

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Gisele de Fátima Leite Souza

**IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE LARVAS, INTESTINO DE BESOUROS,
GALERIAS E MADEIRA EM DECOMPOSIÇÃO EM ÁREAS DE
FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA**



Belo Horizonte
2022

Gisele de Fátima Leite Souza

**IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE LARVAS, INTESTINO DE BESOUROS,
GALERIAS E MADEIRA EM DECOMPOSIÇÃO EM ÁREAS DE
FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Carlos Augusto Rosa

Coorientador: Maxwel Adriano Abegg

Belo Horizonte

2022

043

Souza, Gisele de Fátima Leite.

Identificação e aplicações biotecnológicas de leveduras isoladas de larvas, intestino de besouros, galerias e madeira em decomposição em áreas de floresta amazônica brasileira [manuscrito] / Gisele de Fátima Leite Souza. – 2022.

84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Augusto Rosa. Coorientador: Maxwell Adriano Abegg. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Besouros. 3. Etanol. 4. Fermentação. 5. Leveduras. 6. Xilitol. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Abegg, Maxwell Adriano. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE GISELE DE FÁTIMA LEITE SOUZA

Nº REGISTRO: 2018753619

Às 14:00 horas do dia 14 de dezembro de 2022, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (Universidade Federal de Santa Catarina), Melissa Fontes Landell (Universidade Federal de Alagoas), Paula Benevides de Moraes (Universidade Federal do Tocantins) e Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Orientador), para julgar o trabalho final "Identificação e aplicações biotecnológicas de leveduras isoladas de larvas, intestino de besouros, galerias e madeira em decomposição em áreas de floresta amazônica brasileira" da aluna Gisele de Fátima Leite Souza, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2022

Membros da Banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres
Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Profa. Dra. Melissa Fontes Landell
Profa. Dra. Paula Benevides de Moraes

De acordo:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por Paula Benevides de Moraes, Usuária Externa, em 16/12/2022, às 13:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 19/12/2022, às 10:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Melissa Fontes Landell, Usuária Externa, em 20/12/2022, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior, em 20/12/2022, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Usuário Externo, em 21/12/2022, às 23:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Carlos Augusto Rosa, Coordenador(a), em 04/05/2023, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1907588 e o código CRC 0DC13528.

Ao meu esposo e filhos pelo incentivo e
compreensão para realização deste trabalho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a todos os professores, alunos e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia em especial a secretária Débora, agradeço pelo apoio, conhecimento proporcionado, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador Carlos Augusto Rosa, pela confiança, ensinamentos, oportunidades. Eu te agradeço por compreender minha situação, que além da pesquisa tenho minha vida de mãe.

Ao meu coorientador Maxwell Adriano Abegg, por ter me motivado a dar continuidade na pesquisa quando terminei meu mestrado no Amazonas, e por ter caminhado comigo durante o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro por me proporcionar bolsa de estudos durante o desenvolvimento do doutorado.

Meus mais sinceros agradecimentos ao Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca (INPA) por manter a parceria durante meu doutorado com a identificação e preservação dos espécimes de besouros.

Aos amigos e professores do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET-UFAM) em Itacoatiara, por me acolherem e colaborarem com a coleta dos besouros.

Aos amigos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos da UFMG, pela amizade, companheirismo, boa convivência e por sempre me ajudarem quando precisei! Gostaria de agradecer em especial Katharina, Ana Raquel, Ângela e Fernanda Palladino por toda ajuda, apoio, pelos ensinamentos e pela amizade!

À minha amiga e afilhada Flávia que esteve sempre ao meu lado, principalmente após o retorno presencial das atividades no laboratório por conta da pandemia. Flávia você terá sempre um lugarzinho no meu coração e da minha família, muito obrigada pela parceria!!

Aos meus amores Alice e Raul, por compreenderem a importância da mudança para Belo Horizonte, por terem mudado suas vidas para que eu pudesse fazer o doutorado.

E finalmente, o meu agradecimento ao meu querido esposo, companheiro e amigo Leandro, por todo incentivo, por me fazer acreditar que era possível, por ter assumido os cuidados das crianças quando precisei me mudar para Belo Horizonte e deixá-los em Ituiutaba, seu apoio nesse período foi essencial para que eu pudesse dar continuidade ao doutorado. Muito obrigada pelo apoio e compreensão durante todos estes anos!

A todos o meu muito obrigada!

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Martin Luther King

RESUMO

A floresta amazônica pode abrigar a maior biodiversidade do planeta. No entanto, poucos estudos foram feitos visando caracterizar a diversidade de leveduras nos ambientes da Amazônia brasileira. O estudo da interação de leveduras com besouros tem revelado a presença de espécies desconhecidas desses microrganismos, muitas com propriedades de interesse biotecnológico. Os benefícios acumulados tanto pelos microrganismos quanto pelos insetos durante essas interações ainda são pouco compreendidos. Os besouros da família Passalidae vivem e se alimentam de madeira em decomposição, tendo os intestinos ricamente colonizados por leveduras. Além disso, algumas espécies de leveduras associadas a madeira em decomposição possuem a capacidade de fermentar D-xilose, principal pentose encontrada em resíduos lignocelulósicos. Esses microrganismos têm potencial para uso na produção de etanol de segunda geração, produzido a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar leveduras presentes em madeira em decomposição, larvas e trato intestinal de besouros da família Passalidae e de seu habitat (galerias) em áreas da floresta amazônica em Itacoatiara – estado do Amazonas. Para tanto, foram coletados 35 espécimes de besouros adultos e 11 larvas da família Passalidae, 29 amostras do interior de galerias habitadas por estes insetos e 60 amostras de madeira em decomposição em três pontos na floresta amazônica. Nestas amostras foram obtidos 143 isolados de leveduras do intestino de besouros, 71 provenientes de galerias de besouros, 34 de larvas de besouros e 82 de amostras de madeira em decomposição. A identificação molecular dos isolados de levedura obtidas neste trabalho dos quatro substratos estudados, mostrou a ocorrência de 71 espécies distribuídas em 24 gêneros, sendo 37 prováveis espécies novas. Dentre as espécies isoladas, destaca-se *Spathaspora passalidarum* (n=12) considerada a melhor produtora de etanol a partir da D-xilose, com grande potencial para produção de bioetanol 2G, além de duas possíveis novas espécies do gênero *Spathaspora*. No geral, as espécies mais frequentes foram: *Apiotrichum siamense* (8,6%), *Scheffersomyces amazonensis* (9,9%), *Sugiyamaella* sp. 4 (6,6%), *Sugiyamaella* sp. 5 (5,6%), *Sugiyamaella* sp. 6 (8,6) e *Sugiyamaella* sp. 11 (6,3%). Os 12 isolados de *S. passalidarum* foram submetidas em ensaios de fermentação usando meio de cultura D-xilose (30 g/L). Estes isolados apresentaram rendimentos de etanol (0,16 g/g a 0,41 g/g) e produtividades (0,07 g/L/h a 0,24 g/L/h). A nova espécie de *Spathaspora* sp. 1 produziu xilitol como principal produto da fermentação apresentando rendimento de 0,54 g/g e produtividade de 0,27 g/L/h, com concentração de 16,1 g/L de xilitol. *Spathaspora* sp. 2 produziu 5,4 g/L de xilitol e 3,19 g/L de etanol e foi capaz de consumir aproximadamente 77% da D-xilose em 72 h. Em ensaios com hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, as linhagens testadas de *S. passalidarum* apresentaram rendimentos de etanol variando de 0,28 g/g a 0,32 g/g, produtividade de 0,28 g/L/h a 0,32 g/L/h, e concentrações de etanol entre 16,4 g/L a 19,4 g/L. O gênero *Sugiyamaella* teve 23 possíveis novas espécies distribuídas entre os quatro substratos e nas três localidades estudadas. Espécies deste gênero são conhecidas pela capacidade de produzir xilanases extracelulares, que auxiliariam na degradação da madeira em decomposição. Estes resultados mostram a importância de estudos de bioprospecção de biomas amazônicos para a obtenção de linhagens selvagens para possíveis aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Besouros. Bioetanol 2G. Diversidade. Fermentação. Leveduras. Madeira em decomposição. Xilitol.

ABSTRACT

The Amazon rainforest may harbor the greatest biodiversity on the planet. However, few studies have been carried out aiming to characterize the diversity of yeasts in the environments of the Brazilian Amazon. The study of yeast interaction with beetles has revealed the presence of unknown species of these microorganisms, many with properties of biotechnological interest. The benefits accrued by both microorganisms and insects during these interactions are still poorly understood. The beetles of the family Passalidae live and feed on decaying wood, having intestines richly colonized by yeasts. Furthermore, some species of yeast associated with decaying wood could ferment D-xylose, the main pentose found in lignocellulosic residues. These microorganisms have potential for use in the production of second-generation ethanol, produced from agricultural, agro-industrial and forest residues. Thus, the objective of this work was to isolate and identify yeasts present in decomposing wood, larvae, and intestinal tract of beetles of the Passalidae family and their habitat (galleries) in areas of the Amazon rainforest in Itacoatiara - Amazonas state. For this purpose, 35 specimens of adult beetles and 11 larvae of the Passalidae family were collected, 29 samples from the interior of galleries inhabited by these insects and 60 samples of decomposing wood from three points in the Amazon forest. In these samples, 143 yeast isolates were obtained from the intestine of beetles, 71 from beetle galleries, 34 from beetle larvae and 82 from samples of decaying wood. The molecular identification of yeast isolates obtained in this work from the four substrates studied, showed the occurrence of 71 species distributed in 24 genera, 37 of which are probable new species. Among the isolated species, *Spathaspora passalidarum* (n=12) stands out, considered the best producer of ethanol from D-xylose, with great potential to produce 2G bioethanol, in addition to two possible new species of the genus *Spathaspora*. Overall, the most frequent species were: *Apiotrichum siamense* (8.6%), *Scheffersomyces amazonensis* (9.9%), *Sugiyamaella* sp. 4 (6.6%), *Sugiyamaella* sp. 5 (5.6%), *Sugiyamaella* sp. 6 (8.6) and *Sugiyamaella* sp. 11 (6.3%). The 12 *S. passalidarum* isolates were submitted to fermentation tests using D-xylose culture medium (30 g/L). These isolates showed ethanol yields (0.16 g/g to 0.41 g/g) and productivities (0.07 g/L/h to 0.24 g/L/h). The new species of *Spathaspora* sp. 1 produced xylitol as the main fermentation product, showing a yield of 0.54 g/g and productivity of 0.27 g/L/h, with a concentration of 16.1 g/L of xylitol. *Spathaspora* sp. 2 produced 5.4 g/L of xylitol and 3.19 g/L of ethanol and was able to consume approximately 77% of the D-xylose in 72 h. In trials with hemicellulose hydrolysate of sugarcane bagasse, the tested strains of *S. passalidarum* showed ethanol yields ranging from 0.28 g/g to 0.32 g/g, productivity from 0.28 g/L/h to 0.32 g/L/h, and ethanol concentrations between 16.4 g/L to 19.4 g/L. The genus *Sugiyamaella* had 23 possible new species distributed among the four substrates and in the three locations studied. Species of this genus are known for their ability to produce extracellular xylanases, which would help in the degradation of decaying wood. These results show the importance of bioprospecting studies of Amazonian biomes to obtain wild lineages for possible biotechnological applications.

Keywords: Beetles. 2G Bioethanol. Diversity. Fermentation. Yeasts. Decaying wood. Xylitol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura lignocelulósica evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose (ZAMPIERI, 2015).....	24
Figura 2. Ponto de coleta: (A) Ramal da comunidade Sol Nascente – Piquiá; (B) Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no quilômetro 260 da Rodovia AM-010; (C) Arredores aeroporto – Itacoatiara/AM	29
Figura 3. Coleta de besouros Passalidae (Foto: Katharina O. Barros, 2019)	30
Figura 4. Larva de besouro Passalidae	31
Figura 5. Remoção de forma asséptica do intestino do besouro passalídeo.....	32
Figura 6. Intestino do besouro passalídeo removido assepticamente	32
Figura 7. Swab rotacionado dentro de uma galeria de besouro passalídeo.	33
Figura 8 – Amostra de madeira em decomposição.....	34
Figura 9. Isolados de leveduras por substrato coletados em sítios de bioma amazônico.	43
Figura 10. Frequência de ocorrência dos gêneros de leveduras isoladas do intestino de besouros passalídeos por localidade em sítios de bioma amazônico.....	44
Figura 11. Frequência de ocorrência de gêneros de leveduras isoladas em galeria de besouros passalídeos por localidade.	45
Figura 12. Frequência de ocorrência de gêneros de leveduras isoladas de larvas de besouros por localidade.	46
Figura 13. Frequência de ocorrência de gêneros de leveduras isoladas de madeira em decomposição.	46
Figura 14 - Curvas de rarefação baseada no tamanho da amostra (linhas sólidas) e extrapolação (linhas tracejadas, até 250 indivíduos) da diversidade de espécies de leveduras isoladas nos sítios de coleta: aeroporto, Piquiá e UFAM com base na diversidade de espécies para números de Hill de ordem $q=0$ (riqueza observada de espécies); $q=1$ (índice de Shannon) e $q=2$ (índice inverso de Simpson). Intervalos de confiança de 95%.....	55

Figura 15 - Gráfico de cobertura amostral para amostras rarefeitas (linha sólida) e amostras extrapoladas (linha tracejada) em função do tamanho da amostra para amostras de espécies de leveduras isoladas nos três sítios de coleta; aeroporto, Piquiá e UFAM. Intervalos de confiança de 95%. Cada uma das curvas foi extrapolada até 250 indivíduos. 56

Figura 16. Diagrama de Venn produzido com base no número de espécies de leveduras isoladas; (A) por sítios de coleta nos municípios de Itacoatiara/AM e números de espécies isoladas: Aeroporto (34) Piquiá (35), UFAM (37); (B) por substratos: intestino de besouros (38), galerias de besouros (22), larva de besouros (20), madeira em decomposição (34). 57

Figura 17 – Diagrama de Venn produzido com base no número de espécies de leveduras isoladas por substratos: (A) Intestino de besouros; (B) galerias de besouros; (C) larva de besouros; (D) madeira em decomposição por sítio de coleta (Aeroporto, Piquiá e UFAM) ... 58

Figura 18 - Gráfico de comparação da produção de etanol das linhagens de *Sp. passalidarum* isoladas de diferentes substratos com os controles positivos (NRRLY-27907; HMD1.1); (A) Linhagem isolada de galeria (UFMG-CM-Y7201); (B) Linhagens isoladas de intestino de besouro (UFMG-CM-Y7202; Y7203; Y7204; Y7205); (C) Linhagens isoladas de larvas de besouro (UFMG-CM-Y7206; Y7207); (D) Linhagens isoladas de madeira em decomposição (UFMG-CM-Y7208; Y7209; Y7210; Y7211; Y7212); (E) Linhagens selecionadas para fermentação em hidrolisado de cana-de-açúcar..... 60

Figura 19 – Gráficos de produção de etanol por linhagens selecionadas de *Sp. passalidarum* utilizando meio de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. (A) Linhagem controle (NRRLY 27907); (B) Linhagem controle (HDM1.1); (C) Linhagem isolada de intestino de besouro (UFMG-CM- Y7204); (D) Linhagem isolada de intestino de besouro (UFMG-CM-Y7205); (E) Linhagem isolada de larvas de besouro (UFMG-CM-Y7207) (F) Linhagem isolada de madeira em decomposição (UFMG-CM- Y7210); (G) Linhagem isolada de madeira em decomposição (UFMG-CM-Y7211). 64

TABELAS

Tabela 1 – Identificação das espécies de besouros coletados por localidade.....	42
Tabela 2 - Número de isolados de possíveis novas espécies de leveduras provenientes do intestino de besouros por localidade.....	44
Tabela 3 - Número de isolados de possíveis novas espécies de leveduras de madeira em decomposição por localidade.....	47
Tabela 4 – Lista de leveduras isoladas separadas por sítio de coleta e substrato.....	48
Tabela 5 – Lista das novas espécies de leveduras isoladas.	52
Tabela 6 - Produção de etanol e/ou xilitol a partir da xilose por <i>Spathaspora passalidarum</i> e <i>Spathaspora</i> sp. 1.	61
Tabela 7 - Produção de etanol a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Sp. passalidarum</i>	63

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela: Número de substratos amostrados por local de coleta	83
--	----

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Leveduras.....	16
1.2	Associação entre leveduras e besouros.....	17
1.3	Leveduras associadas com madeira em decomposição.....	19
1.4	Utilização das leveduras isoladas de besouros ou madeira em decomposição para produção de bioetanol.....	20
1.5	Bioetanol.....	23
1.6	Xilitol.....	25
2.	JUSTIFICATIVA.....	27
3.	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivo Geral.....	28
3.2	Objetivos Específicos.....	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Áreas de coleta.....	29
4.2	Coleta e processamento das amostras.....	29
4.2.1	Coleta de larvas e besouros e deposição de espécimes em coleção de artrópodes	30
4.2.2	Isolamento de leveduras de larvas e trato intestinal de besouros.....	31
4.2.3	Coleta e isolamento de leveduras em galerias de besouros/larvas em madeira em decomposição.....	33
4.2.4	Isolamento de leveduras de madeira em decomposição.....	33
4.2.5	Purificação e manutenção das leveduras.....	34
4.3	Identificação das leveduras.....	35
4.3.1	Extração do DNA.....	35
4.3.2	PCR com o iniciador GTG ₅	35
4.3.3	Amplificação de regiões do gene do rRNA.....	36
4.3.4	Amplificação das regiões de codificação (RPB1, XYL1).....	36
4.3.5	Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento.....	37
4.3.6	Sequenciamento de Sanger.....	37

4.3.7	Análise computacional das sequências	38
4.4	Análise de diversidade	38
4.5	Ensaio de fermentação.....	39
4.5.1	Fermentação em meio YPX.....	39
4.5.2	Fermentação em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar	39
4.6	Métodos analíticos	40
4.6.1	Determinação da concentração de açúcares, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol	40
4.6.2	Cálculo dos parâmetros fermentativos.....	40
5.	RESULTADOS	42
5.1.1	Identificação dos isolados de leveduras.....	43
5.1.2	Análise de diversidade	55
5.1.3	Ensaio de fermentação	58
6.	DISCUSSÃO	65
7.	CONCLUSÕES	71
8.	REFERÊNCIAS	72
9.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES REALIZADAS	81
	APÊNDICE.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares que se encontram distribuídas amplamente por todos os biomas do planeta, podendo ser encontradas em geleiras, lagos de alta salinidade, ambientes aquáticos, no solo, no ar, nos intestinos de vertebrados e invertebrados, e em águas ácidas e ambientes marinhos profundos (BUZZINI; LACHANCE; YURKOV, 2017). Nesses ecossistemas, esses microrganismos desempenham processos complexos, ao interagir com outros organismos, como mutualistas, parasitas, competidores ou patógenos. A ecologia das leveduras é estudada, levando em consideração: a descrição do *habitat* em que vivem e se propagam na natureza; substratos e disponibilidade de nutrientes e água; os impactos microbianos que ocorrem em seus *habitats* a partir das interações com outros seres vivos (STARMER; LACHANCE, 2011).

A identificação de leveduras é feita levando-se em conta aspectos morfológicos e testes fisiológicos, bioquímicos e moleculares (KURTZMAN et al., 2011). A técnica de identificação de leveduras mais recorrente nas investigações atuais tem sido conduzida por meio da utilização de análises de sequências de DNA (KURTZMAN; BOEKHOUT, 2017). As comparações mais comumente utilizadas incluem estudar a divergência das sequências de nucleotídeos nos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do RNA ribossômico (RNAr). O sequenciamento desta região permite a correta identificação de espécies de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas. Outra região estudada é o espaçador transcrito interno (*Internal Transcribed Spacer* - ITS), por ser altamente conservada intraespecificamente e variável entre espécies diferentes (FELL et al., 2000; KURTZMAN; BOEKHOUT, 2017; KURTZMAN; ROBNETT, 1998). As sequências destas regiões fornecem informações adicionais para confirmar a identidade das espécies de leveduras. Atualmente, o sequenciamento completo do genoma de leveduras tem-se mostrado uma ferramenta extremamente útil para diferenciar espécies e caracterizar corretamente a filogenia destes microrganismos (LIBKIND et al., 2020).

Apesar da ampla ocorrência de leveduras em ecossistemas naturais e fermentações conduzidas pelo homem, as estimativas apontam que menos de 1% (em torno de 2300) das espécies foram descritas (AZHAR, 2017; KURTZMAN et al., 2015). Estes microrganismos estão inseridos no sub-reino *Dikarya* e pertencem a dois filos, Ascomycota e Basidiomycota,

devido à formação de ascósporos e basidiósporos, respectivamente (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Acredita-se que o potencial biotecnológico da maioria das leveduras ainda é desconhecido. Isso realça a necessidade de aumentar esforços para estudar esses microrganismos, especialmente, em diferentes regiões tropicais (CADETE et al., 2013). Portanto, estudar leveduras que são provenientes de larvas e trato intestinal de besouros passalídeos, bem como suas galerias (*habitat* dos besouros) e troncos de árvores em decomposição é de grande relevância, pois pode-se descobrir novos isolados ou espécies com potencial para a produção de etanol segunda geração (2G) e/ou xilitol.

1.2 Associação entre leveduras e besouros

Os besouros estão presentes em praticamente todos os ambientes terrestres habitáveis (BIEDERMANN; NUOTCLÀ, 2020). Os Passalidae são uma família de besouros grandes (14 a 80 mm de comprimento) e com 680 espécies conhecidas distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. O habitat primário e a fonte de alimento desses besouros são madeira moderadamente podre (> 2 anos morta) (BIEDERMANN; NUOTCLÀ, 2020). Assim, os passalídeos estão entre os insetos saprofíticos mais relevantes relacionados com a decomposição da madeira em florestas tropicais, atrás apenas dos cupins (ULYSHEN, 2018).

Os besouros passalídeos que vivem e se alimentam em troncos de árvores mortas, hospedam em seu intestino vários microrganismos que auxiliam na decomposição da madeira (CEJA-NAVARRO et al., 2019). A extensão dos benefícios acumulados pelos microrganismos por meio de associações com insetos ainda é pouco compreendida pela comunidade científica. Sabe-se que as leveduras desempenham um papel fundamental na vida dos insetos, auxiliando na localização de alimentos, contribuindo para a digestão ou servindo ainda como fonte essencial de nutrientes (STEFANINI, 2018). A microbiota do intestino de insetos tem potencial para fornecer enormes recursos biológicos para aplicações biotecnológicas na medicina e na indústria (JANG; KIKUCHI, 2020)

Besouros das famílias Passalidae, Cerambycidae, Buprestidae e Tenebrionidae (a espécie *Phrenapates bennetti*) são conhecidos por colonizarem o interior de troncos de árvores em decomposição, devido à disponibilidade de nutrientes para seu desenvolvimento (ABREU et al., 2017; BLACKWELL, 2017). Nesse ambiente, os insetos formam galerias que são túneis abertos ao longo da região por onde transitam e se alimentam. Acredita-se que neste *habitat*, onde os besouros vivem, são fornecidos nutrientes para o desenvolvimento de leveduras. É possível que isso ocorra quando as paredes da galeria são provisionadas com

uma mistura de madeira mastigada e excremento que contém os microrganismos. A comunidade microbiana do intestino grosso do besouro acaba por ser renovada em um processo constante após a muda (BLACKWELL, 2017). Para as leveduras, pode ser vantajoso colonizar o intestino de insetos, já que isso permite que as espécies sobrevivam e se reproduzam, criando uma interação mais duradoura com o hospedeiro (RAVELLA et al., 2011; STEFANINI, 2018).

