

LEVANTAMENTO DE LEVEDURAS OCORRIDAS EM FRUTOS MADUROS.

SUA POSIÇÃO SISTEMÁTICA

Sebastiana Joly

Engenheiro Agrônomo

Assistente do Departamento de Microbiologia do

Instituto Zimotécnico

Piracicaba

Tese de Doutorado apresentada à

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Universidade de São Paulo

- 1954 -

- E R R A T A -

	<u>ONDE SE LÊ</u>	<u>LEIA-SE</u>
Pág.	7 - Linha 23 - Wickerhan	Wickerham
"	10 - " 13 - mocoorganismos	microorganismos
"	12 - " 18 - limites	limites
"	13 - " 14 - conseguir	conseguiu
"	23 - " 19 - dignas	dignas
"	38 - " 26 - polisacarideo	polissacarídeo
"	38 - " 30 - Cryptococus	Cryptococcus
"	39 - " 28 - lipofena	lipofera
"	40 - " 12 - colaboração	coloração
"	40 - " 18 - Custus	Custers
"	42 - " 11 - a ação	à ação
"	45 - " 10 - descrições padrões	descrições padrão
"	47 - " 3 - células mães	células mãe
"	47 - " 6 - sistemática	sistemática
"	48 - " 22 - bolcos	blocos
"	57 - Houve repetição da cultura nº 37	
"	57 - Linha 21 - Abbcoillea	Abbevillea
"	57 - " 22 ⁱ - Prunus	Prunus
"	57 - " 36 - Acheas	Achras
"	66 - " 31 ⁱ - Nichaus	Niehaus
"	67 - " 26 - apresentador	apresentados
"	70 - " 3 - me abolismo	metabolismo

+ + + + +

+ + +

+

1	Introdução	1
	Material e métodos	17
2.1	Material	17
2.2	Meios de cultura usados	17
2.3	Coleta das amostras	17
2.4	Isolamento das leveduras	18
2.4.1	Método de enriquecimento	18
2.4.2	Método de sementeação direta	19
2.4.3	Método de sementeação da água de lavagem dos frutos	19
2.4.4	Método de incubação direta	20
2.4.5	Técnica seguida	20
2.5	Identificação sistemática	22
2.5.1	Fisiologia	24
2.5.1.1	Formação da película em meio lí- quido	24
2.5.1.2	Zimograma dos hidratos de carbono	26
2.5.1.3	Auxanograma dos açúcares	31
2.5.1.4	Auxanograma do nitrogênio	35
2.5.1.5	Etanol como única fonte de carbo- no	37
2.5.1.6	Produção de compostos amiláceos .	38
2.5.1.7	Produção de éster	39
2.5.1.8	Produção de pigmentos carotenói- des	39
2.5.1.9	Produção de ácido	40
2.5.1.10	Desdobramento de gorduras	41
2.5.1.11	Coagulação e peptonização do lei- te	41
2.5.2	Morfologia	43
2.5.2.1	Características da reprodução ve- getativa	43
2.5.2.2	Forma e tamanho das células	46
2.5.2.3	Formação de ascosporos	47
2.5.2.4	Formação da balistosporos	50
2.5.3	Caractères morfológicos culturais	50
2.5.3.1	Consistência	50
2.5.3.2	Aspecto	51
2.5.3.3	Superfície	51
3	Resultados	52
3.1	Formação de película	52
3.2	Zimograma dos hidratos de carbono	52
3.3	Hidrólise da arbutina	52
	Resumo	66
	Conclusões	69
	Bibliografia	71

S. Joly

LEVANTAMENTO DE LEVEDURAS OCORRIDAS EM FRUTOS MADUROS.

SUA POSIÇÃO SISTEMÁTICA

Eng. Agr. Sebastiana Joly

1 - INTRODUÇÃO

A finalidade dêste trabalho visa o cumprimento de duas proposições:- a primeira e principal é submeter a julgamento da egrégia banca examinadora os resultados dos nossos estudos parciais sôbre o levantamento de leveduras que ocorrem em frutos da zona de Piracicaba; a outra é satisfazer uma das exigências regimentais do Instituto Zimotécnico, qual seja a defesa de tese para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

As leveduras são microorganismos cujas propriedades fisiológicas oferecem interêsse a um grande número de setores da atividade humana, como soem ser, entre outros:-

1) - na alimentação humana e dos animais domésticos;

2) - em indústrias de fermentação, como fatores de simplificação molecular;

3) - na patologia animal e vegetal, como agentes itiológicos;

4) - na ciência pura, como meio de pesquisas.

As leveduras contendo ergosterol constituem uma fonte de produção de vitamina D, por irradiação (39). Encerram, também, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, piridoxina, biotina e ácido para-aminobenzóico, todos considerados como elementos componentes de vitaminas do grupo B. Possuem, ainda, na sua constituição, elevado teor em proteínas e quantidades relativamente grandes de carboidratos, gorduras e sais minerais (43).

É, justamente por isso, que se tenta o seu uso como complemento na dieta da alimentação humana, servindo-se de strains de Torulopsis utilis para êsse fim. Leveduras irradiadas de há muito são usadas na alimentação dos animais domésticos, como fonte de matérias nitrogenadas, especialmente para o gado.

Segundo LEFÈVRE (22) a levedura de cerveja, em estado sêco, poderá conter um mínimo de 8% de água. Esta humidade está naturalmente condicionada ao processo e aparelhamento empregados na desidratação. Desta percentagem depende a boa conservação da levedura por um tempo mais ou menos longo.

Uma levedura sêca, em condições ideais, apresenta uma composição química que oscila relativamente pouco, segundo a raça, meio de cultura e outros fatores. De um modo geral, ela pode ser resumida nos números do quadro seguinte:-

Água	8,0%
Matérias nitrogenadas	57,0
Matérias graxas	3,0
Matérias minerais	7,0
Mat. extrativas não nitrogenadas	25,0

As substâncias nutritivas originadas da levedura de cerveja são assimiláveis na proporção de 90%. A composição das matérias que entram na constituição da levedura corresponde, de modo exato, às exigências da alimentação humana e animal.

Na opinião do mesmo autor (22) isto vem responder ao grande problema contemporâneo da carência de alimentos nutritivos ricos de proteínas e vitaminas, pois a levedura de cerveja encerra êsses elementos necessários ao organismo em quantidade apreciável. A levedura é suficientemente capaz de substituir a carne graças às proteínas e sais minerais que encerra.

Outra forma de aplicação industrial da levedura sêca é submetê-la a uma pressão forte e elevada temperatura, resultando daí um produto semelhante a matéria plástica, muito duro e resistente. Quando insolubilizado por tratamento especial com formol, torna-se relativamente resistente à ação da água quente e ao desgaste.

Há inúmeros alimentos fermentados para cuja fabricação se aproveita a ação de leveduras que trabalham, ora isoladamente, ora associadas com bactérias. Esta prática é comum entre os havaianos. Muitas bebidas são fabricadas com base neste mesmo princípio. É o caso do kefir, que é um leite alcoólico, no qual se encontra o Saccharomyces cartilaginosus, o S. fragilis, muitos Torulopsis e muitas bactérias, dentre as quais o Bacillus caucasicus (13)

Um tipo interessante de fermentação ocorre com a cerveja da Bélgica. Aquí há interferência de duas espécies de leveduras. A fase principal da fermentação se opera pelo Saccharomyces carlsbergensis, seguindo-se a secundária graças a espécies de Brettanomyces. Esta dura de 6 meses a 2 anos. A propriedade particular desta levedura é converter parte do álcool da cerveja em ácido acético, produzindo um bouquet peculiar à bebida (31).

Na Mandchuria fabrica-se uma bebida alcoólica denominada Sorgo, também conhecida por água da vida. Desta bebida SAITO (*) isolou um Zygosaccharomyces ao qual deu o nome específico de mandshuricus.

Do Pulque, bebida alcoólica muito usada no México e fabricada com a seiva de Agáveas, GUILLIERMOND (37) extraiu uma levedura.

(*) Guilliermond, A
1920 - The Yeasts

Na Argentina, na província de Salta e tãda zona noroeste do país fabrica-se, com farinha de milho, uma bebida fermentada denominada Chicha, de largo uso. Apesar do seu baixo teor alcoólico, ao redor de 3 a 4%, embriaga facilmente (42).

Os povos que habitavam a Suécia antigamente usavam um alimento derivado do leite, de aspecto viscoso, sem coagulação e de gôsto ácido e muito agradável, a que davam o nome de Taette. Dêste leite fermentado foi isolado o Saccharomyces taette, que apresenta duas variedades: o maior e o menor.

Algumas formas superiores de leveduras convertem os carboidratos em matérias lipóidicas. Normalmente elas produzem lipídeos, sendo contudo em quantidades tão pequenas que não encontram aplicação industrial. Durante a primeira Guerra Mundial a Alemanha fez sérias tentativas para a produção industrial de gorduras por intermédio do Endomycopsis ver-nalis (39).

Modernamente sabe-se que o microorganismo produtor de gordura é a Rhodotorula glutinis, assim como o Torulopsis utilis o é de proteína.

A levedura encerra notadamente diástases proteolíticas, invértase, máltase e zímase. As diástases proteolíticas têm por objeto dissolver e digerir as matérias protéicas mais ou menos complexas que contêm os meios nutritivos. A invértase, súcrase ou invertina, provoca o desdobramento hidrolítico da sacarose, convertendo-a em mistura de partes iguais de dextrose e frutose (açúcar invertido). A máltase é susceptível de hidrolisar a maltose produzindo duas moléculas de glucose. A zímase segregada durante a vida anaeróbica da levedura desdobra a glucose em álcool e CO₂ (2).

Graças a isso é que as leveduras são largamente utilizadas em confeitarias, indústrias de álcool, panar e de xarope de mēsa, dentre inúmeras outras.

Entre os insetos, na ordem dos Homópteros, ocorre uma levedura patogênica que invade o sangue tornando-o branco leitoso. Leva o inseto à morte e o mal é transmissível por inoculação (39).

Os animais superiores ingerem leveduras juntamente com os alimentos. Muitas espécies passam intactas pelos sucos digestivos dos animais e do homem e, por isso, são encontradas nas suas fezes. Outras, como as leveduras de panificação se deixam atacar por aqueles sucos e são destruídas. Umas são apenas transitórias e outras são constantes, funcionando como parasitos. Tal é o caso do Saccharomyces guttulatus que infesta os intestinos dos coelhos, vivendo aí como parasitos (39).

O Saccharomyces piriformis, isolado do Ginger beer, vive em simbiose com o Bacterium vermiforme, alojando-se na bainha dessa bactéria, que parece destruir alguma substância nociva à vida da levedura (13).

Há, também, as formas que parasitam o homem causando micoses cutâneas e pulmonares (gênero Candida), meningite (Cryptococcus neoformans) cujo habitat é a superfície de frutos, endocardites (Candida parakrusei e C. Guilliermondi). Outra micose humana é a estomatite cremosa que faz muitas vítimas entre crianças sub-alimentadas ou em condições precárias de higiene, grassando em asilos, segundo dados da literatura médica antiga. Nos adultos se observa como um evento final em certas moléstias como a febre tifóide, a tuberculose ou processos cancerosos. O patógeno desta micose é a Candida albicans (39).

KRUG (18) relata ter encontrado o primeiro caso da podridão do capulho do algodoeiro no Brasil. Esta moléstia não tem sintomas externos visíveis. Só ataca frutos tendo como vetor os insetos. Foi primitivamente mencionada por PEGLION, em 1901, atacando as avelãs, na Itália. O microorganismo aqui encontrado deu origem ao gênero Nematospora. A mesma moléstia foi posteriormente verificada nas Índias Ocidentais e na Califórnia. Mais tarde assinalada na Nigéria e outros países e, finalmente, por KRUG constatada entre nós.

REDAELLI, CASTELLI e CIFERRI (37) isolaram leveduras parasitas do homem e de animais, partindo de amostras de leveduras de pão destinadas à panificação caseira italiana. São elas dos gêneros Mycotorula e Blastodendrion. O pão fermentado com leveduras mistas dessa contaminação não é, todavia, danoso à saúde. Esta mesma levedura foi encontrada por VERONA e CIFERRI (44) parasitando cenouras e causando seu apodrecimento.

O mesmo CIFERRI (*) isolou o Saccharomyces pleomorphus de ananás em putrefação, cuja particularidade interessante é fermentar a sacarose mas não 1/3 da rafinose.

Recentemente se tem usado as leveduras para ensaiar certas vitaminas. WILLIAMS e seus colaboradores afirmam que um meio deficiente em tiamina e contendo tôdas as outras substâncias essenciais à nutrição das leveduras, opera o desenvolvimento desses organismos na proporção direta das quantidades de vitaminas adicionadas ao meio. O desenvolvimento da levedura é medido por centrifugação (39).

As leveduras geralmente ocorrem na matéria orgâ

(*) Mrak, Phaff

nica, especialmente nas de origem vegetal onde há carboidratos. Muitas leveduras têm sido isoladas da exudação de árvores. HANSEN (*) isolou o Saccharomyces ludwigii e várias espécies de Kloeckera da exudação de carvalho, assim como todas as espécies de Nadsonia da exudação de outras essências. HANSEN isolou também a Pichia membranaefaciens da exudação gomosa do olmeiro.

GOIDANICK, CIFERRI e REDAELLI (12) encontraram várias espécies de leveduras em polpa de madeira destinada à manufatura de papel. Entre essas algumas já eram conhecidas como parasitos do homem. A uma nova espécie deram o nome de Mycotorula mucinosa.

MARCUS e NIETHAMMER (*) isolaram leveduras de tecidos sãos de frutos e sementes, assim como BEISEL também o fez de suco fresco de laranjas da Flórida. O Saccharomyces rouxii também foi isolado de suco de frutos (13).

Os frutos passas são comumente recobertos por cristais de açúcar e uma tênue camada de substância esbranquiçada. Trabalhos de BAKER e MRÁK (4) em ameixas e figos passas procedentes da Califórnia revelaram que são células de leveduras que conferem essa aparência brancacenta à superfície dos frutos conservados sob forma de passas.

WICKERHAN e DUPRAT (47) isolaram leveduras provenientes de um suco de uva em conserva sob elevada pressão gasosa, mas cujo sabor se apresentava altamente alterado e alcoólico. O gosto denunciava a atividade presente de Zygosaccharomyces. Tratava-se de uma nova espécie a que deram o nome de Z. versatilis.

(*) Mrak, Phaff

1951. Taxonomy and Morphology of Yeasts.

S. Joly

-8-

A Hansenula subpelliculosa foi encontrada por BEDFORD (5) numa mistura de açúcar, ôvo e ameixas secas.

