos objetivos do trabalho que está sendo apresentado.

**Materiais e Métodos:** Esse tópico deve fornecer informações suficientes para a repetição do trabalho. Descrição repetida de detalhes de técnicas anteriormente publicadas deve ser evitada. Quando um método publicado é modificado pelos autores, essas modificações devem constar do texto. A origem de reagentes, meios de cultura e equipamentos (companhia, cidade, estado, país) deve ser mencionada. Nomes comerciais e marcas registradas também devem ser indicados. A utilização de subtópicos geralmente facilita a leitura e a compreensão desse item.

**Resultados:** Esse tópico deve, através de texto, tabelas ou figuras, fornecer os resultados experimentais. Caso um

tópico relativo à *Discussion* seja incluído, evitar a excessiva interpretação dos resultados, que deverá ser feita na *Discussion*. Caso *Results* e *Discussion* sejam combinados em um único tópico, os resultados devem ser discutidos no texto quando adequado. Tabelas devem ser numeradas independentemente das figuras, devendo-se utilizar números arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto. A localização mais adequada das tabelas e figuras deve ser assinalada.

**Discussão:** Deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações disponíveis.

**Agradecimentos:** Esse tópico é opcional e deve vir após a discussão. Destina-se a agradecimentos por apoio financeiro e pessoal.

**Referências:** A lista de referências bibliográficas deve ser apresentada em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro autor. Todos os autores devem ser mencionados. As referências devem ser numeradas em ordem crescente. Cada referência deve ser citada no texto por seu número. Os nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com o sistema utilizado pelo *Biological Abstracts* ou *Chemical Abstracts*. Todas as referências mencionadas na lista devem ser citadas no texto, assim como todas as referências citadas no texto devem constar da lista. Seguir os seguintes exemplos:

a. Artigo em revista

Campos, L.C.; Whittam, T.S.;  
Gomes, T.A.T.; Andrade,  
J.R.C.; Trabulsi, L.R.  
*Escherichia coli* serogroup 0111  
includes several clones of  
diarrhaegenic strains with

different virulence properties.  
*Infect. Immun.* , 62:3282-3288,  
1994.

b. Trabalho ou capítulo em livro

Nelson, E.B. Current limits to  
biological control of fungal  
phytopathogens. *In: Arora,  
D.K.; Rai, B.; Mukerji, K.G.;  
Knudsen, G. (eds). Handbook of  
applied mycology: soils and  
plants.* Marcel Dekker, New  
York, 1991, p.327-355.

c. Livro pelos autores

Salyers, A.A.; Whitt, D.D.  
*Bacterial pathogenesis. A  
molecular approach.* ASM,  
Washington, 1994, 418p.

d. Patente

Hussong, R.V.; Marth, E.H.;  
Vakaleris, D.G. Manufacture of  
cottage cheese. *U.S. Pat.*  
3,117,870. Jan.14, 1964.

e. Tese

Calzada, C.T. *Campylobacter  
jejuni e Campylobacter coli –  
caracterização em sorogrupos e  
biotipos das cepas isoladas no  
município de São Paulo no período de  
1983-1989.* São Paulo, 1991, 131p.  
(Ph.D. Thesis. Instituto de Ciências  
Biomédicas. USP).

f. Publicação com autor ou editor  
desconhecido

Anonymous. The economy of  
by-products. *Alcool  
Alcoolquim.*, 2: 33-40, 1985.

g. Comunicações em eventos  
(Simpósios, Conferências etc.)

Simões, G.S.; Silva, J.; Toledo, A.S.; Gontijo Filho, P.P. *Micobactérias não tuberculosas isoladas de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida*. XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1993, p.41.

Referências como *personal communication* ou *unpublished data* devem ser evitadas, embora algumas vezes elas sejam necessárias. Nesses casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências bibliográficas. Referências a respeito de trabalhos *accepted for publication* ou *in press* podem ser utilizadas. No entanto, referências de trabalhos *submitted* ou *in preparation* não devem ser utilizadas.

### **Tabelas**

As tabelas não devem estar no meio do texto. Cada tabela deve ser apresentada em uma página separada e numerada em seqüência empregando números arábicos. O título da tabela deve aparecer no topo, e descrever de maneira clara as informações apresentadas. Títulos e subtítulos devem ser concisos, apresentando os dados em colunas e linhas, cuidadosamente arranjadas.

### **Figuras**

As figuras devem ser identificadas com números arábicos. Dados apresentados em tabelas não devem ser repetidos nas figuras. A legenda deve vir no pé da figura.

### **Fotografias e desenhos**

Apenas fotografias extremamente necessárias para a compreensão do trabalho devem ser apresentadas. Sua qualidade deve ser suficiente para garantir boa reprodução. As fotografias devem ser numeradas no verso e identificadas com o nome do autor. No caso de desenhos, os detalhes devem ter qualidade suficiente para permitir redução. Desenhos e figuras devem ser desenhados ou impressos em preto e devem ser preparados como indicado para as fotografias. Ilustrações coloridas não são aceitas.

### **Cópias**

O autor indicado receberá gratuitamente quinze cópias do trabalho. Cópias adicionais, pagas, devem ser requisitadas no retorno da prova gráfica corrigida.

