

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO, ESTABILIDADE E
COMPONENTES DE UM CONSÓRCIO BACTERIANO
DESCONSTRUTOR DE LIGNOCELULOSE**

Anna Carolina De Oliveira Souza

Tecnóloga em Biocombustíveis

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO, ESTABILIDADE E
COMPONENTES DE UM CONSÓRCIO BACTERIANO
DESCONSTRUTOR DE LIGNOCELULOSE**

Anna Carolina De Oliveira Souza

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

Coorientadora: Dra. Milena Tavares Lima Constancio

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

S729e

Souza, Anna Carolina de Oliveira

Estudo do desenvolvimento, estabilidade e componentes de um consórcio bacteriano desconstrutor de lignocelulose : Development, stability and component study of a deconstructing bacterial consortium of lignocellulose / Anna Carolina de Oliveira Souza. -- Jaboticabal, 2020

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lúcia Maria Carareto Alves

Coorientadora: Milena Tavares Lima Constancio

1. Etanol de segunda geração. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Celulose e Hemicelulose. 4. Bagaço de cana-de-açúcar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO, ESTABILIDADE E COMPONENTES DE UM CONSÓRCIO BACTERIANO DESCONSTRUTOR DE LIGNOCELULOSE

AUTORA: ANNA CAROLINA DE OLIVEIRA SOUZA

ORIENTADORA: LUCIA MARIA CARARETO ALVES

COORDINADORA: MILENA TAVARES LIMA CONSTANCIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pós-doutorando DANILLO OLIVEIRA DE ALVARENGA
Departamento de Tecnologia / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 11 de dezembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Anna Carolina De Oliveira Souza – nascida 03 de abril de 1996, em Sertãozinho, São Paulo, Brasil, filha de Elisabete de Oliveira Souza e Roberto Aparecido de Souza. Ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis em 2014 na Faculdade de Tecnologia Nilo de Stefani de Jaboticabal - FATEC, obtendo o título de tecnóloga em biocombustíveis em 2016. Ingressou em agosto do ano seguinte no Curso de Mestrado, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Em 11 de dezembro de 2019 defendeu sua dissertação de mestrado em Microbiologia Agropecuária.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, pela oportunidade, pela orientação, apoio, conselhos e incentivos durante todo o tempo de mestrado;

À Dra. Milena Tavares Lima Constancio pela coorientação, por transmitir seus ensinamentos, pelos incentivos e por toda ajuda e paciência ao longo do trabalho;

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos pela oportunidade;

Ao prof. Dr. Thiago Olitta Basso e a toda sua equipe (Gabriel, Thais, Kevy e Dielle) pelo carinho quando estive com eles;

A todos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas que contribuíram na minha jornada com amizade, companheirismo e me auxiliando sempre que necessário;

À minha família e ao meu namorado que sempre me apoiou, confiou e me incentivou a acreditar em meus sonhos;

Aos meus amigos por sempre estarem ao meu lado me dando forças e me ampararem quando precisei;

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias -FCAV/Unesp;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo bolsa e suporte concedido;

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigado, vocês foram muito importantes.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Biomassa lignocelulósica.....	4
2.1.2 Celulose.....	5
2.1.3 Hemicelulose.....	6
2.1.4 Lignina.....	6
2.2 Etanol de segunda geração.....	6
2.3 Consórcios microbianos.....	8
2.4 Obtenção do consórcio.....	9
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SA-1.....	9
2.6 Identificação de microrganismos por sequenciamento do gene de 16S rRNA.....	9
3 OBJETIVOS.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Microscopia eletrônica de varredura das fibras do bagaço de cana-de-açúcar.....	14
4.2 Análise dos polissacarídeos e lignina residuais na fase sólida dos cultivos.....	15
4.3 Análise de açúcares e ácidos orgânicos na fase líquida dos cultivos.....	16
4.4 Análises estatísticas.....	17
4.5 Análise da população bacteriana por sequenciamento do gene de 16SrRNA.....	17
4.5.2 Obtenção das bactérias.....	17
4.5.3 Extração do DNA.....	17
4.5.4 Construção da biblioteca do gene de 16S rRNA e sequenciamento.....	18
4.5.5 Análises das Sequências Obtidas.....	19
4.6 Eficiência do consórcio para produção de etanol a partir de biomassa.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 Microscopia eletrônica de varredura da biomassa.....	21
5.2 Análise dos polissacarídeos e lignina residuais na fase sólida dos cultivos.....	25
5.3 Análise de açúcares e ácidos orgânicos na fase líquida dos cultivos.....	28
5.4 Extração do DNA.....	34

5.5	Análise da população bacteriana por sequenciamento do gene 16SrRNA	34
5.5	Eficiência do consórcio para produção de etanol a partir de biomassa	50
6	CONCLUSÃO	55
7	REFERÊNCIAS	56

RESUMO – A produção de etanol de segunda geração (2G) obtido a partir de material lignocelulósico para ser eficiente e economicamente viável necessita encontrar melhores opções no processo de transformar celulose e hemicelulose em hexoses e pentoses para que possam ser fermentadas. Com isto, o objetivo deste trabalho foi estudar organismos que compõem o consórcio bacteriano, com capacidade de desconstruir a biomassa lignocelulósica liberando açúcares. O cultivo foi realizado em meio BHB (Bushnell Haas Broth) com bagaço de cana-de-açúcar por 5 e 10 dias para 2^a e 20^a semana de cultivo. Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura avaliando aderência das bactérias à fibra. Além de avaliar composição das frações fibrosas residuais do cultivo e determinar açúcares, essas análises mostraram que com 5 dias para 2^a semana houve maior degradação da lignocelulose e liberação de açúcares. As populações bacterianas presentes no consórcio foram estudadas pelo sequenciamento parcial do gene de 16S rRNA, mostrando que existem gêneros com capacidade de degradar a biomassa, como *Caulobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhizobium* e *Dokdonella*. Através dos estudos realizados, se pode visualizar que o consórcio conseguiu degradar a biomassa e liberar glicose no meio de cultivo, constituindo assim, uma ferramenta que poderá ser aplicada em processos de obtenção de etanol de segunda geração.

Palavras chave: Etanol de segunda geração, Biomassa lignocelulósica, Celulose e Hemicelulose, Bagaço de cana-de-açúcar.

DEVELOPMENT, STABILITY AND COMPONENT STUDY OF A DECONSTRUCTING BACTERIAL CONSORTIUM OF LIGNOCELLULOSE

ABSTRACT - The production of second generation (2G) ethanol obtained from lignocellulosic material to be efficient and economically viable needs to find better options in the process of turning cellulose and hemicellulose into hexoses and pentoses so that they can be fermented. Thus, the objective of this work was to study organisms that make up the bacterial consortium, with the ability to deconstruct lignocellulosic biomass releasing sugars. Cultivation was carried out in BHB (Bushnell Haas Broth) medium with sugarcane bagasse for 5 and 10 days for the 2nd and 20th week of cultivation. Scanning electron microscopy analyzes were performed to evaluate bacteria adherence to the fiber. In addition to evaluating the composition of the residual fibrous fractions of the crop and determining sugars, these analyzes showed that with 5 days to the 2nd week there was greater lignocellulose degradation and sugar release. The bacterial populations present in the consortium were studied by partial sequencing of the 16S rRNA gene, showing that there are genera with the ability to degrade biomass, such as *Caulobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhizobium* and *Dokdonella*. Through the studies, it can be seen that the consortium managed to degrade the biomass and release glucose in the culture medium, thus constituting a tool that can be applied in processes of obtaining second generation ethanol.

Keywords: Second generation ethanol, Lignocellulosic biomass, Cellulose and Hemicellulose, Sugarcane bagasse.

1. INTRODUÇÃO

A procura por fontes renováveis de energia vem crescendo, devido à busca por combustíveis com baixas emissões de CO₂, que causam menos poluição do ar e pelo fim da dependência dos combustíveis fósseis (Proskurina et al., 2019). Uma fonte renovável e com grande valor agregado é a cana-de-açúcar, que além do caldo amplamente utilizado para produção de etanol de primeira geração (1G), oferece a possibilidade de desconstrução da biomassa, como bagaço e palha da cana-de-açúcar, para a geração de açúcares fermentescíveis, que podem ser convertidos e originarem o etanol de segunda geração (2G) (Borges, 2018).

A utilização de biomassa lignocelulósica em processos tecnológicos apresenta desafio primordial que é o processamento, devido à composição (35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina) e estrutura cristalina para cana-de-açúcar (Sawatdeenarunat et al., 2015). Além disso, a lignina, presente nas fibras de lignocelulose, traz a dificuldade de sacarificação da celulose e hemicelulose, por dificultar o acesso a essas moléculas (Isaac et al., 2018).

Neste sentido, para que o processo de sacarificação da celulose seja eficaz é necessário um pré-tratamento da biomassa vegetal. Estes pré-tratamentos são usados para que a lignina seja quebrada, diminuindo, assim, a recalcitrância do material biológico, aumentando a área de superfície da biomassa e facilitando o alcance das enzimas aos carboidratos celulose e hemicelulose (Pin et al., 2019).

Existem inúmeros pré-tratamentos que auxiliam e facilitam a quebra da camada protetora da biomassa, com intuito de se facilitar o acesso enzimático aos açúcares fermentescíveis presentes na celulose e hemicelulose. Como exemplo existem os pré-tratamentos físicos, como a moagem, trituração e explosão da biomassa (Taniguchi et al., 2010) e os químicos, em que se utiliza ácidos e bases para a desconstrução da lignocelulose (Kim et al., 2008; Lu et al., 2009; Proskurina et al., 2019).