Do açúcar, durante sua manufaturação, foi extraído o Saccharomyces zopfi, na Saxônia.

De acôrdo com MRAK e MC CLUNG (28) foram isolados vários gêneros de leveduras de vinhos de diferentes estágios de fermentação, tais como: Saccharomyces, Zygosaccharomyces, Hanseniaspora, Debaryomyces, Pichia, Hansenula, Zygopichia e Torulaspota.

NICKERSON (32) descreveu uma nova espécie de Zygosaccharomyces, o Z. acidifaciens encontrada em garrafas de vinho destinadas à acidificação. Não foram aí encontradas as bactérias do gênero Acetobacter como era de se esperar, mas apenas leveduras. O teor de acidês do meio em questão avisinhava-se de 2,2 e, talvez por isto, nenhum outro microorganismo além de leveduras se encontrava aí presente. Pelo autor foram feitas culturas monocelulares e, mesmo depois de 4 anos, nenhuma variação foi verificada. Não houve formação de película ou de anel, permanecendo o líquido claro durante a fermentação que se processava com moderada produção de CO₂.

As leveduras podem ser isoladas do solo de vinhedos e pomares, superfícies de frutos doces e maduros como uvas, maçãs e citrus, folhas e outras partes da planta. Aparecem no ar levadas pela poeira e veiculadas pelo vento, no corpo de insetos e em grandes altitudes.

PRESCOTT e DUNN (36) dizem que ocasionalmente são as leveduras encontradas em produtos de origem animal. Todavia, espécies do gênero Debaryomyces são comuns nos produtos derivados da carne. Apesar disso, não foi possível até o presente momento, estabelecer uma correlação entre a sua presença frequente com as atividades metabólicas dessas levedu-

ras. CASTELLI e SISANI (✱) estudando conservas de carne verificaram que há nas linguiças aqueles microorganismos e que a sua distribuição é maior na periferia que no centro dos indutos. Experimentalmente verificaram aqueles autores que se pode tornar o salame curado em tempo muito rápido, mergulhando-se seu envólucro numa suspensão de Debaryomyces tyrocola.

SACCHETTI (✱) estudou as leveduras dos queijos moles italianos encontrando Zygosaccharomyces casei e Z. versicolor, aos quais responsabilizou as características delicadas desses produtos do leite. Esses mesmos microorganismos foram encontrados na manteiga, nos cremes e mesmo no leite condensado.

As leveduras são constantemente encontradas nas salmouras de conserva de carnes, vegetais e frutos, formando películas nas superfícies. A concentração de sal nesses produtos varia de 4 a 20%. Os Debaryomyces são o gênero que apresenta maior tolerância aos meios contendo elevada percentagem de sal chegando, algumas espécies, a suportar até 24% de concentração salina. Esta tolerância diminui quando a cultura é mantida em meio artificial por vários anos.

ETCHELLS e BELL (✱) estudaram leveduras isoladas de conserva em fermentação. Encontravam-se elas em diferentes profundidades do meio e não formavam películas. Verificaram que se tratava de Brettanomyces constituindo esta descoberta um acontecimento original, já que este gênero só tem como fonte natural as cervejas.

PASTEUR demonstrou que frutos imaturos que são cobertos com algodão, quando maduros não apresentam leveduras.

(✱) Mrak, Phaff

HANSEN verificou que as leveduras permanecem - latentes no solo sob a forma de ascosporos durante o inverno e a primavera. O vento será o veículo que as conduzem até os frutos sôbre os quais se depositam. Os esporos encontrando as condições propícias, ao aproximar o verão, germinam e dão brotos para formar novos esporos na superfície dos frutos maduros.

Em oposição a estas afirmações, STARKEY e HENRICI (*) são de opinião que as leveduras são relativamente - muito pouco frequentes nos solos. Eles trabalharam com vários tipos de solos e em diferentes épocas do ano. Tendo encontrado quantidades tão pequenas de leveduras foram persuadidos a crer que êsses microorganismos não participam das modificações do solo. A iguais resultados chegou CIFERRI (*) quando trabalhou com solos da República Dominicana. Ele supôs que células vegetativas de levedura postas no solo morrem após uma semana. Também NISSIN (*) pesquisando 10 solos de diferente - constituição física e química, tomados em 4 estações do ano, encontrou leveduras de 50% das amostras trabalhadas. Concluiu que o tipo de solo tem marcada influência sôbre a ocorrência de leveduras, pois solos de pomar apresentam maior quantidade dêsses seres, enquanto solos de pinheirais revelam menor quantidade.

As leveduras comumente se encontram no tracto digestivo dos insetos, sendo por isso provável serem êles os responsáveis mais diretos pela disseminação dêsses microorganismos que o próprio vento. BERSLE (39) achava que o habitat normal de muitas leveduras, inclusive o Saccharomyces ellipsoi-

(*) Mrak, Phaff

1951. Taxonomy and Morphology of Yeasts.

deus é o tubo digestivo dos Dípteros. Tem-se demonstrado também que as leveduras constituem a dieta alimentar de alguns insetos como as Drosófilas que se servem mais desses microorganismos da superfície dos frutos maduros que do seu próprio suco. As leveduras penetram as cavidades naturais dos insetos e aí vivem em aparente simbiose, sendo até transmitidas pelo ovo. São particularmente os Homópteros os insetos para isso preferidos. As leveduras ficam contidas no tecido pseudo vitelino de tal modo que, ao microscópio, se assemelham a uma glândula. As espécies mais frequentes neste tipo de simbiose são as do gênero Schizosaccharomyces.

HOSTE (κ) provou que a espécie pinan desse gênero de leveduras pode ser isolada regularmente do revestimento quitinoso dos escaravelhos Dendroctonus e Ips assim como da madeira atacada por eles. Estas leveduras apresentam uma característica interessante qual seja a de formar esporos do aspecto de chapéu, que não é normal nos Zygosaccharomyces. Esse autor ressaltou a grande variabilidade na proporção da esporulação nas diferentes cepas isoladas percebendo que há uma tendência para desaparecer a faculdade de esporulação. Outra conclusão a que chegou o autor é que a associação constante verificada entre os escaravelhos e essas leveduras não pode ser classificada como simbiose. É mais provável que esses insetos sejam os transmissores das leveduras que vivem associadas a certos fungos como Ceratostomella que infestam as madeiras, na opinião de RUMBOLD (κ)

WEBB (κ) que apresentou um trabalho muito metódico sobre fungos da ambrosia australiana relatou ter encon

(κ) Mrak, Phaff

trado duas espécies de Endomycopsis que podem ser isoladas de túneis de escaravelhos nessas árvores ou de larvas e adultos desses insetos.

As leveduras do gênero Zygosaccharomyces são encontradas em néctares de flôres bem como no mel de abelha mal conservado, já em fermentação, sendo provável que as abelhas sejam a causa da contaminação inicial.

HALL, JAMES e NILSON (14) isolaram leveduras de xarope procedente da Ilha de Barbados, conservado em barrís por alguns meses, para posterior distribuição. Sobreveio ativa fermentação com grande produção de gás e álcool.

SCHEGG e WEIGAND (*) encontraram Rhodotorula e Torulopsis em solução de ácido bórico a 3% quando examinavam produtos farmacêuticos na Alemanha. Fato idêntico se deu na Califórnia, quando foi isolada uma Rhodotorula de um frasco comercial de ácido bórico:- apresentava-se em forma de sedimento de cor rosada.

Os limites ecológicos das leveduras são muito extensos, pois nas terras de maior altitude como no Himalaia foi encontrada a Willia saturno por KLÖCK, assim como nas águas do oceano e lagos por ZOBELL (*).

Os produtos da ação das leveduras eram já usados pelo homem primitivo. Em Gênesis, o primeiro livro da Bíblia, há referência ao uso do vinho; no segundo, o livro de Êxodo, há menção dos pães asmos (pão sem fermento) como elemento integrante de cerimônias religiosas. Depreende-se daí, que era vulgar o uso do fermento no pão para consumo direto. Anteriormente, isto é, 7.000 anos A.C. já se empregavam produ-

(*) Mrak, Phaff

tos semelhantes à cerveja na alimentação (1). O homem não podia governar os mistérios da fermentação porque os domínios do invisível lhe eram indevassáveis. À despeito do incognoscível tinham os homens, contudo, uma intuição da causa dos fenômenos cujo efeito estava a seu serviço. LINEU já supunha ser a fermentação produzida por organismos vivos (1). Nesta época já havia uma noção da relação existente entre doenças, fermentação e putrefação. Essa ideia reinante se objetivou na expressão de BAYLE (1626-1691) quando afirmou que a natureza das doenças só seria conhecida ao se desvendar as causas da fermentação e da putrefação (1). Mais tarde, PASTEUR verificou a realidade da então suposta relação entre doenças, putrefação e fermentação. Sendo de natureza microbiana seus agentes, só com o advento do microscópio êle conseguir provar a sua ideia. Verificou a especificidade das ações desses microorganismos e a êle se deve o estabelecimento dos fundamentos do quimismo das fermentações (1).

Entretanto, quem primeiro viu as leveduras foi LEUWENHOECK (1). Seu sistema de reprodução foi demonstrado, mais tarde (1825), por DÉSMAZIERES, MITSCHERLICH, CAGNIARD-LATOUR, KUTZING e SCHWANN (1). Êste último foi quem verificou e provou a existência de esporos nas células de levedura (1839), cuja posição botânica era muito incerta, errando entre fungo ou alga. Quando êle observou que as células de levedura poderiam formar novas células interiores e que estas eram libertadas por rompimento da célula mãe, então surgiu sua inclusão no grupo dos fungos (45).

Mais tarde, investigações de SEYNES e REESS de finiram mais claramente a morfologia dos ascosporos. REESS demonstrou que os ascosporos são produzidos por células de leveduras de diferentes formatos e que eles germinavam por brota-

S. Joly

-14-

mento. Contudo, êle não tinha a vantagem dos métodos de cultura pura e então indicou, em 1870, que leveduras que formam ascoporos seriam um grupo especial a que êle deu o termo de Saccharomyces originalmente sugerido por MEYER em 1837 para as leveduras de fermentação. REESS (45) achou o desenvolvimento dos ascoporos semelhante a certos Ascomycetos inferiores e determinou os esporos de ascoporos, a célula mãe de asco e incluiu o gênero Saccharomyces com os Ascomycetos inferiores.

Novamente PASTEUR (1) estudou as leveduras resultando de seus estudos melhores conhecimentos sobre êsses microorganismos. Surge HANSEN (1) em 1896, que começou a atribuir um cunho de marcante sistemática nos estudos das leveduras, os quais se estenderam por mais de 30 anos de exaustivos trabalhos. Posteriormente BUCHNER prestou sua contribuição valiosa e científica quando descreveu a zímase alcoólica.

Em 1909 GUILLIERMOND (15) começou a esboçar a linha filogenética das leveduras. Êle fundamenta suas opiniões nos fatos seguintes: os membros da família Endomycetaceae produzem micélio que dá origem à células semelhantes a levedura por gemação ou fragmentação do micélio em oídios, e que produzem ascoporos por conjugação isogâmica de células contíguas no micélio. No gênero Endomycopsis as células semelhantes a levedura são formadas por gemação e é uma simples transição dêsse fungo para levedura de brotamento que resulta o gênero Zygosaccharomyces, o qual forma ascoporos por conjugação isogâmica, mas não produz micélio.

A relação das leveduras ascosporógenas com as Endomycetaceae é tão óbvio que todos os micologistas a tem aceite e elas foram classificadas geralmente como uma família, Saccharomycetaceae, logo após a Endomycetaceae as quais diferem entre si apenas pela formação do micélio. STELLING-DEKKER

é contrário a separação destes microorganismos em duas famílias, uma vez que a diferença entre elas é apenas na formação do micélio.

GUILLIERMOND depois apresentou um novo conceito da filogênese das leveduras, segundo duas linhas de descendência: leveduras haplobionte, que formam ascosporos após a conjugação isogâmica ou heterogâmica, as quais são derivadas das Endomycetaceae, da ordem Plectascales; leveduras diplobionte e haplodiplobionte, derivadas das Exoascales, especialmente através do gênero Taphrina.

Nas Endomycetaceae, os ascosporos são formados pela conjugação de duas células vizinhas no filamento do micélio sendo, portanto, a fase vegetativa haplóide. O zigoto dá nascimento aos ascosporos que são diplóides. Estes, na germinação, dão micélio que, por sua vez, podem dar origem a células como levedura, por gemação ou fragmentação. Assim, GUILLIERMOND colocou nesta família os gêneros Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Debaryomyces, Nadsonia e Nematospora. Noutros gêneros, as células vegetativas são diplóides, sendo apenas os ascosporos haplóides, como no Saccharomyces Ludwigi ou, ainda, os esporos e seus brotos são haplo-diplobionte como nos gêneros Saccharomyces e Hansenula. Estes gêneros foram considerados por GUILLIERMOND como descendentes de Exoascales e, particularmente, do gênero Taphrina.

A concepção de GUILLIERMOND sobre a filogênese das leveduras coloca o gênero Saccharomyces muito distante do Zygosaccharomyces pertencendo a ordens diferentes de Ascomycetos.

STELLING-DEKKER faz êsses dois gêneros apenas sub-gêneros de Saccharomyces. Justifica seu ponto de vista apenas na semelhança estreita das espécies de Zygosaccharomyces

com as espécies de Saccharomyces na fisiologia e outros caracteres. A partenogênese é comum nos Zygosaccharomyces e ocasionalmente observada nas leveduras do gênero Saccharomyces.

WINGE e LAUSTSEN referiram que, de fato, o Saccharomyces pode ser cultivado em estado haplóide, embora tendendo a voltar à fase diplóide pela formação de zigoto. Isto mostra que há apenas uma leve diferença entre o Saccharomyces e o Zygosaccharomyces.

O que também comprova estas afirmações é a obtenção de híbridos pelo cruzamento entre espécies dos dois gêneros referidos. Isto vem demonstrar, evidentemente, que a distância de parentesco não é grande.

Em 1940, GUILLIERMOND supôs a possibilidade da relação entre a levedura e os Ascomycetos.

Há uma evidência considerável de relação entre as leveduras e os Basidiomycetos, tratando-se das espécies do gênero Sporobolomyces.

A filogênese das leveduras anascosporógenas não pode ser determinada de modo seguro. Consideram-se como Ascomycetos cuja capacidade de formar ascosporos se tenha desaparecido.

O que não foi ainda verificado é a relação das leveduras com os Phycomycetos, embora muitas espécies de Mucorales deem aparecimento a brotos de células semelhantes à levedura quando crescem em cultura submersa e é também notável que tais espécies produzam igualmente uma fermentação alcoólica.