Shifrine e Phaff (1956) isolaram leveduras de larvas e adultos de besouros dos gêneros *Dendroctonus* e *Ips* associados com coníferas do norte da Califórnia. Depois da antissepsia da superfície externa dos insetos, os besouros foram dissecados e as leveduras isoladas a partir das partes internas. Naquele estudo, 169 linhagens de leveduras foram identificadas como pertencentes a 13 diferentes espécies, das quais *Candida silvicola* (= *Nakazawaea holstii*, frequência de 41,4%), *Hansenula capsulata* (= *Kuraishia capsulata*, 21,3%) e *Pichia pinus* (= *Ogataea pini*, 18,9%) foram encontradas com maior frequência. Suh et al. (2005) investigaram a diversidade de leveduras de uma variedade de besouros coletados no sudeste dos Estados Unidos e na ilha Barro Colorado no Panamá. Foram isoladas neste estudo mais de 650 leveduras durante um período de três anos, sendo encontradas em torno de 200 novas espécies.

Leveduras fermentadoras de xilose são comumente encontradas no trato digestivo e/ou tubos de alimentação de muitos insetos xilófagos, sugerindo uma associação com a digestão da madeira (SUH et al., 2003, 2006). Neste contexto, durante um levantamento da microbiota intestinal de insetos xilófagos foi descrita a espécie *Trichosporon xylopinii*, com capacidade de degradar e utilizar celulose e xilano, que são os principais componentes dos tecidos vegetais (GUJJARI et al., 2011). Houseknecht et al. (2011) isolaram do intestino de besouros passalídeos e tenebrionídeos associados com madeira em decomposição, seis espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Sugiyamaella*, além de uma nova espécie, *Candida bullrunensis*. Segundo os autores as leveduras do clado *Sugiyamaella* podem desempenhar um papel importante no processo de digestão de insetos xilófagos.

Interações entre leveduras e intestino de besouros e/ou madeira em decomposição possuem um campo enorme a ser pesquisado. No contexto amazônico, em áreas de florestas primárias e secundárias, existem muitas oportunidades de conduzir novos estudos. A partir desse ambiente, é possível identificar e caracterizar novas espécies de leveduras com aplicações biotecnológicas (BARRIGA et al., 2011; CADETE et al., 2012a; LOPES et al., 2018a).

1.3 Leveduras associadas com madeira em decomposição

A madeira é a biomassa mais abundante no ecossistema terrestre. A matéria orgânica do solo é resultante, principalmente, da decomposição de resíduos de origem vegetal (SELLE, 2007). Esses resíduos sofrem inicialmente decomposição parcial pela mesofauna e posteriormente pela microbiota decompositora (TANAHASHI; IKEDA; KUBOTA, 2018). A Amazônia é uma região tropical com alta diversidade biológica, e a maior parte da floresta está situada predominantemente sobre solos de baixa fertilidade. A sobrevivência e a produtividade da floresta dependem da sua alta diversidade vegetal, composta por espécies nativas adaptadas às condições climáticas e nutricionais do solo. Essas espécies têm uma baixa demanda por nutrientes minerais e por isso necessitam de uma eficiente reciclagem da matéria orgânica produzida pela própria floresta. A reciclagem da matéria orgânica está fortemente interligada à atividade biológica (LUIZÃO, 2007).

A composição química da madeira varia de acordo com a parte da árvore, o tipo de madeira, a localização geográfica, o clima e as condições do solo, e tudo isto influencia as comunidades microbianas associadas (CADETE; LOPES; ROSA, 2017). Os fungos que apodrecem a madeira decompõem quimicamente os polímeros estruturais deste substrato, como celulose, hemiceluloses e lignina (TANAHASHI; IKEDA; KUBOTA, 2018). O número e a ocorrência de leveduras em madeira em decomposição podem ser influenciados pelo tipo de madeira (árvore), vegetação, clima, estação, localidade, grau de decomposição do substrato e insetos participantes do processo de decomposição (CADETE; LOPES; ROSA, 2017).

Espécies de leveduras associadas à madeira em decomposição já foram isoladas em diversas localidades, incluindo regiões da Floresta amazônica no norte do Brasil (CADETE et al., 2012a; SOUZA et al., 2017; LOPES et al., 2018a). Algumas destas pesquisas resultaram na descoberta de novas espécies com capacidade de assimilar e fermentar xilose, por exemplo, *Scheffersomyces amazonensis* e *Sc. stambukii* (CADETE et al., 2012b; LOPES et al., 2018b), quatro espécies pertencentes ao clado *Spathaspora* (*Sp. brasiliensis*, *Sp. suhii*, *Sp. roraimanensis* e *Sp. xylofermentans*) (CADETE et al., 2013), assim como *Cyberlindnera xylosilytica* (CADETE et al., 2015).

Pesquisas similares também foram conduzidas em ecossistemas da Mata Atlântica brasileira. Como resultado, a partir do isolamento de leveduras foram descritas novas espécies associadas com madeira em decomposição, tais como: *Spathaspora queiroziae* (SANTOS et al., 2011); *Saturnispora bothae* (MORAIS et al., 2016a); *Spencermartinsiella silvicola* (MORAIS et al., 2016b). Quinze possíveis novas espécies foram obtidas a partir de madeira

em decomposição coletada em sítios de Mata Atlântica. Dentre estas, duas espécies (*Sugiyamaella* sp. e *Sugiyamaella xylanicola*) foram capazes de fermentar a D-xilose em etanol (MORAIS et al., 2013b). Três novas espécies de leveduras pertencentes ao clado *Spathaspora* (*Sp. girioi*, *Sp. hagerdaliae* e *Sp. gorwiae*) também foram isoladas de madeira em decomposição em regiões do ecossistema da Mata Atlântica (LOPES et al., 2016).

Estudos conduzidos em outras localidades, como a China, levaram à descoberta e à descrição de uma nova espécie de levedura fermentadora de xilose pertencente ao clado *Scheffersomyces* — *Scheffersomyces henanensis* (REN et al., 2014). Estudos conduzidos por Shi et al (2021) relataram nove espécies do gênero *Sugiyamaella*, associados com madeira em decomposição, sendo duas espécies novas (*Su. chuxiong* e *Su. yunanensis*) e sete espécies conhecidas: *Su. americana*, *Su. ayubii*, *Su. novakii*, *Su. paludigena*, *Su. valenteae*, *Su. valdiviana* e *Su. xiaguanensis*. Outra nova espécie de levedura *Candida funiuensi*, fermentadora de celobiose também isolada do ecossistema chinês foi descrita por Wang et al. (2015). Ademais, foram propostas cinco novas espécies de *Spathaspora* (*Sp. elongata*, *Sp. mengyangensis*, *Sp. jiuxiensis*, *Sp. parajiuxiensis* e *Sp. rosae*) associadas com madeira em decomposição isoladas em áreas tropicais e subtropicais do sudoeste da China (LV et al., 2020). Na Indonésia, foram descritas três linhagens de leveduras pertencentes a uma nova espécie do clado *Pichia* – *Pichia chibodasensis* – com capacidade de assimilar a D-xilose, isoladas de madeira em decomposição e do solo (KOBAYASHI; KANTI; KAWASAKI, 2017). Muitas espécies de leveduras encontradas em madeira em decomposição estão associadas a insetos que também utilizam esses *habitats* como locais de alimentação ou de reprodução. Em geral, essas associações dependem de benefícios recíprocos trocados entre os parceiros inseto-levedura (CADETE; LOPES; ROSA, 2017).

1.4 Utilização das leveduras isoladas de besouros ou madeira em decomposição para produção de bioetanol

Leveduras capazes de assimilar os açúcares relacionados com a lignocelulose são principalmente encontradas em cascas de árvores e em madeira em decomposição. Pesquisas realizadas em ecossistemas brasileiros, chineses, norte-americanos e tailandeses contribuíram na descoberta de novas leveduras que fermentam e assimilam D-xilose e/ou celobiose (CADETE; LOPES; ROSA, 2017; LOPES et al., 2018b; REN et al., 2014). A caracterização de novas espécies de leveduras e/ou a avaliação de linhagens capazes de converter D-xilose em etanol e/ou xilitol são passos importantes para desenvolver métodos de aplicações biotecnológicas (SENA et al., 2017).

As leveduras mais comuns relacionadas com madeira em decomposição ou besouros associados a este substrato são membros dos clados *Cyberlindnera*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Spencermartinsiella* e *Sugiyamaella*. Espécies destes gêneros possuem capacidade de assimilar/fermentar açúcares presentes na lignocelulose e/ou produzir enzimas que atuam na decomposição da madeira (BLACKWELL, 2017; CADETE; LOPES; ROSA, 2017; BARROS et al., 2021). Além desses clados, *Candida tropicalis* é uma espécie frequentemente encontrada em materiais vegetais em decomposição, incluindo bagaço de cana de açúcar em decomposição (CADETE; LOPES; ROSA, 2017). Morais et al. (2013b) relataram pela primeira vez a conversão de D-xilose em etanol pelas leveduras *Schwanniomyces polymorphus* e *Wickerhamomyces pijperi*, isoladas de madeira em decomposição em ecossistemas da Mata Atlântica. Sete novas espécies de leveduras (*Sugiyamaella bahiana*, *Su. bonitensis*, *Su. carassensis*, *Su. ligni*, *Su. ayubii*, *Su. valenteae* e *Su. xylolytica*) associadas à madeira em decomposição foram descritas por Sena et al. (2017). Neste trabalho, os autores reportaram a capacidade de produção de etanol e/ou xilitol a partir da D-xilose, bem como a atividade xilanolítica por estas leveduras. Ren et al. (2014) relataram o isolamento duas leveduras fermentadoras de D-xilose, cuja fisiologia e morfologia de ascósporos se assemelhavam às do gênero *Scheffersomyces*. Estas linhagens foram descritas como uma nova espécie, *Scheffersomyces henanensis*. A prospecção de leveduras nativas com atividade xilolítica e capazes de bioconverter a xilose em etanol, auxilia na obtenção novas espécies de leveduras e linhagens com potencial para a produção de bioetanol.

Morais et al. (2020) conduziram um estudo na Mata Atlântica com o objetivo de isolar espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose e produtoras de xilanase a partir de amostras de madeira em decomposição, quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Dentre as espécies obtidas, *Sc. stipitis* foi a melhor produtora de etanol, enquanto *Sp. boniae* e *Scheffersomyces* sp. foram excelentes produtores de xilitol. As espécies *Apiotrichum sporotrichoides*, *Aureobasidium pullulans*, *Saitozyma podzolica* e *Su. xylanicola* apresentaram boa atividade xilanolítica (MORAIS et al., 2020). Portanto, os estudos indicam que estes substratos são uma enorme fonte de leveduras, incluindo novas espécies, com promissoras propriedades biotecnológicas.

O gênero *Spathaspora* e a espécie *Sp. passalidarum* foram descritos pela primeira vez por Nguyen et al. (2006). Esta espécie foi isolada a partir do intestino de besouro *Odontotaenius disjunctus* (Coleoptera: Passalidae) coletado nos Estados Unidos. Na Guatemala, outras espécies não descritas dos clados *Phaffomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Spencermartinsiella* e *Sugiyamaella*, também foram isoladas a partir de

intestino de besouros passalídeos (URBINA et al., 2013a). Todas estas espécies foram capazes de assimilar xilose. Algumas das leveduras mais promissoras que apresentam a habilidade de fermentar D-xilose são membros do clado *Spathaspora*, incluindo *Sp. passalidarum* e *Sp. arborariae*. Isto tem estimulado a realização de pesquisas sobre este gênero quanto a capacidade destas leveduras em fermentar esta pentose (CADETE; ROSA, 2018). Desse modo, o potencial da interação entre besouros, madeira em decomposição e leveduras é de interesse, principalmente na prospecção de novas leveduras com capacidade de fermentar D-xilose utilizando biomassa vegetal.

Até o momento, 17 espécies de *Spathaspora* foram descritas. A partir do principal produto do metabolismo da xilose, algumas espécies foram caracterizadas como produtoras de etanol, enquanto outras foram produtoras de xilitol (CADETE et al., 2016a; RUCHALA; SIBIRNY, 2020). As espécies produtoras de etanol, como *Sp. passalidarum*, apresentaram atividades de xilose-redutase (XR) com NADH e NADPH como cofatores; já os produtores de xilitol (*Sp. roraimanensis* e outras) têm atividade XR com NADPH- dependente (CADETE et al., 2016a). Seis isolados identificados como *Sp. passalidarum* foram obtidos de besouros da família Passalidae e galerias de troncos de madeira em decomposição em uma região da floresta amazônica, e foram capazes de produzir etanol utilizando D-xilose como única fonte de carbono (SOUZA et al., 2017). Atualmente, a espécie de levedura *Sp. passalidarum*, dentre as espécies que fermentam a D-xilose, é considerada a melhor produtora de etanol, apresentando alto rendimento e produtividade de etanol, quando cultivada em meio à base de D-xilose sob condições de limitação de oxigênio ou anaerobiose (CADETE; ROSA, 2018). Neste sentido, a alta produtividade e o rendimento em etanol de *Sp. passalidarum* indicam o grande potencial desta linhagem para processos de bioetanol 2G (BERGMANN et al., 2019). Campos et al. (2022) compararam a capacidade fermentativa das espécies de levedura *Sp. arborariae*, *Sp. passalidarum* e *Sch. stipitis* em diferentes condições de cultivo. Os resultados apontaram que *Sp. passalidarum* foi a que apresentou o melhor desempenho para a fermentação de xiloses.

Com o objetivo de desenvolver um processo estável e mais eficiente para biocombustíveis, um estudo recente propôs o desenvolvimento de consórcios microbianos utilizando quatro espécies de leveduras (*Sp. passalidarum*, *Sc. stipitis*, *Candida akabanensis* e *Saccharomyces cerevisiae*). A finalidade deste estudo foi de fermentar completamente os diferentes açúcares produzidos por tratamentos mecânicos e enzimáticos de lignoceluloses (LIMA et al., 2022). Os resultados obtidos mostraram uma produção e rendimentos de etanol significativamente maiores e uma diminuição de açúcares residuais com os consórcios em

comparação com as culturas puras (PEREZ et al., 2020). Outro estudo avaliou as respostas metabólicas extracelulares e intracelulares de *Sp. passalidarum* frente a inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos durante a fermentação. Os resultados mostraram que *S. passalidarum* produziu alterações fisiológicas e bioquímicas complexas que afetaram principalmente o metabolismo de aminoácidos da levedura, e o balanço energético e redox. O perfil metabolômico revelou alvos potencialmente interessantes para engenharia genética que podem aumentar a resistência de *Sp. passalidarum* a inibidores presentes em hidrolisados de lignocelulose. Portanto, é de interesse isolar novas linhagens de *Sp. passalidarum*, e outras leveduras fermentadoras de D-xilose a partir de amostras de intestino de besouros e madeira em decomposição coletados na floresta amazônica, para avaliar o potencial destes microrganismos para produção de bioetanol e/ou xilitol.

1.5 Bioetanol

A preocupação com a demanda energética e a preservação dos recursos ambientais são dois temas em nível mundial que impulsionam a procura por fontes alternativas de energia (ZABED et al., 2017; RAJ et al., 2022). O cenário do etanol celulósico é baseado na fermentação da glicose para produzir etanol (UNREAN; KETSUB, 2018). A produção industrial de bioetanol pelas biorrefinarias brasileiras é um processo bem estabelecido, utilizando melaço de cana-de-açúcar, por outro lado, a produção de bioetanol 2G ainda necessita de melhorias de processo (FARIAS; MAUGERI-FILHO, 2021).

O bioetanol 2G é uma das fontes alternativas consideradas mais promissoras, porque tem o potencial de substituir o uso de combustíveis fósseis. Uma das razões é que os materiais lignocelulósicos provenientes da agricultura e da agroindústria são matérias-primas renováveis abundantes no mundo (CADETE; FONSECA; ROSA, 2014). Considerando a safra 2018/2019, o Brasil produziu 620,8 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, resultando em 29 milhões de toneladas de açúcar, 33,1 bilhões de litros de bioetanol e cerca de 310–380 milhões de toneladas de bagaço (SOUZA, 2020). No Brasil, a indústria de bioetanol à base de biomassa utiliza o bagaço da cana e palha, que é considerada a matéria-prima mais barata, derivada do processamento da cana (FARIAS; MAUGERI-FILHO, 2021). A economia deste esquema de processo poderia ser melhorada pelo uso eficiente de xilose disponível em matérias-primas lignocelulósicas (UNREAN; KETSUB, 2018).

A lignocelulose é uma estrutura complexa formada principalmente por celulose (40-50%), hemicelulose (25-35%) e lignina (15- 35%), além de outros componentes, como extrativos e materiais inorgânicos (RAO et al., 2016; TRAVAINI et al., 2016) (Figura 1). A

lignina é um polímero aromático heterogêneo, com estrutura tridimensional que protege e cobre a celulose, dificultando sua biodegradação. Já a celulose é um polímero linear formado por unidades de glicose que podem formar tensões ou fibrilas devido à formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, gerando estruturas recalcitrantes (TRAVAINI et al., 2016). Diferente da celulose, a hemicelulose é constituída de polímeros heterogêneos de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose) e açúcares ácidos (CADETE; LOPES; ROSA, 2017). Neste contexto, um estudo recente investigou o desempenho da fermentação de uma linhagem de *Sp. passalidarum*, para produção de bioetanol 2G visando o consumo de todos os açúcares liberados após o pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar em uma única etapa de fermentação (FARIAS; MAUGERI-FILHO, 2021). Os resultados mostraram que esta estratégia apresenta um forte potencial para melhorar a produção de bioetanol a partir da mistura de açúcares e de hidrolisados lignocelulósicos em uma única etapa de fermentação (FARIAS; MAUGERI-FILHO, 2021).

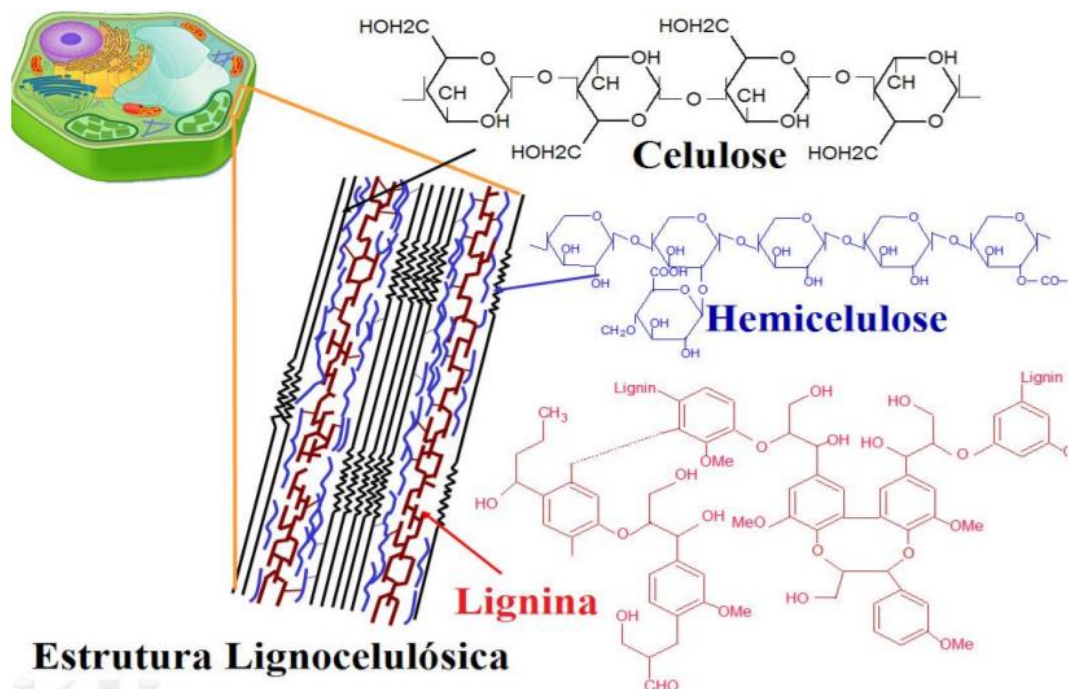


Figura 1. Estrutura lignocelulósica evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose (ZAMPIERI, 2015)

A viabilidade econômica da produção de etanol lignocelulósico depende da hidrólise da biomassa (SANTOS et al., 2016). Desse modo, a remoção de lignina da lignocelulose pode ser realizada por diferentes pré-tratamentos: físico-mecânicos, biológicos e físico-químicos

(ROCHA et al., 2015). O pré-tratamento aumenta a acessibilidade da lignocelulose às enzimas hidrolíticas da celulose de maneira a torná-la susceptível à sacarificação (FILLAT et al., 2017). Durante o processo de pré-tratamento estão presentes no hidrolisado lignocelulósico inibidores, tais como, ácidos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico), derivados de furano (furfural e 5-hidroximetil furfural), e compostos fenólicos (vanilina, siringaldeído, ácido *p*-coumarico, ácido ferúlico, 4-hidroxibenzaldeído). Estes inibidores podem inibir o crescimento microbiano e causar a redução do rendimento e da produtividade do etanol (GAO et al., 2017; SANTOS et al., 2016). A hidrólise enzimática ou sacarificação decompõe os carboidratos em açúcares fermentáveis, pela ação combinada de diferentes atividades enzimáticas. Finalmente, os microrganismos convertem açúcares em álcoois, ácidos orgânicos, alcenos, lipídios ou outros produtos químicos por meio de processos de fermentação (FILLAT et al., 2017).

Vários estudos têm focado no isolamento de espécies de levedura a partir de materiais vegetais em decomposição, principalmente aquelas que assimilam e fermentam a xilose (CADETE; LOPES; ROSA, 2017; MORAIS et al., 2020). Isso inclui estudar insetos perfurantes de madeira, para obter linhagens e/ou espécies capazes de converter essa pentose a partir da biomassa lignocelulósica em produtos valor agregado, como o xilitol e o etanol. Bazoti et al. (2017) utilizaram uma linhagem de levedura de uma nova espécie de *Wickerhamomyces* isolada de fontes lignocelulósicas, para produzir etanol 2G. O hidrolisado de cana não foi destoxificado para remover inibidores. Todavia, a levedura foi capaz de produzir etanol, mesmo na presença de ácido acético como inibidor.

A biodiversidade da Floresta amazônica tem permitido a descoberta de novas espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose. Portanto, os estudos voltados para leveduras nativas com capacidade de assimilação e fermentação de xilose, para seu emprego na produção de bioetanol são de extrema relevância para o setor biotecnológico.