Todos os pré-tratamentos citados trazem algumas desvantagens, os que envolvem processos físicos não apresentam alcance elevado aos açúcares presentes no interior da fibra, além de exigirem alta demanda de

energia elétrica para realização (Lu et al., 2009). Por outro lado, os pré-tratamentos químicos, além de alto custo com produtos químicos e utilizam de enzimas para realização da hidrólise, liberam resíduos químicos que agredem o meio ambiente e o próprio sistema de produção (Mori, 2015).

Há grande interesse no aspecto tecnológico para a utilização da biomassa. Portanto, o desenvolvimento dos pré-tratamentos ou cotratamentos biológicos como, por exemplo, a utilização de enzimas, que apresentam bom desempenho, mas possuem alto custo de obtenção (Rabelo, 2010).

A liberação de enzimas extracelulares e hidrolíticas por microrganismos naturalmente exercem papel fundamental na transformação natural da biomassa (Wongwilaiwalin et al., 2010). Pertencente ao mesmo grupo dos pré-tratamentos biológicos, os consórcios podem ser compostos por fungos e/ou bactérias, que possuem enzimas hidrolíticas que agem na hidrólise do material lignocelulósico.

Os consórcios microbianos produtores de enzimas com potencial para desconstrução da biomassa têm aplicação ampla, requerem baixo uso de energia, custos reduzidos de produção e não necessitam da utilização de produtos químicos que deixam resíduos (Paye et al., 2016; Sharma; Xu; Qin, 2019). Porém, assim como os outros pré-tratamentos ou tratamentos apresenta desvantagens por necessitarem de um tempo maior de tratamento, correr risco de contaminação e rendimento de açúcar mediano (Hartmann, 2017).

O uso de diversas enzimas nos pré-tratamentos ou cotratamentos com microrganismos tem como objetivo dissociar o complexo formado entre a lignina e a celulose, diminuir o grau de cristalinidade da celulose, aumentar área superficial da biomassa e minimizar formação de compostos que inibem a hidrólise da biomassa e a fermentação dos açúcares liberados (Rabelo, 2010).

Desta forma, estudos recentes apontam para o uso de enzimas bacterianas, isoladas ou provenientes diretamente da ação de microrganismos, como alternativa para degradar biomassa lignocelulósica e liberar açúcares que possam ser usados em processos fermentativos (Wongwilaiwalin et al., 2010; Paye et al., 2016; Patel, A. K.; Singhanian, R. R.; Sim, S. J.; Pandey, 2019).

Sendo assim, os tratamentos biológicos para liberação dos monossacarídeos que constituem a celulose e hemicelulose são processos importantes pois poderão diminuir o custo do processo, não são poluentes ou deixam resíduos indesejáveis e permitirão aproveitar com mais eficiência resíduos da agroindústria em processos produtivos, como por exemplo o etanol 2G.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é normalmente composta por 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina, esta composição pode variar de acordo com a origem vegetal (Andrade *et al.*, 2018). A lignocelulose é considerada o tipo de matéria orgânica mais abundante no mundo chegando, até 60% de biomassa existente, e é classificada como um polímero de carboidratos complexos que tem estruturas cristalinas estáveis (Rodrigues, 2019).

Recentemente, há uma tendência na utilização da biomassa lignocelulósica, como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar, usado para a produção de energia, celulose e papel, além de etanol de 2G (Pandey *et al.*, 2000). Além disso, biomassa oleaginosa é usada para a produção de óleo e biodiesel, e florestas energéticas com lenha, entre outras fontes são classificadas como biomassa lignocelulósica (Proskurina *et al.*, 2017).

A utilização da lignocelulose para a produção de etanol 2G, ou outro processo que necessite dos monossacarídeos da celulose e hemicelulose, apresenta desafio primordial que é o processamento. Os polissacarídeos da lignocelulose, devido à estrutura tridimensional e à alta concentração de lignina, são de difícil acesso tornando a hidrólise e sacarificação um problema a ser contornado (Isaac *et al.*, 2018). Para que a sacarificação seja eficaz é necessário tratamento para diminuir a recalcitrância da lignocelulose, aumentar a área de superfície da biomassa, facilitando o alcance das enzimas hidrolíticas aos polímeros de carboidrato (Pin *et al.*, 2019).

Essas biomassas lignocelulósicas são formadas por três principais frações macromoleculares: celulose, hemicelulose e lignina as quais são unidas, formando rede complexa e resistente. Através da Figura 1, pode ser observada essa estrutura da biomassa lignocelulósica, dos polissacarídeos e monossacarídeos (Isikgor e Becer, 2015).

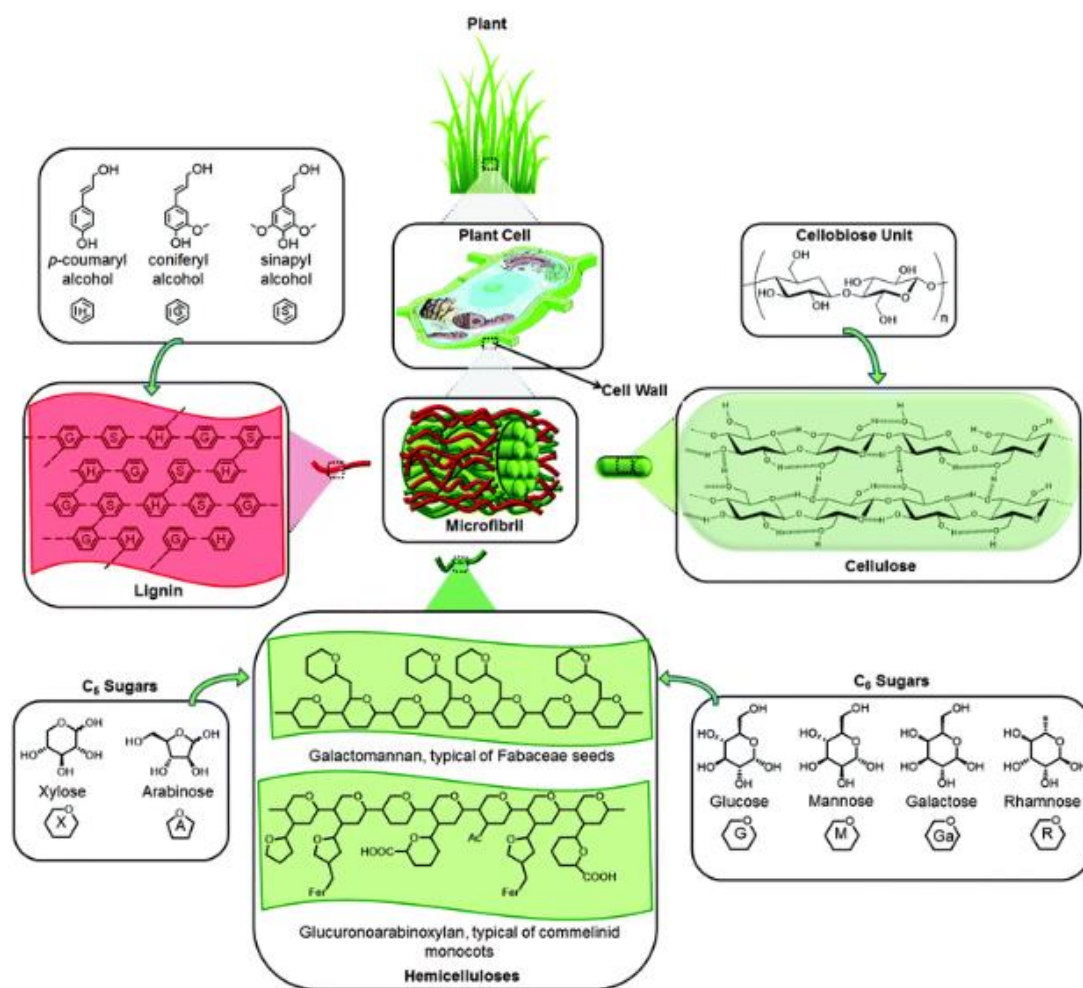


Figura 1. Esquema da estrutura do complexo lignocelulósico. Celulose, hemicelulose e lignina (Isikgor e Becer, 2015).

2.1.2 Celulose

A celulose é um polissacarídeo com forma molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$, um polímero linear formado por monômeros de glicose, unidos por ligações β -1,4; como demonstrada na Figura 1. A celulose apresenta biologicamente o papel de estruturar, proteger e conferir resistência mecânica à parede celular dos vegetais. É o polissacarídeo com maior abundância na terra e o principal composto das paredes celulares das plantas em geral. As moléculas se agregam formando fibrilas que é a matriz para formação da hemicelulose e lignina (Braga, 2018).

2.1.3 Hemicelulose

A hemicelulose é um polímero amorfo e sua classificação, se dá de acordo com o açúcar presente na estrutura (xilanas, galactanas, mananas, glucanas, galacturanas, α -L-ramnose e α -L-fucose). Está presente nas fibrilas formadas na celulose e confere elasticidade das células vegetais. Os principais açúcares que podem ser encontrados na hemicelulose são: pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos, desoxiexose, β -D-xilose, β -D-glucose, ácido β -D-glucurônico, α -L-ramnose, α -D-arabinopiranoose, β -D-manose, ácido- α -D-4-O-metilglucurônico, α -L-fucose, α -L-arabinosefuranose, α -D-galactose e ácido- α -D-galacuturônico (Isikgor e Becer, 2015; Rodrigues, 2019), , como pode ser observado na Figura 1.

2.1.4 Lignina

A lignina é macromolécula amorfa, com alta complexidade, proveniente da polimerização de três álcoois superiores: álcool sinapílico, álcool coniferílico, álcool *p*-cummarílico (fenilpropano), ilustrado na Figura 1. Esta estrutura funciona como cola celular interligando todas as camadas da biomassa, sendo responsável pela rigidez nas plantas, impermeabilidade e atua como barreira a enzimas, microrganismos e umidade. A lignina é a camada que confere proteção contra danos a plantas (Isikgor e Becer, 2015; Rodrigues, 2019).