Em suma, as leveduras têm sua filogênese nos fungos, dos quais descendem através de várias ordens.

Essas são razões mais que legítimas para justificarem a coerência do objeto desta tese de doutoramento, a

qual se enquadra perfeitamente bem dentro das finalidades do Instituto Zimotécnico, cujo roteiro mestre é mostrar, fomentar e estimular a zimotecnia no país, bem como outras formas de indústrias ou pesquisas científicas com base nos microorganismos. Pelo menos êsse é o nosso pensamento.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O material que nos proporcionou elementos para êsse trabalho foi colhido nos próprios da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, notadamente pomares e parque central.

2.2 Meios de cultura usados.

Os meios de cultura usados nos diversos ensaios foram os constantes da lista abaixo especificada.

- a) - Meio de Laurent, para isolamento;
- b) - Meio para formação de micélio;
- c) - Meio para zimograma dos hidratos de carbono;
- d) - Meio para estudar a utilização do etanol como única fonte de carbono;
- e) - Meio para o auxanograma do nitrogênio;
- f) - Meio para o auxanograma dos açúcares;
- g) - Meio para a formação de película;
- h) - Meio para a produção de éster;
- i) - Meio para a produção de ácido;
- j) - Meio para a mensuração das células e sua forma típica;
- k) - Meio para a produção de compostos amiláceos;
- l) - Meio para a coagulação e peptonização do leite;
- m) - Meio para o desdobramento da arbutina;
- n) - Meio para o desdobramento da asculina;
- o) - Meio para o desdobramento de gorduras;
- p) - Meio para a produção de ascosporos.

2.3 Coleta das amostras

Todas as amostras foram colhidas com observância rigorosa da técnica e assepsia.

Foram usados vasos de Bohêmia esterilizados, com boca fechada com guardanapo de algodão. Os frutos foram colhidos em perfeito estado de maturação, sadios e de boa aparência, com auxílio de pinça e escalpelos flambados antes e depois da colheita de cada fruto. Esta foi feita diretamente da árvore ao vaso, evitando o contacto dos frutos com as mãos.

Os vasos eram imediatamente etiquetados após a colheita para identificação da procedência das leveduras, contendo lugar, hora e fruto.

As amostras após chegadas no laboratório eram normalmente trabalhadas imediatamente. Quando não, conservavam-se em geladeira a uma temperatura constante de 4°C.

2.4 Isolamento das leveduras

Há vários métodos preconizados para o isolamento de leveduras partindo-se de frutos maduros. Dentre eles poderemos destacar:-

- a) - enriquecimento;
- b) - semeadura direta;
- c) - semeadura da água de lavagem;
- d) - incubação direta.

2.4.1 Método de enriquecimento

Este método consiste, em grandes linhas, em introduzir uma porção do fruto num meio nutritivo adequado ao desenvolvimento do microorganismo em aprêço, incubando-o, a seguir, a 28°C durante 48 horas (26).

Ensaiando este método usamos como meio nutritivo, o meio líquido de Laurent, em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, incubados a 28°C durante 48 horas.

O ideal seria usar neste ensaio o meio de malte líquido pois ele é que se apresenta mais propício para a

nutrição e decorrente desenvolvimento das leveduras. Não o fizemos pela dificuldade de obtenção da matéria prima no mercado, obrigando-nos ao emprêgo do meio de Laurent mesmo com as falhas que ocasionalmente pudesse trazer consigo.

Ao invés de usar apenas um fragmento do fruto, como ordinariamente se recomenda, pareceu-nos melhor o seu aproveitamento integral com a finalidade de captar as células de leveduras localizadas em tôda a região externa do fruto, bem como as que porventura se encontrassem no suco. Por isso, achamos melhor seccionar os frutos introduzindo-os totalmente no frasco contendo o meio de cultura líquido.

O meio de Laurent apresenta a seguinte composição:

(NH ₄) ₂ SO ₄	4,71 g
K ₃ PO ₄	0,75 g
MgSO ₄	0,10 g
Água destilada	1.000,00 ml

2.4.2 Método de sementeação direta.

O método de sementeação direta consiste em passar-se o fruto sobre o meio de mosto de malte-ágar e incubar-se, a seguir, durante 48 horas a 28°C.

Neste método apenas as células da superfície do fruto são retiradas, não se conseguindo isolar as que se ocultam nas rugosidades do pedúnculo ou do cálice, quando persistente. Além disso há a agravante de grande contaminação de fungos, cujo desenvolvimento rápido suplanta ao das colônias de leveduras, impossibilitando assim seu aproveitamento por repicagem.

Ensaíamos este método sem resultado, cuja aplicação para frutos grandes é impraticável.

2.4.3 Método por sementeação da água de lavagem dos frutos.

Neste caso lavam-se os frutos com água recém des

tilada e as águas resultantes é que se empregam para sementeação em caixas de Pétri, as quais serão postas em incubação a 28°C durante 48 horas (26).

Tentámos também êste processo inúmeras vezes, sem resultado apreciável, pelas mesmas dificuldades e inconvenientes citados no processo anterior, notadamente a grande contaminação do meio de cultura por fungos.

2.4.4 Método de incubação direta.

Por iniciativa própria experimentamos passar os frutos por um liquidificador e incubar o líquido resultante a 28°C durante 48 horas.

Não fomos felizes em nossa tentativa porquanto novamente os inconvenientes anteriormente citados aqui apareceram com igual e mesmo maior intensidade.

Deante dos resultados obtidos em nossos primeiros ensaios resolvemos optar pelo primeiro método citado porque, por êle, tôdas as leveduras da superfície externa do fruto são recolhidas e posteriormente isoladas. Embora as leveduras internas sejam também aproveitadas neste caso, êsse fato não invalida a nossa tese, pois não é incompatível com a natureza dêste trabalho em que nos propuzemos a estudar as leveduras que comumente ocorrem em frutos maduros da zona de Piracicaba.

Em meio líquido se consegue derimir os prejuízos consequentes das contaminações por fungos, possibilitando um isolamento em caixas de Pétri e ulterior separação das colônias de aspecto diferente.

2.4.5 Técnica seguida

Servindo-nos do método de enriquecimento procedemos dentro da seguinte técnica.

Praticamos apenas uma passagem em caixa de Pé-

S. July

-21-

tri, realizando o método de diluição em série até 1:200.000, para conseguir colônias bem distintas. Posteriormente fizemos culturas unicelulares para absoluta pureza das culturas, posto que contradizendo LODDER e VAN RIJ (24) que admitem caráter de pureza para culturas isoladas em caixas de Pétri com algumas passagens. O alvitre desses autores por nós foi praticado apenas para confirmação da pureza das culturas unicelulares adrede executadas.

Adotamos o sistema de LINDNER, cuja prioridade se deve a HANSEN, construindo a câmara úmida com um anel metálico aderente à lâmina por meio de parafina. A lâmina, com as gotículas do meio de cultura contendo células de levedura era invertida sobre o anel metálico, previamente untado com vaselina, com a finalidade de vedar a evaporação, impedir o secamento do meio e evitar qualquer contaminação.

Em geral as culturas são acompanhadas de bactérias trazidas dos frutos. Por isso mesmo, é imprescindível a sua purificação antes de se tentar qualquer teste que ofereça possibilidade de classificação sistemática.

Para isso, um dos meios mais aconselháveis é o de RAULIN, incubando-se a 25°C durante 3 a 5 dias. Depois, - far-se-á uma segunda passagem, se ainda subsistirem bactérias.

Ensaíamos este meio durante os nossos trabalhos mas sem resultados muito positivos.

PIJPER estudou as leveduras de escarros de broncomicoses e adotou como sendo o melhor na purificação de suas culturas, um meio ácido (19) preparado nas seguintes condições:

Peptona	10,00 g
Extrato de carne ...	5,00 g
Água destilada	1.000,00 ml

Junta-se HCl 0,1 n até que 3 gotas de uma solução a 0,05% de

cristal violeta adicionadas a 5 ml do meio se torne nitidamente azul.

Ensaíamos êste meio e encontrando certa dificuldade na obtenção da reação exata preconizada, introduzimos uma ligeira modificação no modo de preparar êste meio, que foi por nós seguido daí por diante. A modificação introduzida foi a seguinte: a reação final acima proposta corresponde a pH 3,8. Isso nos autorizou a adotar êsse teor de acidez na preparação do meio de cultura. Os resultados foram constantes, mais seguros e a prática de preparação simplificada.

Êsse meio de cultura proporciona nutrição suficiente para as leveduras cuja tolerância máxima ao pH ultrapassa àquele limite. Uma só passagem por êsse meio ácido quâsi sempre elimina as bactérias, deixando a levedura pura. Nos casos de insucesso, uma segunda passagem por êste meio depois de alguns dias da primeira tentativa, garante pureza integral da levedura.

2.5 Identificação sistemática

Segundo JELINEK (16) o melhor método para classificar leveduras é por meio de reações serológicas. Fundamenta suas razões na grande variabilidade entre os micróbios, a qual é muito mais pronunciada que em qualquer outro organismo vivo. Êsses seres mudam suas formas e funções com relativa facilidade, dificultando sobremaneira sua classificação. A inconstância dos caracteres celulares é tal que as formas aberrantes predominam com frequência sobre as normais, tornando a classificação precária. A constituição antigênica das células deve ser sujeita também a variações do mesmo modo que suas funções e forma. A especificidade constitucional seria mais rígida e mais constante que a morfológica e funcional.

São hipóteses que êste autor atribue como per-

feitamente admissíveis. O próprio BENHAM afirma ser o método serológico superior aos demais em que se empregam provas de fermentação, colônias gigantes, etc.

Todavia, uma classificação estrita não pode ser feita ainda diante do estado atual dos conhecimentos a esse respeito.

SCHULTZ e POMPER (*), em 1948, experimentaram uma comparação da diferente assimilação de amino-ácidos, com o objetivo de uma classificação taxonômica.

Depois, em 1950, SCHULTZ e MC MANUS (*) optaram pela adoção do uso do enxôfre para diferenciação das espécies.

Também, o uso de vitaminas com a mesma finalidade foi tentado por SCHULTZ e ATKIN (*), em 1947.

Todos esses métodos são temerários para se introduzir atualmente pois carecem de uma confirmação que só pode ser oferecida quando generalizados para todas as espécies.

Deante disso, resolvemos optar pelo método de LODDER e VAN RIJ (24) autoridades mundialmente conhecidas no campo científico, intensamente citadas em todas as obras dignas de menção e, pela atualidade com que abordam o assunto, constitui seu método um padrão de classificação. A natureza do nosso trabalho exigia a escolha de um método de classificação deste jaez.

Posto que essas asserções sejam verídicas, pareceu-nos mais judicioso um ecletismo de métodos, por razões talvez muito pessoais que resultaram de insistentes tentativas na realização dos diversos ensaios. Essa disposição se firmou de modo definitivo diante da opinião abalisada do professor egípcio SHEATA, notável especialista em taxonomia de leveduras, que o-

(*) Lodder, Kreger-van Rij
1952. The Yeasts

ra empresta sua colaboração à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo e ao Instituto Zimotécnico. São de sua autoria numerosas alterações que aparecem nesta tese, em lugar competente.

Os ensaios para identificação sistemática das leveduras por nós isoladas foram aplicados segundo:

- a) - a fisiologia;
- b) - a morfologia;
- c) - os caracteres morfológicos culturais das leveduras.

2.5.1 a) - Fisiologia

A fisiologia assim como a morfologia são as expressões máximas da potencialidade do organismo.

2.5.1.1 Formação de película em meio líquido

O meio preconizado comumente para isso é o glucosado a 2% e peptonizado a 1%. Este meio proporciona a formação de película porém, a nitidez não é perfeita. O mais aconselhável é o extrato de malte, adotado atualmente como padrão. Introduziu-se uma pequena modificação na técnica comum de preparo deste meio segundo SORIANO (41). Esta modificação refere-se à prova de hidrolisação do amido, durante o preparo, usando-se o iodo, que produz, a frio, reação de coloração característica.

Há strains de leveduras típicas quanto a formação de película como as isoladas por CRUESS e HOHL (7) de vinhos originários da Espanha como o Spanish Sherry, assim como de vinhos francêses. As leveduras espanholas são de ação fortemente oxidativas sobre o álcool e o ácido acético do vinho. Elas conferem um bouquet característico e um aroma de vinho fino.

A formação de película tem significação biológica, segundo LANGERON e GUERRA (20) pois é caráter de aerobiose, já que se desenvolve na superfície do líquido. Entretanto,

aparece também em atmosfera pura de CO₂. Conclue-se, daí, que há outros fatores operantes além do oxigênio na sua formação. Prova-se isso pelo aparecimento de um veu membranoso em tubos de fermentação de Candida albicans, quando o tampão de parafina foi empurrado para o alto, no método de GUERRA, aliás muito sensível.

Os gêneros que formam película são: Hansenula, Pichia, Zygopichia e Debaryomyces (leveduras ascospórogenas) e o Mycoderma (levedura anascospógena).

Crescem como escuma na superfície do meio líquido e tendem a ser oxidativas mais que fermentativas na dissimilação de açúcares. Sendo fermentativas elas produzem pouco álcool, tendendo a produzir considerável quantidade de éster. Muitas delas utilizam o álcool rapidamente e pode ser causa da decomposição das bebidas fermentadas, ou pode contribuir para o desenvolvimento do sabor especial como em sherry.

LANGERON-GUERRA (20) descrevem com bastante detalhe os diferentes tipos de película.

SHEATA prefere que a observação vá apenas do 4^o ao 14^o dia, com anotações diárias sobre a cor, espessura e aspecto, usando-se tubos de cultura de 200x22 mm, com 15 ml de extrato de malte, enquanto LODDER prescreve observação do 3^o ao 30^o dias.

O primeiro critério é mais razoável, conforme nos foi dado observar. É que no intervalo decorrente entre as observações do 4^o dia e do 30^o alguma alteração do primeiro aspecto costuma ocorrer, ficando deficientes os detalhes que se manifestam nesse lapso de tempo, como modificação do véu mucoso a membranoso (20) ou sedimentação da película.

Para tornar mais completas as observações resolvemos adotar no Instituto Zimotécnico a opinião daqueles -

autores e realizar as anotações do 4º ao 14º dia e depois no 30º.