1.6 Xilitol

O xilitol (1,2,3,4,5-pentol), é um álcool de açúcar natural com cinco carbonos, economicamente importante no mercado mundial de alimentos e saúde (AHUJA et al., 2020; PAL et al., 2016). Está entre os produtos microbianos mais valiosos comumente usados como adoçante, utilizado como substituto do açúcar em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Embora o xilitol seja obtido por hidrogenação da D-xilose usando catalisadores químicos sob alta temperatura e pressão, a produção biotecnológica do xilitol oferece uma melhor

alternativa no processo de produção do xilitol e do custo geral do processo (CORTEZ et al., 2016; RAO et al., 2016).

A demanda do xilitol vem aumentando nos últimos anos em decorrência de suas diversas funcionalidades e novas aplicações, sendo indispensável produzir xilitol em grande escala para atender à demanda industrial (LUGANI; PURI; SOOCH, 2021). A bioconversão de xilose para xilitol pode ser uma alternativa econômica, quando realizada por bactérias, fungos filamentosos, leveduras ou através de suas enzimas purificadas, pois todas são capazes de reduzir a D-xilose ao xilitol como ocorre no primeiro passo no metabolismo de D-xilose (CADETE et al., 2016b; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015).

Um dos maiores desafios na produção de xilitol por processos de biotecnologia é a disponibilidade de linhagens capazes de produzir altos rendimentos deste poliálcool em um contexto industrial (CADETE et al., 2012b). Neste contexto, Palladino et al. (2021) testaram as leveduras *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis* para produção de xilitol utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com suplementação de sulfato de amônio, extrato de farelo de arroz e extrato de levedura. Sugerindo que *Cy. xylosilytica* é uma candidata promissora para a produção biotecnológica de xilitol. Outro estudo, utilizou resíduos agrícolas (sabugo de milho, palha de arroz e palha de trigo) para a produção de xilitol usando as leveduras *Dabaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Pachysolen tannophilus* e *Candida guilliermondii* (SARAVANAN et al., 2021). A análise experimental e os resultados de modelagem revelaram um rendimento máximo de xilitol quando a espiga de milho foi hidrolisada com *Pa. tannophilus*. Os resultados deste estudo revelaram que produção de xilitol por *Pa. tannophilus* utilizando o hidrolisado de sabugo de milho foram os obtiveram alto rendimento de xilitol, quando comparado aos outros substratos e microrganismos estudados. Recentemente, uma nova espécie do gênero *Cyberlindnera* (*Cyberlindnera dasilvae*) isolada do intestino de besouros cerambycídeos da Guiana Francesa e madeira em decomposição da Floresta amazônica no Brasil, apresentou capacidade de converter D-xilose em xilitol (BARROS et al., 2021). Portanto, a abordagem biológica torna-se promissora para a produção em larga escala de produtos como o xilitol. Assim, a melhoria de linhagens e o desenvolvimento de processos envolvendo substratos alternativos de baixo custo, como a lignocelulose, são áreas essenciais com imensas possibilidades futuras (AHUJA et al., 2020).

2. JUSTIFICATIVA

A riqueza de espécies no bioma amazônico permanece ainda relativamente pouco explorada em relação à diversidade e à potencialidade para a obtenção de produtos biotecnológicos. O número reduzido de espécies de leveduras até o momento descrito e estudado a partir do bioma amazônico quanto a potenciais aplicações motiva a busca por novas espécies, bem como sua caracterização quanto ao potencial biotecnológico. Estudos indicam que o conteúdo intestinal de besouros é rico em espécies/linhagens de leveduras novas para a ciência. Besouros da família Passalidae são encontrados em troncos de madeira em decomposição e têm permitido a descoberta de novas espécies de leveduras, muitas das quais fermentadoras de D-xilose, o açúcar mais abundante da fração hemicelulose da madeira. Desse modo, é de interesse estudar linhagens de leveduras isoladas a partir de madeira em decomposição, além do trato intestinal de besouros passalídeos, bem como suas larvas e galerias, coletados em áreas da Floresta amazônica no norte do Brasil. Nesse cenário, a prospecção e a descrição de leveduras nativas com capacidade de assimilação e fermentação de pentoses, utilizando biomassa vegetal, são de grande importância para o emprego direto na produção de bioetanol. Essa produção utiliza resíduos vegetais disponíveis, sem competir com áreas agrícolas. Além disso, representa uma alternativa promissora economicamente viável em relação aos combustíveis fósseis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar leveduras presentes em madeira em decomposição, larvas e trato intestinal e galerias de besouros da família Passalidae em áreas da Floresta amazônica em Itacoatiara – estado do Amazonas, e testar a fermentação de D-xilose pelas linhagens encontradas para a produção do etanol de segunda geração e/ou xilitol.

3.2 Objetivos Específicos

1. Isolar novas linhagens de *Sp. passalidarum* e outras leveduras provenientes de amostras de madeira em decomposição, do intestino de besouros e larvas da família Passalidae e de galerias destes insetos coletadas a partir da Floresta amazônica brasileira.
2. Selecionar, dentre os microrganismos isolados, leveduras capazes de fermentar D-xilose produzindo etanol e/ou xilitol.
3. Caracterizar e identificar as leveduras isoladas por meio de métodos moleculares.
4. Verificar a fermentação de D-xilose em ensaios de bancada em meio complexo e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar.
5. Determinar os parâmetros fermentativos das leveduras selecionadas.
6. Depositar os isolados na coleção de Microrganismos e Células da UFMG.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de coleta

A coleta da madeira em decomposição, de besouros e larvas da família Passalidae e de galerias (tuneis de adultos e larvas) destes insetos foi realizada em três pontos na floresta amazônica: no ramal da comunidade Sol Nascente – Piquiá ($S03^{\circ}01.045' W058^{\circ}28.830'$) (Figura 2A), no Campus II da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no quilômetro 260 da Rodovia AM-010 ($S03^{\circ}05.654' W058^{\circ}27.464'$) (Figura 2B), e nos arredores do aeroporto ($S03^{\circ}07'37.3'' W58^{\circ}28'24.6''$) (Figura 2C), no município de Itacoatiara – AM, durante o mês de fevereiro de 2019 (início da estação da cheia no estado do Amazonas).



Figura 2. Ponto de coleta: (A) Ramal da comunidade Sol Nascente – Piquiá; (B) Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no quilômetro 260 da Rodovia AM-010; (C) Arredores aeroporto – Itacoatiara/AM

4.2 Coleta e processamento das amostras

4.2.1 Coleta de larvas e besouros e deposição de espécimes em coleção de artrópodes

As coletas de besouros e larvas foram feitas nos arredores do município de Itacoatiara, com o auxílio de pinças estéreis. Os insetos foram colocados individualmente em placas de Petri estéreis (Figuras 3 e 4). Esse material foi levado o mais rapidamente possível ao laboratório de micologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET – da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Os insetos foram transportados vivos, com fragmentos de cascas. Os insetos que não foram dissecados em até 3 dias da coleta, foram armazenados a -20°C até o uso (RIVERA et al., 2009).

Os exemplares de besouros foram identificados pelo doutorando Marcus Vinicius Oliveira Bevilaqua sob supervisão do entomologista Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca. Os critérios utilizados para a identificação foram diferenças morfológicas tais como: coloração preta, formato da cabeça, aparelho bucal tipo mastigador; e pelo fato de que esses insetos se encontrarem invariavelmente em galerias de troncos de madeira em decomposição. Os espécimes foram depositados na coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).



Figura 3. Coleta de besouros Passalidae (Foto: Katharina O. Barros, 2019)



Figura 4. Larva de besouro Passalidae

4.2.2 Isolamento de leveduras de larvas e trato intestinal de besouros

Os besouros e larvas foram mantidos em placas de Petri estéreis por 3 dias, sem alimentação, antes da dissecação. Segundo Suh e Blackwell (2004), manter os espécimes sem alimento auxilia na eliminação de alguns organismos contaminantes que possam ser eventualmente isolados do intestino. Em seguida, os insetos foram congelados até sua morte e sofreram desinfecção superficial por submersão em etanol 70% (5 min), água sanitária 2,5% (w/v) (5 min) e água estéril (10 min) antes da remoção do intestino. A semeadura da água utilizada no final do processo de desinfecção é essencial para fornecer um controle para monitorar a presença de microrganismos de superfície em cada dissecação (URBINA et al., 2013a). A água (100 μ L) foi semeada em ágar YM acidificado (peptona 0,5%; extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; dextrose 1%; ágar 2%; água destilada 1000mL, suplementado com cloranfenicol 0,02%; pH ajustado a 3,5 com ácido clorídrico), como controle negativo (SUH; BLACKWELL, 2004).

O intestino foi removido assepticamente com um bisturi com o auxílio de uma lupa. O intestino grosso foi cortado com um bisturi estéril em três partes que foram esmagadas, com auxílio de uma pinça, em microtubos de 2ml estéreis, contendo 1000 μ L de solução salina 0,9% e realizado a diluição de 10^{-1} (Figuras 5 e 6). Foram semeados 100 μ L deste macerado

puro e da solução 10^{-1} em ágar YM acidificado e YNB-xilose (D-xilose 1%; yeast nitrogen base 0,67%; cloranfenicol 0,02%, água destilada 1000mL). Este procedimento foi realizado em duplicata [modificado a partir de Ravella et al. (2011)]. As culturas foram incubadas a temperatura ambiente ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 5 dias, e colônias individuais foram purificadas por ao menos 2 repiques sucessivos em ágar YM.



Figura 5. Remoção de forma asséptica do intestino do besouro passalideo.

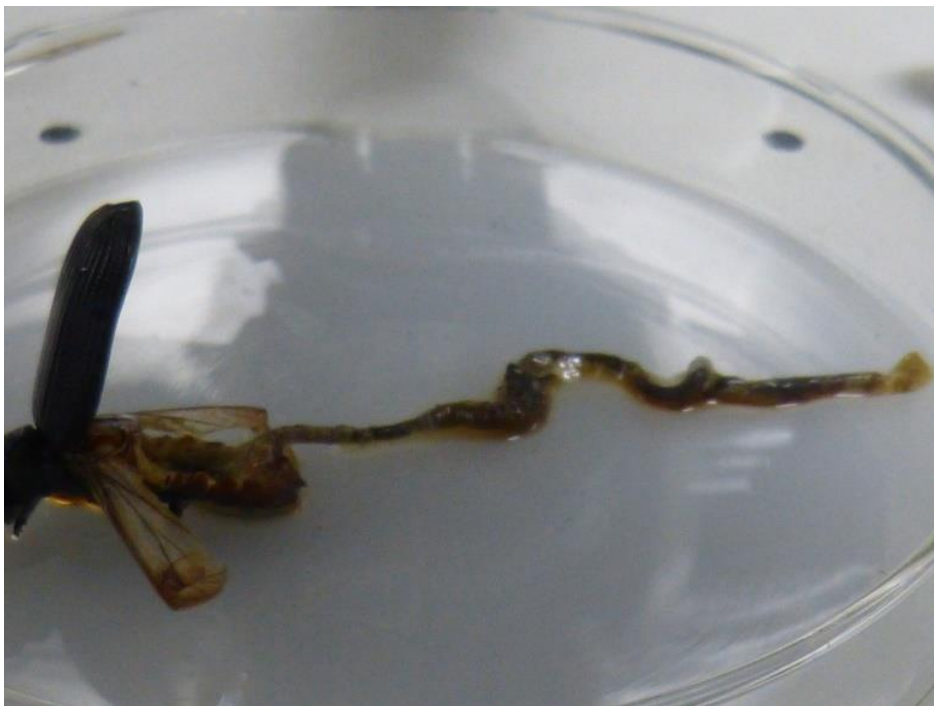


Figura 6. Intestino do besouro passalideo removido assepticamente

4.2.3 Coleta e isolamento de leveduras em galerias de besouros/larvas em madeira em decomposição

Para o isolamento de leveduras provenientes de galerias de besouros/larvas Passalidae foram autoclavados 30 tubos de ensaio com rosca contendo 1mL de salina (0,9%) estéril. Swabs embebidos nesta solução salina foram rotacionados dentro de galerias onde foram encontrados besouros e/ou larvas de besouros Passalidae (Figura 7). Posteriormente esse swab foi mantido dentro do tubo de ensaio estéril e levado ao Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET – da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Para semeadura, os tubos foram homogeneizados no vórtex por 10 segundos para agitação e com o auxílio do próprio swab espalhados na placa em ágar YM acidificado e YNB-xilose, este procedimento foi realizado em duplicata. As culturas foram incubadas a 30°C por 5 dias, e colônias individuais de cada morfotipo diferente foram purificadas por ao menos 2 repiques sucessivos em ágar YM.



Figura 7. Swab rotacionado dentro de uma galeria de besouro passalídeo.

4.2.4 Isolamento de leveduras de madeira em decomposição

Foram coletadas 20 amostras de madeira em decomposição em cada sítio de coleta (Figura 8). Um grama de cada amostra de madeira foi adicionado separadamente em frascos contendo 15 mL do meio líquido YNB-xilana (xilana 1%; yeast nitrogen base 0,67%; cloranfenicol 0,02%; pH $5,0 \pm 0,2$.) e 15 mL do meio líquido YNB-D-xilose (D-xilose 0,5 %;

yeast nitrogen base 0,67 %; cloranfenicol 0,02 %). Os frascos foram incubados em agitador horizontal a 150 r.p.m. e 25°C por 3 a 7 dias. Dos frascos que apresentaram crescimento positivo, caracterizado pela turvação do meio, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida a tubos contendo 5 mL do meio YNB-xilana ou D-xilose. Os tubos foram incubados sob as mesmas condições anteriores e dos tubos que apresentaram crescimento, uma alçada foi semeada separadamente em placas contendo ágar YM. As placas foram incubadas a 25 °C até a observação do desenvolvimento de colônias (CADETE et al., 2009; CADETE et al., 2011). Uma ou mais colônias de cada morfotipo diferente foi isolada e purificada por ao menos 2 repiques sucessivos em ágar YM.



Figura 8 – Amostra de madeira em decomposição.

4.2.5 Purificação e manutenção das leveduras

Das placas que apresentaram crescimento de leveduras, pelo menos uma colônia de cada morfotipo foi descrita quanto às suas características macroscópicas, purificada em meio ágar YM (glicose 1 %, extrato de levedura 0,3 %, extrato de malte 0,3 %, peptona bacteriológica 0,5 %, ágar 2 %) e preservada em caldo GYMP (glicose 2 %, extrato de levedura 0,5 %, extrato de malte 1 %, Na₂PO₄ 0,2 %) com 20 % de glicerol a – 80 °C. As leveduras isoladas durante o estudo foram depositadas na Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.3 Identificação das leveduras

As leveduras obtidas foram preliminarmente agrupadas de acordo com suas características morfológicas e testes fisiológicos e bioquímicos, segundo procedimento padrão (KURTZMAN et al., 2011). As leveduras com perfis fisiológicos idênticos foram submetidas à análise molecular, por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando-se o iniciador GTG₅ para a realização do agrupamento em perfis moleculares distintos.

4.3.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA total, as linhagens foram crescidas em ágar YM por 24 horas a 25 °C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise (25 mL de solução de Tris 1M e ácido clorídrico; 5 mL de solução de EDTA 0,5M; 10 mL de solução de cloreto de sódio e 50 mL de solução SDS a 10%) e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Decorrida essa etapa do processo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) aos tubos, e homogeneizados por inversão e centrifugados a 14.800 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo, e adicionados v/v de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente para precipitação do DNA. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 13.200 rp.m. por 10 minutos. O sobrenadante descartado por inversão, e ao *pellet* formado foram acrescentados 200 µL de etanol 70 %. As amostras centrifugadas a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. A lavagem do DNA com etanol foi repetida mais uma vez, e, na última etapa do processo, o etanol foi retirado com auxílio de pipeta e descartado, e os tubos incubados *overnight* à temperatura ambiente para evaporação do álcool. Após essa etapa, o DNA foi ressuspensado em 100 µL de tampão Tris EDTA 0,1 M (TE) pH 8 e estocado a – 20 °C.

4.3.2 PCR com o iniciador GTG₅

Para o agrupamento das leveduras em perfis moleculares foram utilizadas a técnica de impressão digital de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase, utilizando o iniciador específico GTG₅ (5'GTGGTGGTGGTGGTG3'), segundo protocolo descrito por Lieckfeldt, Meyer e Borner (1993). Os ensaios foram realizados, utilizando-se 2,5µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1µL de dNTP 2,5mM (Invitrogen, EUA), 1,5µL de MgCl₂ 25 mM (MBI Fermentas), 2µL do iniciador (GTG)₅ 10pmol (Invitrogen, EUA), 0,2µL de taq DNA polimerase 1,25U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA a 200ng/µL. O volume final da reação ajustado com água deionizada para 25µL. A reação foi conduzida em termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguidos de extensão final a 72°C por seis minutos. Após as reações de amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5x (Tris-Borato-EDTA – 89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA) a 80V. As amostras foram coradas com GelRed (Biotium, EUA), visualizadas sob luz ultravioleta.

4.3.3 Amplificação de regiões do gene do rRNA

Das leveduras que apresentaram perfis fisiológicos e moleculares distintos, uma amostra foi selecionada para o sequenciamento. A reação de PCR foi realizada de acordo com Lachance et al. (1999), em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR Fermentans 10 X, 2 µL de MgCl₂ 1,5M, 2 µL de dNTP 0,05 mM, 1 µL dos iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') a 10 pmol/µL, 1 µL de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Taq DNA Polymerase Fermentans) e água Milli-Q q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Eppendorf AG 6325 (Eppendorf). O programa de ciclagem constituiu-se de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos seguida de extensão a 72°C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TBE 0,5 X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) durante 20 min a 120 mV. Os *amplicons* previamente corados com solução de GelRed (Biotium), visualizados sob luz ultravioleta.

4.3.4 Amplificação das regiões de codificação (RPB1, XYL1)

Para espécies onde as regiões D1/D2 e ITS não permitiram a discriminação em nível de espécie, as regiões codificadoras RPB1 (RNA polymerase II large subunit) e XYL1

(xylose reductase) foram sequenciadas. A amplificação foi realizada com os primers RPB1-Af (5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3') (STILLER; HALL, 1997) e RPB1-Cr (5'-CCNGCDATNTRTTRTCCATRTA-3') (MATHENY et al., 2002). Para o fragmento do gene XYL1, foram utilizados primers degenerados XYL1-forward (5'-GGTYTTYGGMTGYTGGAARSTC-3') e XYL1-reverse (5'-AAWGATTGWGGWCCRAAWGAWGA-3') (URBINA; BLACKWELL, 2012). O programa de amplificação por PCR para essas duas regiões foi realizado conforme descrito por Urbina e Blackwell (2012). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X; 3,0 µL de MgCl₂ (25 mM); 2,0 µL de dNTPs 10 mM (2,5 mM cada); 1,0 µL de cada um dos primers a 10 pmol/µL, 1,0 µL de DNA (150 ng/µL), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e completando com água Milli-Q até um volume final de 50 µL. A verificação dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese com gel de agarose 1% a 120mV por 20min em tampão TBE 0,5 X. Os *amplicons* previamente corados com solução de GelRed (Biotium), visualizados sob luz ultravioleta.

4.3.5 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento

Para purificação dos *amplicons* gerados pela reação de PCR, foram adicionados aos tubos 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para a precipitação do DNA. Em seguida, centrifugados por 25 minutos a uma rotação de 13.000 r.p.m.. O sobrenadante foi descartado, e 120 µL de etanol 70% (v/v) adicionados para lavar o sedimento. A mistura foi homogeneizada por inversão. Em seguida, realizada uma nova centrifugação a 13.000 r.p.m. por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado novamente. Os tubos foram incubados *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. O DNA será então ressuspendido em 10 µL de água Milli-Q. O produto obtido foi quantificado por espectrometria, utilizando NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

4.3.6 Sequenciamento de Sanger

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas utilizando o Kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730 em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems) preparada para um volume final de 10 µL, sendo: 1 µL do iniciador (NL1, NL4, ITS1 ou ITS4 a 5 pmol/µL), 1 µL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 µL de Big Dye, 1 µL de DNA (contendo entre 5 e 20 ng/µL) e o restante do volume completado com água Milli-Q. O

programa de termociclagem utilizado consistiu em uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de hibridação a 50°C e 4 minutos de extensão final a 60°C. Para reação de precipitação, foi adicionado aos produtos do sequenciamento 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3 molares e 50 µL de etanol absoluto (Merck) em cada poço. A microplaca foi homogeneizada brevemente em vórtex por 10 segundos e deixada em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 4000 r.p.m. a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 4000 r.p.m. à 4 °C. Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão. Após evaporação do etanol a placa foi selada e armazenada a 4°C, protegida da luz e encaminhada ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou de Belo Horizonte, Minas Gerais. Em cada poço foi acrescentado 10µL de formamida, seguida de desnaturação 95°C por 3 minutos mais gelo.

4.3.7 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram submetidas à análise de qualidade utilizando o *Electropherogram quality analysis*, disponível no site da Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Foram selecionadas bases contíguas, com valor de *phred* maior que 20, e comparadas com as sequências depositadas no GenBank utilizando o programa BLASTn (*Basic Locus Alignment Search Tool*) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), sendo comparadas com aquelas depositadas no GenBank. Os isolados que apresentaram 99% ou mais de similaridade na sequência analisada com a outra depositada anteriormente no GenBank, foram consideradas como pertencentes a mesma espécie apresentada. Por outro lado, as sequências analisadas que apresentaram similaridade menor ou igual a 98% com a espécie depositadas no GenBank, foi considerada como “similar” podendo representar uma possível espécie nova.

4.4 Análise de diversidade

Para a análise da riqueza, foram feitas curvas de acumulação de espécies para os locais de coleta e por substratos amostrados. Curvas integradas de rarefação/extrapolação com base no tamanho e cobertura da amostra foram calculadas com base nos três primeiros números de Hill: $q = 0$ (riqueza de espécies); $q = 1$ (índice de Shannon); $q = 2$ (índice de Simpson) (CHAO et al., 2012; CHAO; JOST, 2014). Foram feitas extrapolações, com valores de até

250 indivíduos. A comparação dos padrões dos estimadores entre as partições foi realizada utilizando o intervalo de confiança de Hill do método Bootstrap, como a média de 999 repetições. As estimativas foram obtidas usando o pacote R "iNEXT" (HSIEH et al., 2016)

Diagramas de Venn foram construídos para mostrar a similaridade das comunidades de leveduras em relação aos sítios de coleta e substratos. Os diagramas foram gerados utilizando um programa online *Bioinformatics & Evolutionary Genomics* (disponível em <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

4.5 Ensaio de fermentação

4.5.1 Fermentação em meio YPX

As leveduras foram previamente cultivadas em 50 mL de meio YPX (D-xilose 20 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹) e incubadas em agitador horizontal a 200 r.p.m. a temperatura de 30°C por 24 horas. Para a obtenção do inóculo, as células foram recuperadas por centrifugação a 2600 x g por 15 minutos, lavadas em solução salina 0,85% estéril e ressuspensas no meio de fermentação na concentração celular inicial de 0,5 g L⁻¹. As fermentações foram conduzidas em triplicata, em frascos de 125 mL, contendo 50 mL do meio YPX com concentração inicial de D-xilose a 30 g L⁻¹, tampados com rolhas de algodão hidrofóbico e gaze esterilizadas e incubados em agitador horizontal à temperatura de 30°C e 200 r.p.m. por 72 horas. Os ensaios foram monitorados por meio da retirada de alíquotas de 1 mL das amostras nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. As amostras coletadas foram centrifugadas por 15 minutos a 2600 x g, e o sobrenadante devidamente identificado e armazenados a - 20°C para análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high-performance liquid chromatography*) (PALLADINO et al., 2021).