2.2 Etanol de segunda geração

Etanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração (2G) é o etanol extraído das fibras da biomassa vegetal. A lignocelulose mais utilizada no Brasil é proveniente do bagaço da cana-de-açúcar. Essa produção se dá através do processamento e da hidrólise da celulose e da hemicelulose presente na biomassa (Lorenzi e Andrade, 2019).

Desta forma, o etanol 2G pode aumentar a produção de etanol, é considerado uma alternativa energética renovável e que não compete com a produção de açúcar ou outro produto com função nutricional, como o etanol produzido utilizando o milho (Lorenzi e Andrade, 2019).

Porém, considerando-se a complexidade estrutural das fibras de lignocelulose, a produção de etanol 2G necessita que a biomassa vegetal seja

tratada ou pré-tratada (física ou química). Esse tratamento é necessário para que as fibras de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) sejam expostas, facilitando a ação de enzimas que hidrolisam essas moléculas e liberando açúcares que possam ser fermentados pelas leveduras, gerando assim o bioetanol (Lorenzi e Andrade, 2019).

Existem inúmeros pré-tratamentos que auxiliam e facilitam a quebra da camada protetora da biomassa, com intuito de acessar os açúcares fermentescíveis presentes, como, por exemplo, os físicos, com moagem, trituração e explosão da biomassa. As desvantagens ocorrem devido ao fato de não exporem totalmente as fibras e necessita de alta demanda de energia elétrica (Taniguchi et al., 2010).

Os pré-tratamentos químicos, utilizando ácidos e bases, apresentam vantagens por conseguirem acessar a fibra da biomassa e as desvantagens são a geração de resíduos ao final do processo. Há necessidade de uma etapa para extração dos resíduos (Lu et al., 2009),

Os pré-tratamentos biológicos como, por exemplo, a utilização de enzimas, apresentam bom desempenho, mas possuem alto custo de obtenção, sendo está uma das maiores desvantagens (Sharma et al., 2019).

Todos os pré-tratamento apresentam vantagens e desvantagens, porém sempre deve ser visada a melhora da digestibilidade das biomassas, o aumento da acessibilidade das enzimas à celulose e a recuperação da hemicelulose e lignina (Fernandes, 2018). Desta forma, para que o pré-tratamento atinja o objetivo o mesmo deve, alterar a estrutura da lignina, o que visa melhoria na hidrólise enzimática, reduzir cristalinidade, aumentar a porosidade e a superfície da biomassa e a diminuição do grau de polimerização da celulose (Brienzo et al., 2015).

O pré-tratamento é uma das etapas do processo mais caras na conversão da degradação da biomassa, liberando açúcares fermentescíveis. Por isso, esta etapa apresenta potencial para eficiência e melhoria, além de baixar o custo no processo de produção de etanol 2G (Rabelo, 2010).

2.3 Consórcios microbianos

Um consórcio microbiano é a união de microrganismos que trabalham juntos para degradar ou metabolizar compostos (Desiderato et al., 2018). Se organizando em comunidade, os consórcios são capazes de realizar tarefas que os organismos separados não conseguiriam. Esses consórcios, normalmente, são compostos por fungos e/ou bactérias que são hábeis para degradação de compostos, como petróleo (Dantas; 2016), biomassa (Lynd et al., 2002) e xenobióticos (Wanapaisan et al., 2018), dentre outras fontes.

As comunidades bacterianas, de modo geral, são importantes na manutenção dos ciclos biogeoquímicos. Apresentam interações de cooperação e as de não cooperações (Ghosh *et al.*, 2016). Essas interações podem mudar gradualmente a composição das comunidades microbianas, produzindo consórcios especializados em determinadas funções (Jiménez *et al.*, 2018).

As comunidades consorciadas podem conter espécies que são capazes de realizar degradação e metabolização de compostos específicos, produzindo enzimas que auxiliam nesta degradação. As espécies de um consórcio estabelecem relações sinérgicas e essas interações aumentam o nível de degradação do material em questão, porém, essas comunidades podem exercer outras relações neutralismo, mutualismo, comensalismo, antagonismo, competição, entre outras (Cortes-Tolalpa et al., 2016).

Durante a degradação da biomassa lignocelulósica, existem várias espécies microbianas celulolíticas, que atuam junto com espécies não-celulolíticas, removem polissacarídeos da parede celular da planta, aumentando o acesso a outras espécies de microrganismos presentes no consórcio para desconstrução do material lignocelulósico (Lima, 2014).

Os consórcios que são potencialmente degradadores de biomassa lignocelulósica podem vir a ser selecionados de diversas fontes de materiais, mesmo que de áreas diferentes, ou se diferenciarem apesar de terem origem diferente, como um originário da água e outro do solo (Cortes-Tolalpa et al., 2016).

2.4 Obtenção do consórcio

O consórcio bacteriano utilizado para o desenvolvimento deste trabalho foi isolado do solo, de área de cultivo comercial de cana-de-açúcar com colheita mecanizada. A área possuía palhada em decomposição e estava localizado em propriedade da Usina São Martinho (LAT: 21°19'23.51220" S / LOG: 48°09'12.24864" O / ALT: 534,100 m) (De Almeida, 2011). A coleta das amostras foi realizada em áreas aleatórias do solo com profundidade de 0 a 20 cm, sempre em zigue-zague. Após a coleta, as amostras foram reunidas e homogeneizadas, tornando-se assim uma única amostra, a qual foi utilizada para o isolamento do consórcio (Paixão et al., 2010).

A amostra homogeneizada foi mantida por 12hs a temperatura de 30°C com agitação de 150rpm. Após o período de incubação, a suspensão ficou em repouso por 1 hora para decantação da fase sólida. Para o enriquecimento, uma alíquota de 500 µL do sobrenadante da suspensão de solo foi inoculada em 50 ml de meio de cultivo BHB estéril, contendo 0,5 % de bagaço de cana (seco, triturado e esterilizado em 120°C, 1 atm e 20 min), após foram adicionados 800 µL desse meio em tudo tipo eppendorf com glicerol estéril para estoque (De Almeida, 2011).

2.5 *Saccharomyces cerevisiae* SA-1

A levedura SA-1 é uma cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* isolada pela empresa Copersucar (Basso et al., 2008), que apresenta resistência em relação a inibidores da classe de ácidos orgânicos e a compostos fenólicos, não sendo afetada em nenhuma das fases de crescimento (lag, log, estacionaria). Podendo-se afirmar assim a sua eficiência para produção de etanol 2G em condições de cultivo adversas (Cola, 2018).

2.6 Identificação de microrganismos por sequenciamento do gene de 16S rRNA

Nas últimas décadas, os avanços tecnológicos e as técnicas moleculares direcionadas ao gene de 16S rRNA se desenvolveram e foram se aprimorando para caracterizar a composição taxonômica e a diversidade filogenética de amostras ambientais ou organismos individuais, analisando

comunidades microbianas de vários habitats (água, solo, entre outros) (Langille et al., 2013).

Esse marcador (16S rRNA), possui regiões que são variadas (V1 a V9). Portanto, a sequência codificadora pode ser utilizada para estirpes de espécies específicas dentro dessas regiões variadas (Liu e Stahl, 2007; Wang e Qian, 2009). Além de apresentar classificação taxonômica de microrganismos, facilitada pela disponibilidade de iniciadores (“*primers*”), que permitem à amplificação do gene e pelas filogenéticas que podem ser realizadas a partir da sequência nucleotídica (Janssen, 2006).

Essa técnica de classificação é de suma importância, pois tem presença em todos os organismos vivos, a função do gene de 16S rRNA normalmente não se altera e o gene apresenta tamanho suficiente para análises (Janda e Abbott, 2007), suas regiões hipervariáveis onde as posições vão de: 69-99 (V1), 137-242 (V2), 433-497(V3), 576-682(V4), 822-879(V5), 986-1043(V6), 1117-1173(V7), 1243-1294(V8) e 1435-1465(V9) (CORRÊA, 2017).

Porém essas regiões variáveis do gene apresentam diferentes sequências e nenhuma das regiões é capaz de distinguir entre todas as bactérias, mas existem métodos que auxiliam a identificação molecular, são eles: qPCR (PCR em tempo real), análise de temperatura de *melting*, sondas fluorescentes (hidrolisando *amplicons* curtos), facilitando assim a identificação de espécies bacterianas (Chakravorty et al., 2007).

A região V4 corresponde as posições 576-682 pb (pares de base) do gene de RNA 16S, é descrita por Yang e colaboradores (2016) entre uma das regiões mais confiáveis para representar sequências completas na análise filogenética da maioria dos filos bacterianos, evidenciando assim que a sub-região V4 é ideal para o desenho de iniciadores universais com resolução filogenética superior para filos bacterianos.

A identificação pelo gene de 16S rRNA em amostras com vários organismos pode ocorrer atualmente através dos dados gerados pelos sequenciadores de nova geração (“Next Generation Sequencing” ou NGS), pois a metodologia NGS estabelece um processamento paralelo de fragmentos, podendo ler até bilhões de fragmentos (LIMA, 2014). Desta forma, se os genes de uma amostra complexa de microrganismos forem submetidos a PCR com primers específicos do gene de 16S rRNA, as análises das

sequências podem indicar quais organismos estão presentes naquela amostra biológica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a dinâmica dos organismos que constituem um consórcio bacteriano, verificando a capacidade de utilizar a biomassa lignocelulósica como fonte de carbono e a capacidade dessa população em liberar glicose no meio de cultivo.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estudar a dinâmica dos organismos que constituem o consórcio e lignocelulose e se esses microrganismos estão aderidos ou não às fibras de lignocelulose nos cultivos *in vitro*.
- Avaliar a capacidade das bactérias presentes no consórcio em liberar glicose no meio de cultivo.
- Avaliar o consórcio quanto à sua capacidade de liberar açúcares que possam ser utilizados em processos fermentativos para a produção de etanol 2G.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 2 traz o fluxograma experimental do estudo sobre os componentes do consórcio degradador de lignocelulose.