2.5.1.2 Zimograma dos hidratos de carbono

O termo fermentação veio do latim, do verbo ferveo, interpretando a efervescência causada pelo desprendimento gasoso durante a fermentação alcoólica na fabricação do vinho. PASTEUR definiu a fermentação como vida sem oxigênio. Este fenômeno, mais tarde, teve interpretação segura quando se classificou fermentação como função em que várias substâncias são acceptoras de hidrogênio, enquanto respiração é apenas o oxigênio que é o acceptor de hidrogênio libertado no processo enzimático. Isto, apenas de um modo geral, pois há fermentação oxidativa em que o oxigênio é usado como acceptor (fermentação do ácido láctico e fermentação do ácido oxálico) e, em outros casos, certas substâncias, especialmente aldeídos, agem como acceptores, chamando-se então fermentação anoxidativa (17).

A respiração e a fermentação são processos catabólicos promovidos por enzimas.

Já GUILLIERMOND (13) afirmava ser a fermentação apenas a primeira fase da respiração, em que esse fenômeno é apenas intramolecular, operando-se em ausência do oxigênio. Neste estágio o carboidrato se desdobra em álcool e CO₂; no segundo estágio, o álcool é oxidado em água e gás carbônico.

A fermentação, como propriedade fisiológica, é usada para a sistemática das leveduras.

Para o estabelecimento do zimograma pode-se em pregar:

- a) - o sacarômetro de Einhorn;
- b) - o tubo de Durham;
- c) - o tampão de parafina.

Segundo GUERRA (19) que adota a última técnica, êsse processo é o mais sensível porque t^oda superfície líquida fica sujeita a um contr^ole. A menor bolha de gás despreendida a prisiona-se sob a parafina que passa a funcionar como um pist^o, não escapando à percepção a marcha do fenômeno, uma vez - que êle fica registrado pela maior ou menor altura do tamp^o - de parafina. GUERRA usa neste ensaio uma solução peptona Chat^e - poteaut a 1%, com adição de 2% dos açúcares desejados. Êste - meio é de uso mais ou menos generalizado (27).

SHEATA é de opinião que a peptona não se pres- ta para esta finalidade. É que sendo capaz de nutrir as leve- duras, elas deixam de fermentar os açúcares presentes. Deve-se empregar levedura autolizada que não contém carbono para o de- senvolvimento, porém, é rica em nitrogênio, sais minerais e fatores de crescimento (31).

A levedura autolizada prepara-se da seguinte - maneira: mistura-se uma parte do fermento prensado de padaria com uma parte de água, incubando-se a mistura por 3 dias a 55°C. A seguir, ferve-se por alguns minutos e filtra-se atra- ves de um filtro de terra de diatomáceas (hyflo super-cell ou standard super-cell). O filtrado representa estritamente a le- vedura autolizada. Dilue-se com 9 partes de água de torneira e juntam-se 2% do açúcar a ser ensaiado. Para o caso especial da rafinose deve-se usar 4%. Distribue-se nos tubos de cultu- ra, tampona-se e esteriliza-se a uma atmosfera durante 15 mi- nutos.

O estrato de levedura não serve para êste en- - saio porque o fermento prensado encerra trealose solúvel como carboidrato de reserva. Êste pode falsear os resultados, dando uma fermentação positiva. Só a autólise é capaz de destruir a - quele carboidrato (6).

Os tubos de Durham asseguram resultados apreciáveis. Resolvemos modificar o tamanho padrão desses tubos, que é de 10 x 75 mm, para 10 x 45 mm acolhendo a ideia de SHEATA. Obtivemos, daí por diante, resultados muito mais concordes. É que os tubos captadores de gás de menor tamanho conduzem a um resultado mais sensível porque uma fermentação fraca exerce pequena pressão, às vezes insuficiente para levantar o tubo e captar o gás. Podemos dar um apôio integral a essa sugestão, baseados na realidade do fato em tentativas anteriores. A adoção dos tubos de Durham é hoje prática de rotina em nosso laboratório.

Os tubos de Einhorn foram postos fora de cogitação porque não são muito sensíveis ao desenvolvimento gasoso (6).

Há uma constância no poder fermentativo das leveduras, podendo diminuir com a idade, porém, sem transformação ou perda (20).

Segundo as leis de fermentação de KLUYVER-DEKKER é necessário o emprêgo de glucose, lactose, maltose, sacarose, galactose, rafinose e, às vezes, inulina para o estabelecimento do zimograma dos hidratos de carbono. A arbutina é usada por DIDDENS e LODDER e a asculina por STELLING-DEKKER.

A arbutina é um glucosídeo derivado da hidroquinona e a asculina um glucosídeo derivado da asculetina. Quando a levedura age positivamente, por hidrólise, liberta a hidroquinona e a asculetina. Estes agem sobre os iônios férricos conferindo uma cor marrom ao redor das colônias de levedura. A observação, neste caso, deve ser feita ao 2º, 4º e 6º dias.

Empregamos nesta prova o meio indicado por MRAK e PHAFF (31), cuja fórmula se vê em continuação:

Fórmula para a hidrólise da arbutina

Levedura autolisada	10,0 %
Glucose	0,1
Arbutina	0,5
FeCl ₃	0,001
Ágar	2,0

Fórmula para a hidrólise da asculina

Levedura autolisada	10,0 %
Glucose	0,1
Asculina	0,5
FeCl ₃	0,001
Ágar	2,0

Em ambas as fórmulas esteriliza-se por 30 minutos a 1/2 atmosfera de pressão para reduzir, ao mínimo, qualquer decomposição pela ação do calor.

A fermentação dos carboidratos nada mais é senão a manifestação sensível de uma função biológica das leveduras. Alguns desses microorganismos são capazes de elaborar o complexo enzimático (zimase) para fermentar as hexoses, enquanto outras não têm essa faculdade. Resulta desse fato serem as leveduras zimáticas ou azimáticas. Entretanto, os holo-sídeos só podem ser fermentados quando hidrolisados. Pela ação das hidrólases resultam, conseqüentemente, açúcares diretamente fermentiscíveis. Há leveduras hábeis para a elaboração das carboídrases, as quais são específicas para cada holosídeo. Acresce, em conseqüência deste fato, que as leveduras podem ser zimáticas simples ou zimato-oxidásicas. Isto equivale dizer que a prova da glucose é indispensável e decisiva, devendo ser praticada a priori, pois dos resultados obtidos ter-se-á indicação para o prosseguimento para as provas dos demais açúcares.

Operamos com 6 açúcares, de acôrdo com a prática comum e de rotina na sistemática. Foram eles: glucose, sa-

carose, maltose, lactose e rafinose.

A fermentação deste triolosídeo apresenta caracteres particulares. Algumas leveduras o fermentam parcialmente porque, após a hidrólise que despolimeriza a rafinose em frutose e melibiose, só é fermentada a frutose pelo complexo enzimático. Neste caso, fermenta apenas $1/3$ da rafinose. Outras após esse primeiro desdobramento são capazes de hidrolisar a melibiose, com formação de glucose e galactose, atingindo assim os termos mais simples para uma fermentação completa. Em casos raros a levedura fermenta apenas a glucose, ficando a galactose intacta (47). Este fenômeno se dá com o Saccharomyces versatilis. Diz-se que houve fermentação de $2/3$ da rafinose. Usa-se o aparelho de Van Iterson Kluyver que acusa quantitativamente a fermentação da rafinose.

WICKERHAM (46) adotou uma técnica diferente para averiguar exatamente quando a levedura fermenta apenas $1/3$ da rafinose. Cessando o desprendimento do CO₂ pela levedura - em estudo, faz-se inocular o Saccharomyces carlsbergensis que fermenta enérgicamente a melibiose. Havendo desprendimento gasoso significa que a levedura em questão apenas fermenta a frutose. Se, ao contrário, nenhum desprendimento gasoso se dá, é porque a levedura em aprêço fermentou também a melibiose.

SKINNER e BOUTHILET (40) usaram outra técnica: inocularam primeiro o Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus. Depois da fermentação da frutose fizeram esterilizar novamente aquele caldo para aí inocular as leveduras desconhecidas cuja capacidade para fermentar a melibiose eles queriam conhecer.

Em nosso trabalho dispensamos o uso do sacarômetro de Van Iterson Kluyver, pois julgamos não se tratar de um detalhe indispensável na sistemática.

Dêste modo decorre imediatamente a evidência - da relação íntima entre o poder fermentativo da levedura com a taxonomia.

LODDER faz observações da fermentação até o 10^o dia. Em nossos trabalhos o fizemos extendendo as observações até o 15^o por analogia com o método de SHEATA.

2.5.1.3 Auxanograma dos açúcares

Outra propriedade biológica das leveduras é a utilização dos hidratos de carbono. Eles são parcialmente gastos na respiração e na síntese do material celular. Os carboidratos são, portanto, usados na função catabólica e anabólica dêsses microorganismos.

Mesmo na função anteriormente examinada, a fermentação, que é essencialmente catabólica porque é a primeira fase da respiração, opera-se concomitantemente a síntese celular. Nessa função, a levedura consome, aproximadamente 30% da glucose, e 70% dêsse substrato é transformado em CO₂ e etanol.

Todos os açúcares fermentiscíveis são assimiláveis, porém a recíproca não é verdadeira (24).

Foi BEIJERINCK, em 1889, quem introduziu essa prática. DIDBENS e LODDER modificaram mais tarde a técnica anterior (*).

OKUNUKI (1931) usou meio sintético com ágar em tubos de ensaio. Empregou 16 fontes de carbono, incubando 5 dias para observar o desenvolvimento. Experimentou a capacidade das leveduras para utilizar 5 ácidos orgânicos. Determinava a quantidade de ácido consumido por titulação após 35 dias (*).

(*) Wickerham, Burton

1948. J. Bact. 56 (3): 363-371

ZIKES (1906) usou meio líquido. Incubavam-se - culturas por 4 semanas para então observar o desenvolvimento (x).

REDAELLI e CIFERRI (1929) usaram um meio neutro de Raulin contendo 1% de carboidratos, álcool ou ácido, - com pH determinado. Após 10 dias faziam a centrifugação da cultura para verificação do desenvolvimento (x).

BEDFORD (1942) empregou um meio líquido que permitia o desenvolvimento apenas para algumas espécies (x).

A técnica mais em uso consiste em empregar um meio sintético sólido, vertido em caixa de Pétri sobre uma suspensão de levedura preparada recentemente. Após a solidificação dêsse meio, distribuem-se os açúcares em zonas convencionadas. Incuba-se a 25°C. No 2º dia pode-se realizar a leitura dos resultados. Quando êste for pouco nítido é necessário repetir a prova.

Algumas espécies não oferecem, de pronto, um resultado satisfatório. Neste caso, costuma-se usar o meio líquido adotado por WICKERHAM e BURTON (**), especialmente para certos açúcares como galactose e lactose, para os quais a levedura tem necessidade de adaptação (51).

LODDER (24) prefere oferecer a êstes strains - um meio com lactose e galactose, segundo o caso e, também a glucose. Após alguns dias retira-se a cultura daquele meio - por centrifugação. Julga então LODDER que a levedura está apta às provas comuns de auxanograma em caixa de Pétri.

(x) Wickerham, Burton

1948. J. Bact. 56 (3): 363-371

(**) Lodder, Kreger-van Rij

1952. The Yeasts

Outros autores submetem a cultura a um meio sintético com a finalidade de obrigar a levedura a dispor de suas reservas de carboidratos (48).

Outra técnica que pode ser aplicada nesta prova é a de caixas de repetição, cuja ideia LIDERBERGS teve a primazia. Atualmente foi adaptada por SHIFRINE, PHAFF e DEMAIN (38) para estudar a assimilação do carbono pelas leveduras. Neste método há economia de material, assim como de tempo dispendido pelo operador, pois uma caixa de Pétri comporta até 25 culturas. Em linhas gerais consta o método do seguinte: inocula-se primeiro uma caixa com as culturas desejadas. Quando estão iniciando o desenvolvimento faz-se comprimir um bloco de madeira recoberto com flanela contra essa superfície de ágar com as microculturas, de modo a se ter impresso no tecido a série desejada. Isto vai servir para estampar outras caixas com diversos carboidratos.

Ao que parece é uma técnica muito engenhosa para os fins colimados e que apresenta bons resultados em confronto com as placas auxanográficas e com o meio líquido de WICKERHAM.

Para o auxanograma de BEIJERINCK é necessário um meio de cultura muito purificado, devendo o ágar ser previamente lavado. Dêste modo a levedura se ressentirá, encontrando certa dificuldade para se desenvolver. Faz-se mister a adição de extrato de levedura como fator de crescimento ou uma mistura de vitaminas.

SHEATA usa o meio Difco Nitrogen carbon base para o auxanograma dos açúcares. Os resultados são nítidos.

A técnica preconizada manda que as caixas sejam incubadas a 30°C por 24 a 48 horas afim de exudar completamente a água de condensação para não dificultar o trabalho.

Aconselha também deixar as caixas abertas em estufa por algumas horas com o mesmo objetivo, antes da distribuição dos açúcares. Esta prática favorece muito a contaminação. Outro recurso é aumentar a concentração de ágar ou colocar papel de filtro sob a tampa para absorver os vapores condensados.

Êstes detalhes podem ser alienados da prática desde que se opere com um meio de consistência suficiente e não se deixe o açúcar de uma determinada área atingir a delimitada por outro.

Em nossos trabalhos usamos meio de fórmula indicada por MRAK-PHAFF (31) abaixo mencionada:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 g
KH_2SO_4	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
Ágar lavado	1,0 l

Lava-se o ágar da seguinte maneira: dissolve-se o ágar em água, na proporção de 2%. Verte-se numa banheira para solidificar. Corta-se em pedaços de 4 a 5 cm² e coloca-se num vaso. Lava-se em água corrente por 5-7 dias. Depois lava-se em água destilada por 2 dias, mudando-se a água várias vezes. No fim desta lavagem mede-se o volume do ágar, passando-se a operar com êle no uso da fórmula supra citada,

Juntamos 5 gotas de água de levedura autolizada para cada caixa de Pétri. (aproximadamente 0,20 ml)

Além desta técnica em caixa de Pétri, operamos também com tubos de cultura. Neste caso, cada tubo continha um carboidrato. Dêste modo, cada cultura é repicada em 5 tubos diferentes e mais um para contrôle. Esta inovação foi introduzida por influência do professor dr. ONORATO VERONA que emprestou sua colaboração ao Instituto Zimotécnico, embora por tempo muito curto. Apenas nos foi dado realizar esta técnica a guisa de conhecimento, uma vez que a quasi totalidade dos nos

os ensaios já tinha sido concluída.

O meio de cultura para esta técnica é o seguinte:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5%
KH_2SO_4	0,1
MgSO_4	0,05
CaCl_2	0,01
NaCl	0,01
Água de levedura	20 gotas
Água destilada	1.000 ml

Acrescenta-se o hidrato de carbono na base de 0,5% e o ágar - na proporção de 3,5%. Este ágar deve ser lavado para não veicular qualquer impureza que possa servir de substrato à levedura. Esta lavagem porém se faz do modo seguinte:

Água	200 ml
Piridina	15 ml
Ágar	10 g

Deixa-se essa mistura em repouso por 3 dias. Em seguida lava-se com etanol até ficar inteiramente branco quando, então, está em condições de ser usado.