4.5.2 Fermentação em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar

O hidrolisado hemicelulósico foi fornecido pelo Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (Universidade de São Paulo – USP). O hidrolisado foi obtido pela hidrólise ácida do bagaço de cana de açúcar conduzida em reator de aço inox de 250 L a 120 °C por 20 minutos, utilizando-se ácido sulfúrico 98 % na proporção 1:10 (100 mg de H₂SO₄/g de bagaço). O hidrolisado foi filtrado e concentrado a vácuo em cinco vezes seu volume inicial a 70 °C. Para reduzir os inibidores, foi realizado um ensaio de destoxificação conforme descrito em Alves et al. (1998). Primeiro o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de óxido de cálcio (CaO) e depois diminuindo para pH 5,5 com ácido fosfórico (H₃PO₄), seguido

da adição de 2,5 % p/v de carvão vegetal ativado em pó, e mantido sob agitação a 200 r.p.m. à temperatura de 30°C por uma hora. O precipitado resultante foi removido por filtração a vácuo. O hidrolisado tratado foi autoclavado a 111°C por 15 minutos. Após esterilização, o hidrolisado foi suplementado com extrato de levedura (3 % p/v). A concentração inicial de D-xilose do hidrolisado foi verificada por HPLC. A composição final encontrada para a realização do experimento foi de aproximadamente 57,5 g L⁻¹ de D-xilose; 4,6 g L⁻¹ glicose; 3,1 g L⁻¹ ácido acético e 1,1 g L⁻¹ glicerol.

As leveduras foram previamente crescidas em meio YPX (D-xilose 30 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹ e extrato de levedura 10 g L⁻¹), e os mesmos procedimentos para a obtenção do inóculo no ensaio em meio semissintético foram realizados conforme descrito por Palladino et al (2021). Os ensaios foram conduzidos em triplicata, em frascos de 125 mL, contendo 50 mL do hidrolisado suplementado com uma concentração celular inicial de 0,5 g L⁻¹. Os frascos foram incubados em agitador horizontal à temperatura de 30°C e 200 r.p.m. por 96 horas. Os ensaios foram monitorados por meio da retirada de alíquotas de 1 mL das amostras nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras coletadas foram devidamente identificadas e estocadas a -20°C para análises posteriores (PALLADINO et al., 2021).

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Determinação da concentração de açúcares, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol

As concentrações de xilose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol em meio complexo (YPX), além de glicose, xilose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foram determinadas por HPLC, como descrito anteriormente.

4.6.2 Cálculo dos parâmetros fermentativos

Os parâmetros fermentativos $Y_{p/s}^{EtOH}$ (fator de conversão de açúcares em etanol, g/g), $Y_{p/s}^{XOH}$ (fator de conversão de xilose em xilitol, g/g), Q_p^{EtOH} (produtividade em etanol, g L⁻¹ h⁻¹), Q_p^{XOH} (produtividade em xilitol, g L⁻¹ h⁻¹) e o consumo de açúcares (xilose e/ou glicose, %) foram calculados como respostas aos ensaios experimentais. Os fatores de conversão de açúcares em etanol e de xilose em xilitol correlacionam o ΔP produzido (ΔP_{etanol} ou $\Delta P_{xilitol}$) com ΔS consumido (substrato consumido S para produzir o produto P). O coeficiente angular da reta que passa pela origem fornece a estimativa de $Y_{p/s}^{EtOH}$ e $Y_{p/s}^{XOH}$. A produtividade em etanol ou xilitol [Q_p (g L⁻¹ h⁻¹)] foi determinada pela razão entre a concentração de etanol (g L⁻¹) ou xilitol (g L⁻¹) e o tempo de produção (horas). O consumo de xilose e/ou glicose (%) foi

calculado como porcentagem dos açúcares consumidos a partir da concentração inicial (PALLADINO et al., 2021). As análises estatísticas foram realizadas utilizando teste Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal dos dados. A análise dos dados foi realizado por meio de um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (análogo à ANOVA) seguido do teste Dunn's *post hoc* para comparação de médias ao nível de significância de 5%. As análises foram realizadas usando o programa PAST4.11.

5. RESULTADOS

No presente trabalho foram coletados um total de 35 espécimes de besouros da família Passalidae, 11 larvas, 29 swabs de galerias de besouros e 60 amostras de madeira em decomposição em três pontos na floresta amazônica. O número de espécimes de besouros e larvas assim como das galerias não foram determinados estatisticamente, sendo coletados os que foram encontrados em cada sítio estudado (APÊNDICE A). Com relação a madeira em decomposição foram coletadas vinte amostras de cada localidade conforme descrito anteriormente. Os besouros foram identificados no laboratório de Entomologia (INPA) como pertencentes a família Passalidae (tabela 1). As larvas foram identificadas somente em nível de família (Passalidae). No campus II da UFAM foi a localidade onde foi encontrado o maior número de espécimes de besouros (24), com destaque para *Passalus latifrons* (Percheron, 1841) com 12 espécimes.

Tabela 1 – Identificação das espécies de besouros coletados por localidade.

Local da coleta	Gênero	Espécie	Nº de espécimes
Aeroporto	<i>Passalus</i>	<i>Passalus coniferus</i> (Eschscholtz, 1829)	2
		<i>Passalus variiphyllus</i> (Kuwert, 1891)	3
	<i>Spasalus</i>	<i>Spasalus aquinoi</i> (Fonseca 1990)	2
	<i>Veturius</i>	<i>Veturius magdalenae</i> (Boucher, 2005)	1
		<i>Veturius paraensis</i> (Luederwaldt, 1927)	1
Piquiá	<i>Passalus</i>	<i>Passalus latifrons</i> (Percheron, 1841)	1
	<i>Popilius</i>	<i>Popilius marginatus</i> (Percheron, 1835)	1
UFAM (Campus II)	<i>Passalus</i>	<i>Passalus abortivus</i> (Percheron, 1835)	2
		<i>Passalus amazonicus</i> (Kuwert, 1891)	1
		<i>Passalus latifrons</i> (Percheron, 1841)	12
	<i>Popilius</i>	<i>Popilius marginatus</i> (Percheron, 1835)	1
	<i>Veturius</i>	<i>Veturius cephalotes</i> (Le Peletier and Serville, 1825)	1
		<i>Veturius magdalenae</i> (Boucher, 2005)	5
		<i>Veturius sinuosus</i> (Drapiez, 1820)	2

A partir destas amostras foram obtidos 330 isolados de leveduras (Figura 9), distribuídos em 24 gêneros [filo Ascomycota (18) e Basidiomycota (6)]. Cento e quarenta e três isolados foram obtidos do intestino de besouros, sendo 65 isolados em meio YM e 78 em meio contendo xilose como única fonte de carbono. Foram obtidos 71 isolados provenientes de galerias de besouros, sendo 47 isolados em meio YM e 24 em meio contendo xilose. Dos 34 isolados de larvas de besouros, 13 foram isolados em meio YM e 21 em meio contendo

xilose. Com relação a madeira em decomposição foram isolados um total de 82 leveduras, sendo que 47 foram isolados em meio líquido YNB-xilana e 35 em meio líquido YNB-xilose.

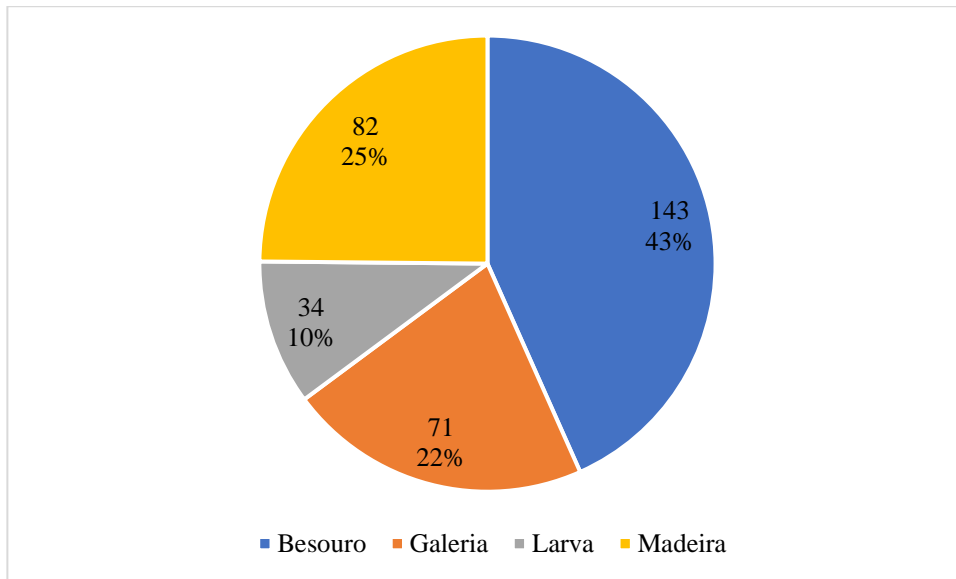


Figura 9. Isolados de leveduras por substrato coletados em sítios de bioma amazônico.

5.1.1 Identificação dos isolados de leveduras

No presente trabalho, 135 isolados (57 isolados em meio YM e 78 em meio xilose) de levedura provenientes do intestino de besouro foram identificados como pertencentes a 12 gêneros (*Apiotrichum Candida/Lodderomyces*, *Colacogloea*, *Kuraishia*, *Lodderomyces*, *Ogataea*, *Saitozyma*, *Scheffersomyces*, *Schwanniomyces*, *Spathaspora*, *Spencermartinsiella*, *Sugiyamaella*, *Vanrija*) nas três localidades (Figura 10). As espécies mais abundantes encontradas foram dos gêneros *Apiotrichum* (13 isolados, 9,6%), *Scheffersomyces* (12 isolados, 8,9%) e *Sugiyamaella* (75 isolados, 55,6%). Os resultados mostraram um elevado número de possíveis novas espécies principalmente do gênero *Sugiyamaella* nas três localidades (Tabela 2). Quatro isolados de *Sp. passalidarum* foram obtidas de amostras do intestino de besouros na região do Aeroporto.

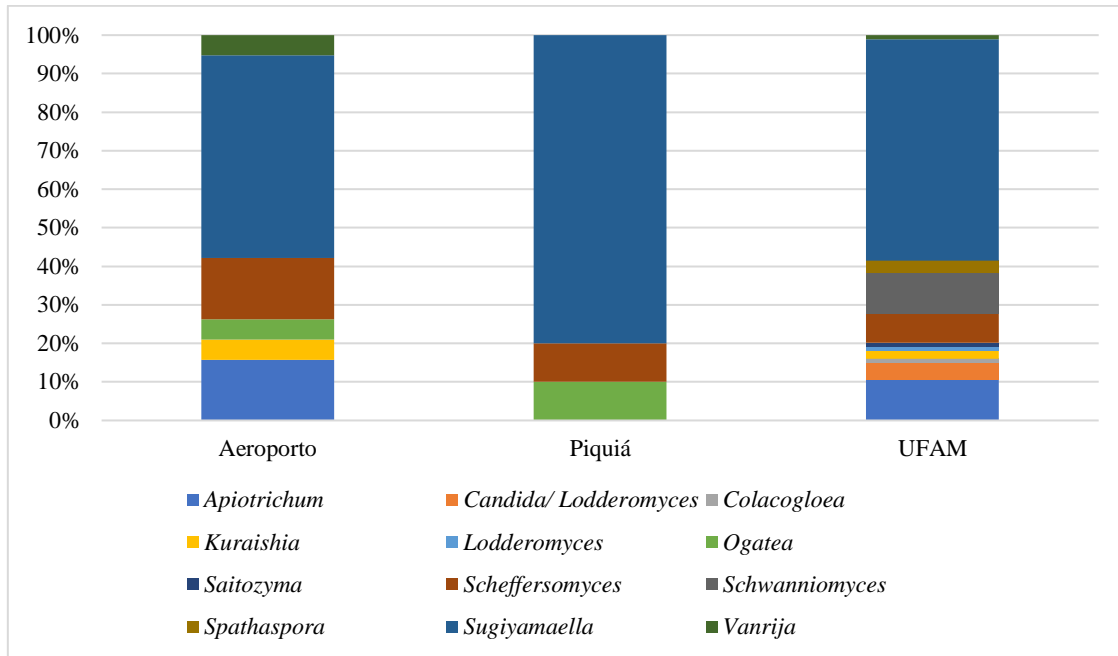


Figura 10. Frequência de ocorrência dos gêneros de leveduras isoladas do intestino de besouros passalídeos por localidade em sítios de bioma amazônico.

Tabela 2 - Número de isolados de possíveis novas espécies de leveduras provenientes do intestino de besouros por localidade.

Espécies	Aeroporto	Piquiá	UFAM	TOTAL
<i>Candida</i> sp. 1 (clado <i>Clavispora</i>)	1			1
<i>Colacogloea</i> sp.			1	1
<i>Ogatea</i> sp.	1	1		2
<i>Scheffersomyces</i> sp.	1			1
<i>Spathaspora</i> sp. 1			1	1
<i>Spencermartinsiella</i> sp.	1			1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 1	1	1	4	6
<i>Sugiyamaella</i> sp. 2	2	1	4	7
<i>Sugiyamaella</i> sp. 3			1	1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 4	1		9	10
<i>Sugiyamaella</i> sp. 5		1	11	12
<i>Sugiyamaella</i> sp. 6	1	5	10	16
<i>Sugiyamaella</i> sp. 7	1			1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 8	2		1	3
<i>Sugiyamaella</i> sp. 9	1			1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 10			1	1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 11	3		7	10
<i>Sugiyamaella</i> sp. 18			1	1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 21	1			1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 22			1	1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 23			4	4
<i>Vanderwaltozyma</i> sp.	1			1
<i>Vishniacozyma</i> sp.	1			1

Das leveduras obtidas de galerias de besouros foram identificados 66 isolados, distribuídos em 11 gêneros (*Apiotrichum*, *Candida/ Lodderomyces*, *Hanseniaspora*, *Limtongozyma*, *Ogataea*, *Scheffersomyces*, *Schwanniomyces*, *Spathaspora*, *Spencermartinsiella*, *Sugiyamaella*, *Syzygospora*). A espécie *Sp. passalidarum* foi isolada de galerias somente na região do Aeroporto, com apenas um representante (Figura 11). *Spathaspora* apresentou duas possíveis novas espécies, com apenas um isolado de cada obtidos da região da UFAM (*Spathaspora* sp. 1) e do Piquiá (*Spathaspora* sp. 2). O gênero *Sugiyamaella* foi representado por oito novas espécies.

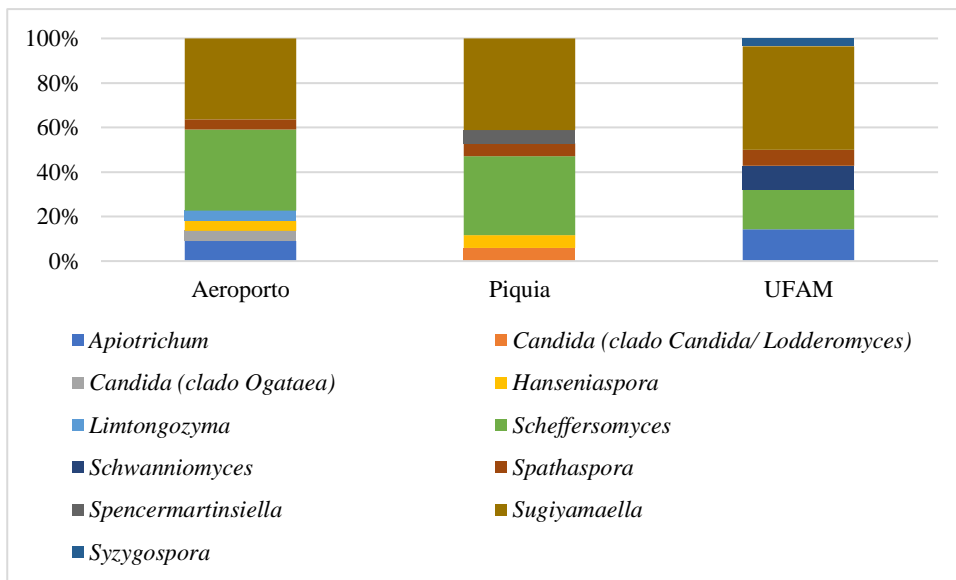


Figura 11. Frequência de ocorrência de gêneros de leveduras isoladas em galeria de besouros passalídeos por localidade.

Os 34 isolados de leveduras obtidos de larvas de besouros passalídeos foram identificados como pertencentes a sete gêneros (*Apiotrichum*, *Candida/ Lodderomyces*, *Rhodotorula*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Sugiyamaella*, *Vanderwaltozyma*) (Figura 12). *Sp. passalidarum* foi isolada de larvas nas regiões do Aeroporto e Piquiá com apenas um representante de cada localidade. O gênero *Sugiyamaella* apresentou 11 diferentes espécies, sendo dez prováveis espécies novas.

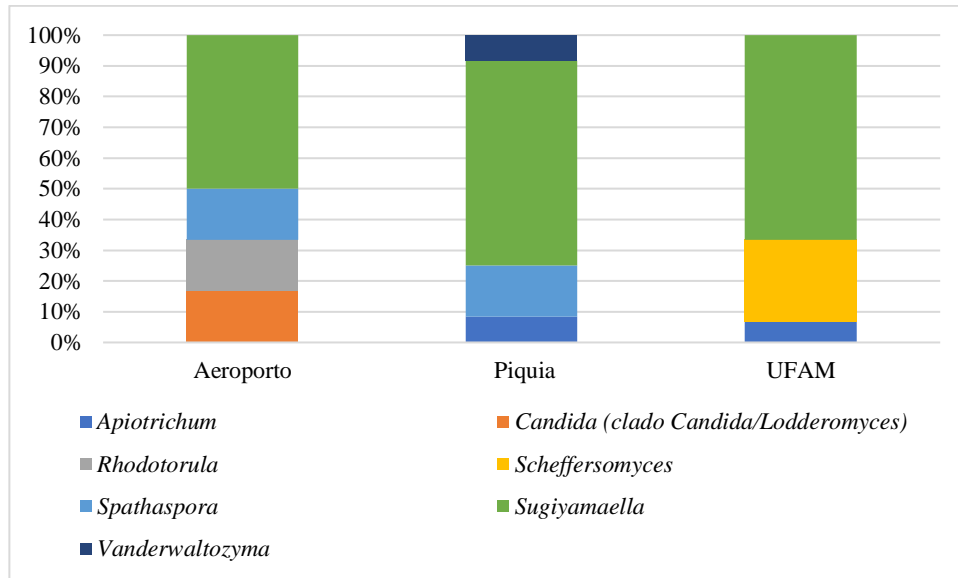


Figura 12. Frequência de ocorrência de gêneros de leveduras isoladas de larvas de besouros por localidade.

Com relação a madeira em decomposição foram obtidos oitenta e dois isolados de levedura, identificadas e distribuídas em 14 gêneros (*Apiotrichum*, *Clavispora*, *Yamadazyma*, *Cyberlindnera*, *Kuraishia*, *Kurtzmaniella*, *Meyerozyma*, *Middelhovenomyces*, *Ogataea*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Spencermartinsiella*, *Sugiyamaella*, *Vanrija*) (Figura 13). Foram obtidas quatro linhagens de *Sp. passalidarum* de amostras de madeira em decomposição na região do Aeroporto. Na tabela 3 são apresentados o número de isolados de possíveis novas espécies obtidas de madeira em decomposição nos três sítios de coleta.

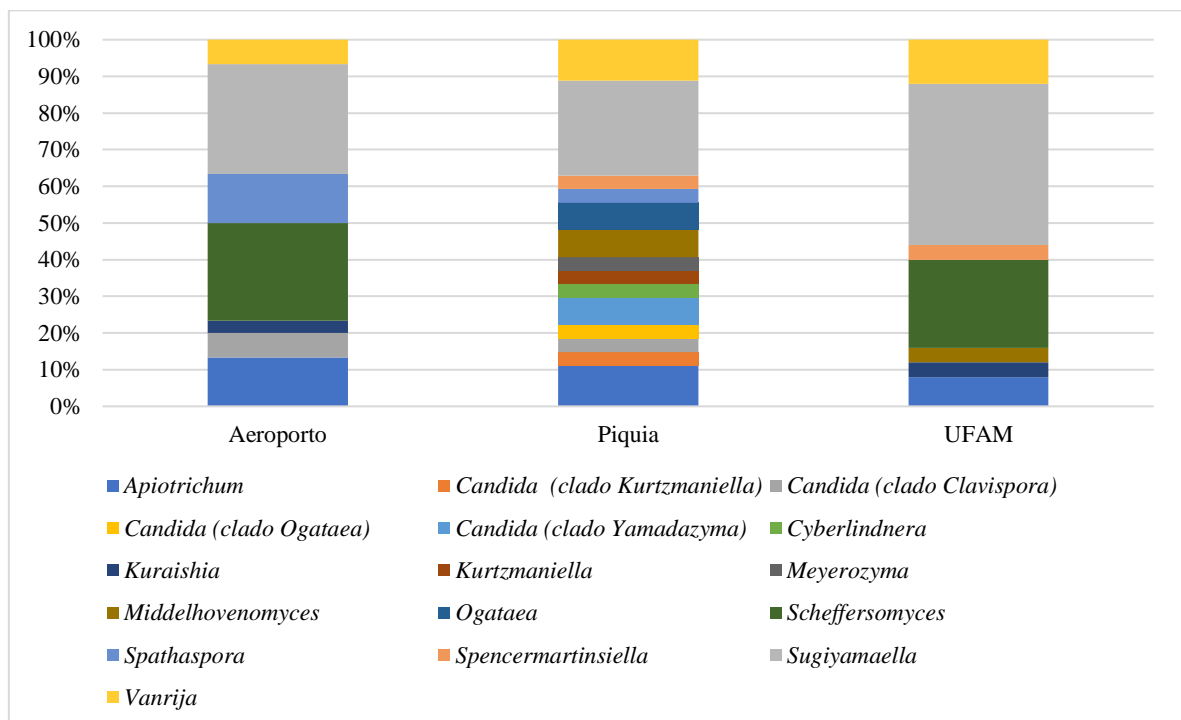


Figura 13. Frequência de ocorrência de gêneros de leveduras isoladas de madeira em decomposição.

Tabela 3 - Número de isolados de possíveis novas espécies de leveduras de madeira em decomposição por localidade.