## Normas gerais para publicação de artigos na **Electronic Journal of Biotechnology**

**Electronic Journal of Biotechnology** is an international scientific electronic journal which publishes papers from all areas related to Biotechnology. It covers from molecular biology and the chemistry of biological process to aquatic and earth environmental aspects, as well as computational applications, policy and ethical issues directly related to Biotechnology. Molecular biology, genetic engineering, microbial biotechnology, plant biotechnology, animal biotechnology, marine biotechnology, environmental biotechnology, biological processes, industrial applications, bioinformatics and others are some of the main subjects considered. Also short communications a welcomed. All contributions should be concise and written in English. **Electronic Journal of Biotechnology** has no page charges. Authors must assure that no part of the article has been published nor submitted for publication elsewhere.

**TITLE PAGE** It should contain the following information:

- a) The full title of the paper without abbreviations. The title should be as brief and informative as possible, specifying clearly the content of the article.
- b) If the title is long (more than 80 characters and spaces), a shortened running title having no more than 50 characters and spaces should be provided.
- c) Full names of all authors indicating the corresponding authors.
- d) Affiliation, telephone, fax, electronic addresses and URL's of personal and institutional WEB pages.

**FINANCIAL SUPPORT** Authors must include the financial support received for research.

**KEYWORDS** Authors must provide between three and six keywords, which must not be part of the title of the paper. Phrases and general or broad words such as "pH" or "growth" are not allowed.

**PRESENT ADDRESS** Authors should provide their present address in case it is different than the affiliation described at the Title page. It should include address, phone and fax.

**ABBREVIATIONS** They should be indicated as in example:

Abbreviations: PCR: polymerase chain reaction; AFLP: amplified fragment length polymorphism; Cy5: CyTM5 amidite (5'-cyamine-d[seq]) fluorochrome technology.

**ABSTRACT** An abstract not exceeding 200 words containing the principal ideas, methodology, results and important conclusions is required. Foot notes and abbreviations should be avoided in the abstract. A reference might be included only if necessary, and mentioning the complete citation. Considering that the abstract is published separately by the analysis information services, it should contain enough basic information so that the paper could be fully understood by those who do not have access to the full text.

**INTRODUCTION** It should be brief and limited to the definition of the problem, the aims and purposes of the research and its relation with other

studies in the field. Also the working hypothesis must be clearly stated.

**MATERIALS AND METHODS** It should include relevant details on the experimental design and techniques so that the experiments can be repeated.

**RESULTS** Results should be clearly presented. Tables and figures should only be included if required to fully understand the data.

**DISCUSSION** The aim of this section is the interpretation of the results and their relation to the existing knowledge. The contribution to Biotechnology must be clearly stated. The information given in any part of the text may be cited but not repeated in the Discussion Section. Alternatively **Results** and **Discussion** can be presented in one section.

**ACKNOWLEDGMENTS** The acknowledgments of the contributions of colleagues can be stated in this section. Acknowledgments for financial support must be cited on the corresponding section.

**REFERENCES** For original articles (research, short communications, technical notes, biotechnology issues for developing countries, issues in biotechnology teaching), at least 75% of the references must be from ISI indexed journals from the last decade. This exigency is not applied to patents. Citations from thesis, personal communications, and unpublished data are not allowed.

For review articles at least 75% of the references must be from ISI indexed journals.

Research articles should have at least 15 references.

Review articles should have at least 80 references.

**a) In the text:**

References must be cited in the text mentioning the last name of the author and year between parenthesis. In case of two authors, both should be mentioned. When there are three or more authors, mention only the first author followed by et al. When two or more references are cited in the same parenthesis, the authors should be in chronological order. And if they have the same year, they should be in alphabetical order.

Moreover, if there is more than one reference of the same author and the same year, they should be indicated with letters. See examples:

- 1 author: (Gardner, 1999).
- 2 authors: (Larvol and Wilkerson, 1998).
- 2 or more authors: (Frishman et al. 1998). 2 or more references in the same parenthesis: (Benton, 1996; Frishman et al. 1998; Larvol and Wilkerson, 1998; Pennisi, 1999).
- 2 or more references with the same year: (Klevecz, 1999; Wedin, 1999; Persidis, 2000).
- 2 or more references with the same author and the same year: (Benton, 1996a; Benton 1996b; Benton 1996c).

**b) In the References section:**

At the end of the paper, in the References section the literature should be arranged in alphabetical order. If they have the same author, they should be in chronological order. They must be presented according to the following examples: (based on ISO 690 and ISO 690-2).

## **Manuscript**

## **Preparation:**

*General:* Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use. An electronic copy of the manuscript on disk should accompany the final accepted version. Please use Word, Word Perfect or LaTeX files for the text of your manuscript.

*Structure:* Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. For submission in hardcopy, do not import figures into the text - see Illustrations. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

*Text Layout:* Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 or 10 pt font size and standard fonts. If submitting in hardcopy, print the entire manuscript on one side of the paper only.

*Corresponding author:* Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

*Abstract:* Each paper should be provided with an Abstract of about 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

*Keywords:* Immediately after the abstract, provide a maximum of ten keywords (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

*Symbols:* Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), '%' and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

*Units:* Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and must not be used.

*Maths:* Authors should make clear any symbols (e.g. Greek characters, vectors, etc.) which may be confused with ordinary letters or characters. Duplicated use of symbols should be avoided where this may be misleading. Symbols should be defined as they arise in the text and separate Nomenclature should also be supplied.

*References:* All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:  
Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:  
Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan,

New York.  
Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

*Colour Costs and Queries:* For colour illustrations, a colour printing fee is charged to the author per colour page. Further information concerning colour illustrations and costs is available from Author Support at [authorsupport@elsevier.ie](mailto:authorsupport@elsevier.ie), and at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>.