2.5.1.4 Auxanograma do nitrogênio

Esta prática é a mesma introduzida por BEIJERINCK, em 1889. STELLING-DEKKER (*) usava o KNO_3 como fonte de nitrogênio. LODDER, além do KNO_3 usou também $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ureia, asparagina e peptona.

Nesta prova usa-se o ágar lavado pelas mesmas razões já citadas, resultando idêntica condição da necessidade do fator de crescimento.

Apenas o bom senso nos foi suficiente a aconselhar agora o uso de vitaminas porque a água de levedura contém nitrogênio em seus constituintes, o que levaria a um re-

(*) Wickerham

1946. J. Bact. 52 (3): 293-301.

sultado falso.

Nestas condições juntamos 5 gotas de uma mistura de vitaminas para cada caixa que contém, aproximadamente, 20 ml de meio. Essa mistura de vitaminas é constituída por: biotina, tiamina, pantotenato de cálcio, inusitol e piridoxina, nas seguintes quantidades, respectivamente: 0,0125; 0,1250; 0,6250; 0,6250 e 1,250 mmg.

Nos auxanogramas as culturas usadas devem ser novas para não se incorrer no erro de, levando células mortas, propiciar alimento aos microorganismos, conduzindo assim a um resultado falso.

NICKERSON (жж), usando meio líquido juntou como fator de crescimento glucose e colocou nitratos para o ensaio. Na verificação provou a presença de nitritos por reações coloridas pois se sabe que microorganismos capazes de usar nitratos como única fonte de nitrogênio reduzem também os nitratos a nitritos.

LODDER (24) constatou que não há paralelismo - entre a transformação do nitrato a nitrito e a habilidade de assimilar nitratos por parte da levedura.

Na técnica preconizada por VERONA usam-se tubos de cultura com as diferentes fontes de nitrogênio, separadamente, como no caso anterior. É um recurso para se afastar da agravante que afeta o método das caixas de Pétri, isto é, a desigual concentração e difusão das fontes de nitrogênio através do meio.

A fórmula usada neste caso é a seguinte:

(жж) Skinner, Emmons, Tsuchiya

1947. Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes.

Glucose	2,0 %
KH ₂ SO ₄	0,1
MgSO ₄	0,05
CaCl ₂	0,01
NaCl	0,01
Água de levedura	20 gotas
Água destilada	1,000 ml

Acrescenta-se a fonte de nitrogênio na base de 0,5% e o ágar na proporção de 3,5%, lavado como para o auxanograma dos carboidratos.

As fontes de nitrogênio usadas foram, de acordo com LODDER: peptona, asparagina, ureia, nitrato de potássio e sulfato de amônio.

As quantidades distribuídas são mínimas para evitar a toxicidade inibidora do crescimento. A leitura é feita no 2º dia.

2.5.1.5 Etanol como única fonte de carbono

A prova da capacidade das leveduras usarem o etanol como fonte de carbono é usada também em sistemática.

LODDER não atribue um valor muito real para essa manifestação, tratando-se de distinguir espécies.

É uma função anabólica e catabólica que se opera simultaneamente, manifestando-se pela formação de anel nas paredes do vaso, película e sedimento.

MC LEAN e HOFFERT (25) estudando a ação das leveduras em vários meios orgânicos verificaram que o álcool etílico e o acetato de sódio são, entre as demais, os que melhores resultados oferecem para aproveitamento por parte das leveduras. Estas formam estoque de gordura e de carboidratos partindo desses substratos.

LODDER faz a leitura depois de uma semana. Excepcionalmente essa observação é prolongada para três semanas.

S. Joly

-38-

SHEATA observa do 2º ao 7º dia.

Usamos tubos grandes de 200 x 22 mm contendo o seguinte meio de cultura, segundo MRAK-PHAFF (31):

(NH₄)₂SO₄ 0,1 %
KH₂PO₄ 0,1
MgSO₄.7H₂O 0,1
Álcool etílico 4,0 % em volume.

Esteriliza-se por 15 minutos a 1,5 atmosferas de pressão. Depois desta esterilização a concentração de álcool se aproxima de 3% por volume.

2.5.1.6 Produção de compostos amiláceos

Os compostos amiláceos resultam de uma função biológica das leveduras.

Foi primeiro observada em culturas de Torulopsis rotundata, quando dava reação característica de cor com solução de iodo, a frio.

ASCHNER, MAGER e LEIBOWITZ (3) verificaram que em condições apropriadas do substrato e pH a levedura produz amido no interior das cápsulas que circundam as células. A substância amilácea é secretada no meio, tornando possível a prova pelo iodo.

Num mutante não capsulado a produção dessa substância se dá na parede celular, sem excreção.

Êsses autores não se restringiram apenas a reação colorimétrica mas extraíram da célula o amido e, após hidrólise, constataram cabalmente tratar-se de um polisacarídeo, após tôdas as provas necessárias.

Não é, por conseguinte, necessário generalizar esta prova a tôdas as culturas porquanto só espécies que revelam pertencer ao gênero Cryptococcus ou Torulopsis são capazes da produção desse amiláceo.

O meio usado, segundo LODDER, foi o seguinte:

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 %
KH ₂ PO ₄	0,1
Mg ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,05
Glucose	1,0
Ágar	2,5

Ajusta-se o pH a 4,5, aproximadamente, por meio de HCl diluído. Esteriliza-se durante 15 minutos a 110°C.

Juntam-se algumas gotas de água de levedura ou mistura de vitaminas em cada caixa. As caixas inoculadas são incubadas a 25°C por 1 a 2 semanas. Prova-se a presença de compostos amiláceos colocando-se lugol na superfície.

2.5.1.7 Produção de éster

Não há uma relação muito estreita entre essa faculdade biológica dos microorganismos e a sistemática. Por isso esta prova é colocada em plano secundário. Contudo ela é realizada cultivando-se a levedura em extrato de malte e verificando-se ao 3^a e 30^a dias. Sendo uma propriedade organoléptica, esta avaliação depende da sensibilidade do operador na percepção do acetato de etilo.

Em nossos trabalhos cultivamos as leveduras em tubos de 200 x 22 mm, segundo o método de SHEATA, com 20 ml de extrato de malte.

2.5.1.8 Produção de pigmentos carotenóides

Segundo MRAK, PHAFF e MACKINNEY (30) as Rhodotorulas e Sporobolomyces possuem pigmentos carotenóides, enquanto que Taphrina deformans, Torulopsis pulcherrima, T. lipofena, T. luteola, Pichia, Zygosaccharomyces e Pullularia embora produzindo uma pigmentação na cultura, essa não é de natureza carotenóidica nem é intra celular.

Com sua técnica própria e o emprêgo de éter de petróleo ou benzeno, Na₂SO₄ e H₂SO₄ conseguiram resultados apreciáveis.

Entretanto, PETERSON et al (35) obtiveram resultados fáceis e concludentes usando um caldo sintético de WICKERHAM e agitando rotativamente por 72 horas. Nestas condições, os pigmentos formados são passíveis de extração com acetona fria e transferidos depois para éter de petróleo para caracterização por cromatografia ou espectrofotometria.

Êsses autores referendam essa técnica apresentando a vantagem sobre o precedente método de que não há destruição ou alteração do pigmento.

No curso de nossos trabalhos não deparamos com uma oportunidade para exercitar estas provas porque não isolamos nenhuma cultura com colaboração desse tipo.

2.5.1.9 Produção de ácido

Certas leveduras têm a capacidade de sintetizar ácido em quantidade relativamente apreciável, usando glucose como substrato. Essa é uma faculdade peculiar ao gênero Brettanomyces.

Segundo CUSTUS (*) o ácido formado é capaz de dissolver o carbonato de cálcio disperso no meio de cultura, possibilitando uma avaliação dessa função biológica. Percebe-se o fenômeno por áreas claras e translúcidas, muito visíveis por transparência à luz.

O meio usado foi consubstanciado na fórmula seguinte:

Ágar	20 g
Glucose	50 g
CaCO ₃ em pó impalpável ...	5 g
Extrato de levedura	1.000 ml

Após a esterilização os tubos devem ser agitados afim de se obter uma distribuição homogênea através do meio.

As observações são feitas após 10 dias da inocu

5 July

-41-

lação, incubando-se os tubos a 25°C.

2.5.1.10 Desdobramento de gorduras

LODDER aplicou êste ensaio para Candida lipolytica e Trichospora pullulans.

A técnica usada foi a seguinte: derrete-se sebo, filtra-se e esteriliza-se. Coloca-se 0,5 ml, aproximadamente, numa caixa de Pétri de modo a formar uma camada delgada - que forre o fundo da caixa. Deixa-se num refrigerador por 2 horas. Coloca-se, então, sôbre êsse fundo de gordura sólida, um meio de Gorodkova acrescido de 0,1 g de CaCO₃. Ao verter - êste meio na caixa deve-se ter a precaução de não colocá-lo a uma temperatura superior a 40°C para não liquefazer o sebo. - Êste cuidado é porque se tem em vista a formação de duas camadas distintas. Alguns dias depois de inoculado o meio e incubado a 25°C, pode-se fazer a leitura. Esta será positiva quando houver uma zona de côr branco-calcárea sob a cultura desenvolvida. É que se formam sais de cálcio em consequência da libertação de ácidos graxos pelas leveduras.

Há outra técnica usada por MRAK-PHAFF (31). Consiste em se colocar o meio sôbre uma lâmina e repicar aí 1 a 2 estrias. Deixa-se desenvolver em temperatura ambiente e a hidrólise da matéria graxa pode ser observada após 3 a 7 dias, do mesmo modo que em caixas de Pétri.

Como na técnica anterior, esta prova se baseia na ação extra-celular da lípase.

2.5.1.11 Coagulação e peptonização do leite

LANGERON (19) considera uma prática inútil para a sistemática. Na sua opinião é apenas um meio de cultura em que as características morfológicas da Candida tropicalis se manifestam de modo exuberante.

Neste objetivo o leite é um meio de cultura por

excelência.

Esse autor tece considerações sobre a viragem do indicador do azul ao rosa, objetando sobre a inutilidade - dessa prova porque é manifesta apenas pelas espécies que fermentam a lactose, o que redundaria numa prática dupla de fermentação.

LODDER (24) considera apenas a coagulação e peptonização do leite como reação característica e manifesta para Candida lipolítica.

DIDDENS e LODDER (*) consideram que a coagulação do leite pode ser tanto devida a ação coagulante, como a ação combinada do ácido e do etanol formados durante a fermentação, no caso da lactose.

LODDER (24) em suas experiências verificou que ácido e etanol não são suficientes para coagular o leite. O pH do meio é 5,5, enquanto que para a coagulação o pH é 4,8, aproximadamente. Com Candida pseudotropicalis a coagulação parece ser mais devida a ação da renina.

Daí a razão da presença de um indicador que o tornesol, pois a levedura pode sintetizar também ácido, causando, além da coagulação, a viragem da cor. Pode, também, coagular ou peptonizar com teor alcalino e, portanto, sem viragem, que é a manifestação apenas da coagulação.

Para que o enzima exerça sua ação é necessário prover o meio de íônios de cálcio que funcionam como ativadores da paracaseína formada pela renina.

É essa a razão de um suprimento de cálcio ao meio quando o leite não o possui.

(*) Lodder, Kreger-van Rij

1952. The Yeasts

Costuma-se, por conseguinte, fazer a prova com meio contendo lactato de cálcio ou sem essa adição, para se verificar a coagulação ou fermentação, respectivamente.

A prova não é de valor absoluto, mas apenas acessório.

A fórmula usada é a seguinte: leite desnatado fresco em tubo de cultura. Esteriliza-se por 30 minutos a 100°C por 3 dias consecutivos. Junta-se 1 ml de uma solução estéril a 1% de turnesol e, desejando-se, 1 ml de solução de lactato de cálcio a 5%.

2.5.2 b) Morfologia

Como as funções fisiológicas, a observação da morfologia é imprescindível num estudo sistemático.

2.5.2.1 Características da reprodução vegetativa.

O método de RIVALIER e SEYDEL preconizado por LODDER, consiste no seguinte, em linhas gerais: mergulha-se u ma lâmina em meio de cultura liquefeito, colocando-se, em seguida, numa caixa de Pétri sôbre um bastonete de vidro em forma de U. Repica-se a levedura em estudo fazendo-se algumas es trias e recobrando-se depois com lamínula. Colocam-se, ao lado, algumas gotas de água esterilizada com a finalidade de tornar um ambiente eminentemente úmido. Incuba-se a 25°C por 4 a 5 dias.

Experimentamos essa técnica sem resultados muito apreciáveis, motivo por que não pudemos adotá-la como prática de rotina.

Outro método tentado nesta prova é o indicado por LANGERON (19) e que consiste no seguinte: fazer uma película sôbre uma lamínula com o meio de cultura liquefeito. Aí se semeia a levedura em estudo, invertendo-se essa superfície sôbre um anel metálico fixo numa lâmina de modo a construir a

lí uma câmara fechada, em cujo interior se colocam algumas gotas de água esterilizada.

Entretanto, por razões independentes de nossa vontade, não nos foi possível adotar essa prática como método de rotina em nossas pesquisas.

Finalmente, o que nos proporcionou resultados mais exatos e mais constantes foi a técnica de WICKERHAM (49), exatamente o método usado por SHEATA.

Opera-se em caixa de Pétri contendo meio de extrato de malte-ágar. Repica-se o inóculo fazendo-se uma estria e dois pontos, em lugares diferentes da placa. Um destes pontos é recoberto com uma lamínula, assim como uma parte da estria. Incuba-se a 25°C e começa-se a observação ao microscópio após suficiente desenvolvimento da cultura. Este exame se prolonga até o 15º dia, segundo SHEATA, embora LANGERON e GUERRA (20) admitam a extensão desta prova para o 20º dia. Também neste detalhe seguimos a escola de SHEATA.

O meio de cultura usado na formação do micélio é muito variado, de acordo com os diferentes autores. LODDER usa o meio de batata-ágar; LANGERON refere-se ao meio de batata-cenoura que supõe apresentar surpreendentes resultados. O meio de corn meal é apresentado por alguns autores como excelente nessa finalidade. ALMEIDA (1) usa um meio líquido de fécula de batata, modificação do processo usado por LANGERON e TALICE, o qual promove a exibição dos filamentos da levedura em 24 horas num ambiente de 37°C. Segundo aquele autor esse meio de cultura induziu a formação de esporos em tempo muito reduzido, permitindo sumariamente uma classificação rápida.