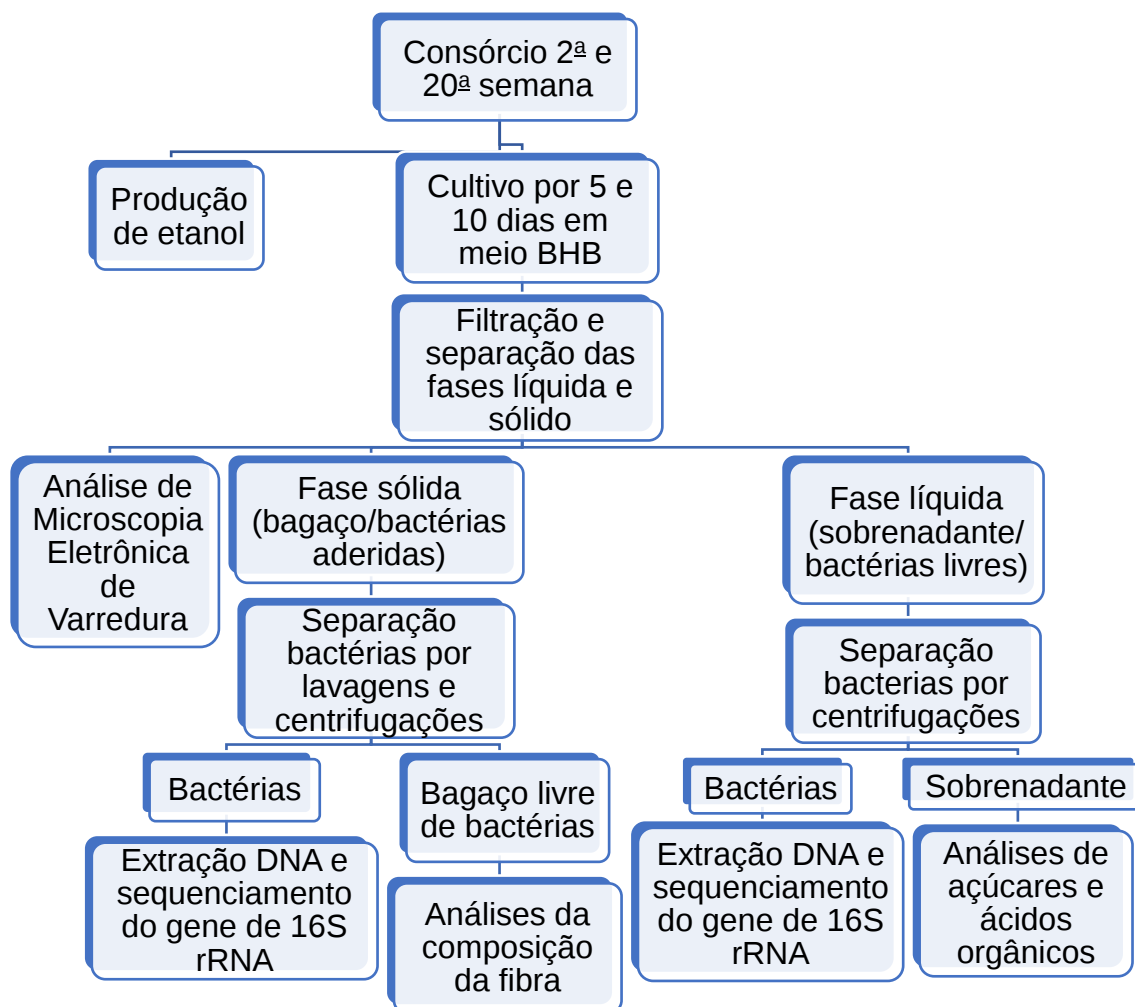


Figura 2. Fluxograma experimental do estudo sobre desenvolvimento, estabilidade e componentes de um consórcio bacteriano desconstrutor de lignocelulose.

O consórcio foi cultivado em meio BHB com modificações. O meio de cultivo BHB (Bushnell e Hass, 1941) utilizado foi constituído (g.L^{-1}) por: sulfato de magnésio, 0,2; cloreto de cálcio, 0,02; fosfato monopotássico, 1,0; fosfato de amônio, 0,02; nitrato de potássio, 1,0; e cloreto férrico, 0,05; contendo como fonte de carbono 2,0 mg/mL de bagaço de cana-de-açúcar lavado, seco, triturado e peneirado (32 mesh) a 0,5 mm.

As culturas foram mantidas a temperatura de 30 °C e agitação de 120 rpm em agitador orbital por 5 e 10 dias, para ambos os dias de cultivo foram realizados cultivos em triplicatas. O inóculo utilizado para crescimento se deu através de 1000 µL do meio de cultivo da 2ª e 20ª semana. A escolha das semanas de cultivo se deu através de estudos prévios realizados por Desiderato et al., (2018), que visualizou a estabilidade dos gêneros presentes no consórcio, a partir da segunda semana de cultivo mantendo-se até a vigésima.

As triplicatas cultivadas foram submetidas a filtração, em papel de filtro Whatman nº 1 sob condições estéreis para a separação das fases a serem estudadas (líquida e sólida), onde a fase sólida, é fração que corresponde ao bagaço, e a fase líquida, que corresponde a fração do sobrenadante do cultivo.

4.1 Microscopia eletrônica de varredura das fibras do bagaço de cana-de-açúcar

Após cultivo dos consórcios originários da segunda e vigésima semana de isolamento, em meio BHB, com bagaço de cana-de-açúcar, por 5 e 10 dias (a 30 °C, e agitação de 120 rpm) a fase sólida do meio de cultivo foi separada por filtração. Foram realizados controles em triplicatas, com e sem agitação na presença do meio BHB, nas mesmas condições do cultivo, mas sem adição do consórcio. As fibras (fase sólida) foram submetidas às etapas de fixação com glutaraldeído 3%, lavagem com tampão fosfato 0,1 M, pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄), desidratação com etanol de 10% a 99%, montagem no suporte adequado e vaporização de uma camada de 20-30 nm de ouro sob as amostras, seguindo a metodologia descrita por (Gross et al., 2014)). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Joel JSM6610LV), com ampliações de 1.000 a 10.000 x (Costa, 2017).

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade Paulista (USP).

4.2 Análise dos polissacarídeos e lignina residuais na fase sólida dos cultivos

As fases sólidas dos cultivos do consórcio obtidos após filtração e extração da população bacteriana, aderida ao bagaço, foram utilizadas para a quantificação de celulose, hemicelulose e lignina residuais dos meios de cultivo. As frações fibrosas residuais foram analisadas em cultivos dos consórcios da 2ª e 20ª semana, nos tempos 0, 5 e 10 dias. Essas análises foram realizadas em analisador de fibras (Filter Bag Technique da Ankom®) no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da FCAV/Unesp de Jaboticabal.

As análises de Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram avaliadas utilizando os procedimentos de Goering e Van Soest (1970).

Para realização das análises de Fibra em Detergente Neutro – FDN foram adicionados 100 ml da solução de detergente neutro (30,0 g Sulfato de sódio + 10,0 mg Etileno glicol + 18,0 g EDTA + 6,81 g Borato de sódio + 4,56 g Fosfato de sódio em 1 litro de água destilada). Para Fibra em Detergente Ácido - FDA foram adicionados dos 100 ml da solução de detergente ácido composto por 28,5 ml de ácido sulfúrico e 20 g de CetilTrimetil Amônio Brometo (CTAB), para ambos os tratamentos as amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram previamente pesadas e separadas. Em seguida, as mesmas foram aquecidas à ebulição por 1 hora, em um digestor de fibras (MA- 455 Marconi®). Posteriormente, as amostras foram filtradas a vácuo e lavadas por 3 vezes com água destilada quente e 2 vezes com acetona pura em temperatura ambiente. As amostras foram levadas para estufa a 105 °C por 12 horas e logo após foram resfriadas em dessecador e pesadas. Por fim, as amostras foram incineradas por 3 horas a 550 °C para remoção dos minerais presentes na amostra e posteriormente foram pesadas (Pereira e Rossi, 1995).

4.3 Análise de açúcares e ácidos orgânicos na fase líquida dos cultivos

Os sobrenadantes dos cultivos filtrados, foram centrifugados (centrífuga Sorvall a 16266 x g por 30 minutos a 4 °C), e armazenado em -20°C. Os sedimentos foram utilizados para extração de DNA bacteriano total e, posteriormente, sequenciados. Cada amostra de sobrenadante foi concentrada no Concentrador plus Eppendorf AG 22331 Hamburg a partir de um volume inicial de 15 mL até volume final de 1 mL. A amostra obtida foi filtrada em filtro de éster de celulose de 0,45 µm e submetida a análise cromatográfica.

A quantificação dos açúcares frutose, glicose e sacarose foram estabelecidas pela obtenção de curvas padrão nas concentrações: 0,12; 0,25; 0,37 e 0,5 µmol/mL. As análises das amostras foram realizadas em sistema de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu) equipado com detector de índice de refração RID (Shimadzu, modelo RID - 10A). A separação dos açúcares foi realizada por uma coluna Supelcosil LC-NH2 (25 cm x 4.6 mm) que tem velocidade de fluxo constante de 1 mL/min utilizando o tampão de acetonitrilo: H₂O (75: 25, v:v) com temperatura de 35 °C. A quantidade de amostras padrões injetadas foi de 20 µL. Todas as análises foram feitas em triplicata e ao final foi realizado o cálculo da média e, assim, gerado o desvio padrão (Lima, 2014).