Espécies	Aeroporto	Piquiá	UFAM	TOTAL
<i>Apiotrichum</i> sp.		1		1
<i>Candida</i> sp. 2 (clado <i>Yamadazyma</i>)		2		2
<i>Middelhovenomyces</i> sp.			1	1
<i>Ogataea</i> sp.		2		2
<i>Scheffersomyces</i> sp.	3		3	6
<i>Spencermartinsiella</i> sp.		1	1	2
<i>Sugiyamaella</i> sp. 1		1	1	2
<i>Sugiyamaella</i> sp. 2		1		1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 3		1		1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 4			3	3
<i>Sugiyamaella</i> sp. 5	1			1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 6	1			1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 12			1	1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 15	4	1	4	9
<i>Sugiyamaella</i> sp. 16		1		1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 17		1		1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 20	1			1
<i>Vanrija</i> sp.		1		1

Na tabela 4 são apresentadas as espécies de leveduras isoladas neste trabalho, separadas por tipo de substrato, sítio de coletas e filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Das espécies encontradas, 60 pertencem ao filo *Ascomycota* e 11 ao filo *Basidiomycota*. Dentre as espécies ascomicéticas isoladas, 29 (48%) foram encontradas na forma de singletos. Para basidiomicetos foram encontrados oito singletos (72%). Os substratos estudados apresentaram um elevado número de possíveis novas espécies (45%), principalmente o gênero *Sugiyamaella* (23 espécies, 32%), como mostrado na tabela 5. Dentre setenta e uma espécies isoladas, as mais frequentes foram *Apiotrichum siamense* (8,6%), *Scheffersomyces amazonensis* (9,9%) e quatro possíveis novas espécies do gênero *Sugiyamaella* (*Sugiyamaella* sp. 4 – 6,6%; *Sugiyamaella* sp. 5 – 5,6%; *Sugiyamaella* sp. 6 – 8,6%; *Sugiyamaella* sp. 11 – 6,3%).

Tabela 4 – Lista de leveduras isoladas separadas por sítio de coleta e substrato.

Espécies	Aeroporto				Piquiá				UFAM				TOTAL
	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	
<i>Ascomycota</i>													
<i>Candida boidinii</i> (clado <i>Ogataea</i>)								1					1
<i>Candida cylindracea</i> (clado <i>Ogataea</i>)		1											1
<i>Candida maltosa</i> (clado <i>Candida/ Lodderomyces</i>)									3				3
<i>Candida metapsilosis</i> (clado <i>Candida/ Lodderomyces</i>)					1								1
<i>Candida natalensis</i> (clado <i>Kurtzmaniella</i>)								1					1
<i>Candida parapsilosis</i> (clado <i>Candida/ Lodderomyces</i>)			1										1
<i>Candida pseudointermedia</i> (clado <i>Clavispora</i>)				2				1					3
<i>Candida</i> sp. 1 (clado <i>Clavispora</i>)	1												1
<i>Candida</i> sp. 2 (clado <i>Yamadazyma</i>)								2					2
<i>Candida tropicalis</i> (clado <i>Candida/ Lodderomyces</i>)									1				1
<i>Cyberlindnera dasilvae</i>								1					1
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>		1			1								2
<i>Kuraishia piskuri</i>	1			1					2			1	5
<i>Kurtzmaniella</i> sp.								1					1

Espécies	Aeroporto				Piquiá				UFAM				TOTAL
	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	
<i>Limtongozyma cylindracea</i>		1											1
<i>Lodderomyces elongisporus</i>									1				1
<i>Meyerozyma carpophila</i>							1						1
<i>Middelhovenomyces petrohuensis</i>							2						2
<i>Middelhovenomyces</i> sp.												1	1
<i>Ogataea</i> sp.	1				1			2					4
<i>Scheffersomyces amazonensis</i>	3	2		5	1	3			6	4	3	3	30
<i>Scheffersomyces coipomoensis</i>									1				1
<i>Scheffersomyces</i> sp.	1			3							3	3	10
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>									4	2	1		7
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> var. <i>vanrijiae</i>									1				1
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> var. <i>yarrowii</i>									5	1			6
<i>Spathaspora materiae</i>							1						
<i>Spathaspora passalidarum</i>	4	1	1	4			1	1					12
<i>Spathaspora roraimanensis</i>									2	1			3
<i>Spathaspora</i> sp. 1									1				1
<i>Spathaspora</i> sp. 2						1							1
<i>Spencermartinsiella</i> sp.	1					1		1				1	4
<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>				1								1	2
<i>Sugiyamaella paludigena</i>				1		2		1					4
<i>Sugiyamaella smithiae</i>				1						1			2
<i>Sugiyamaella</i> sp. 1	1				1	1		1	4			1	9
<i>Sugiyamaella</i> sp. 2	2	1			1			1	4		3		12
<i>Sugiyamaella</i> sp. 3								1	1				2
<i>Sugiyamaella</i> sp. 4	1		1			1	1		9	2	2	3	20

Espécies	Aeroporto				Piquiá				UFAM				TOTAL
	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	Besouros	Galeria	Larva	Madeira	
<i>Sugiyamaella</i> sp. 5				1	1				11	3	1		17
<i>Sugiyamaella</i> sp. 6	1	3	1	1	5	1	1		10	3			26
<i>Sugiyamaella</i> sp. 7	1												1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 8	2								1				3
<i>Sugiyamaella</i> sp. 9	1												1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 10									1	1			2
<i>Sugiyamaella</i> sp. 11	3	3				1	1		7	3	1		19
<i>Sugiyamaella</i> sp. 12						1						1	2
<i>Sugiyamaella</i> sp. 13							1						1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 14											1		1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 15				4				1				4	9
<i>Sugiyamaella</i> sp. 16								1					1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 17							1						1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 18									1		1		2
<i>Sugiyamaella</i> sp. 19							1						1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 20				1									1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 21	1												1
<i>Sugiyamaella</i> sp. 22			1						1				2
<i>Sugiyamaella</i> sp. 23									4				4
<i>Sugiyamaella xylolytica</i>											1		1
<i>Vanderwaltozyma</i> sp.	1						1						2
Basidiomycota													
<i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>				1					1				2
<i>Apiotrichum scarabaeorum</i>				1									1
<i>Apiotrichum siamense</i>	3	2		2		1	2		9	4	1	2	26
<i>Apiotrichum</i> sp.							1						1
<i>Colacogloea</i> sp.									1				1

Tabela 5 – Lista das novas espécies de leveduras isoladas.

Identificação	Código UFMG- CM	ID coleta	Região	Acesso no GenBank	Espécie referência	Identidade	Gaps
Ascomycota							
<i>Candida</i> sp.1 (clado <i>Clavispora</i>)	Y7169	BAY18.3.5	D1/D2	OP099794	<i>Candida floscolorum</i> JL13	687/701(98%)	4/701(0%)
					<i>Candida akabanensis</i> CBS 5039	656/733(89%)	21/733(2%)
					<i>Candida pseudofloscolorum</i> CBS 8584	496/502(99%)	2/502(0%)
<i>Candida</i> sp. 2 (clado <i>Yamadazyma</i>)	Y7170	MPXA9.2	NL1		<i>Candida michaelii</i> ATCC MYA-4332	450/463(97%)	0/463(0%)
<i>Kurtzmaniella</i> sp.	Y7172	MPXO12.6	NL1		<i>Kurtzmaniella quercitrusa</i> CBS 4412	492/498(99%)	2/498(0%)
<i>Middelhovenomyces</i> sp.	Y7173	MUXA3.4	D1/D2	OP114641	<i>Middelhovenomyces tepae</i> CBS:8170	563/584(96%)	4/584(0%)
			ITS	OP114641	<i>Middelhovenomyces petrohuensis</i> CBS 8173	368/416(88%)	29/416(6%)
<i>Ogataea</i> sp.	Y7174	BPY13.1.3	NL1		<i>Ogataea haglerorum</i> CBS 14645	180/188(96%)	3/188(1%)
<i>Scheffersomyces</i> sp.	Y7148	BAY17.1.3	D1/D2	OP099796	<i>Scheffersomyces queiroziae</i> UFMG CLM 5.1	395/401(99%)	0/401(0%)
					<i>Candida broadrunensis</i> ATCC MYA-4650	395/401(99%)	0/401(0%)
					<i>Candida lignicola</i> CBS:10612	395/401(99%)	0/401(0%)
			ITS	OP099822	<i>Scheffersomyces queiroziae</i> UFMG CLM 5.1	425/430(99%)	0/430(0%)
					<i>Scheffersomyces coipomoensis</i> CBS:8178	424/430(99%)	0/430(0%)
<i>Spathaspora</i> sp. 1	Y7018	GUX8.6	D1/D2	OP099797	<i>Candida lyxosophila</i> ATCC MYA-4685	434/456(95%)	2/456(0%)
					<i>Spathaspora brasiliensis</i> HMD19.3	434/456(95%)	4/456(0%)
					ITS	OP099823	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i> CBS8417
					<i>Candida subhashii</i> TF29	346/403(86%)	14/403(3%)
<i>Spathaspora</i> sp. 2	Y7167	GPY12.2	NL1		<i>Spathaspora arborariae</i> ATCC MYA-4684	538/550(98%)	2/550(0%)
<i>Spencermartinsiella</i> sp.	Y7175	BAY21.1.3	D1/D2	OP099798	<i>Spencermartinsiella cellulocola</i> CBS 11952	513/517(99%)	0/517(0%)
			ITS	OP099824	<i>Spencermartinsiella cellulocola</i> CBS 11952	485/522(93%)	31/522(5%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 1	Y6921	BUX3.1.5	D1/D2	MZ254646	<i>Su. americana</i> ATCC MYA-4662	465/487(95%)	0/487(0%)
			ITS	MZ261922	<i>Su. carassensis</i> UFMG-CM-Y606	465/512(91%)	9/512(1%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 2	Y6922	BPY7.2.4	D1/D2	MZ254647	<i>Su. bonitensis</i> UFMG-CM-608	641/684(94%)	6/684(0%)
			ITS	MZ261923	<i>Su. bonitensis</i> UFMG-CM-608	562/629(89%)	11/629(1%)

Identificação	Código UFMG-CM	ID coleta	Região	Acesso no GenBank	Espécie referência	Identidade	Gaps
<i>Sugiyamaella</i> sp. 3	Y7078	BUY1.2.1	D1/D2	OP099799	<i>Su. americana</i> ATCC MYA-4662	538/565(95%)	1/565(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 4	Y7079	BUX2.1.7	D1/D2	OP099800	<i>Su. americana</i> ATCC MYA-4662	463/476(97%)	0/476(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 5	Y7080	BUY4.3.2	D1/D2	OP099801	<i>Su. carassensis</i> UFMG-CM-Y606	428/460(93%)	1/460(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 6	Y7081	BUY10.2.5	D1/D2	OP099802	<i>Su. americana</i> NRRL YB-2067	444/471(94%)	4/471(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 7	Y7083	BUY14.1.1	D1/D2	OP099803	<i>Su. carassensis</i> UFMG-CM-Y606	485/502(97%)	0/502(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 8	Y7084	BAX14.3.3	D1/D2	OP099804	<i>Su. carassensis</i> UFMG-CM-Y606	459/483(95%)	2/483(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 9	Y7085	BAY20.1.3	D1/D2	OP099805	<i>Su. bullrunensis</i> CBS:11840	483/571(85%)	15/571(2%)
			ITS	OP099825	<i>Su. americana</i> NYNU 17714	215/241(89%)	6/241(2%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 10	Y7088	GUY1.3	D1/D2	OP099808	<i>Su. ligni</i> UFMG-CM-Y295	516/589(88%)	9/589(1%)
			ITS	OP099826	<i>Su. carassensis</i> UFMG-CM-Y606	381/464(82%)	30/464(6%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 11	Y7089	GUX2.3	D1/D2	OP099809	<i>Su. americana</i> NRRL YB-2067	471/506(93%)	0/506(0%)
			ITS	OP099827	<i>Su. bullrunensis</i> CBS:11840	310/329(94%)	3/329(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 12	Y7090	GPY3.1	D1/D2	OP099810	<i>Su. americana</i> NRRL YB-2067	508/545(93%)	8/545(1%)
			ITS	OP099828	<i>Su. bullrunensis</i> CBS:11840	292/316(92%)	9/316(2%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 13	Y7091	LPX4.2.4	D1/D2	OP099811	<i>Su. ligni</i> UFMG-CM-Y295	571/592(96%)	2/592(0%)
			ITS	OP099829	<i>Su. ligni</i> UFMG-CM-Y295	382/429(89%)	10/429(2%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 14	Y7092	LUX14.2.1	D1/D2	OP099812	<i>Su. americana</i> ATCC MYA-4662	440/463(95%)	0/463(0%)
			ITS	OP099830	<i>Su. americana</i> NYNU 17714	293/314(93%)	8/314(2%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 15	Y7093	MUXA3.3	D1/D2	OP099813	<i>Su. bahiana</i> UFMG CM-Y304	442/449(98%)	1/449(0%)
			ITS	OP099831	<i>Su. bahiana</i> UFMG CM-Y304	403/429(94%)	9/429(2%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 16	Y7094	MPXO9.6	D1/D2	OP099814	<i>Su. ayubii</i> UFMG-CM-Y607	486/504(96%)	0/504(0%)
			ITS	OP099832	<i>Su. valenteae</i> UFMG CM-Y609 <i>Su. ayubii</i> UFMG-CM-Y607	412/474(87%) 358/396(90%)	27/474(5%) 15/396(3%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 17	Y7095	MPXA11.5	D1/D2	OP099815	<i>Su. bonitensis</i> UFMG-CM-Y608	536/574(93%)	4/574(0%)
			ITS	OP099833	<i>Su. carassensis</i> UFMG-CM-Y606	642/727(88%)	25/727(3%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 18	Y7176	BUY2.2.3	NL1		<i>Su. americana</i> NRRL YB-2067	401/428(94%)	1/428(0%)

Identificação	Código UFMG-CM	ID coleta	Região	Acesso no GenBank	Espécie referência	Identidade	Gaps
<i>Sugiyamaella</i> sp. 19	Y7177	LPX4.1.2	NL1		<i>Su. carassensis</i> UFMG-CM-Y606	403/432(93%)	1/432(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 20	Y7178	MAXO17.7	NL1		<i>Su. lignohabitans</i> NRRL YB-1473	534/540(99%)	1/540(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 21	Y7082	BPX13.2.2	NL1		<i>Su. bullrunensis</i> CBS:11840	346/389(89%)	10/389(2%)
			NL1		<i>Su. ligni</i> UFMG-CM-Y295	342/389(88%)	6/389(1%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 22	Y7179	BUY33.1.2	NL1		<i>Su. americana</i> ATCC MYA-4662	394/418(94%)	4/418(0%)
			NL1		<i>Su. bullrunensis</i> CBS:11840	379/417(91%)	2/417(0%)
<i>Sugiyamaella</i> sp. 23	Y7180	BUY26.2.6	NL1		<i>Su. bonitensis</i> UFMG-CM-Y608	393/455(86%)	9/455(1%)
			NL1		<i>Su. ligni</i> UFMG-CM-Y295	391/454(86%)	7/454(1%)
<i>Vanderwaltozyma</i> sp.	Y7182	LPY1.2.3	D1/D2	OP099816	<i>Vanderwaltozyma yarrowii</i> CBS:6070	602/631(95%)	3/631(0%)
			ITS	OP099834	<i>Vanderwaltozyma yarrowii</i> BS:2684	525/608(86%)	35/608(5%)
Basidiomycota							
<i>Apiotrichum</i> sp.	Y7168	MPXO9.4	D1/D2	OP099793	<i>Apiotrichum wieringae</i> CBS:8903	690/714(97%)	0/714(0%)
<i>Colacogloea</i> sp.	Y7171	GUY30.2	D1/D2	OP099795	<i>Colacogloea terpenoidalis</i> CBS 8445	555/562(99%)	1/562(0%)
					<i>Colacogloea retinophila</i> CBS 8446	548/562(98%)	0/562(0%)
			ITS	OP099821	<i>Colacogloea terpenoidalis</i> CBS 8445	368/388(95%)	1/388(0%)
<i>Syzygospora</i> sp.	Y7181	GUY27.1	NL1		<i>Syzygospora pallida</i> FO31621	546/612(89%)	4/612(0%)
<i>Vanrija</i> sp.	Y7183	MPXA12.2	D1/D2	OP099817	<i>Vanrija albida</i> CBS:7214	539/548(98%)	2/548(0%)
<i>Vishniacozyma</i> sp.	Y7184	BAY21.1.2	NL1		<i>Vishniacozyma taibaiensis</i> CBS 9919	506/514(98%)	0/514(0%)

5.1.2 Análise de diversidade

De acordo com a análise realizada, foi possível verificar que para nenhum dos locais estudados os valores potenciais de riqueza e diversidade foram atingidos. Em relação a sobreposição dos intervalos de confiança de 95% no gráfico gerado pela análise iNEXT, não é possível afirmar que os valores de riqueza são estatisticamente diferentes. Para diversidade de Shannon e diversidade de Simpson, o sítio de coleta Piquiá apresentou maior diversidade, não ocorrendo sobreposição dos intervalos de confiança de 95% em relação ao sítio de coleta UFAM (Figura 14). Com relação ao esforço amostral, um maior valor de cobertura foi observado para a comunidade isolada da UFAM (88%). Os valores de cobertura amostral das comunidades dos sítios de coleta aeroporto e Piquiá foram 74% e 65% respectivamente. Em nenhum dos sítios analisados a curva de cobertura amostral atingiu a estabilidade (Figura 15), o que indica que mais coletas seriam necessárias para se atingir a diversidade total estimada.

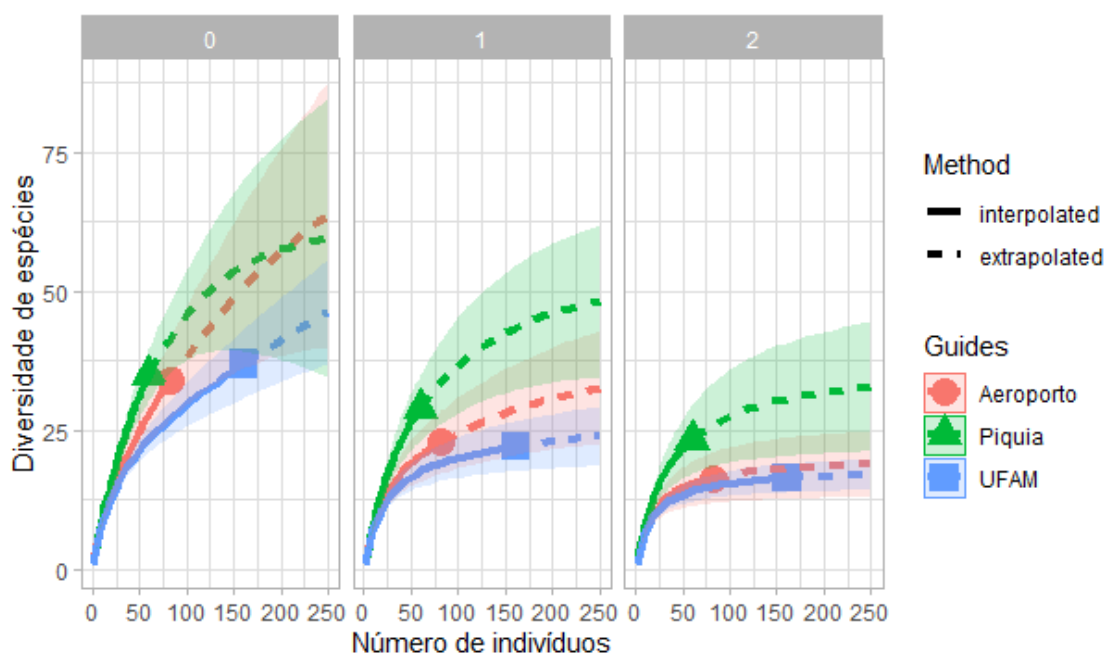


Figura 14 - Curvas de rarefação baseada no tamanho da amostra (linhas sólidas) e extrapolação (linhas tracejadas, até 250 indivíduos) da diversidade de espécies de leveduras isoladas nos sítios de coleta: aeroporto, Piquiá e UFAM com base na diversidade de espécies para números de Hill de ordem $q=0$ (riqueza observada de espécies); $q=1$ (índice de Shannon) e $q=2$ (índice inverso de Simpson). Intervalos de confiança de 95%.

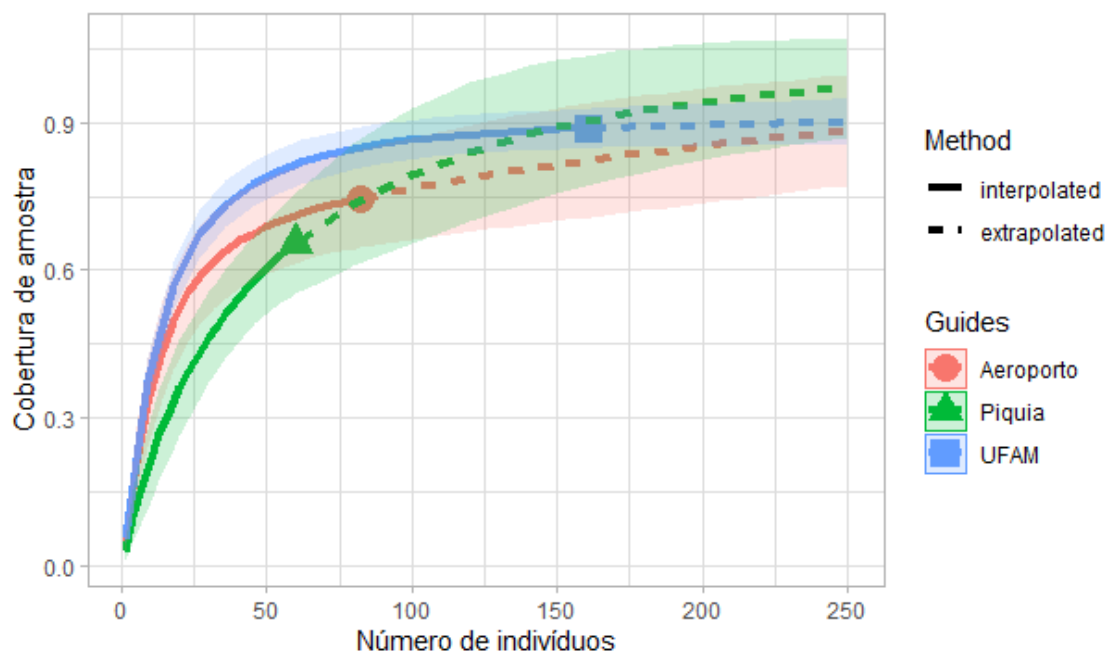


Figura 15 - Gráfico de cobertura amostral para amostras rarefeitas (linha sólida) e amostras extrapoladas (linha tracejada) em função do tamanho da amostra para amostras de espécies de leveduras isoladas nos três sítios de coleta; aeroporto, Piquiá e UFAM. Intervalos de confiança de 95%. Cada uma das curvas foi extrapolada até 250 indivíduos.