A filamentação dos fungos é prova de bastante valia porque se revela o tipo característico do micélio, se falso ou se verdadeiro, ou ainda se apresenta artrosporos ou

blastosporos, bem como sua forma e arranjo.

Para LANGERON e TALICE os tipos de micélio tiveram uma tal relevância que êles propuzeram o estabelecimento de uma base de identificação de gêneros fundamentada nessa característica. Contudo, essa pretensão foi precária, pois carecia de uma base mais segura. Por isso foi abolida pelos próprios autores.

São reminiscências dessa inovação LANGERON-TALICE que ainda perduram para designar certas descrições padrões de filamentos. São êles Mycotorula, Mycotoruloides, Candida, Mycocandida e Blastodendrion.

Além destes métodos, tivemos oportunidade de experimentar outra importante criação de VERONA. É uma variação do método RIVALIER e SEYDEL e consta do seguinte: com uma pipeta distribue-se o meio de cultura liquefeito sobre uma lâmina, em caixa de Pétri. Essa lâmina se apoia por uma de suas extremidades num bastonete de vidro, de modo a se obter um plano inclinado de 10° , aproximadamente sobre o plano horizontal. O meio de cultura, a uma temperatura de 60°C , mais ou menos, encontrando a superfície fria e inclinada váe escorrendo e solidificando-se, de modo a formar uma película de espessura variável, segundo a inclinação da lâmina. Esta circunstância oferece uma graduação diferente para o desenvolvimento do microorganismo.

O meio de cultura usado por êsse autor oferece, também, muita vantagem, em virtude de sua simplicidade e riqueza. Apresenta a seguinte composição:

Meio de feijão branco

Feijão branco 200 g
Água 1.000 ml

Ferve-se até que os feijões se depositem ao fundo do recipien

S. Joly

46

te. Retira-se o líquido sobrenadante e junta-se:

Sacarose 200 g
Água de levedura 10 ml
Ágar 20 g

Outra eficiência desse método é a possibilidade de coloração fácil, apresentando os mais belos aspectos, para uma preparação permanente.

VERONA procede do seguinte modo para colorir tais preparações:

Mordente

Solução aquosa a 10% de alumínio férrico

Corante

Hematoxilina férrica de Heindhein

Solução de hematoxilina a 10% ... 10 ml
Água destilada 90 ml

Mergulha-se a lâmina, após suficiente secagem, no mordente por 2 a 4 horas. Trata-se, em seguida, pela hematoxilina férrica por 2 a 12 horas. Lava-se em água destilada e diferencia-se pelo alumínio férrico amoniacal a 5%.

Este método supera o de KUFFERATH, pois suprime os inconvenientes de uma técnica muito delicada e, por isso, susceptível de erro.

2.5.2.2 Forma e tamanho das células

A apreciação das células em sua forma e tamanho é uma estimativa que permite ao observador, de posse de seus conhecimentos, quase de modo exato, colocar a levedura no seu grupo competente. Isto porque as formas típicas são muito características pois se encontram apiculadas, triangulares, ovais, elípticas, ogivais, etc.

Nesta prova é também possível a observação da reprodução vegetativa. Esta se dá por gemação que é típica para determinados gêneros, assim como a cissiparidade o é para

S July

-47-

outros. Um terceiro grupo possui os dois tipos combinados.

Algumas leveduras apresentam a tendência de manter as células filhas ligadas às células mães, resultando daí uma cadeia de células, enquanto outras se desprendem logo que formadas. A posição dos brotos na célula de origem constitui também uma indicação orientadora na sistemática.

Nesta ocasião se deve fazer a mensuração das células o que é de capital importância. Para isto deve-se usar um meio padrão que oferece normais e invariáveis possibilidades de desenvolvimento. Embora não se possa controlar a variação da constituição do malte, que não é a mesma nas diversas regiões de procedência, ainda assim é um meio ideal para as leveduras.

LODDER (24) aconselha a se fazer a prova em meio de extrato de malte em vaso de Erlenmeyer, cultivando-se por 3 dias a 25°C. Ao 30º dia novo exame se faz para ratificação da observação primeira, pois que os valores mensurados são tomados ao 3º dia.

Em nossos trabalhos, entretanto, realizamos isso em tubos de cultura de 200 x 22 mm com 20 ml de extrato de malte, à semelhança da técnica de SHEATA.

A observação ao microscópio se faz sem qualquer corante, pois a célula pode sofrer alguma deformação que iria influir nas medidas exatas de seu tamanho normal.

2.5.2.3 Formação de ascosporos

As leveduras possuem a capacidade de formar ascosporos que são mais resistentes ao aquecimento e condições de desidratação que as células vegetativas.

Não se formam comumente por idade da cultura, mas por circunstâncias especiais. A condição precípua é que a cultura seja jovem e vigorosa e submetida a agentes desfavorá

veis.

Segundo PRESCOTT e DUNN (36) uma levedura é induzida a esporular por inanição ou por efeito de circunstâncias tóxicas presentes.

De acôrdo com êsses mesmos autores, certas substâncias são estimulantes à esporulação, tais como CaSO_4 , gelatina, acetato de sódio ou peptona.

Há outros fatores concorrentes para induzir a formação de ascosporos como sejam: temperatura apropriada, pH ajustado, umidade suficiente e ar necessário.

Algumas espécies perdem a habilidade de esporular, quando estocadas em laboratório. A regressão dessa tendência é devido ao fato de não se poder reproduzir, artificialmente as condições que se encontram na natureza, segundo BEIJERINCK e LINDNER (*) já supunham a seu tempo. Hoje se sabe que realmente isso se passa, pois em muitos casos o microorganismo secreta substâncias capazes de provocar verdadeiras mutações na sua própria constituição.

O número de ascosporos é típico para cada espécie, bem como sua forma e aspecto.

Há vários meios cujo uso já se tem tornado clássico, tais como o de Gorodkova, bolcos de gesso que exigem um meio de pré-esporulação anteriormente, talhadas de cenoura, talhadas de batata, suco de vegetais, etc.

Embora tivéssemos experimentado todos êsses, adotamos, por fim, o meio de suco de 4 vegetais e o de talhada de cenoura, exatamente os que constituem a rotina no laboratório de SHEATA.

(*) Dvornick

5 July

-49-

Para a preparação do meio de vegetais, segundo MRAK, PHAFF e DOUGLAS (29) opera-se da seguinte maneira: pesos iguais de cenoura, beterraba, pepino e batatas, sem descascar, são usados. Junta-se uma quantidade de água igual ao peso total desses 4 vegetais. Esteriliza-se essa mistura por 10 minutos a uma atmosfera de pressão. Separa-se o líquido filtrando-se em gaze. Esse extrato deve ter um pH de 5,7 mais ou menos e 4° Balling. Juntam-se 2 g de ágar e 2% de água de levedura autolizada. Distribue-se em tubos, inclinando-se.

Segundo aqueles autores, esse meio de cultura, além de proporcionar uma esporulação muito rápida, mantém as leveduras de estoque sem perda da faculdade de produzir ascosporos e para os demais fungos é útil para estimular a produção de conídios.

O preparo de talhadas de cenoura consta apenas de pedaços desse vegetal cortados longitudinalmente e esterilizados em tubos grandes com 1 ml de água destilada.

Após a repicagem deixamos em estufa a 25°C, examinando ao 6^a, 15^a e 30^a dias. As observações ao microscópio se fazem em água esterilizada, sem qualquer corante.

É requerido do operador um traquejo suficiente para não incorrer no erro de tomar gotas de óleo ou mesmo vacúolos que são elementos constituintes internos da célula, pelos ascosporos procurados. Quanto se tratar de um caso duvidoso é aconselhável realizar uma coloração eletiva de ascosporos. Para isso, um método que dá resultados seguros é o seguinte:-

- 1 - Solução de bicromato de potássio a 1%, por 15 segundos;
- 2 - Solução de malachita green a 5%, por 5 minutos, aquecendo;
- 3 - Solução alcoólica de safranina por 30 segundos;
- 4 - Lavar após cada operação.

A solução alcoólica de safranina tem a seguinte fórmula, segundo FLEMMING:

Álcool absoluto	50 ml
Água destilada	25 ml
Safranina	0,5 g

2.5.2.4 Formação de balistosporos

Alguns gêneros tais como Sporobolomyces e Bullera produzem esporos que são expulsos por um mecanismo especial, projetando-os à distância, de sorte que conseguem alcançar a tampa da caixa de Pétri em que está a cultura. Ao microscópio isto é facilmente visto.

Outra técnica de observação consiste no seguinte: inocula-se a cultura numa lâmina em que se tenha feito uma película com o meio de cultura. Inverte-se essa sobre um bastonete de vidro recurvado em U que, por sua vez, repousa noutra lâmina, sem meio de cultura. Quando os esporos são expulsos alcançam a segunda lâmina, formando uma verdadeira imagem da colônia. A isto se dá o nome de imagem de espelho.

O meio usado é o de malte-ágar.

Não fizemos esta prova pelo fato de não possuímos nenhuma cultura destes gêneros, cujos esporos, de forma específica revelariam estes gêneros citados.

2.5.3 c) Caracteres morfológicos culturais

É esta uma prova auxiliar na caracterização das leveduras, sendo de importância relativa.

Verifica-se o resultado após o desenvolvimento por 3-4 semanas em meio de malte-ágar e temperatura de 25°C. Então é dado anotar:

2.5.3.1 Consistência

Esta pode ser cremosa ou membranosa.

No primeiro caso, tocando-se com a agulha de

platina, a colônia é macia e não oferece resistência. Com esse fio consegue-se retirar uma pequena quantidade que se destaca facilmente. Colocando-se essa porção em água vai formar uma suspensão homogênea e sem partículas. No segundo caso, a colônia oferece uma resistência à penetração da agulha e, tentando-se destacar uma pequena quantidade não se consegue facilmente, porque há na superfície uma espécie de membrana que tende a se destacar. Colocando-se um pouco dessa cultura em água, forma uma suspensão com muitos aglomerados.

Há, todavia, algumas espécies, que se manifestam cremosas e membranosas. É assim que têm o centro membranoso e o contorno cremoso.

2.5.3.2 Aspecto

Este é também variável.

Uma cultura pode ser lisa, como geralmente ocorre com as colônias cremosas ou rugosas, quando têm a superfície plissada. Este aspecto não indica que a consistência seja forçosamente membranosa.

As colônias podem se mostrar com aparência seca ou úmida, do mesmo modo que brilhantes ou mate.

2.5.3.3 Superfície

Esta é também outra manifestação específica.

Uma colônia pode se apresentar plana, convexa ou semi-convexa em relação ao plano da superfície do meio de cultura.

Frequentemente a cor se relaciona com a espécie. Algumas vezes uma cor determinada se mostra jaspeada por outra.

Outro caráter de importância secundária, mas que pode ser assinalado, é o contorno.

Notam-se contornos lobados, lisos e serrilha-

dos. Nos bordos dêste último tipo percebe-se claramente a filamentação da colônia extendendo-se sôbre o meio de cultura.

Há outras provas consideradas absolutamente inúteis e, por isso, afastadas de qualquer tentativa. Tal é o caso das culturas em gota pendente, liquefação da gelatina e colônias gigantes, sendo esta última perfeitamente substituível por culturas em estrias examinadas pouco acima.

3 - RESULTADOS

Trabalhando com 14 frutos diferentes, conseguimos obter 69 culturas de leveduras que foram submetidas aos vários testes de classificação com os resultados seguintes.

3.1 Formação de película

a) - Anel, sedimento, película delicada, rugosa, creme e sêca: culturas nº 6, 11, 13, 16, 20, 26, 28, 30, 31, 36, 47, 56, 58, 59, 60, 63 e 68.

b) - Anel, sedimento, película espessa, rugosa, creme e sêca: culturas nº 9, 25, 48, 62, 67 e 69.

c) - Anel, sedimento, película delicada, lisa, cinza e úmida: culturas nº 7, 15, 17, 41, 52, 53, 54, 55 e 66.

d) - Anel, sedimento, película espessa, lisa, branca e sêca: culturas nº 4, 12, 23 e 65.

e) - Anel, sedimento, película espessa, lisa, creme e úmida: culturas nº 1, 5, 8, 51 e 64.

f) - Anel, sedimento, película delicada, lisa, creme e úmida: culturas nº 14, 38, 43, 50 e 57.

g) - Anel, sedimento, sem película, ilhotas: culturas nº 2, 3, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 29, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 46, 49, 57 e 61.

3.2 Zimograma dos hidratos de carbono

Resultados no quadro nº 2

3.3 Hidrólise da arbutina

Foi positivo apenas para a cultura nº 55. Foi negativo para as culturas nº 1, 7, 8, 10, 12, 15, 23, 24, 30, 39, 43, 44, 48, 55 e 65.

3.4 Hidrólise da asculina

Foi positivo para as culturas nº 1, 7, 8, 10, 12, 15, 23, 24, 30, 39, 43, 44, 48, 55 e 65.

As culturas de nº 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68 e 69 não foram submetidas à prova da asculina e da arbutina, porquanto não foi possível encontrar no comércio êsses glucosídeos; aquelas culturas acima citadas foram trabalhadas no laboratório de Sheata, justamente as que serviram no nosso aprendizado. Não sendo prova absolutamente essencial, foi considerada dispensável.

3.5 Auxanograma dos açúcares

Resultado no quadro nº 3.

3.6 Auxanograma do nitrogênio

Resultado no quadro nº 4.

3.7 Etanol como única fonte de carbono

Foram as seguintes culturas que se desenvolveram bem nesta prova: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 20, 23, 24, 26, 28, 47, 48, 50, 51, 52, 56, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 67, 68 e 69. Desenvolvimento médio: nº 13 e 49. Desenvolvimento fraco: nº 32, 34, 41, 42, 54, 55 e 65. Sem desenvolvimento: nº 3, 11, 14, 19, 21, 22, 24, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 53, 57, 61 e 66.

3.8 Formação de ascospores

Das 69 culturas isoladas, 27 são capazes de formar ascospores e 42 não.

São ascosporógenas as seguintes: ascospores ru-

gosos 1-2 por asco: culturas nº 2, 8, 15, 16, 26, 28, 40 e 47. Com 1-3 por asco: cultura nº 25. Com 1-4 por asco: cultura nº 27. Ascosporos lisos, 1 por asco: culturas nº 19, 35, 42, 52, 53, 56 e 66; 1-2 por asco: culturas nº 20, 44, 36 e 61; 1-3 - por asco: cultura nº 64; 1-4 por asco: cultura nº 59. Ascosporos em forma de chapéu, 1-2 ascosporos por asco: culturas nº 7 e 11; com 2-4 por asco: cultura nº 48.