A liberação de ácidos orgânicos no sobrenadante nos cultivos do consórcio foram avaliadas por HPLC (Shimadzu). Os ácidos orgânicos foram separados com o uso de uma coluna C18 (5 µm 150 x 4.6mm) Restek e monitorado por detector de absorbância de ultravioleta UV, devidamente regulado para medir sinais visíveis a 210 nm, com temperatura de 25 °C que tem velocidade de fluxo constante de 1 mL/min utilizando o tampão de ácido fosfórico 0,1%. Os ácidos orgânicos foram quantificados e identificados por comparação dos tempos de retenção e pelas áreas de picos que possuem soluções de ácidos puros. Foram utilizados como padrões os ácidos: málico, tartárico, láctico, maleico e cítrico (Sigma Aldrich-USA) (Sacco, 2017).

As análises de quantificação de açúcares e ácidos orgânicos descritas acima foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da FCAV/Unesp de Jaboticabal.

4.4 Análises estatísticas

Utilizando os dados acima citados foram realizados cálculos das médias referentes às triplicatas para os tempos de 0, 5 e 10 dias tanto para análise de liberação de açúcares pelo consórcio como para análise da constituição da fibra, além de realizado o teste de Tukey com parâmetro de 5% através do programa R versão 3.6.1 com a utilização do pacote Agricolae para análise.

4.5 Análise da população bacteriana por sequenciamento do gene de 16S rRNA

4.5.2 Obtenção das bactérias

A fase sólida, que é fração que corresponde ao bagaço, e a fase líquida, que corresponde ao sobrenadante, do cultivo de cada amostra cultivada foram separadas por filtração. As bactérias da fase líquida foram recuperadas por centrifugação como descrito no item 4.3 e as bactérias aderidas ao bagaço de cana-de-açúcar foram obtidas conforme metodologia sugerida por Pavani, (2017).

4.5.3 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras bacterianas obtidas das fases líquidas e sólidas foi realizada utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram qualificadas através da eletroforese, feita em uma cuba modelo Max Cell EC 360 M com tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) em gel de agarose 0,8% e corada com brometo de etídio (0,5 mg/ml), durante 60 minutos, com voltagem constante de 90 V. A visualização se deu por meio de um sistema de luz UV que é documentado através do GEL DOC Universal Hood II (BIO-RAD), um visualizador de géis.

As amostras também foram avaliadas em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Termo Scientific), usado para estimar a pureza do DNA

extraído na razão 230/260 nm (<2) e para indicação de impurezas proteicas na razão 260/280 nm (<1,7) (CORCOLL *et al.*, 2017).

4.5.4 Construção da biblioteca do gene de 16S rRNA e sequenciamento

O gene 16S rRNA foi amplificado utilizando *primers* que compreendem a região V4 do gene, contendo em torno de 300 pb. Os *primers* utilizados para amplificar a região V4 do gene 16S rRNA foram os descritos por Caporaso e colaboradores (2012):

Primer 515F

(AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTATGGTAATTGTGTGCCAGCGCCGCGGTAA)

Primer 806R

(CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGTCAGTCAGCCGGACTACGGGTTCTAAT).

A primeira PCR que corresponde a região V4 do gene de 16S rRNA, contendo em torno de 300 pb, seguiu com uma desnaturação inicial de 95 °C por 3 min, seguindo por 25 ciclos com desnaturação por 30 seg a 95 °C, pareamento 55 °C por 30 seg, extensão a 72 °C por 30 seg e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Posteriormente, os produtos da reação foram purificados com AMPure XP Beads (ANGENCOUR AMPure XP).

A segunda PCR realizada para ligar os adaptadores, seguiu com 3 min à 95° C para desnaturação do DNA, seguindo de 8 ciclos de 30 seg a 95° C, 30 seg a 55° C, extensão a 30 seg a 72° C, e uma extensão final a 5 min a 72° C, sendo depois mantidas a 4° C.

Após a amplificação, o produto de PCR passara por duas purificações, primeiro com AMPure XP Beads (ANGENCOUR AMPure XP) e em seguida utilizando o Kit DNA Clean Concentration (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras purificadas foram quantificadas via PCR em Tempo Real (qPCR), com o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems). Após a validação, seguiram para o sequenciamento, que foi realizado na plataforma Illumina MiSeq, com o Kit MiSeqReagent v2 (300 cycle) PE 2x150 pb, de acordo com as recomendações do fabricante.

As análises dos dados foram realizadas no Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da FCAV/UNESP de Jaboticabal.

4.5.5 Análises das Sequências Obtidas

Os fragmentos amplicons de todas as amostras foram submetidos a plataforma Quantitative Insights Into Microbial Ecology - Qiime2 versão 2017.6.0 (CAPROSO et al., 2011), o qual retirou possíveis quimeras e realizou a filiação taxonômica usando o banco de dados SILVA versão 128 (Bowman et al., 2007).

A identificação dos gêneros mais e menos abundantes presentes no consórcio foi gerada na plataforma Microbiome Analyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/MicrobiomeAnalyst/faces/home.xhtml>), a nível taxonômico de gêneros. Os gráficos de beta (β) diversidade, os quais também foram realizados na plataforma Microbiome Analyst, foram obtidos utilizando-se o índice Chao1 (estimador baseado em abundância), que incorpora contagens de leitura de baixa abundância nos cálculos. O método de ordenação foi de análise de coordenadas principais (PCoA), com visualizações em nível taxonômico utilizado para gerar os gráficos OTU e método estatístico: análise de variância multivariada MANOVA Permutacional (PERNOVA).

4.6 Eficiência do consórcio para produção de etanol a partir de biomassa

A avaliação da eficiência do consórcio na liberação de açúcares do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar para uso no processo fermentativo foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Thiago Olitta Basso do Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, USP. Nesta etapa, 1 foram feitos 2 ensaios de fermentação: o primeiro, emulando o processo de fermentação e sacarificação separadas (SHF), que consistiu na decomposição do bagaço pelo consórcio até o tempo cuja concentração de glicose atingisse o seu valor máximo, quando então foi realizado o inóculo de levedura; e na outra

estratégia, emulando sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), o inóculo de levedura foi adicionado junto com o consórcio.

Os ensaios de fermentação foram realizados com a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* industrial SA-1. Para os testes, uma colônia isolada da levedura em meio sólido foi cultivada em meio líquido contendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de glicose. A concentração celular na fase exponencial do crescimento foi determinada em termos de massa úmida, através da centrifugação de alíquotas de 1 mL da suspensão celular em microtubos por 5 min a 10000 rpm e 4°C (centrifuga Hitachi CT 15RE). Este valor de concentração celular foi utilizado para calcular o volume da suspensão necessário para resultar em cultivos com 4 g/L da levedura (massa úmida) nos frascos com consórcio e bagaço. O volume calculado da suspensão foi então centrifugado, o sedimento lavado com água destilada e adicionado aos frascos contendo o consórcio e bagaço.

As concentrações de açúcares e etanol foram determinadas em um sistema de HPLC (Shimadzu Prominence) equipado com detector de índice de refração RID (Shimadzu, detector de índice de refração RID-20A), Bombas LC-20AB, Injetor SIL-20AC, Forno CTO-20^a e coluna de troca iônica HPX-87h da Biorad com vazão constante de 0,6 mL/min utilizando uma solução de ácido sulfúrico (5mm) com temperatura de 60°C. O volume de injeções foi de 10 µL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microscopia eletrônica de varredura da biomassa

As microscopias eletrônicas de varreduras (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7) mostraram que a estrutura do bagaço de cana-de-açúcar foi alterada pelo cultivo com o consórcio, causando assim a desestruturação parcial da fibra pela ação bacteriana. Nesta análise, é possível notar que o processo de autoclavagem não interferiu na estrutura da fibra do bagaço de cana-de-açúcar, que se mostrou como estrutura plana e compacta, sem presença de descamação da fibra (Figura 3A e B). Por outro lado, quando o material ficou 10 dias em agitação mecânica no meio de cultivo, sem a presença de microrganismos começou a apresentar quebras. Porém com estrutura compactada e com poucas descamações, em relação aos demais tratamentos (Figura 3C e D).

A análise da estrutura do bagaço, submetido ao cultivo por 5 dias (Figura 4 e 6) ou 10 dias (Figura 5 e 7) na presença dos consórcios mostrou a desconstrução da estrutura planar e compacta do bagaço, presença de fissuras e descamações, assim como a aderência de vários tipos bacterianos na superfície da fibra. Esses resultados podiam ser observados em todas as amostras estudadas e sugerem que os microrganismos do consórcio estavam alterando a morfologia da fibra de lignocelulose, para utilizar esse material biológico como fonte de carbono.