A partir do total de espécies isoladas (70) foi produzido um Diagrama de Venn com base nos números de isolados por sítio de coleta (Figura 16 A). Onze espécies (*A. siamense*, *Sc. amazonensis*, *Spencermartinsiella* sp., *Sugiyamaella* sp. 1, *Sugiyamaella* sp. 2, *Sugiyamaella* sp. 4, *Sugiyamaella* sp. 5, *Sugiyamaella* sp. 6, *Sugiyamaella* sp. 11, *Sugiyamaella* sp. 15 e *Vanrija humicola*) foram compartilhadas nos três locais coletados, sendo a maioria (8) de possíveis novas espécies. Na região do aeroporto foram obtidas 11 espécies exclusivas pertencentes a nove gêneros (*Apiotrichum*; *Candida/ Lodderomyces*; *Clavispora*; *Limtongozyma*; *Ogataea*; *Rhodotorula*; *Sugiyamaella*; *Vishniacozyma*). No sítio de coleta do Piquiá foram obtidas 16 espécies exclusivas distribuídas em 11 gêneros (*Apiotrichum*; *Candida/ Lodderomyces*; *Cyberlindnera*; *Kurtzmaniella*; *Meyerozyma*; *Middelhovenomyces*; *Ogataea*; *Spathaspora*; *Sugiyamaella*; *Vanrija* e *Yamadazyma*). No campus da UFAM foram encontradas 18 espécies exclusivas pertencentes a nove gêneros (*Candida/ Lodderomyces*; *Colacogloea*; *Middelhovenomyces*; *Saitozyma*; *Scheffersomyces*; *Schwanniomyces*; *Spathaspora*; *Sugiyamaella*; *Syzygospora*).

Sete espécies (*A. siamense*; *Sc. amazonensis*; *Sp. passalidarum*; *Sugiyamaella* sp. 2; *Sugiyamaella* sp. 4; *Sugiyamaella* sp. 5; *Sugiyamaella* sp. 6) foram compartilhadas pelos quatro substratos estudados (Figura 16 B). O intestino de besouro e madeira em decomposição apresentaram 16 espécies exclusivas cada um. As larvas de besouros

passalídeos foram as que apresentaram sete espécies exclusivas e galerias dos besouros tiveram seis espécies exclusivas.

Foram produzidos outros diagramas (Figura 17), onde foram comparados cada substrato estudado por sítio de coleta. Foi possível observar que das 38 espécies isoladas do intestino de besouro somente quatro espécies (*Sc. amazonensis*; *Sugiyamaella* sp. 1; *Sugiyamaella* sp. 2 e *Sugiyamaella* sp. 6) foram compartilhadas nos três locais de coleta. Em relação as 22 espécies obtidas de galerias de besouros, ocorreu o compartilhamento de três espécies (*Sc. amazonensis*; *Sugiyamaella* sp. 6 e *Sugiyamaella* sp. 11) nos locais de coleta estudado. Vinte espécies foram isoladas de larvas de besouros e somente *Sugiyamaella* sp. 4 foi encontrada nos três locais. Das trinta e quatro espécies de leveduras obtidas de madeira em decomposição somente três (*A. siamense*; *Sugiyamaella* sp. 15 e *V. humicola*) foram encontradas nos três sítios de coleta .

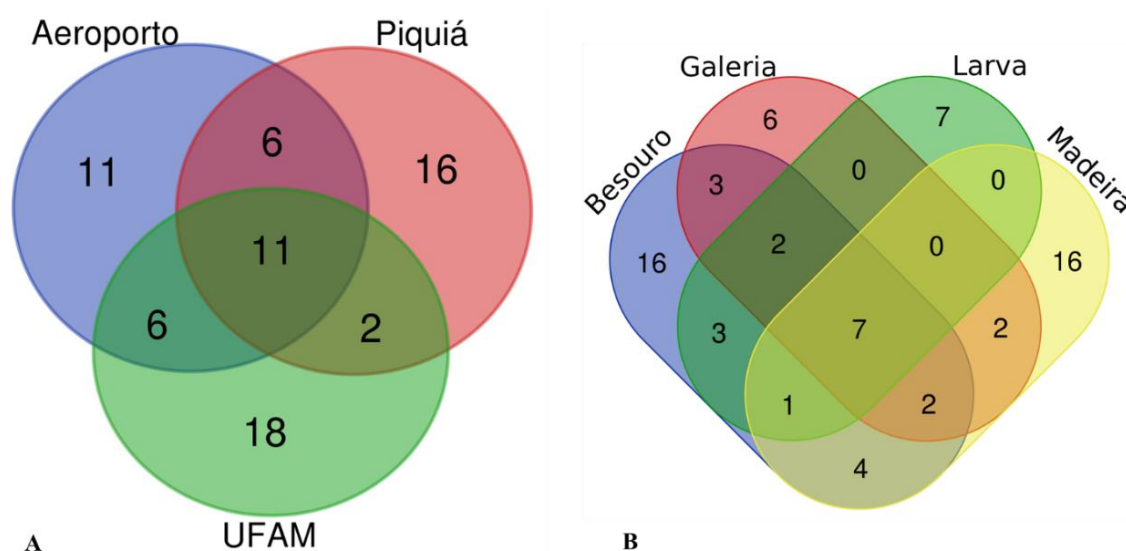


Figura 16. Diagrama de Venn produzido com base no número de espécies de leveduras isoladas; (A) por sítios de coleta nos municípios de Itacoatiara/AM e números de espécies isoladas: Aeroporto (34) Piquiá (35), UFAM (37); (B) por substratos: intestino de besouros (38), galerias de besouros (22), larva de besouros (20), madeira em decomposição (34).

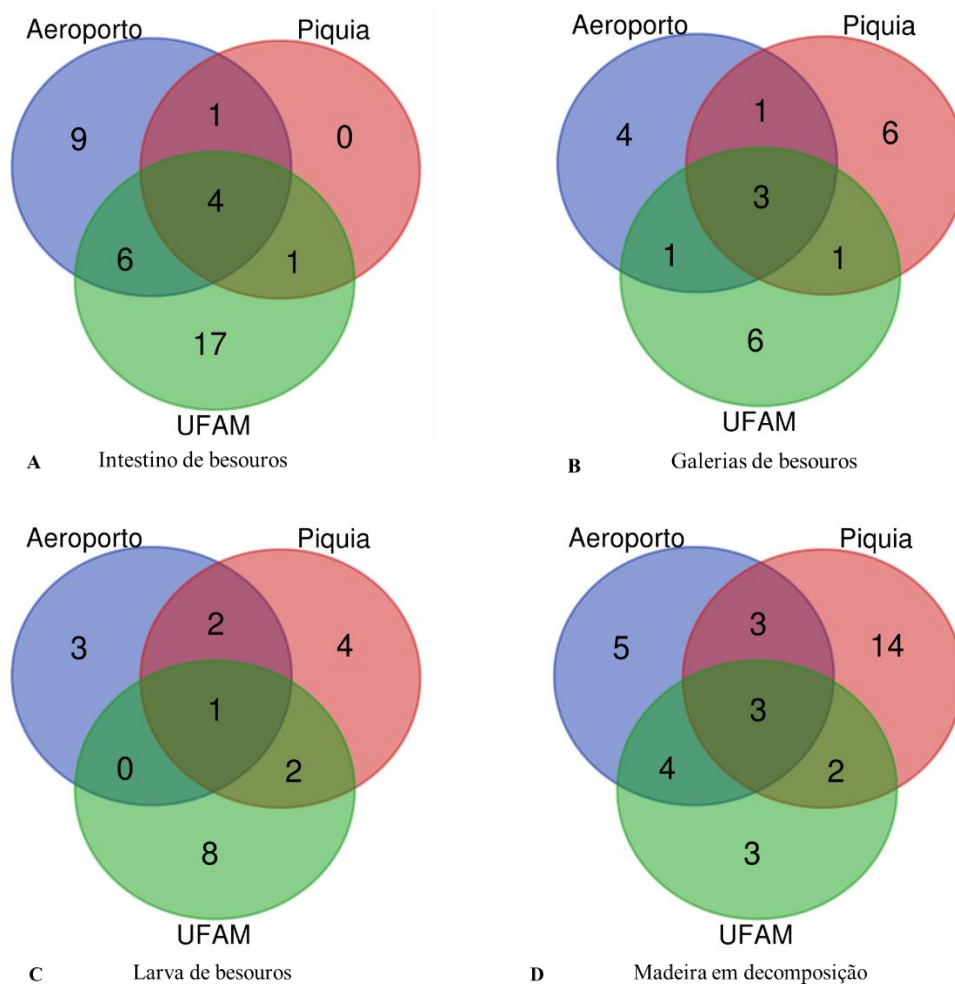


Figura 17 – Diagrama de Venn produzido com base no número de espécies de leveduras isoladas por substratos: (A) Intestino de besouros; (B) galerias de besouros; (C) larva de besouros; (D) madeira em decomposição por sítio de coleta (Aeroporto, Piquiá e UFAM)

5.1.3 Ensaio de fermentação

Doze isolados de *S. passalidarum* e duas prováveis espécies novas pertencente ao clado *Spathaspora* foram submetidas a ensaios de fermentação em D-xilose (30 g/L) para avaliar a produção de etanol e/ou xilitol. Foram utilizadas como controle positivo as linhagens *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907^T (linhagem tipo) e HMD1.1 (CADETE et al., 2012a). Dos 12 isolados de *Sp. passalidarum*, uma foi obtida de galeria de besouro (UFMG-CM-Y7201), quatro de intestino de besouros (Y7202; Y7203; Y7204; Y7205), duas de larvas de besouros (Y7206 e Y7207) e quatro de madeira em decomposição (Y7208; Y7209; Y7210; Y7211 e MAXA17.3). Os resultados dos parâmetros de fermentação [$Y_{p/s}^{EtOH}$ (g/g), rendimento em etanol; $Y_{p/s}^{XOH}$ (g/g), rendimento de xilitol; Q_p (g/L·h), produtividade de etanol e/ou xilitol; η (%), eficiência de fermentação (%); consumo de D-xilose (%)] e as concentrações de células, etanol e xilitol (g/L) estão resumidas na Tabela 6. Esses resultados foram calculados

de acordo com o tempo de fermentação (tempo de máxima produção de etanol ou tempo de término do experimento de fermentação) para cada linhagem de levedura.

Os resultados da fermentação mostraram que todas os isolados de *Sp. passalidarum* testadas foram capazes de consumir D-xilose, com taxas de consumo variando de 71,3% a 95,4% em 48h. As concentrações de etanol variaram de 4,22 g/L a 11,5 g/L em 48 h. As linhagens NRRL Y27907^T (controle positivo) e UFMG-CM-Y7210 foram as que apresentaram maiores de rendimento de etanol ($Y_{p/s}^{EtOH} = 0,39$ e $0,41$ g/g, respectivamente) e eficiência de fermentação ($\eta = 76,2$ e $78,2\%$, respectivamente). Na figura 18 são apresentados os gráficos de comparação dos isolados de *Sp. passalidarum* isoladas nos diferentes substratos estudados: (A) galeria; (B) intestino de besouros; (C) larva de besouros e (D) madeira em decomposição com as linhagens controle.

Sapathaspora sp. 1 apresentou capacidade de consumir 100% a D-xilose em 48h. Ao término da fermentação foi observada a produção de xilitol na concentração de 16,1g/L ($Y_{p/s}^{XOH} = 0,54$ g/g) com eficiência de fermentação (η) 59,1% em 48h. Embora o xilitol tenha sido o principal produto obtido nesse ensaio de fermentação, também foi encontrado em menor concentração o etanol com 3,0 g/L em 48h (Tabela 6).

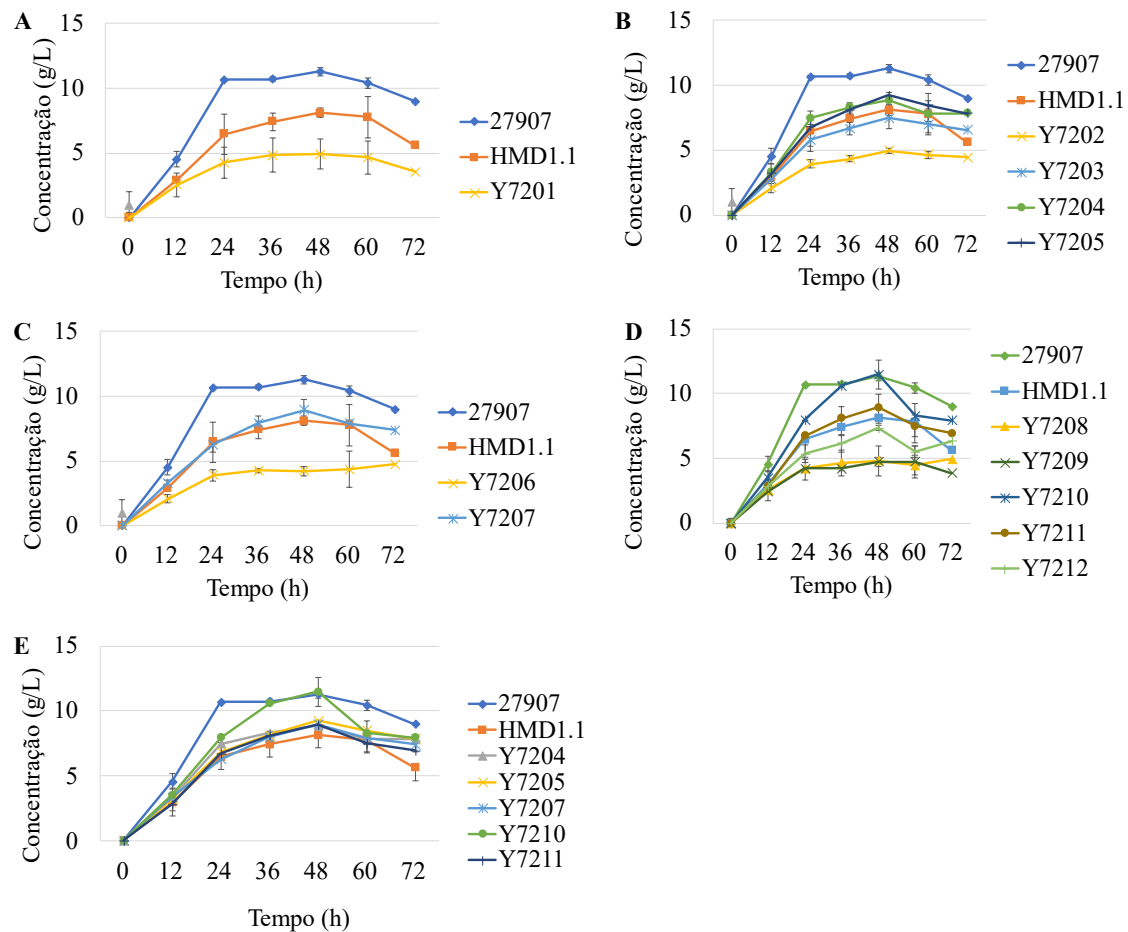


Figura 18 - Gráfico de comparação da produção de etanol das linhagens de *Sp. passalidarum* isoladas de diferentes substratos com os controles positivos (NRRLY-27907; HMD1.1); (A) Linhagem isolada de galeria (UFMG-CM-Y7201); (B) Linhagens isoladas de intestino de besouro (UFMG-CM-Y7202; Y7203; Y7204; Y7205); (C) Linhagens isoladas de larvas de besouro (UFMG-CM-Y7206; Y7207); (D) Linhagens isoladas de madeira em decomposição (UFMG-CM-Y7208; Y7209; Y7210; Y7211; Y7212); (E) Linhagens selecionadas para fermentação em hidrolisado de cana-de-açúcar

Tabela 6 - Produção de etanol e/ou xilitol a partir da xilose por *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora* sp. 1.

Espécies de levedura	Consumo de açúcar ¹ (%)	Biomassa (g/L)	Etanol (g/L)	$Y_{p/s}^{EtOH}$ ² (g/g)	η^{EtOH} ⁴ (%)	Q_p^{EtOH} ³ (g/L/h)	Xilitol (g/L)	$Y_{p/s}^{XOH}$ ² (g/g)	Q_p^{XOH} ³ (g/L/h)	η^{XOH} ⁴ (%)	Tempo ⁵ (h)
<i>S. passalidarum</i>											
NRRL27907 ^T	95,4	11,67±0,68	11,3±0,15	0,39±0,009	76,2	0,24±0,003	-	-	-	-	48
HMD1.1	87,1	13,47±1,68	8,12±0,69	0,16±0,014	61,2	0,17±0,014	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7201	81,6	11,72±0,72	4,83±1,3	0,22±0,042	42,8	0,1±0,027	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7202	71,3	11,6±0,22	4,95±0,24	0,23±0,014	45,1	0,1±0,005	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7203	81,0	12,65±0,23	7,49±0,46	0,31±0,015	60,1	0,16±0,009	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7204	88,9	12,65±0,23	8,84±0,32	0,31±0,015	63,7	0,18±0,01	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7205	89,9	12,3±0,21	9,25±0,29	0,34±0,005	66,1	0,19±0,006	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7206	75,8	11,8±1,28	4,22±0,19	0,22±0,05	40,5	0,09±0,003	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7207	89,4	11,97±0,89	8,97±0,5	0,33±0,013	63,1	0,19±0,013	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7208	76,7	12,17±0,68	4,8±1,001	0,23±0,03	43,6	0,1±0,02	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7209	71,7	12,02±0,64	4,7±0,16	0,23±0,002	43,4	0,1±0,003	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7210	92,3	11,97±0,56	11,5±0,06	0,41±0,044	78,2	0,24±0,001	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7211	84,1	12,35±0,46	8,9±0,88	0,38±0,01	64,7	0,19±0,018	-	-	-	-	48
UFMG-CM-Y7212	75,5	12,1±0,82	7,32±0,67	0,33±0,04	63,6	0,15±0,014	-	-	-	-	48
<i>Spathaspora</i> sp. 1											
UFMG-CM-Y7018	100	13,85±0,4	3,0±0,05	0,104±0,002	19,9	0,09±0,043	16,1±0,12	0,54±0,004	0,27±0,01	59,1	48

¹consumo de açúcar (%) – percentual do açúcar inicial consumido

² $Y_{p/s}^{EtOH}$ (g/g) e $Y_{p/s}^{XOH}$ (g/g) – teor de etanol ou xilitol: correlação entre etanol ou xilitol (ΔP) produzido com açúcar (ΔS) consumido (rendimento do etanol à base do açúcar total consumido; rendimento de xilitol à base de xilose consumido)

³ Q_p^{EtOH} e Q_p^{XOH} (g/L/h) – produtividade do etanol ou xilitol: relação entre concentração de etanol ou xilitol (g/L) e tempo (h) (produtividade do etanol calculada para cada período de consumo de açúcar; produtividade xilitol calculada durante taxa de consumo constante de xilose)

⁴ η^{EtOH} (%) e η^{XOH} (%) – eficiência de conversão: percentual do rendimento máximo teórico do etanol ou xilitol (0,511 g de etanol por g xilose e 0,917 g de xilitol por g xilose)

⁵Tempo de fermentação considerado para cálculos;

⁵Tempo de produção máxima de etanol (g/L) chegou ou ao final do experimento.

Após a realização dos ensaios de fermentação de D-xilose, isolados de *Sp. passalidarum* foram selecionadas para o teste de fermentação em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Para selecionar os isolados, primeiramente foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar distribuição normal dos dados, onde foram analisados os dados da produção de etanol (g/L), rendimento ($Y_{p/s}^{EtOH}$ em g/g) e produtividade (Q_p^{EtOH} em g/L/h) do etanol dos 12 isolados de *Sp. passalidarum* e comparadas com a linhagem tipo *Sp. passaludarum* NRRL27907^T. O teste Shapiro-Wilk apresentou para produção de etanol $W=0,924$ e $p < 0,008$; rendimento de etanol $W=0,926$ e $p < 0,01$; e para produtividade do etanol $W=0,925$ e $p < 0,009$, ou seja, todos apresentaram uma distribuição diferente da normal, sendo indicado para análise dos dados um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (análogo à ANOVA). O resultado do teste de Kruskal-Wallis apresentou valor de $p < 0,05$ evidenciando que há diferenças estatísticas significativas entre os dados apresentados. Para a comparação par-a-par o teste Dunn's *post hoc* evidenciou que cinco isolados (UFMG-CM-Y7204; Y7205; Y7207; Y7210; Y7211) não apresentaram diferenças significativas com relação aos resultados da linhagem *Sp. passaludarum* NRRL27907^T e foram selecionadas para o teste de fermentação utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. No gráfico apresentado no APÊNDICE C (E) são comparadas as linhagens controle com os isolados *Sp. passalidarum* selecionados para fermentação em hidrolisado de cana-de-açúcar.

Os resultados dos parâmetros de fermentativos [$Y_{p/s}^{EtOH}$ (g/g), rendimento de etanol; Q_p (g/L·h), produtividade de etanol; η (%), eficiência de fermentação; consumo de açúcar (D-xilose e glicose) (%)] e células, concentrações de etanol (g/L) em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar estão dispostos na Tabela 7. Os resultados foram calculados com base no tempo de fermentação (tempo de produção máxima de etanol ou tempo de finalização do experimento de fermentação) para cada isolado de *Sp. passalidarum*.

Tabela 7 - Produção de etanol a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por *Sp. passalidarum*.

Espécies de levedura	Consumo de xilose (%)	Biomassa (g/L)	Etanol (g/L)	$Y_{p/s}^{EtOH}$ 2 (g/g)	η^{EtOH} 3 (%)	Q_p^{EtOH} 4 (g/L/h)	Tempo 5 (h)
<i>S. passalidarum</i>							
NRRL27907	64,7	29,3±0,4	11,4±0,41	0,26±0,01	50,6	0,19±0,01	96
HMD1.1	94,8	26,6±0,5	19,4±0,66	0,32±0,01	62,9	0,32±0,01	96
Y7204	94,6	25,9 ±0,8	19,4±0,97	0,32±0,02	61,2	0,32±0,01	96
Y7205	94,6	31,5±1,4	17,1±0,05	0,28±0,01	55,3	0,28±0,01	96
Y7207	89,8	25,5±0,9	16,6±0,12	0,3±0,01	57,3	0,28±0,01	96
Y7210	92,3	25,9±0,5	16,4±0,67	0,28±0,01	53,2	0,27±0,01	96
Y7211	84,1	28,1±0,1	17,7±0,49	0,3±0,01	58,1	0,29±0,01	96

¹consumo de xilose (%) – percentual do açúcar inicial consumido;

² $Y_{p/s}^{EtOH}$ (g/g) – teor de etanol: correlação entre etanol (ΔP) produzido com açúcar (ΔS) consumido (rendimento do etanol à base do açúcar total consumido);

³ η^{EtOH} (%) – eficiência de conversão: percentual do rendimento máximo teórico do etanol (0,511 g de etanol por g de xilose);

⁴ Q_p^{EtOH} (g/L/h) – produtividade do etanol: relação entre concentração de etanol (g/L) e tempo (h) (em misturas de xilose/glicose, produtividade do etanol calculada para cada período de consumo de açúcar)

⁵Tempo de fermentação considerado para cálculos;

⁵Tempo de produção máxima de etanol (g/L) chegou ou ao final do experimento.