3.9 Caractéres morfológicos culturais

a) - Colônia semi convexa, creme, fosca, sêca, lisa, bordos serrilhados. Culturas nº 1, 6, 10, 23, 63, 67 e 69.

b) - Colônia semi convexa, branco creme, fosca, sêca, rugosa, bordos lobados. Culturas nº 4, 5, 9, 12, 17, 51, 58, 62 e 68.

c) - Colônia plana, branco amarelada, pouco brilhante, úmida, lisa e parcialmente rugosa, bordos lobados. Culturas nº 2, 7, 16, 30, 36, 47, 48, 59 e 60.

d) - Colônia plana, creme cinza, pouco brilhante, úmida, lisa, bordos serrilhados. Culturas nº 3, 18, 22, 25, 32, 33, 37, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 46 e 57.

e) - Colônia semi convexa, creme, pouco brilhante, úmida, lisa, bordos lobados. Culturas nº 8, 15, 20, 25, 26, 28 e 38.

f) - Colônia semi convexa, creme, fosca, pouco úmida, lisa e parcialmente rugosa, bordos lobados. Culturas nº 11, 56 e 64.

g) - Colônia plana, creme cinza, brilhante, úmida, lisa, bordos serrilhados. Culturas nº 14, 18 e 27.

h) - Colônia plana, creme cinza, pouco brilhante, úmida, lisa, bordos serrilhados. Culturas nº 21, 29 e 54.

i) - Colônia convexa, creme, pouco brilhante,

S. Joly

-55-

úmida rugosa, bordos lobados. Culturas nº 13, 31 e 65.

j) - Colônia plana, creme cinza, pouco brilhante, úmida, lisa, bordos lobados. Culturas nº 34, 35, 42, 52, 53, 61 e 66.

k) - Colônia convexa, amarela, pouco brilhante, úmida, lisa, bordos lobados. Culturas nº 49, 50 e 55.

Quadro nº 1 - Leveduras isoladas de frutos maduros

S. July

Nº DAS CULTURAS	NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR	VARIEDADE	PROCEDENCIA	FICHA
1	Vitis sp.	uva	Campos da Paz	Pomar -Escola	22-1-54
2	"	"	"	"	"
3	"	"	"	"	"
4	"	"	"	"	"
5	"	"	"	"	"
6	"	"	"	"	"
7	"	"	"	"	"
8	"	"	"	"	"
9	"	"	ananas	"	"
10	"	"	"	"	"
11	"	"	Seibel	"	"
12	"	"	"	"	"
13	"	"	"	"	"
14	"	"	"	"	"
15	"	"	Seibel 10096	"	"
16	"	"	"	"	"
17	"	"	"	"	"
18	"	"	"	"	"
19	"	"	"	"	"
20	"	"	"	"	"
21	"	"	"	"	"
22	"	"	"	"	"
23	"	"	Concord	"	"
24	"	"	"	"	"
25	"	"	"	"	"
26	"	"	"	"	"
27	"	"	"	"	"
28	"	"	"	"	"
29	"	"	Raboso	"	"
30	"	"	"	"	"
31	"	"	"	"	"
32	Anacardium occidentale, L	cajú	Dr. Philippe	"	1-2-54
33	"	"	"	"	"
34	"	"	"	"	"

-continua-

S. Joly

NR DAS CULTURAS	NOME CIENTIFICO	NOME VULGAR	VARIEDADE	PROCEDÊNCIA	FICHA
35	Anacardium occidentale, L	caju	Ceará	Pomar-Escola	1-2-54
36	"	"	"	"	"
37	"	"	"	"	"
37	"	"	Dr. Philippe	"	"
38	"	"	"	"	"
39	"	"	"	"	"
40	"	"	"	"	"
41	"	"	Ceará	"	"
42	"	"	"	"	"
43	Malpighia puncifolia, L	cereja	das Antilhas	"	10-2-54
44	"	"	"	"	"
45	Psidium araçá, Raddi	araçá	roxo	"	"
46	"	"	"	"	"
47	Myrciaria jaboticaba, Berg	jaboticaba	branca	"	"
48	"	"	"	"	"
49	Psidium araçá, Raddi	araçá	do Chile	"	"
50	"	"	"	"	"
51	Spondia monbin	cironeia	"	Pomar Dr. Jayme	3-2-54
52	"	"	"	"	"
53	Anenhoe carambola, L	carambola	"	Pomar-Escola	10-2-54
54	Abcoillea fenzliana, Berg	guabiroba	de Goiás	"	10-2-54
55	Prunus domestica	ameixa	kelsey	"	"
56	Psidium gua Java, L	goiaba	vermelha	"	"
57	"	"	"	"	"
58	"	"	"	"	"
59	"	"	"	"	"
60	"	"	"	"	"
61	Eugenia uniflora, L	pitanga	gigante	"	"
62	"	"	"	"	"
63	"	"	"	"	"
64	Areca bambu	areca bambu	"	Parque Escola	23-2-54
65	"	"	"	"	"
66	Spondia monbin	ciromela	"	Pomar Dr. Jayme	3-2-54
67	"	"	"	"	"
68	"	"	"	"	"
69	Scheas sapota, L	sapotí	"	Pomar-Escola	22-8-54

S. Joly

Quadro nº 2 - Zimograma dos açúcares

Nº DAS CULTURAS	FONTES UTILIZADAS					
	GLUCOSE	GALACTOSE	SACAROSE	MALTOSE	LACTOSE	RAFINOSE
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-
25	+	-	-	-	-	-
26	+	-	-	-	-	-
27	+	-	-	-	-	-
28	+	-	-	-	-	-
29	+	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	-
31	+	-	-	-	-	-
32	+	-	-	-	-	-
33	+	-	-	-	-	-
34	+	-	-	-	-	-

-continua-

S. July

-continuação-

-59-

Nº DAS CULTURAS	FONTES UTILIZADAS					
	GLUCOSE	GALACTOSE	SACAROSE	MALTOSE	LACTOSE	RAFINOSE
35	+	-	-	-	-	-
36	+	-	-	-	-	-
37	+	-	-	-	-	-
38	+	-	-	-	-	-
39	+	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	-	-
41	+	-	-	-	-	-
42	+	-	-	-	-	-
43	+	-	-	-	-	-
44	+	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-
46	+	-	-	-	-	-
47	+	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-
49	+	-	-	-	-	-
50	+	-	-	-	-	-
51	+	-	-	-	-	-
52	+	-	-	-	-	-
53	+	-	-	-	-	-
54	+	-	-	-	-	-
55	+	-	-	-	-	-
56	+	-	-	-	-	-
57	+	-	-	-	-	-
58	+	-	-	-	-	-
59	+	-	-	-	-	-
60	+	-	-	-	-	-
61	+	-	-	-	-	-
62	+	-	-	-	-	-
63	+	-	-	-	-	-
64	+	-	-	-	-	-
65	+	-	-	-	-	-
66	+	-	-	-	-	-
67	+	-	-	-	-	-
68	+	-	-	-	-	-
69	+	-	-	-	-	-

S. July

Quadro nº 3 - Auxanograma dos açúcares

Nº DAS CULTURAS	FONTES UTILIZADAS				
	GLUCOSE	GALACTOSE	SACAROSE	MALTOSE	LACTOSE
1	+	+	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	-	+	-
5	+	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-
8	+	+	-	-	-
9	+	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-
11	+	+	-	-	-
12	+	-	-	-	-
13	+	+	-	+	-
14	+	+	-	+	-
15	+	+	-	-	-
16	+	+	-	-	-
17	+	-	+	-	-
18	+	+	-	+	+
19	+	+	-	+	+
20	+	+	-	+	-
21	+	+	-	+	-
22	+	+	+	+	-
23	+	+	-	-	-
24	+	-	-	-	-
25	+	+	-	+	-
26	+	+	-	+	-
27	+	+	+	+	-
28	+	+	-	+	-
29	+	+	-	+	-
30	+	+	-	-	-
31	+	+	-	+	-
32	+	+	-	+	-
33	+	+	-	+	-
34	+	+	-	+	-

S. Joly

-continuação-

Nº DAS CULTURAS	FONTES UTILIZADAS				
	GLUCOSE	GALACTOSE	SACAROSE	MALTOSE	LACTOSE
35	+	-	-	-	-
36	+	+	-	+	-
37	+	+	+	+	-
38	+	+	-	-	-
39	+	+	-	-	-
40	+	+	-	+	-
41	+	+	-	+	-
42	+	+	-	+	-
43	+	+	-	-	-
44	+	+	-	-	-
45	+	+	-	+	-
46	+	+	-	+	-
47	+	+	-	+	-
48	+	-	-	-	-
49	+	+	-	+	-
50	+	-	+	+	-
51	+	+	-	+	-
52	+	-	-	+	-
53	+	+	-	+	-
54	+	+	-	+	-
55	+	+	+	+	-
56	+	+	-	+	-
57	+	+	+	+	-
58	+	-	-	-	-
59	+	+	-	+	-
60	+	+	-	+	-
61	+	+	-	+	-
62	+	+	-	+	-
63	+	+	-	+	-
64	+	-	-	-	-
65	+	+	-	+	-
66	+	+	-	+	-
67	+	+	-	+	-
68	+	+	+	+	-
69	+	-	-	-	-

S. July

-62-

Quadro nº 4 - Auxanograma do nitrogênio

Nº DAS CULTURAS	FONTES UTILIZADAS				
	NITRATO DE POTÁSSIO	SULFATO DE AMÔNIO	PEPTONA	UREA	ASPARAGINA
1	-	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+
6	-	+	+	+	+
7	-	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+
9	-	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+
11	-	+	+	+	+
12	-	+	+	+	+
13	-	+	+	+	+
14	-	+	+	+	+
15	-	+	+	+	+
16	-	+	+	+	+
17	-	+	+	+	+
18	-	+	+	+	+
19	-	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+
21	-	+	+	+	+
22	-	+	+	+	+
23	-	+	+	+	+
24	-	+	+	+	+
25	-	+	+	+	+
26	-	+	+	+	+
27	-	+	+	+	+
28	-	+	+	+	+
29	-	+	+	+	+
30	-	+	+	+	+
31	-	+	+	+	+
32	-	+	+	+	+
33	-	+	+	+	+
34	-	+	+	+	+

-continua-

S. July

-63-

-continuação-

Nº DAS CULTURAS	FONTES UTILIZADAS				
	NITRATO DE POTASSIO	SULFATO DE AMONIO	PEPTONA	UREA	ASPARAGINA
35	-	+	+	+	+
36	-	+	+	+	+
37	-	+	+	+	+
38	-	+	+	+	+
39	-	+	+	+	+
40	-	+	+	+	+
41	-	+	+	+	+
42	-	+	+	+	+
43	-	+	+	+	+
44	-	+	+	+	+
45	-	+	+	+	+
46	-	+	+	+	+
47	-	+	+	+	+
48	-	+	+	+	+
49	-	+	+	+	+
50	-	+	+	+	+
51	-	+	+	+	+
52	-	+	+	+	+
53	-	+	+	+	+
54	-	+	+	+	+
55	-	+	+	+	+
56	-	+	+	+	+
57	-	+	+	+	+
58	-	+	+	+	+
59	-	+	+	+	+
60	-	+	+	+	+
61	-	+	+	+	+
62	-	+	+	+	+
63	-	+	+	+	+
64	-	+	+	+	+
65	-	+	+	+	+
66	-	+	+	+	+
67	-	+	+	+	+
68	-	+	+	+	+
69	-	+	+	+	+

S. July

-64-

Quadro nº 5 - Determinação genérica e específica das culturas estudadas

Nº das Culturas	Gênero e espécie
1	<i>Candida mycoderma</i> (Ress) nov. comb.
2	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
3	<i>Kloeckera apiculata</i> (Ress emend. Klöcker) Janke
4	<i>Candida solani</i> nov. spec.
5	<i>Candida solani</i> nov. spec.
6	<i>Candida mycoderma</i> (Ress) nov. comb.
7	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
8	<i>Pichia farinosa</i> (Lindner) Hansen
9	<i>Candida krusei</i> (Cast.) Berkhout
10	<i>Candida mycoderma</i> (Ress) nov. comb.
11	<i>Pichia fermentans</i> Lodder
12	<i>Candida krusei</i> (Cast.) Berkhout
13	<i>Torulopsis molischiana</i> (Zikes) Lodder
14	<i>Kloeckera lafari</i> (Klöcker) Janke
15	<i>Pichia farinosa</i> (Lindner) Hansen
16	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
17	<i>Candida krusei</i> (Cast.) Berkhout
18	<i>Kloeckera apiculata</i> (Ress emend. Klöcker) Janke
19	<i>Kloeckera lafari</i> (Klöcker) Janke
20	<i>Pichia farinosa</i> (Lindner) Hansen
21	<i>Kloeckera magna</i> (De Rossi) Janke
22	<i>Kloeckera africana</i> (Klöcker) Janke
23	<i>Candida mycoderma</i> (Ress) nov. comb.
24	<i>Kloeckera apiculata</i> (Ress emend. Klöcker) Janke
25	<i>Pichia farinosa</i> (Lindner) Hansen
26	<i>Pichia farinosa</i> (Lindner) Hansen
27	<i>Kloeckera lafari</i> (Klöcker) Janke
28	<i>Pichia farinosa</i> (Lindner) Hansen
29	<i>Kloeckera magna</i> (De Rossi) Janke
30	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
31	<i>Candida brumptii</i> Langeron et Guerra
32	<i>Kloeckera apiculata</i> (Ress emend. Klöcker) Janke
33	<i>Kloeckera apiculata</i> (" " ") "
34	<i>Kloeckera</i> sp.