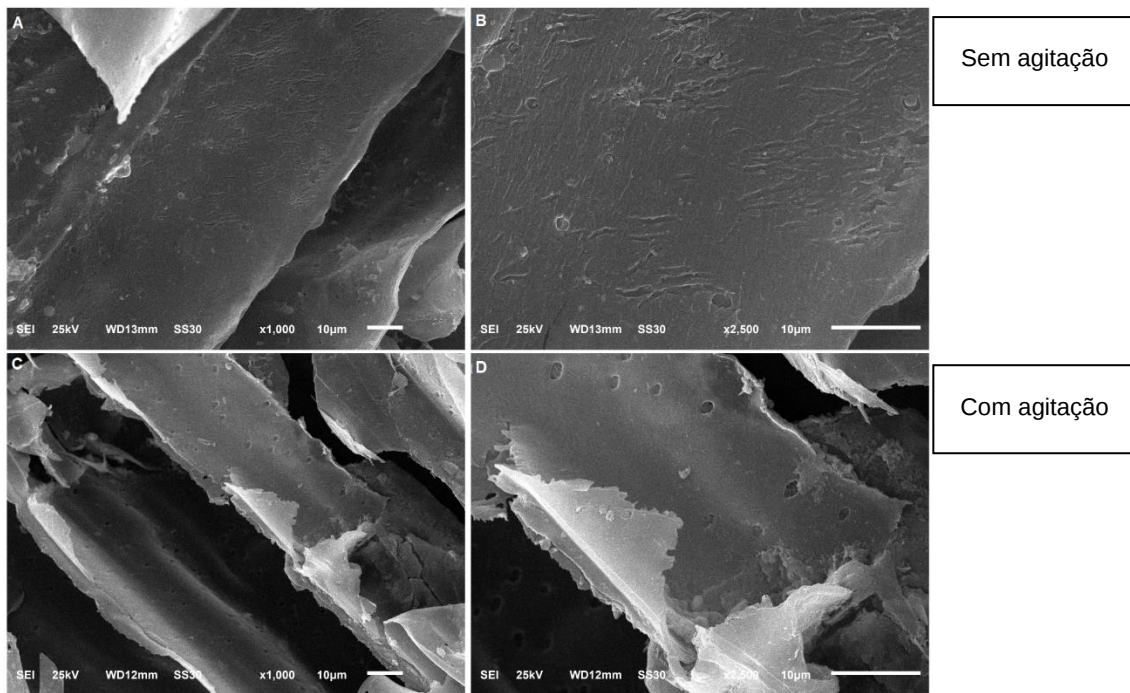


Figura 3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do bagaço de cana-de-açúcar com e sem a presença do consórcio bacteriano, bagaço sem agitação e sem presença de bactérias em aumento de 1.000 X (A) e 2.500 X (B), bagaço com agitação e sem presença de bactérias em aumento de 1.000 X (C) e 2.500 X (D).

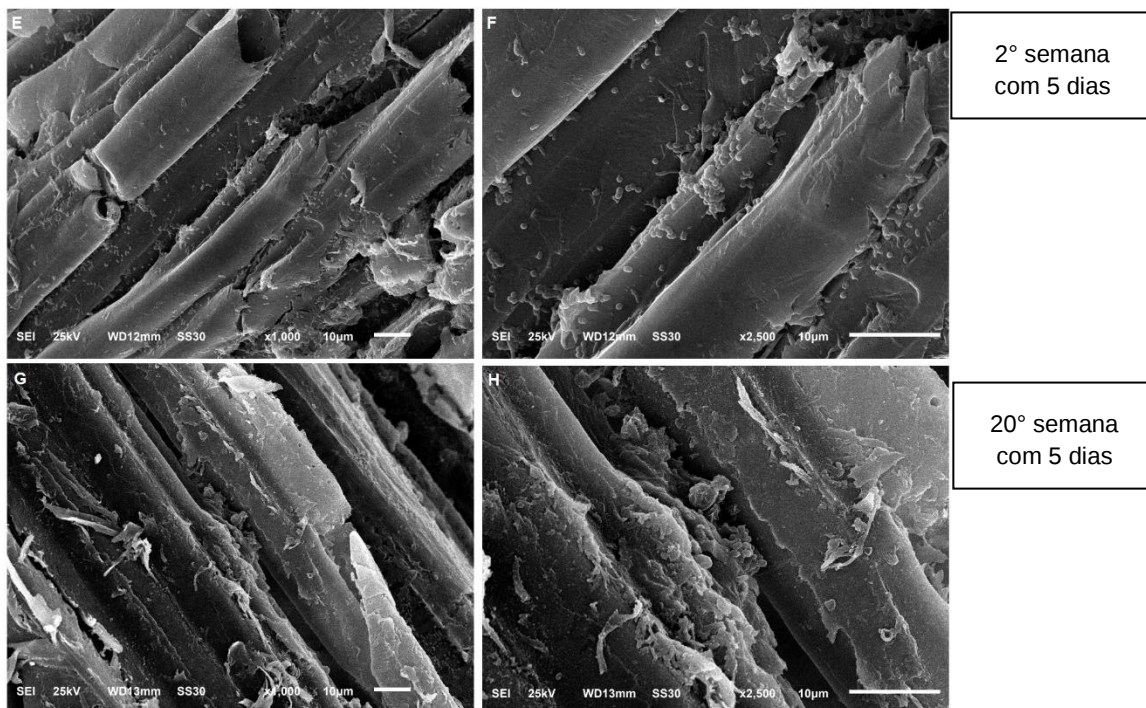


Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do bagaço com agitação na presença de bactérias com 5 dias de cultivo da 2ª semana em aumento de 1.000 X (E) e 2.500 X (F) bagaço com agitação na presença de bactérias com 5 dias de cultivo da 20ª semana em aumento de 1.000 X (G) e 2.500 X (H).

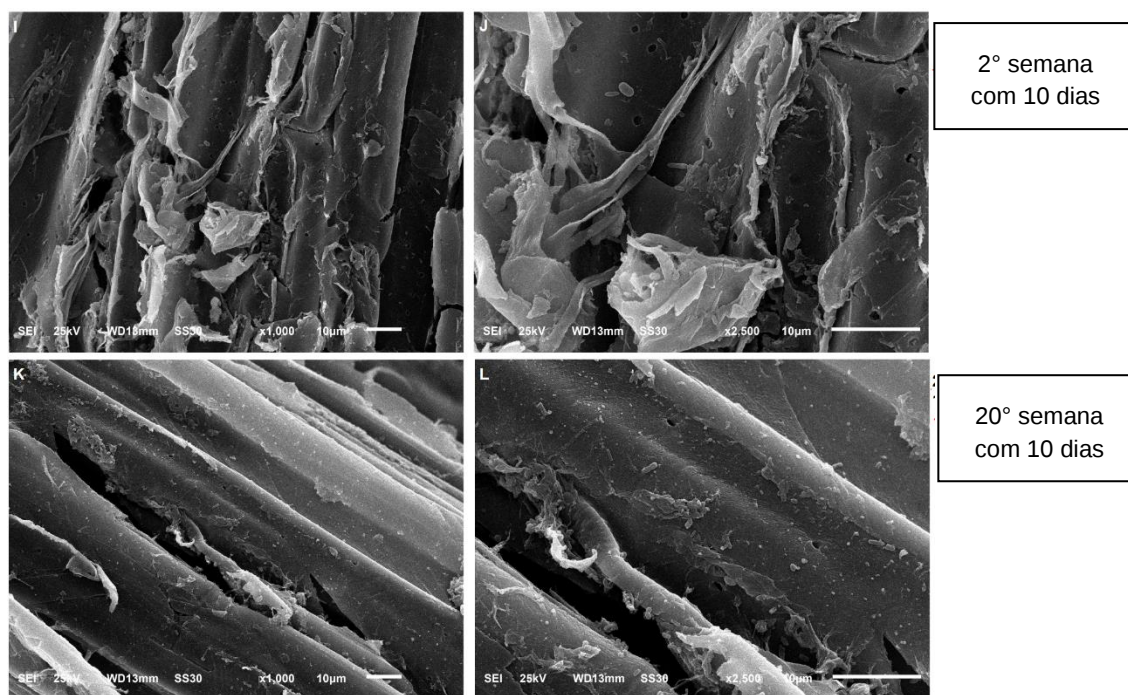


Figura 5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do bagaço com agitação na presença de bactérias com 10 dias de cultivo da 2ª semana em aumento de 1000 X (I) e 2500 X (J) e bagaço com agitação na presença de bactérias com 10 dias de cultivo da 20ª semana em aumento de 1000 X (H) e 2.500 X (L).

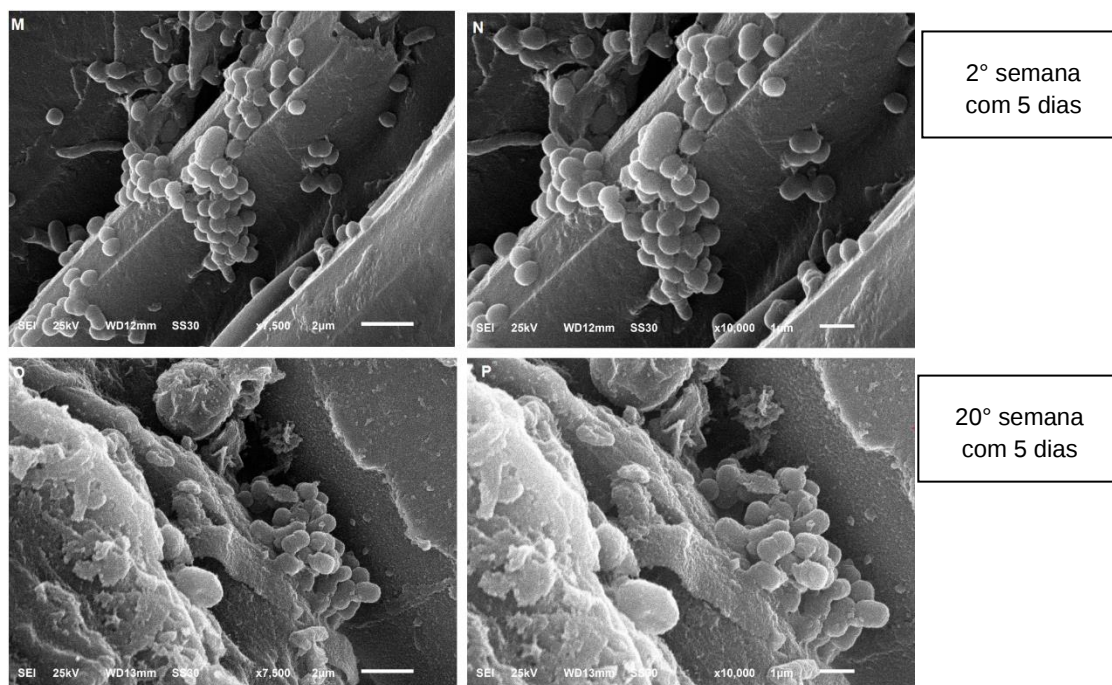


Figura 6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do bagaço com agitação na presença de bactérias com 5 dias de cultivo da 2ª semana em aumento de 7500 X (M) e 10000 X (N) e bagaço com agitação na presença de bactérias com 5 dias de cultivo da 20ª semana em aumento de 7500 X (O) e 10000 X (P).