Considerando os açúcares glicose e D-xilose presentes no hidrolisado, a glicose foi praticamente 100% consumida em 48h por todos os isolados testados e o consumo de D-xilose variou de 64,7 a 94,8% em 96h (Tabela 7). Foi possível observar nesse ensaio que a glicose e D-xilose foram inicialmente metabolizadas, mas a taxa de consumo de glicose foi mais rápida que a de D-xilose (Figura 19). Após o consumo de glicose, a D-xilose foi consumida rapidamente, e esse comportamento foi observado após 24 h. Em relação a produção de etanol, as linhagens *Sp. passalidarum* HMD1.1 (controle positivo) e a UFMG-CM-Y7204 produziram as mesmas concentrações de etanol de 19,4g/L em 96 h. Estas linhagens também apresentaram os maiores de rendimentos de etanol ($Y_{p/s}^{EtOH} = 0,32\text{g/g}$) e eficiência de fermentação ($\eta = 62,9$ e $61,2\%$ respectivamente) e produtividade ($Q_p^{EtOH} 0,323$ g/L/h). A linhagem *S. passalidarum* NRRL27907 foi a que apresentou os menores resultados nesse experimento (concentração de etanol 11,4 g/L; $Y_{p/s}^{EtOH} = 0,26\text{g/g}$; 50,6; $\eta = 50,6\%$ e $Q_p^{EtOH} 0,19$ g/L/h). A concentração celular das linhagens testadas variou de 25,5 a 31,5 g/L.

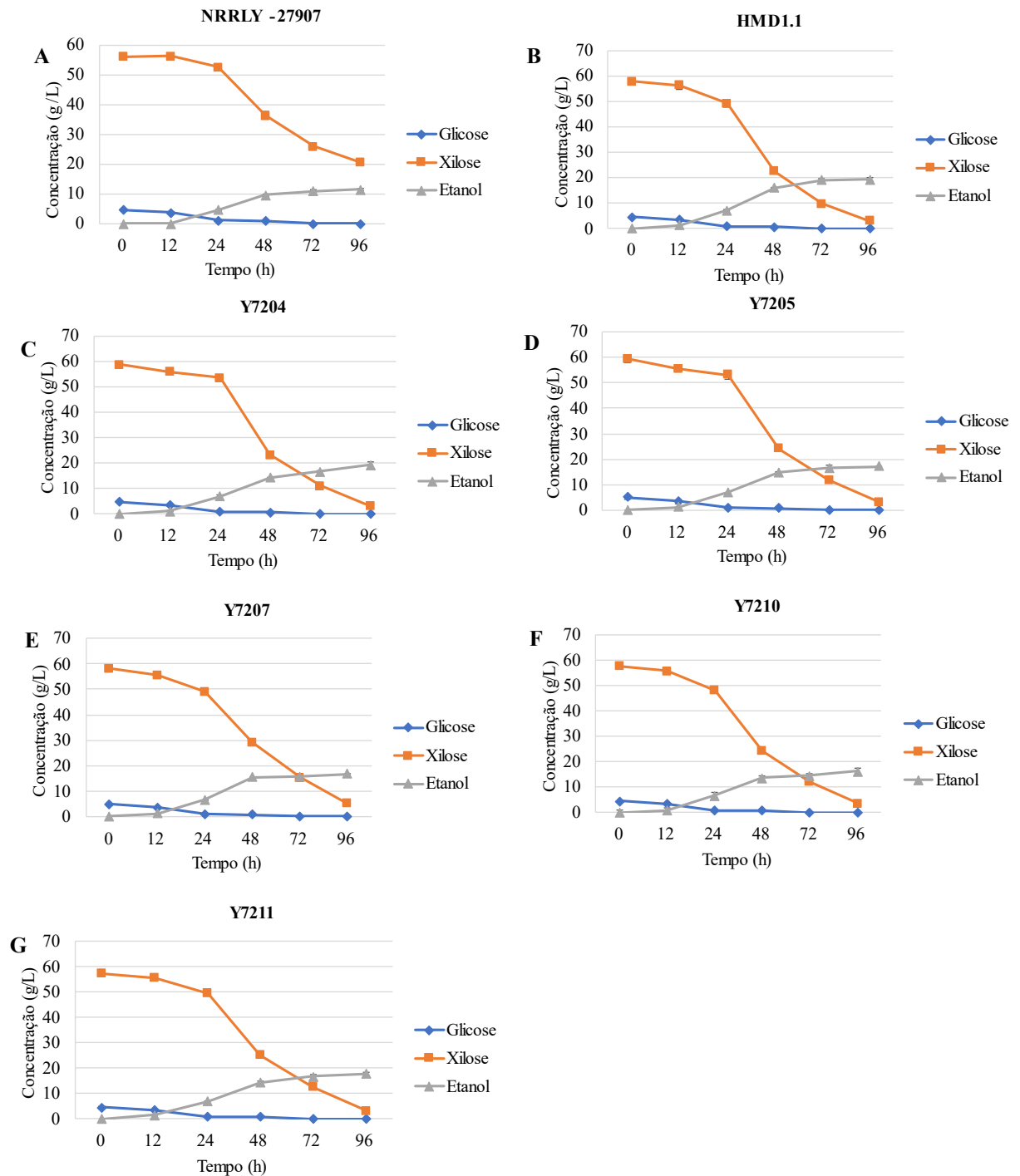


Figura 19 – Gráficos de produção de etanol por linhagens selecionadas de *Sp. passalidarum* utilizando meio de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. (A) Linhagem controle (NRRLY 27907); (B) Linhagem controle (HMD1.1); (C) Linhagem isolada de intestino de besouro (UFMG-CM- Y7204); (D) Linhagem isolada de intestino de besouro (UFMG-CM-Y7205); (E) Linhagem isolada de larvas de besouro (UFMG-CM-Y7207) (F) Linhagem isolada de madeira em decomposição (UFMG-CM- Y7210); (G) Linhagem isolada de madeira em decomposição (UFMG-CM-Y7211).

6. DISCUSSÃO

As leveduras já foram relatadas a partir de uma variedade de insetos, incluindo besouros (SUH et al., 2003). Os passalídeos são besouros saproxílicos que vivem e se alimentam em troncos de árvores mortas, onde constroem suas galerias, e seu intestino hospeda vários microrganismos que auxiliam na decomposição da madeira (ALENCAR et al., 2020). No presente trabalho foram obtidos 330 isolados de leveduras distribuídos em 24 gêneros, obtidas de madeira em decomposição, intestino dos besouros, larvas e de galerias de besouros passalidae. A região em que se obteve um número mais elevado de besouros foi o Campus II da UFAM. Por ser uma área degradada, com sombreamento e umidade, esta favorece a colonização de besouros passalídeos em troncos em decomposição. Na região do Piquiá foram coletados menos besouros por ser uma área de floresta fechada e menos degradada. O número elevado de *Passalus latifrons* Percheron no sítio de coleta da UFAM pode estar relacionada com a preferência desta espécie em colonizar os troncos na segunda fase de decomposição em áreas mais degradadas (ALENCAR et al., 2020).

Foram isoladas quatro espécies de leveduras basidiomicéticas do gênero *Apiotrichum*. Dentre as espécies isoladas, *Apiotrichum siamense* foi a que apresentou um maior número de isolados (26) recuperados dos três sítios de coleta e de todos os substratos estudados. Urbina et al. (2013a) relataram pela primeira vez a associação de *A. siamense* com intestino de besouros passalídeos. Esta espécie também foi isolada de madeira em decomposição utilizando hidrolisado bagaço de cana-de-açúcar do Parque Estadual do Rio Doce (MORAIS et al., 2020). *Apiotrichum mycotoxinivorans* foi representado por dois isolados, sendo um obtido em meio YM, a partir de amostra do intestino de besouro da área da UFAM, e outro de madeira em decomposição em meio YNB-xilana, na região do aeroporto. Esta levedura tem sido isolada de amostras de madeira em decomposição de diferentes biomas brasileiros (LARA et al., 2014; MORAIS et al., 2020) e tem a capacidade de produzir enzimas xilanolíticas (LARA et al., 2014). *Apiotrichum scarabaeorum* e *Apiotrichum* sp. apresentaram somente um isolado cada a partir de amostras de madeira em decomposição das regiões do aeroporto e Piquiá, respectivamente. *A. scarabaeorum* foi descrito por Middelhoven et al. (2004) isolado do intestino de larva de um escaravelho (Coleoptera, Scarabaeidae). Recentemente esta espécie foi isolada de amostras de solo da planta de chá assam (*Camellia sinensis* var. *assamica*) coletadas no norte da Tailândia (KUMLA et al., 2020). Os autores relataram que *A. scarabaeorum* foi capaz de produzir ácido indol-3-acético, um tipo

dominante de auxina encontrado em plantas e que pode auxiliar no aumento do comprimento das raízes.

Espécies do gênero *Scheffersomyces* já foram isoladas em insetos que se alimentam de madeira (SUH et al., 2013; URBINA et al., 2013a; LIU et al., 2016; JIA et al., 2020), e em madeira em decomposição (URBINA; BLACKWELL, 2013; REN et al., 2014; LOPES et al., 2018a; JIA et al., 2020; MORAIS et al., 2020). A espécie *Sc. amazonensis* foi isolada nos três sítios de coleta e dos quatro substratos; dez isolados do intestino de besouro, nove de galeria, três isolados de larvas e oito de madeira em decomposição. Esta espécie foi descrita a partir de isolados obtidos de madeira em decomposição coletada da floresta amazônica brasileira (CADETE et al., 2012a). Outros estudos reportaram esta espécie como produtora de xilitol (CADETE et al., 2012a, 2016b, 2017; SILVA et al., 2020), e capaz de fermentar a celobiose (SANTOS et al., 2011; CADETE et al., 2012b; LOPES et al., 2018a). *Scheffersomyces coipomoensis* foi isolada de larva e intestino de besouros (SUH et al., 2013). Neste trabalho, esta espécie apresentou um único isolado proveniente do intestino de besouro na área da UFAM. Além dessas espécies, uma nova espécie do gênero *Scheffersomyces* foi isolada dos quatro substratos (larva e intestino de besouro, galeria, madeira em decomposição) apresentando similaridade nas sequências de nucleotídeos das regiões D1/D2 e ITS com a linhagem UFMG-CM-Y365 isolada de madeira em decomposição da Mata Atlântica.

Espécies do gênero *Spathaspora* têm sido amplamente descritos por sua associação com madeira em decomposição nos ecossistemas brasileiros (CADETE; ROSA, 2018; LOPES et al., 2018a). É um gênero cosmopolita, mas a maioria das espécies conhecidas possui habitats relativamente distintos. Atualmente, a maioria das espécies de *Spathaspora* foi obtida de coletas realizadas no leste da Ásia (principalmente na China) e na América do Sul (CADETE & ROSA, 2018; LV et al., 2020). Isolados de *Sp. passalidarum* foram obtidos a partir de amostras de madeira em decomposição, besouros passalídeos e galerias destes insetos na floresta amazônica brasileira (CADETE et al., 2012a; SOUZA et al., 2017). Esta levedura também foi isolada na China central a partir de amostras de madeira em decomposição (REN et al., 2014). No presente trabalho foram obtidos 12 isolados de *Sp. passalidarum*. A maioria destes isolados (10) foram obtidos da região do aeroporto, provenientes do intestino de besouro (4), madeira em decomposição (4), larva (1) e galeria (1). Na região do Piquiá também foi obtida de amostras de madeira em decomposição (1) e larva (1). *Sp. passalidarum* é uma levedura naturalmente fermentadora de pentose, com potencial para ser aplicada na bioconversão de açúcares a etanol e/ou xilitol a partir de biomassas lignocelulósicas (BONAN et al., 2021). *Sp. roraimanensis* foi outra espécie isolada

proveniente do intestino de besouro (*Passalus latifrons*, Percheron) e de galeria nos arredores da UFAM. No presente trabalho foram obtidos três representantes dessa espécie. Esta espécie foi descrita por Cadete et al. (2013) associada com amostras de madeira em decomposição em uma região da floresta amazônica brasileira no estado de Roraima. Além da associação com madeira em decomposição, esta espécie foi isolada de intestino de besouro previamente em áreas da floresta amazônica na região de Itacoatiara por Souza et al. (2017). *Sp. roraimanensis* foi capaz de converter a D-xilose em xilitol (CADETE et al., 2016a; SOUZA et al., 2017). Duas possíveis novas espécies do gênero *Spathaspora* foram obtidas de amostras de galeria. Cada espécie apresentou somente um isolado, sendo que *Spathaspora* sp. 1 (UFMG-CM-Y7018) foi obtida da região da UFAM e *Spathaspora* sp. 2 (UFMG-CM-Y7167) do Piquiá. *Spathaspora* sp. 2 apresentou sequências de nucleotídeos das regiões D1/D2 idênticas as linhagens UFMG-CM-Y6060, UFMG-CM-Y7003, UFMG-CM-Y7004, isolados em outros biomas brasileiros.

O gênero *Sugiyamaella* apresentou o maior número de espécies isoladas. Das vinte e sete espécies obtidas neste estudo, quatro são conhecidas, *Su. lignohabitans*, *Su. paludigena*, *Su. smithiae* e *Su. xylolytica*; as outras vinte e três são possíveis espécies novas. *Su. paludigena* e *Su. lignohabitans* foram reportadas isoladas de baratas *Cryptocercus* sp. (Blattodea: Cryptocercidae) associadas a madeira (URBINA et al., 2013b). As espécies *Su. lignohabitans* e *Su. xylolytica* possuem a capacidade de fermentar D-xilose, e têm potencial para a produção de bioetanol e/ou xilitol a partir de resíduos vegetais (MORAIS et al., 2013a; SENA et al., 2017). *Su. smithiae* já foi obtida de excrementos de insetos da broca que habitam a madeira do pinheiro japonês vermelho (KURTZMAN et al., 2011), intestino de cupim *Reticulitermes chinensis* (ALI et al., 2017), intestino de um besouro tenebrionídeo (Coleoptera: Tenebrionidae), galeria de inseto (HOUSEKNECHT et al., 2011) e madeira em decomposição (LARA et al., 2014). É importante ressaltar que esta espécie é capaz de produzir xilanase como mostrado por Lara et al. (2014). Neste trabalho foram recuperados dois isolados de *Su. lignohabitans* obtidos de amostras de madeira em decomposição nas regiões do aeroporto e UFAM. Dentre os setes isolados de *Su. paludigena*, um foi recuperado de madeira em decomposição no sítio de coleta do aeroporto. Seis foram obtidos da área do Piquiá de amostras de madeira em decomposição (1), galeria de besouros (2) e larva de besouros passalídeos (3). *Su. xylolytica* apresentou um único isolado proveniente de larva de besouro na UFAM. Foram obtidos dois isolados *Su. smithiae*, sendo que um de amostras de madeira em decomposição (aeroporto) e outro de galeria (UFAM).

Estudos têm reportado a descrição de novas espécies pertencentes ao gênero *Sugiyamaella*, a partir de madeira em decomposição (MORAIS et al., 2013a; SENA et al., 2017; LOPES et al., 2018a; HUANG et al., 2018; SHI et al., 2021; CHAI et al., 2022). Neste contexto, no presente trabalho, foram obtidas vinte e três possíveis espécies novas desse gênero, isoladas dos quatro substratos estudados e das três localidades. Doze apresentaram somente um isolado cada. Portanto, a descoberta de novas espécies de *Sugiyamaella* é importante para aumentar o conhecimento e compreensão desse gênero e fornecer informações para utilização biotecnológica.

Outras espécies também foram obtidas neste trabalho, apresentado um ou dois isolados, sendo que do total de 71 espécies, 50,7% são singletos (36) e doze dubletos. Com relação aos singletos, dezenove são possíveis novas espécies, distribuídos em dez gêneros (*Apiotrichum*, *Clavispora*, *Colacogloea*, *Kurtzmaniella*, *Middelhovenomyces*, *Spathaspora*, *Sugiyamaella*, *Syzygospora*, *Vanrija* e *Vishniacozyma*). Os dubletos representam sete possíveis novas espécies distribuídos entre os gêneros *Yamadazyma*, *Sugiyamaella* e *Vanderwaltozyma*. Além das espécies já citadas, outras apresentaram cinco ou mais isolados. Neste sentido, *Kuraishia piskuri* apresentou três isolados de amostras do intestino de besouro e dois de madeira em decomposição. *K. piskuri* foi isolada de excrementos de inseto de um pinheiro caribenho (*Pinus caribaea*) (KURTZMAN; ROBNETT, 2014) e madeira em decomposição sendo capaz de produzir etanol a partir de D-xilose (MORAIS et al., 2020). No presente trabalho, *Schwanniomyces vanrijae* foi isolada tanto de amostras do intestino de besouro quanto galeria na região da UFAM. Esta espécie já foi isolada de amostras de madeira em decomposição de regiões da Mata Atlântica no Brasil e possui a capacidade de produzir etanol a partir de D-xilose (MORAIS et al., 2020). *Sw. vanrijae* também apresenta capacidade biofungicida para controlar as doenças em frutos de macieira sob condições de armazenamento (MADBOULY et al., 2020). *Sw. vanrijae* associada à própolis também foi capaz de proteger os frutos de limão contra o patógeno *Penicillium digitatum*, responsável pelo mofo verde (ABO-ELYOUSR et al., 2021). *Vanrija humicola* é uma espécie de levedura Basidiomycota comumente isolada de amostras de solo (YURKOV, 2018). Esta espécie foi recuperada de amostras do intestino de cupins (*Reticulitermes chinensis*) que se alimentam de madeira e identificadas como produtoras de xilanase (ALI et al., 2017). As espécies que foram encontradas com menor número de isolados podem representar microbiota de levedura transitória encontrada nos locais de coleta e/ou substrato.

Os ensaios de fermentação por D-xilose em meio sintético foram realizados com os doze isolados de *Sp. passalidarum* e com as linhagens *Spathaspora* sp. 1 (UFMG-CM-Y7018)

e *Spathaspora* sp. 2 (UFMG-CM-Y7167). As linhagens *Sp. passalidarum* NRRLY 27907 (controle positivo) e UFMG-CM-Y7210 foram as que apresentaram os maiores rendimentos de etanol ($Y_{p/s} = 0,39$ e $0,41$ g/g, respectivamente) e produtividade ($Q_p = 0,24$ g/L/h) na concentração de 30g/L de D-xilose a 30°C. Campos et al. (2022) avaliaram a produção de etanol de *Sp. arborariae* HM19.1A, *Sp. passalidarum* NRRLY 27907, e *Sc. stipitis* NRRL 7124 em três diferentes concentrações de xilose (40, 80 e 100g/L), sendo que *Sp. passalidarum* foi a que apresentou o maior rendimento de etanol ($Y_{p/s} = 0,44$ g/g) e produtividade ($Q_p=1,02$ g/L/h) cultivadas em 100 g/L de D-xilose a 32 °C. Outro estudo com foco no isolamento de novas leveduras fermentadoras de D-xilose a partir de madeira em decomposição coletadas em dois locais floresta amazônica foi conduzido por Cadete et al. (2012a). Foram realizados ensaios de fermentação usando meio de cultura D-xilose (50 g/L). Duas linhagens de *S. passalidarum* (HMD1.1 e HMD14.1) apresentaram os maiores rendimentos de etanol (0,31 a 0,37 g/g) e produtividades (0,62 a 0,75 g/L/h). Foi possível observar que após 48h de fermentação as leveduras apresentaram uma diminuição na concentração do etanol. Segundo Cadete et al. (2012a) provavelmente ocorre a assimilação do etanol pelas leveduras como consequência do esgotamento do açúcar do meio enquanto o oxigênio permanece disponível. Os resultados deste trabalho mostraram que linhagens selvagens de *S. passalidarum* apresentam potencial para produção de etanol nas condições testadas.

A produção de xilitol foi observada durante o ensaio de fermentação, confirmando a capacidade de *Spathaspora* sp. 1 e *Spathaspora* sp. 2 converterem a D-xilose em xilitol. *Spathaspora* sp. 1 foi capaz de consumir 100% da D-xilose em 48h, apresentando uma concentração 16,1g/L de xilitol com rendimento ($Y_{p/s} = 0,54$ g/g) e produtividade ($Q_p = 0,27$ g/L/h) com eficiência de 59,1%. Além do xilitol, *Spathaspora* sp. 1 foi capaz de produzir em menor concentração o etanol (3,0g/L). *Spathaspora* sp. 2 consumiu aproximadamente 77% da D-xilose em 72 h, apresentando concentrações 5,4g/L de xilitol e 3,19g/L de etanol com rendimentos ($Y_{p/s}^{XOH} = 0,32$ g/g; $Y_{p/s}^{EtOH} = 0,17$ g/g) e produtividade ($Q_p^{XOH} = 0,07$ g/L/h; $Q_p^{EtOH} = 0,04$ g/L/h) com eficiência de 35,7% e 34,8% respectivamente. Cadete et al. (2015) testaram linhagens de *C. xylosilytica*, em meio de fermentação contendo 50 g/L de D-xilose, apresentando taxas de consumo de xilose variando de 86% a 94% e uma produção máxima de xilitol de 34 g/L ($Y_{p/s} = 0,726$ g/g e $Q_p = 0,459$ g/L/h) após 72 h. Linhagens de *C. xylosilytica* também foram testadas por Palladino et al (2021) com 60 g/L de D-xilose, onde UFMG-CM-Y309 apresentou produção de xilitol de 46,87 g/L com consumo de 87,92% ($Y_{p/s} = 0,87$ g/g e $Q_p = 0,65$ g/L/h) em 72 h. Os resultados dos testes de fermentação das possíveis novas

espécies de *Spathaspora* apresentaram baixa produção de xilitol nas condições testadas neste trabalho.

Após a realização dos ensaios de fermentação de D-xilose, foram selecionadas as linhagens que não apresentaram diferenças estatísticas em relação a *Sp. passalidarum* NRRL27907 nas condições testadas, para os testes de fermentação em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. O consumo simultâneo de glicose e D-xilose é uma característica importante para microrganismos que fermentam biomassa lignocelulósica, por serem os açúcares mais abundantes nesse substrato (HARNER et al., 2015). Durante este ensaio de fermentação foi possível verificar que a glicose foi o primeiro açúcar consumido, e o consumo de xilose foi mais lento até o esgotamento da glicose. Durante a co-fermentação o consumo de xilose por *S. passalidarum* pode ocorrer simultaneamente ou não com o consumo de glicose, dependendo do nível de oxigênio no meio de cultura (HOU, 2012). Ribeiro et al. (2021) mostraram que a glicose inibe a metabolização da D-xilose em *Sp. passalidarum* diminuindo a expressão de genes e a atividade de enzimas-chave do metabolismo desta pentose.