-continua-

-continuação-

n ^o das culturas	Gênero e espécie
35	<i>Kloeckera</i> sp.
36	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
37	<i>Kloeckera apiculata</i> (Reess emend. Klöcker) Janke
38	<i>Pichia farinosa</i> (Lindner) Hansen
39	<i>Kloeckera apiculata</i> (Reess emend. Klöcker) Janke
40	<i>Kloeckera apiculata</i> (Reess emend. Klöcker) Janke
41	<i>Kloeckera apiculata</i> (" " ") "
42	<i>Kloeckera</i> sp.
43	<i>Kloeckera apiculata</i> (Reess emend. Klöcker) Janke
44	<i>Kloeckera apiculata</i> (" " ") "
45	<i>Kloeckera africana</i> (Klöcker) Janke
46	<i>Kloeckera africana</i> (") "
47	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
48	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
49	<i>Torulopsis ernobii</i> nov. spec.
50	<i>Torulopsis ernobii</i> " "
51	<i>Candida krusei</i> (Cast.) Berkhout
52	<i>Kloeckera</i> sp.
53	<i>Kloeckera</i> sp.
54	<i>Kloeckera magna</i> (De Rossi) Janke
55	<i>Torulopsis famata</i> (Harrison) nov. comb.
56	<i>Pichia fermentans</i> Lodder
57	<i>Kloeckera apiculata</i> (Reess emend. Klöcker) Janke
58	<i>Candida krusei</i> (Cast.) Berkhout
59	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
60	<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen
61	<i>Kloeckera</i> sp.
62	<i>Candida krusei</i> (Cast.) Berkhout
63	<i>Candida mycoderma</i> (Reess) nov. comb.
64	<i>Pichia fermentans</i> Lodder
65	<i>Candida brumptii</i> Langeron et Guerra
66	<i>Kloeckera</i> sp.
67	<i>Candida mycoderma</i> (Reess) nov. comb.
68	<i>Candida solani</i> nov. spec.
69	<i>Candida mycoderma</i> (Reess) nov. comb.

4 - RESUMO.

Em nossos trabalhos não nos cingimos a um determinado conjunto de métodos preconizados por um só autor. Tivemos oportunidade de selecionar aqueles que melhores resultados nos proporcionaram no mourejar do trabalho todo.

Nossos esforços foram assistidos por dois cientistas de renome mundial, cujos nomes se acham assinalados - neste trabalho, cabendo-nos uma expressão de reconhecida admiração.

Ao lado disto, entretanto, muitos foram os fatores negativos operantes, tais como falta de água no laboratório, falta de energia elétrica, falta de certas matérias primas e de alguns meios de cultura para determinados testes, tudo constituindo um lastro contrário para resultados eficientes.

A única razão que nos anima é que êsses resultados parciais nos possibilitam a futuras conclusões positivas.

A chave de classificação por nós usada foi a de Lodder Kreger-van Rij.

Isolamos 69 culturas de leveduras dos 14 gêneros diferentes de frutos manipulados. Obtivemos apenas 4 gêneros de leveduras.

Houve predominância de espécies zimáticas simples sôbre as zimato-oxidásicas numa percentagem de 98,55%.

A percentagem do grupo das Cryptococcaceae sôbre as Endomycetaceae seria de 72,46% si colocássemos tôdas as Kloeckeras no grupo das anascosporógenas segundo Lodder; - verificamos todavia que nem todas as apiculadas são fungos im perfeitos, o que veio comprovar visivelmente a afirmação de Dvornik (8) e Nichaus (33). Destarte não pudemos colocar as

apiculadas ascospórógenas num grupo específico: genericamente pusemos como *Kloeckeras*; há uma idéia de se dar a essas apiculadas a denominação de *Saccharomyces niehausii*, apesar da forma celular se afastar sensivelmente da forma típica dêsse grupo.

Nenhuma levedura do gênero *Saccharomyces* foi isolada neste levantamento, apesar de termos manipulado uvas maduras. A explicação razoável que parece satisfazer é que a época da colheita dos frutos era muito chuvosa, e possivelmente tivesse lavado deles essas espécies.

Isto põe em evidência a necessidade da aplicação de leveduras selecionadas para qualquer investimento industrial em que se deseje a ação de espécies capazes de fermentar.

Os tubos de Durham na prova de fermentação são os mais sensíveis; a inconveniência de seu uso reside no fato de exigir uma fiscalização diária, porque terminando o fenômeno, o líquido pode reabsorver o gás formado, iludindo por completo o observador desavisado. Além disso êsse sacarômetro não acusa apreciavelmente a fermentação da rafinose que oferece um aspecto especial. Deve-se então fazer uma restrição, adotando-se os tubos de Einhorn que revelam quantitativamente a fermentação dêsse triolosídeo.

Apesar de operarmos com excessivo cuidado nos testes houve muito desvio entre as formas encontradas e os tipos padrão apresentador por Lodder, o que não nos tolheu de situar tais indivíduos nos lugares competentes, pois nada nos impede de julgar que sejam quiçá strains dentro da espécie - porque um tratato como êsse que nos serviu de modelo tem um valôr regional bastante restrito. Tanto isto é real que em nossos trabalhos isolamos do sapoti um microorganismo, ao que

parece, inteiramente novo e não descrito ainda. Apresenta caracteres de levedura e de fungo. Segrega um pigmento preto intra celular, pelo que a chamamos provisoriamente de "Levedura preta". Forma pseudo micélio, assimila nitrato de tódas as fontes usadas no auxanograma, assim como todos os açúcares, - com exceção da rafinose, desdobra a arbutina e a asculina, não fermenta nenhum açúcar, apresenta pequeno desenvolvimento no meio de etanol; forma película espessa, creme, úmida, anel e sedimento, no meio líquido de extrato de malte. As culturas - em estria tem aspecto muito variável segundo o meio de cultura usado, apresentando-se então com coloração muito diversa. Êste microorganismo presentemente é objeto de estudo de Shea-ta e Mrak.

Notamos grande ocorrência de leveduras apiculadas neste levantamento, atingindo a 40,57% sôbre as demais. - Dessa percentagem 13,04% pertence a uva, um valor igual ao caju e o resto para os demais frutos. As apiculadas são leveduras de fermentação baixa e que fazem fermentar energicamente a glucose. Deixam a sacarose inatacada, sendo por isso usadas na indústria da cidra doce à qual conferem um bouquet agradável. Esta indústria não está ainda desenvolvida em nosso país.

Segundo se poderia depreender da implícita afirmação de Jörgensen (17), o metabolismo oxidativo ou anoxidativo de uma levedura estaria relacionado com a habilidade de formar ascosporos; tivemos ocasião de examinar a análise de correlação dêsses dois fatos o que nos autorizou a atribuir - um valôr positivo ao fato. Portanto, há uma estreita correlação entre essas duas manifestações vitais da levedura.

Os valores obtidos para tal análise foram extraídos de Lodder Kreger-van Rij e são os seguintes:

Metabolismo fermentativo das ascosporógenas 60.

Metabolismo fermentativo das anascosporógenas

58.

Metabolismo oxidativo das ascosporógenas 16.

Metabolismo oxidativo das anascosporógenas 41.

$$\sum_{1}^{4} x^2 = \frac{(a d - b c)^2 \cdot N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} = \frac{(60.41 - 16.58)^2 \cdot 175}{76.99 \cdot 118.57}$$

$$\sum_{1}^{4} x^2 = \frac{(2460 - 928)^2 \cdot 175}{50606424} = \frac{(1532)^2 \cdot 175}{50606424} = \frac{2347024 \cdot 175}{50606424}$$

$$\sum_{1}^{4} x^2 = \frac{410 \cdot 729200}{50606424} = 8,1161 \approx 8,12$$

$$g1 = 1 \begin{cases} 5\% = 3,84 \\ 1\% = 6,66 \end{cases}$$

8,12 > 6,66 → significativa

5 - CONCLUSÕES

1) - Em nossos trabalhos houve predominância - de espécies de leveduras zimáticas simples sôbre as zimato-oxidásicas, numa percentagem de 98,55%.

2) - Houve grande ocorrência de leveduras apiculadas, atingindo 40,57% das quais, 13,04% foram isoladas da uva.

3) - A percentagem das Cryptococcaceae sôbre - as Endomycetaceae seria de 72,46%, colocando-se as Kloeckeras no grupo das leveduras anascosporógenas.

4) - Não encontramos nenhuma levedura do gênero Saccharomyces, embora trabalhássemos com uvas maduras, além de 13 outros frutos maduros.

5) - Nas provas de fermentação, mediante supervisão acurada, os tubos de Durham são os mais sensíveis.

6) - Há estreita correlação entre o metabolismo oxidativo ou anoxidativo de uma levedura e a habilidade de formar ascósporos.

6 - BIBLIOGRAFIA

- I - Almeida, F. de (1)
1950 - An. Fac. Med. Univ. São Paulo 25:387-394.
- II - Almeida, J.R. (2)
1940 - Alcool e destilaria, pág. 44.
- III - Aschner, M., J. Mager e J. Leibowitz (3)
1945 - Nature 156 (3958): 295.
- IV - Baker, E.E., e E.M. Mrak (4)
1938 - J. Bact. 36 (3): 317-318.
- V - Bedford, C. L. (5)
1942 - Mycol. 34:628
- VI - Bouthilet, R. J., M. E. Neilson, E. M. Mrak, e H.J. Phaff (6)
1949 - Jour. of Gen. Microb. 3 (2): 282-289.
- VII - Cruess, W. V., e L. Hohl (7)
1938 - J. Bact. 36 (3): 318.
- VIII - Dvornik, R. (8)
1938 - Zentralbl. f. Bakt., II Abt, 98 (16/20): 315-344.
- IX - Fales, F. W., e J. P. Baumberger (9)
1948 - Jour. Biol. Chem. 173 (1): 1-8.
- X - F. Arnulf (10)
1948 - Wines and vine 29 (8): 25-26.
- XI - Fuentes (11)
1942 - Rev. de Med. Trop. Y Paras. Bact. Clin. Y Lab.
8 (4): 49-51.
- XII - Goidanich, G., R. Ciferri, e P. Redaelli (12)
1939 - Mycol. 2: 48-51
- XIII - Guilliermond, A. (13)
1920 - The Yeasts, New York, John Wiley and Sons Inc.
pág. 212, 247, 257 e 264.
- XIV - Hall, H. H., L. H. James, e E. K. Nelson (14)
1937 - J. Bact 33 (6): 577-585
- XV - Henrici, A. T. (15)
1941 - Bact. reviews 5 (2): 97-179.
- XVI - Jelinek, B. (16)
1938 - Ann. des ferment. 4: 1-26
- XVII - Jörgensen, A. (17)
1948 - Microorg. and ferment., London Charles Griffin

- and C° Ltd. pág. 79 e 252.
- XVIII - Krug, H. P. (18)
1936 - Bol. techn. Inst. Agr. Campinas 23 (1)
- XIX - Langeron, M. (19)
1945 - Précis de Mycol. Masson et Cie. pág. 482, 489 e 490.
- XX - Langeron, M., e P. Guerra (20)
1938 - Ann. de Parasit. Hum. et Comp. 16 (1): 36-84.
- XXI - Langeron, M., e P. Guerra (21)
1938 - Ann. de Parasit. Hum. et Comp. 16 (2): 162-179.
- XXII - Lefèvre, R. M. (22)
1943 - Chem. Ind. 49: 242-248.
- XXIII - Lilly, V. G., e H. L. Barnett (23)
1951 - Physiology of the fungi. Mc Graw-Hill Book C° Inc. First Edition pág 49 e 51.
- XXIV - Lima, U. de A. (*)
1954 - Boletim nº 8 do Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Univ. de S. Paulo - Piracicaba, pág. 8.
- XXV - Lodder, J., e N. J. W. Kreger-van Rij (24)
1952 - The Yeasts. North-Holland Publishing C° Amsterdam, pág. 7, 8, 9, 13, 23, 24, 26 e 32.
- XXVI - Mc Lean, e Hoffert (25)
1926 - Bioch. Jour. 20: 343-348.
- XXVII - Migoya, A. E. E. (26)
1950 - Rev. de Invest. Agric. 4 (3): 277-295.
- XXVIII - Morquer, R., E. Puget, e A. Bazex (27)
1954 - Rev. de Mycol. 19 (1): 63-84
- XXIX - Mrak, E. M., e L. S. Mc Clung (28)
1938 - J. Bact, 36 (3): 316-317.
- XXX - Mrak, E. M., H. K. Phaff, e H. C. Douglas (29)
1942 - Science 96 (2497): 432.
- XXXI - Mrak, E. M., H. J. Phaff, e G. Mackinney (30)
1949 - J. Bact. 57 (4): 409-411.

(*) Ver XLV

- E. Joly
- XXXII - Mrak, E. M. e H. J. Phaff (31)
1951 - Taxonomy and Morphology of Yeasts.
Food Technology Division. Univ. of California,
Berkeley, Calif.
- XXXIII - Nickerson, W. J. (32)
1943 - J. Mycol. 35: 66-78.
- XXXIV - Niehaus, C. J. G. (33)
1932 - Zentralbl. f. Bakt., II Abt 87 (5/8): 97-150.
nov. 11 illus.
- XXXV - Perlman, P. (34)
1950 - Amer. Jour. of Bot 37 (3): 237-240
- XXXVI - Peterson, W. J., T. A. Bell, J. L. Etchells e W. W. G.
Smart Jr. (35).
1954 - J. Bact 67 (6): 708-713.
- XXXVII - Phaff, H. J., e E. M. Mrak (*)
1948 - I Wallerstern Lab. Communic 11 (35): 261-279.
- XXXVIII - Prescott, S., e C. G. Dunn (36)
1940 - Industrial Microbiology, Mc Graw. Hill Book
Co. New York. pag. 27
- XXXIX - Redaelli, P., T. Castelli, e R. Ciferri (37)
1938 - Mycop. 1: 182-184.
- XL - Shifrine, M., H. J. Phaff, e A. L. Demain (38)
1954 - J. Bact. 68 (1): 28-35
- XLI - Skinner, C. E., C. W. Emmons, e H. M. Tsuchiya (39)
1947 - Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes. New
York, John Wiley & Sons Inc. London. Chapman Hall.
Limited. pag. 311, 315, 316 e 322.
- XLII - Skinner, C. E., e R. Bouthilet (40)
1947 - J. Bact 53 (1): 37-47.
- XLIII - Soriano, S. (41)
1953 - Apostila de Microbiologia da Faculd. de Agr.
e Vet. de Buenos Aires. pag. 26.
- XLIV - Soriano, S. (42)
1938 - Rev. Arg. de Agron. Tomo 5, nº 2, pag. 73-81

(*) Ver XLVII

S. Joly

-74-

- XLV - (43) *
- XLVI - Verona, O., e R. Ciferri. (44)
1938 - Mycop. 1: 273
- XLVII - (45) **
- XLVIII - Wickerham, L. J. (46)
1943 - J. Bact. 46 (6): 501-505.
- XLIX - Wickerham, L. J., e E. Duprat (47)
1945 - J. Bact. 50 (5): 597-607
- L - Wickerham, L. J., e K. A. Burton (48)
1948 - J. Bact. 56 (3): 363-371.
- LI - Wickerham, J. L. (49)
1951 - Tec. Bull n^o 1029 - Department of Agric., U. S.
Washington, D. C.
- LII - Wickerham, J. L. (50)
1946 - J. Bact. 52 (3): 293-301.
- LIII - Wilkinson, J. T. (51)
1949 - Biochem. Jour. 44 (4): 460-467.

* Ver XXIV

** Ver XXXVII