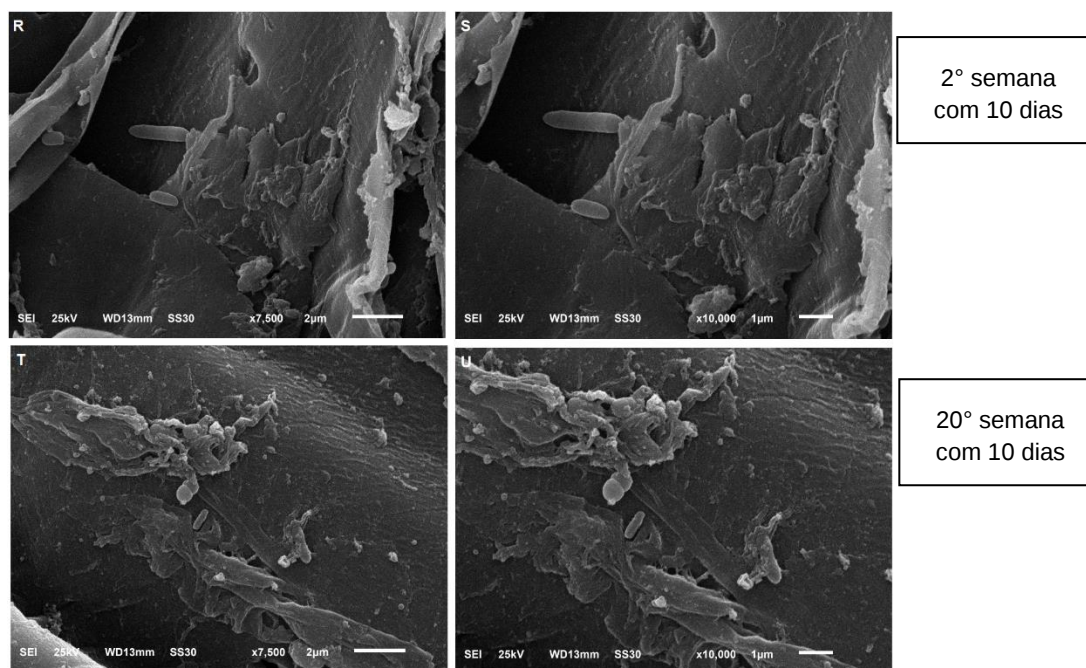


Figura 7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do bagaço com agitação na presença de bactérias com 10 dias de cultivo da 2ª semana em aumento de 7500 X (R) e 10000 X (S) e bagaço com agitação na presença de bactérias com 10 dias de cultivo da 20ª semana em aumento de 7500 X (T) e 10000 X (U).

A degradação bacteriana causa modificações estruturais à fibra, aumentando assim a acessibilidade das enzimas à celulose, hemicelulose e lignina (Dar et al., 2018). Além disso, os do presente estudo mostraram que existia diferenças morfológicas entre as bactérias aderidas e agrupamento das mesmas nos tempos 5 e 10 dias de cultivo de cultivo, o que sugere dinâmica populacional no consórcio e interação entre os organismos (Figuras 6 e 7).

Essa dinâmica entre a população do consórcio bacteriano poderia estar relacionada à liberação de moléculas e alteração geral dos processos metabólicos pelos microrganismos (Jiménez et al., 2017). As flutuações bacterianas em consórcio estão bem descritas, de maneira que o consórcio poderá apresentar sinergismo, competição e comensalismo entre as espécies presentes (Jiménez et al., 2017), o que pode auxiliar no metabolismo das bactérias diversas, na degradação e aderência na fibra, presente no cultivo, como observado nas micrografias.

Os resultados são consistentes com algumas observações de Pessi, (2009) que notou diferença aparente no grau de degradação do bagaço de

cana-de-açúcar, quando esse tratado com consórcio microbiano, por microscopia eletrônica de varredura. O autor observou a formação de biofilme sobre o material lignocelulósico e presença de organismo na fibra no tratamento com inóculo. No presente estudo não foi possível afirmar a formação de biofilmes, apesar de se encontrar bactérias aderidas umas às outras. Os resultados podem ser explicados se for considerada a plasticidade dos gêneros presentes no consórcio. Entretanto, é possível notar a presença das bactérias aderidas às fibras e descamação, o que sugere que estavam ocorrendo a degradação da biomassa lignocelulósica pelos microrganismos.

Pode-se concluir ainda, que a não formação de biofilme pelo consórcio mostrou que as bactérias podem estar tanto aderidas ao bagaço como livres no sobrenadante, podendo então consumir nutrientes e açúcares aderidos às fibras ou livres no meio de cultivo.

5.2 Análise dos polissacarídeos e lignina residuais na fase sólida dos cultivos

As análises de FDN (celulose), FDA (hemicelulose) e Lignina foram realizadas para verificar a existência de degradação da matéria lignocelulósica no meio de cultivo. A figura 8 mostra a porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina presente no bagaço residual do cultivo durante as semanas.

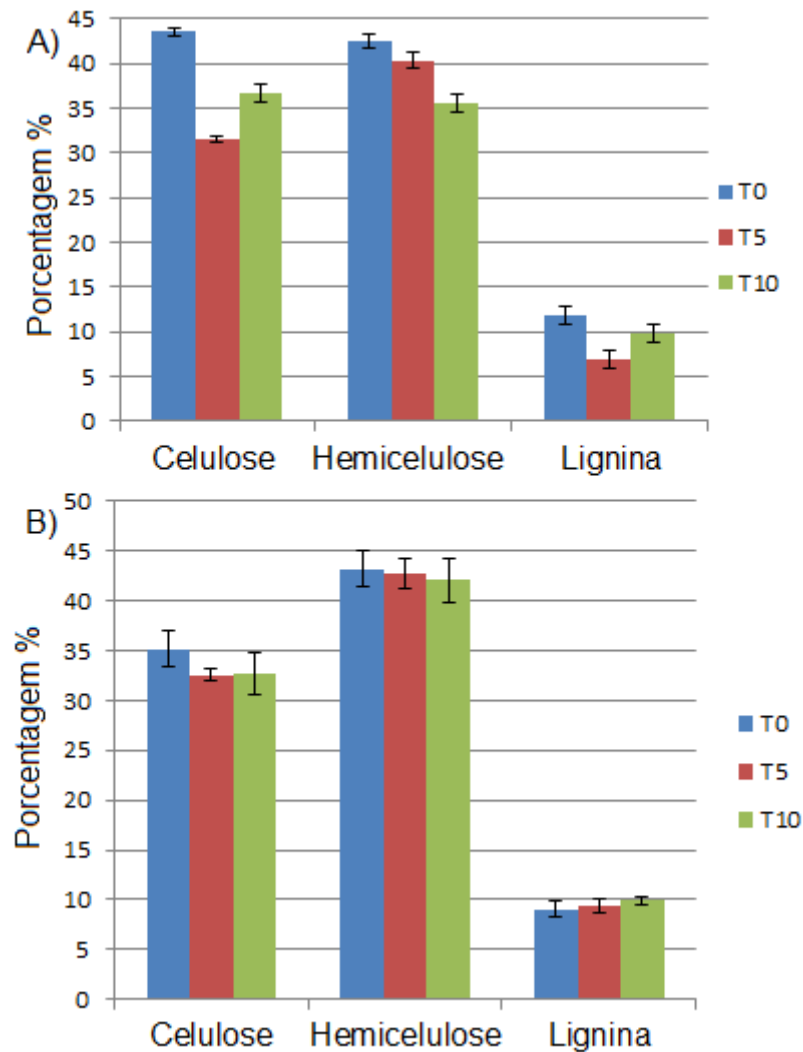


Figura 8. Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina referente às análises do resíduo sólido do cultivo dos consórcios da 2ª (A) e 20ª (B) semana nos tempos 0, 5 e 10 dias. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

No cultivo do consórcio da segunda semana com do bagaço, o consórcio promoveu alterações significativas nos níveis de celulose com 5 e 10 dias (Figura 8 A) em relação ao tempo 0. O teor de hemicelulose diminuiu para o tempo de 10 dias, além de observada diminuição significativa da lignina nas culturas aos 5 primeiros dias.

Por outro lado, o cultivo do bagaço do consórcio na vigésima semana não apresentou diferenças significativas entre os teores de celulose, hemicelulose e lignina em relação ao tempo 0 (Figura 8 B). Esses resultados

demonstram que o desempenho do consórcio em degradar a biomassa lignocelulósica, promovendo alterações significativas nos níveis de celulose e hemicelulose constituintes da biomassa principalmente, ocorre na semana 2. Além disso, os resultados realizados com a fibra sugerem que o consórcio é eficiente em degradar as camadas da biomassa, expondo estas fibras e facilitando a aderência das bactérias para que consigam hidrolisar as frações lignocelulósicas.

No trabalho realizado por Cortes-Tolalpa e colaboradores (2016) que avaliaram consórcio microbiano para degradar palha de trigo com tempo de incubação máximo de 61 dias, como a obtenção de diferenças significativas para celulose, hemicelulose e lignina presentes no substrato final. Os autores notaram que a porção que o consórcio mais consome equivale à hemicelulose com mais de 50%, sendo que para celulose e lignina foram mais baixas as taxas de degradação, ao longo do período estudado.