As linhagens *Sp. passalidarum* HMD1.1 (controle positivo) e UFMG-CM-Y7204 foram as que apresentaram as melhores concentrações de etanol (19,4g/L) com um consumo de xilose de aproximadamente 94% ($Y_{p/s} = 0,32$ g/g e $Q_p = 0,32$ g/L/h) e eficiência de aproximadamente $\eta = 62\%$ em 96h. Cadete et al. (2012a) avaliaram a produção de etanol utilizando o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (50g/L de D-xilose e 5g/L de glicose) pela linhagem de *S. passalidarum* UFMG- HMD-1.1. Os autores verificaram o consumo de 84,9% dos açúcares presente no hidrolisado e produção de 8,8g/L de etanol em 96 h. O potencial de *Sp. passalidarum* UFMG-CM-Y473 foi avaliado para produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com peróxido de hidrogênio alcalino e hidrolisado com preparação enzimática comercial (DE SOUZA et al., 2018). Ao final de 72 h de fermentação, a concentração de etanol foi de 24 g/L com rendimento de $Y_{p/s} = 0,32$ g/g e produtividade $Q_p = 0,34$ g/L/h, obtidos após o consumo de 75 g/L dos açúcares fermentáveis (glicose e xilose). Farias & Maugeri-Filho (2021) avaliaram o desempenho de *Sp. passalidarum* usando fermentações extrativas alimentadas em lote com reciclo celular e remoção simultânea de etanol *in situ* em meio hidrolisado hemicelulósico suplementado com melão. O máximo rendimento e produtividade de etanol foi de 0,482 g/g e 9,5 g/L/h, respectivamente, com eficiência de processo de 94,3%. Os resultados obtidos no presente trabalho ressaltam a importância de mais pesquisas usando leveduras *Spathaspora* utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho sugerem que a bioprospecção de levedura fermentadoras de D-xilose associadas a besouros e os substratos que estes insetos colonizam na região amazônica pode representar uma rica fonte de microrganismos fermentadores desta pentose e/ou produtores de xilitol.

O presente trabalho também indica que existe uma grande diversidade de espécies pertencentes ao gênero *Sugiyamaella* associada a besouros Passalidae na região de floresta amazônica estudada.

A descoberta de 12 isolados de *Sp. passalidarum* é de extrema relevância pois pode indicar o verdadeiro nicho ecológico, intestino de besouros Passalidae, desta levedura, que tem sido considerada como a espécie mais promissora para produção de etanol a partir da D-xilose.

Cinco isolados de *Sp. passalidarum* obtidas neste trabalho apresentaram resultados nos experimentos de fermentação da D-xilose similares a linhagem de referência NRRL Y-27907, mostrando potencial para serem utilizadas em ensaio de fermentação com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Os isolados selecionados de *Sp. passalidarum* apresentaram resultados de fermentação da D-xilose em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar melhores do que a linhagem tipo desta espécie de levedura. Isto mostra a importância de estudos de bioprospecção de novas leveduras de biomas brasileiros para serem utilizadas em processos de obtenção do etanol de segunda geração a partir de hidrolisados vegetais.

As novas espécies *Spathaspora* sp. 1 (UFMG-CM-Y7018) e *Spathaspora* sp. 2 (UFMG-CM-Y7167) foram capazes de converter a D-xilose a xilitol, além de produzir etanol em menor concentração.

8. REFERÊNCIAS

- ABREU, R. L. S. D. et al. Passalid (Insecta: Coleoptera: Passalidae) collected from trunks of *Scleronema micranthum* (Malvaceae). **Acta Amazonica**, v. 47, n. 1, p. 71-74, 2017.
- ABO-ELYOUSR, K. A. M. et al. Evaluation of the synergy between *Schwanniomyces vanrijiae* and propolis in the control of *Penicillium digitatum* on lemons. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2021.
- AHUJA, Vishal et al. Biological and Pharmacological Potential of Xylitol: A Molecular Insight of Unique Metabolism. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1592, 2020.
- ALENCAR, J. B. R. et al. Effect of Structural Variation of Dead Trunks on Passalid (Coleoptera: Passalidae) Assemblages in Central Amazonian Campinaranas. **Neotrop Entomol** 49, 337–346 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00759-5>
- ALI, S. S. et al. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis*. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0181141, 2017.
- AZHAR, S. H. M et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
- BARRIGA, E. J. C. et al. Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. In: GRILLO, O.; VENORA, G. (Ed.). **Changing diversity in changing environment**. London: IntechOpen, p. 55-86, 2011.
- BARROS, K. O. et al. *Cyberlindnera dasilvae* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from rotting wood and frass of cerambycid larva. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 004986, 2021.
- BAZOTI, S. F. et al. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582-587, 2017.
- BERGMANN, J. C. et al. Biotechnological application of non-conventional yeasts for xylose valorization. In: SIBIRNY, A. (Ed.) **Non-conventional yeasts: from basic research to application**, p. 23-74, 2019.
- BIEDERMANN, P. H. W.; NUOTCLÀ, J. A. Sociais Beetles.Em: Starr C (eds) **Encyclopedia of Social Insects**. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90306-4_108-1, 2020.
- BLACKWELL, M. Made for each other: ascomycete yeasts and insects. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.
- BONAN, C. I. D. G. et al. Biorefinery platform for *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in the production of ethanol, xylitol, and single cell protein from sugarcane bagasse. **BioEnergy Research**, p. 1-13, 2021.

BUZZINI, P.; LACHANCE, M-A; YURKOV, A. (Ed.). **Yeasts in natural ecosystems: diversity**. Basel: Springer International Publishing, 2017.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res.** 9 p. 1338–42, 2009

CADETE, R. M. et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43135, 2012a.

CADETE, R. M. et al. *Candida amazonensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from rotting wood in the Amazonian Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n.6, p. 1438-1440, 2012b.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p. 421-431, 2013.

CADETE, R. M. et al. *Cyberlindnera xylosilytica* sp. Nov., a xylitol-producing yeast species isolated from lignocellulosic materials. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 2968-2974, 2015.

CADETE, R. M. et al. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: *XYL1.2* from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n.167, p. 1-14, 2016a.

CADETE, R. M. et al. The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 1-5, 2016b.

CADETE, R. M. et al. Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 5, p. 1203-1213, 2017.

CADETE, R. M.; FONSECA, C.; ROSA, C. A. Chapter 12: Novel yeast strains from Brazilian biodiversity: Biotechnological applications in lignocellulose conversion. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed.) **Biofuels. Biofuels in Brazil**. Cham: Springer, p.255-279, 2014.

CADETE, R. M.; LOPES, M. R.; ROSA, C. A. Yeasts associated with decomposing plant material and rotting wood. In: BUZZINI, P.; LACHANCE, M. A.; YURKOV, A. (Ed.). **Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity**. Cham: Springer, p. 265-292, 2017.

CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, v. 35, n. 2, p. 191-199, 2018.

- CAMPOS, V. J. et al. Physiological comparisons among *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, and *Scheffersomyces stipitis* reveal the bottlenecks for their use in the production of second-generation ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1-14, 2022.
- CEJA-NAVARRO, J. A. et al. Gut anatomical properties and microbial functional assembly promote lignocellulose deconstruction and colony subsistence of a wood-feeding beetle. *Nature microbiology*, v. 4, n. 5, p. 864-875, 2019.
- CHAI, C-Y. et al. Four new species of Trichomonascaceae (Saccharomycetales, Saccharomycetes) from Central China. *MycoKeys*, v. 90, p. 1-18, 2022.
- CHAO, A. et al. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological monographs*, v. 84, n. 1, p. 45-67, 2014.
- CHAO, A.; JOST, L. Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, v. 93, n. 12, p. 2533-2547, 2012.
- CORTEZ, D.V. et al. Improvement on D-xylose to xylitol biotransformation by *Candida guilliermondii* using cells permeabilized with Triton X-100 and selected process conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 180, n. 5, p. 969-979, 2016.
- DE SOUZA, R. F. R et al. Production of ethanol fuel from enzyme-treated sugarcane bagasse hydrolysate using d-xylose-fermenting wild yeast isolated from Brazilian biomes. *3 Biotech*, v. 8, n. 7, 2018.
- FARIAS, D.; MAUGERI-FILHO, F. Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar composition. *Fuel*, v. 288, p. 119673, 2021
- FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, 2000.
- FILLAT, U. et al. Laccases as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: A review. *Fermentation*, v. 3, n. 17, p. 1-30, 2017.
- GAO, J. et al. Enhanced fermentative performance under stresses of multiple lignocellulose-derived inhibitors by over expression of a typical 2-Cys peroxiredoxin from *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 10, n. 79, 2017.
- GUAMÁN-BURNEO, M.C. et al. Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 108, n. 4, p. 919-931, 2015.

GUJJARI, P. et al. *Trichosporon xylopinii* sp. nov., a hemicellulose-degrading yeast isolated from the wood-inhabiting beetle *Xylopinus saperdoides*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 10, p. 2538-2542, 2011.

HARNER, N. K. et al. Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 1-20, 2015.

HSIEH, T. C. et al. iNEXT: iNterpolation and EXTrapolation for species diversity. R package version 2.0. 12. 2016.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 205-214, 2012.

HOUSEKNECHT, J. L. et al. Yeasts in the *Sugiyamaella* clade associated with wood-ingesting beetles and the proposal of *Candida bullrunensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 1751-1756, 2011

HUANG, L-N et al. *Sugiyamaella xiaguanensis* fa, sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 3307-3310, 2018.

JANG, S.; KIKUCHI, Y. Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry. **Current Opinion in Insect Science**, 2020.

JIA, R-R et al. Three new Scheffersomyces species associated with insects and rotting wood in China. **MycoKeys**, v. 71, p. 87, 2020.

KOBAYASHI, R.; KANTI, A.; KAWASAKI, H. *Pichia chibodasensis* sp. nov., isolated in Indonesia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1024-1027, 2017.

KUMLA, J. et al. Evaluation of multifarious plant growth promoting trials of yeast isolated from the soil of assam tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) plantations in Northern Thailand. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1168, 2020.

KURTZMAN, C. P.; BOEKHOUT, T. Yeasts as distinct life forms of fungi. In: BUZZINI, P.; LACHANCE, M. A.; YURKOV, A. (Ed.). **Yeasts in natural ecosystems: Ecology**. Cham: Springer, p. 1-37, 2017.

KURTZMAN, C. P. et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: A taxonomic**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, p. 87-110, 2011.

KURTZMAN, C. P. et al. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. **FEMS Yeast Research**, n. 15, p. 1-17, 2015.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Ed.). **The yeasts: A taxonomic study.** 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.

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

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Description of *Kuraishia piskuri* fa, sp. nov., a new methanol assimilating yeast and transfer of phylogenetically related *Candida* species to the genera *Kuraishia* and *Nakazawaea* as new combinations. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 1028-1036, 2014.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.

LACHANCE, M. A. et al. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeasts species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p.172- 177, 1999.

LARA, C. A. et al. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 6, p. 1107-1119, 2014.

LIBKIND, D. et al. Towards yeast taxogenomics: lessons from novel species descriptions based on complete genome sequences. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 6, p. foaa042, 2020.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T. Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. **Journal Basic Microbiology**, v. 33, p. 413-426, 1993.

LIMA, C. S. et al. Metabolomic profiling of *Spathaspora passalidarum* fermentations reveals mechanisms that overcome hemicellulose hydrolysate inhibitors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-15, 2022.

LIU, X-J et al. Taxonomy and physiological characterisation of *Scheffersomyces titanus* sp. nov., a new D-xylose-fermenting yeast species from China. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

LOPES, M. R. et al. Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f.a., sp. nov. and *Spathaspora gorwiae* f.a., sp. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 4, p. fow044, 2016.

LOPES, M. R. et al. Characterisation of the diversity and physiology of cellobiose-fermenting yeasts isolated from rotting wood in Brazilian ecosystems. **Fungal biology**, v. 122, n. 7, p. 668-676, 2018a.

LOPES, M. R. et al. *Scheffersomyces stambukii* f.a, sp. nov., a d-xylose-fermenting species isolated from rotting wood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 2306-2312, 2018b.

LUGANI, Y.; PURI, M.; SOOCH, B. S. Recent insights, applications and prospects of xylose reductase: a futuristic enzyme for xylitol production. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 4, p. 921-946, 2021.

LUIZÃO, F. J. Ciclos de nutrientes na Amazônia: respostas às mudanças ambientais e climáticas. **Ciência e Cultura**, v. 59, n. 3, p. 31-36, 2007.

LV, S-L et al. Five new additions to the genus *Spathaspora* (Saccharomycetales, Debaryomycetaceae) from southwest China. **MycoKeys**, v. 75, p. 31, 2020.

MADBOULY, A. K. et al Biocontrol of *Monilinia fructigena*, causal agent of brown rot of apple fruit, by using endophytic yeasts. **Biological control**, v. 144, p. 104239, 2020.

MIDDELHOVEN, W. J. et al. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 975-986, 2004.

MORAIS, C. G. et al. *Sugiyamaella xylanicola* sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from rotting wood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2356-2360, 2013a.

MORAIS, C. G. et al. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, n. 11, p.19-28, 2013b.

MORAIS, C. G. et al. *Saturnispora bothae* sp. nov., isolated from rotting wood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 3810-3813, 2016a.

MORAIS, C. G. et al. *Spencermartinsiella silvicola* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 604-608, 2016b.

MORAIS, C. G. et al. Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. **Fungal Biology**, v. 124, n. 7, p. 639-647, 2020.

NGUYEN, N. H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232-1241, 2006.

PAL, S. et al. Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol. **Process Biochemistry**, vol. 51, n. 7, p. 809-819, 2016.

- PALLADINO, F. et al. Novel potential yeast strains for the biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 3, p. 690-702, 2021.
- PEREZ, G. et al. Simultaneous identification to monitor consortia strain dynamics of four biofuel yeast species during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 12, p. 1133-1140, 2020.
- RAJ, T. et al. Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives. **Bioresource technology**, v. 344, p. 126292, 2022.
- RAO, V. L. et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, n.1, p.299-310, 2016.
- RAVELLA, R. S. et al. *Candida northwykensis* sp. nov., a novel yeast isolated from the gut of the click beetle *Melanotus villosus* **Current Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 115-120, 2011.
- REN, Y. et al. Description of *Scheffersomyces henanensis* sp. nov., a new D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotten wood. **PloS One**, v. 9, e92315, 2014.
- RIBEIRO, LÍLIAN E. et al. Influence of glucose on xylose metabolism by *Spathaspora passalidarum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 157, p. 103624, 2021.
- RIVERA, F. N. et al. Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, n. 2, p. 325-342, 2009.
- ROCHA, G. J. M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.
- RUCHALA, J.; SIBIRNY, A. A. Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 4, p. fuaa069, 2021.
- SANTOS, L. V. et al. Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12 n. 1, p. 40-57, 2016.
- SANTOS, R. O. et al. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 635-642, 2011.
- SANTOS, A. R. O. et al. The yeast community of *Conotelus* sp. (Coleoptera: Nitidulidae) in Brazilian passionfruit flowers (*Passiflora edulis*) and description of *Metschnikowia amazonensis* sp. nov., a large-spored clade yeast. **Yeast**, v. 37, n. 3, p. 253-260, 2020.
- SARAVANAN, P. et al. Prospective evaluation of xylitol production using *Dabaryomyces hansenii* var *hansenii*, *Pachysolen tannophilus*, and *Candida guilliermondii* with sustainable agricultural residues. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-19, 2021.

SELLE, G. L. Ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 4, 2007.

SENA, L. M. et al. D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 1, p. 53-67, 2017.

SHI, Cheng-Feng et al. Diversity of the genus *Sugiyamaella* and description of two new species from rotting wood in China. **MycologyKeys**, v. 77, p. 27, 2021.

SHIFRINE, M.; PHAFF, H. J. The association of yeasts with certain bark beetles. **Mycological Society of America**, v. 48, n. 1, p. 41-55, 1956.

SILVA, D. D. V et al. Production and purification of xylitol by *Scheffersomyces amazonensis* via sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 14, n. 2, p. 344-356, 2020.

SOUZA, G. F. L. et al. Efficient production of second generation ethanol and xylitol by yeasts from Amazonian beetles (Coleoptera) and their galleries. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 20, p. 814-824, 2017.

SOUZA, Z. J. Bioelectricity of sugarcane: A case study from Brazil and perspectives. In: **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. Academic Press, p. 255-279, 2020.

STARMER, W.T.; LACHANCE, M.-A. Yeast ecology. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Ed.), **The yeasts: A taxonomic study**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, p. 65-83, 2011.

STEFANINI, I. Yeast-insect associations: It takes guts. **Yeast**, n. 35, p. 315-330, 2018.

STILLER, J. W.; HALL, B. D. The origin of red algae: implications for plastid evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 9, p. 4520-4525, 1997.

SUH, S-O.; BLACKWEL, M. Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 1, p. 87-95, 2004.

SUH, S-O. et al. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 3137-3145, 2003.

SUH, S-O. et al. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycological Research**, vol. 109, n. 3, p. 261-265, 2006.

SUH, S-O. et al. *Scheffersomyces parashehatae* fa, sp. nov., *Scheffersomyces xylosifermentans* fa, sp. nov., *Candida broadrunensis* sp. nov. and *Candida manassasensis* sp. nov., novel yeasts associated with wood-ingesting insects, and their ecological and biofuel implications. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4330-4339, 2013.

TANAHASHI, M.; IKEDA, Hi.; KUBOTA, K. Elementary budget of stag beetle larvae associated with selective utilization of nitrogen in decaying wood. **The Science of Nature**, v. 105, n. 5-6, p. 33, 2018.

TRAVAINI, R. et al. Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 2-12, 2016.

ULYSHEN, Michael D. Chapter 3 – Ecology and Conservation of Passalidae. *In*: ULYSHEN, Michael D. (ed.) **Saproxyllic insects: Diversity, Ecology and Conservation**. Springer, 2018.

URBINA, H. et al. The gut of Guatemalan passalid beetles: a habitat colonized by cellobiose- and xylose-fermenting yeasts. **Fungal Ecology**, v. 6, n. 5, p. 339-355, 2013a.

URBINA, H. et al. *Scheffersomyces cryptocercus*: a new xylose-fermenting yeast associated with the gut of wood roaches and new combinations in the *Sugiyamaella* yeast clade. **Mycologia**, v. 105, n. 3, p. 650-660, 2013b.

URBINA, H.; BLACKWELL, M. Multilocus phylogenetic study of the *Scheffersomyces* yeast clade and characterization of the N-terminal region of xylose reductase gene. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39128, 2012.

URBINA, H.; BLACKWELL, M. New combinations, *Scheffersomyces amazonensis* and *S. ergatensis*. **Mycotax**, v. 123, p. 233-234, 2013.

UNREAN, P.; KETSUB, N. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial crops and products**, v. 123, p. 238-246, 2018.

VARIZE, C. S. et al. *Spathaspora piracicabensis* fa, sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 4, p. 525-531, 2018.

WANG, Y. et al. *Candida funiuensi* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotten wood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1755-1758, 2015.

YURKOV, A. M. Yeasts of the soil—obscure but precious. **Yeast**, v. 35, n. 5, p. 369-378, 2018.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 71, p. 475-501, 2017.

ZAMPIERI, D. Expressão gênica e atividades de celulasas, β -glicosidasas, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29. 2015. p.129. **Tese** – Doutorado em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES REALIZADAS

- Participação: 2nd Associated International Laboratory Meeting (LIA 2019) - Bact-Inflam Conference, from August 21st to 23rd, 2019, at the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.
- Participação no Webinar “Caminhos da bioconversão” - Infors LATAM Ltda., www.infors-ht.com - maio/2020.
- Mesa redonda online "PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS EM ALIMENTOS: DESAFIOS E POTENCIALIDADES" realizada no dia 14 de julho de 2020. Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, duração total de 3h.
- Mesa redonda online "FONTES ALIMENTARES ALTERNATIVAS" realizada no dia 28 de julho de 2020. Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, duração total de 4h.
- Participação da Comissão Organizadora do VII Simpósio de Microbiologia da UFMG – Conecta SIM 2020, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado online de 03 a 06 de novembro de 2020.
- Participação do “VII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM”, promovido pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03, 04, 05 e 06 de novembro de 2020 com duração total de 12h.
- Resumo expandido CONECTA SIM 2020: Souza, G. F. L.; Barros, K. O.; Santos, A. R. O.; Fonseca, C. R. V.; Abegg, M. A.; Rosa, C. A., **Identificação de leveduras isoladas do intestino de besouros em áreas de floresta amazônica brasileira.**
- Participação do “IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 27 a 29 de setembro de 2022, com carga horária de 20 horas.
- Resumo apresentado no IX Simpósio de Microbiologia da UFMG (2022): Gisele de Fátima Leite Souza, Ana Raquel de Oliveira Santos, Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga, Katharina de Oliveira Barros, Maxwell Adriano Abegg, Carlos Augusto Rosa, **Diversidade de leveduras associadas a madeira em decomposição do bioma amazônico com potencial para aplicação na produção de etanol 2G.**
- Resumo apresentado no IX Simpósio de Microbiologia da UFMG (2022): Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga, Katharina de Oliveira Barros, Gisele de Fátima Leite Souza, Carlos Augusto Rosa, **Co-cultivo de bactérias ácido lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria do processo fermentativo de produção de cachaça.**

- Resumo apresentado no IX Simpósio de Microbiologia da UFMG (2022): Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga, Katharina de Oliveira Barros, Giulia Magni França, Gisele de Fátima Leite Souza, Carlos Augusto Rosa, **Diversidade de leveduras associadas a madeira em decomposição de três áreas da floresta amazônica brasileira.**

- Artigos submetidos para publicação

- ***Sugiyamaella bielyi* f. a., sp. nov., and *Sugiyamaella amazoniana* f. a., sp. nov., two yeast species isolated from passalid beetles and rotting wood in Amazonia.** Gisele F. L. Souza; Katharina O. Barros; Flávia B. M. Alvarenga; Ana Raquel O. Santos; Cláudio R. V. Fonseca; Maxwell A. Abegg; Marc-André Lachance; Carlos A. Rosa.

- **The Brazilian Amazonian rainforest harbors a high diversity of yeasts associated with rotting wood, including many candidates for new yeast species.** Katharina O. Barros; Flávia Barbosa Magalhães Alvarenga; Giulia Magni; Gisele L. Souza; Maxwell A. Abegg; Fernanda Palladino; Ana Raquel O. Santos; Sílvio S. Silva; Rita C. L. B. Rodrigues; Trey K. Sato; Chris Todd Hittinger; Carlos A Rosa.

- ***Spathaspora brunopereirae* sp. nov. and *Spathaspora domphillipsii* sp. nov., two D-xylose-fermenting ascosporegenous yeasts from Amazonian Forest biomes.** Ana Raquel Santos; Gisele Souza; Katharina Barros; Flávia Alvarenga; Mariana Lopes; Lauren Drumond; Luiz H. Rosa; Aristoteles Goes-Neto; Paula B. Morais; Marc-André Lachance; Carlos A. Rosa.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela: Número de substratos amostrados por local de coleta

Substrato	Aeroporto	Piquiá	UFAM	Total
Intestino besouro	9	2	24	35
Larva	3	5	3	11
Galeria	8	9	12	29
Madeira em decomposição	20	20	20	60