Esta percepção observada por Cortes-Tolalpa e colaboradores (2016), ocorre pelo fato das estruturas da celulose, hemicelulose e lignina se apresentarem em formas e graus de complexidade distintos, em que a fração da celulose é formada por cadeia linear, conferindo-lhe cristalinidade, com ligações de hidrogênio entre cadeias, fazendo com que esta fração seja resistente dificultando a desconstrução (Santos, 2018). Por sua vez, a hemicelulose é a camada que liga a celulose à lignina e esta camada possui na estrutura ligações e ramificações, conferindo-lhe forma amorfa e não cristalina, sendo assim facilmente hidrolisada (Santos, 2018).

É possível observar degradação em todas as camadas da biomassa para os tratamentos da semana 2, mostrando níveis de degradação diferentemente expressos, mostrando assim que o consórcio é eficiente em degradar a biomassa, podendo ser utilizado para diminuir os custos com compostos químicos que são utilizados para conseguirem o acesso a celulose e hemicelulose presentes na biomassa como tratamento ou ainda, podendo ser utilizado como opção de pré-tratamento realizando o acesso das enzimas às camadas internas da biomassa e facilitando assim a hidrólise destas frações.

5.3 Análise de açúcares e ácidos orgânicos na fase líquida dos cultivos

Na Figura 9 se destaca as concentrações de glicose disponível no meio BHB com 5 e 10 dias de cultivo dos consórcios da 2ª e 20ª semana. Os resultados demonstraram a liberação de glicose no meio decorrente da hidrólise das fibras, o que corresponde a concentrações de aproximadamente 5,6 mg/mL, 1,9 mg/mL, 1,24 mg/mL e 0,87 mg/mL, respectivamente para 2ª semana e 20ª semana para os dias 5 e 10 de cultivo.

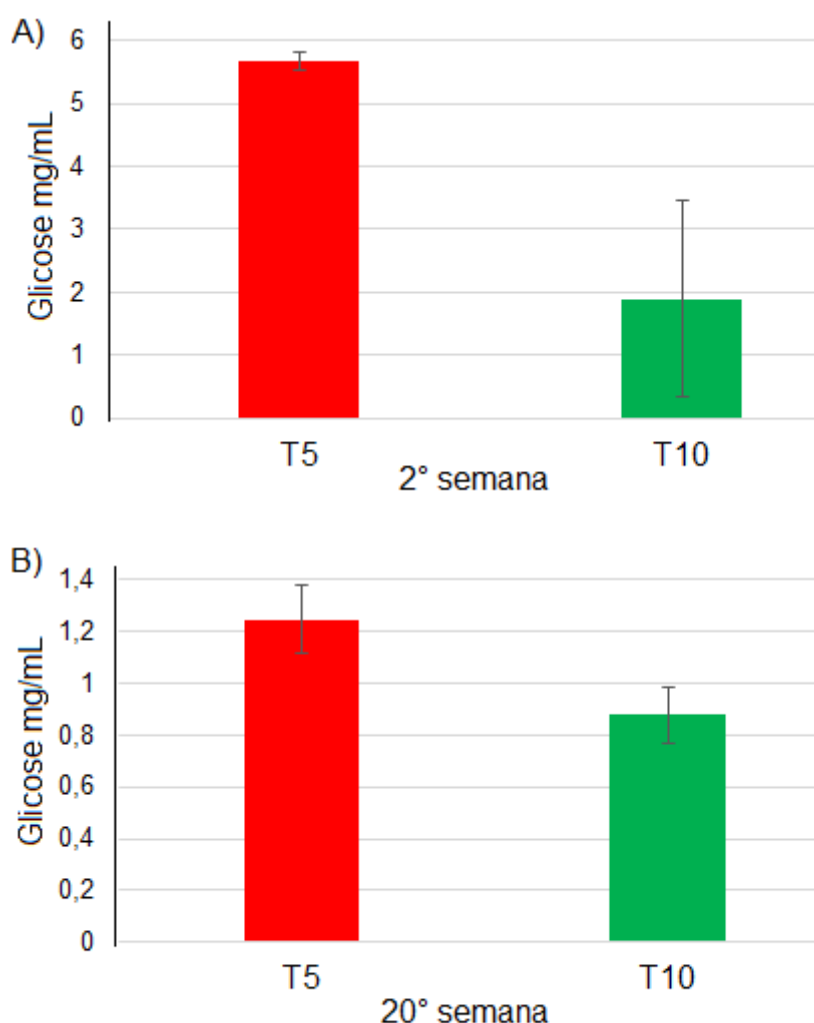


Figura 9. Concentração de glicose (medida por HPLC) presente no sobrenadante da cultura dos consórcios da 2ª semana (A) e 20ª semana (B), cultivados por 5 (T5) ou 10 (T10) dias. O eixo Y traz a concentração em mg/mL de glicose livre no meio.

A diminuição da concentração de glicose após 10 dias de cultivo do consórcio da semana 2 ou a baixa concentração nos tratamentos da semana 20 indicam baixa atividade dos organismos presentes, como observado na baixa diminuição de celulose nesses tratamentos e, consumo pelos próprios organismos do consórcio da glicose liberada. Por outro lado, pode-se observar que a quantidade de glicose liberada no meio está aumentada no consórcio da semana 2 com 5 dias de cultivo (5,6 mg/L). Em comparação com outros trabalhos que utilizam biomassa lignocelulósica para liberação de açúcar, mas com tratamentos, físicos e/ou químicos, é possível observar que a liberação de açúcar livre no meio do presente estudo foi baixa, evidentemente decorrente do uso desse açúcar pelos próprios microrganismos constituintes do consórcio.

Freitas e colaboradores (2017) utilizaram tratamento físico de descarga elétrica de alta frequência e alta voltagem na biomassa, comprovando que este tratamento provoca modificações nas fibras do bagaço, liberando, assim, glicose na conversão. Os autores avaliaram os tempos de exposição do material lignocelulósico às descargas elétricas, como melhor resultado obtido, o tempo de 2 minutos de exposição, que obteve maior eficiência, liberando aproximadamente 0,23 g/L de glicose, conforme visualizado em análise por HPLC.

Silva (2014), que utilizou tratamento físico-químico, com ácido sulfúrico diluído de 2% (v/v) e aquecimento de 15 minutos em autoclave a 121 °C, verificou a liberação de 78,7 g/L de AT (açúcares totais) e 50,19 g/L de AR (açúcares redutores) no meio para essas condições de tratamento, comprovando que mesmo com concentração relativamente baixa de ácido é possível notar a presença de açúcares no meio.

Ambos os trabalhos obtiveram resultado positivos, porém com utilização de tratamentos que demandam de muita energia para aquecimento e geram resíduos químicos na utilização de ácido, que agridem o meio ambiente. Utilizando-se tratamento biológico, houve presença de açúcar, sem demandar de muita energia ou utilização de compostos químicos e não apresenta custos altos durante a produção.

Quando foi analisado o rendimento do processo de hidrólise através do cálculo do balanço de massa (tabela 1) como proposto por Zhu e colaboradores (2011), observou que o tratamento que apresentou melhor rendimento foi o promovido pelo consórcio da semana 2 com 5 dias de cultivo.

Na tabela 1 estão todos os dados usados para o cálculo do rendimento em açúcar (glicose), considerando a concentração obtida por análise de HPLC do sobrenadante do meio de cultivo e o valor em % de celulose observada pela análise quantitativa de Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Ácido (FDA) e Lignina (LIG). A porcentagem de celulose foi calculada pela diferença entre o valor da Fibra em Detergente Ácido (FDA) e o de lignina (FDA-LIG), remanescentes no meio de cultivo após diferentes tempos. Os cálculos foram realizados tendo por base a equação abaixo, descrita por Zhu e colaboradores (2011), onde:

Y_g = rendimento teórico máximo

C_g = Concentração de glicose medida

C_{g0} = Concentração de glicose inicial

X_{G0} = Fração mássica de celulose no bagaço

C_{IS0} = Concentração de bagaço seco (9g/ml)

φ_G = razão de peso molecular de glicose para monômero de glucana

1.11

$$Y_g = \frac{C_g - C_{g0}}{\varphi_G C_{IS0} X_{G0}}$$

Tabela 1. Dados utilizados para o cálculo do balanço de massa ou porcentagem de eficiência de hidrólise (Yg) dos ensaios de utilização do bagaço de cana de açúcar pelos consórcios bacterianos da segunda e vigésima semanas, cultivados por 5 e 10 dias.

	Celulose	XG0	CIS0	Cg	Cg	Cg	Cg (meio)	Yg
	%		mg/mL	umol/mL	ug/mL	mg/mL	mg/mL	%
2° T0 -1	43,10	0,43	9,00	344,61	62030,79	62,03	4,13	
2° T0 -2	43,77	0,43	9,00	362,92	65326,23	65,32	4,35	
2° T0 -3	43,95	0,44	9,00	317,72	57190,41	57,19	3,81	
Média	43,61	0,43	9,00	341,75	61515,810	61,51	4,10	0
2° T5 -1	31,34	0,31	9,00	458,09	82456,38	82,45	5,49	
2° T5 -2	31,65	0,31	9,00	482,88	86918,13	86,91	5,79	
2° T5 -3	31,73	0,31	9,00	475,78	85641,03	85,64	5,71	
Média	31,57	0,31	9,00	472,25	85005,18	85,00	5,66	35,9
2° T10 -1	37,95	0,38	9,00	305,77	55039,14	55,03	3,67	
2° T10 -2	36,54	0,36	9,00	67,08	12074,85	12,07	0,80	
2° T10 -3	35,46	0,35	9,00	102,11	18379,8	18,37	1,22	
Média	36,65	0,36	9,00	158,32	28497,93	28,49	1,90	-50,5
20°T0 -1	37,16	0,37	9,00	123,38	22209,66	22,21	1,48	
20°T0 -2	33,93	0,34	9,00	83,61	15051,2	15,0	1,00	
20°T0 -3	34,40	0,34	9,00	113,44	20420,82	20,42	1,36	
Média	35,16	0,35	9,00	106,81	19227,22	19,22	1,28	0
20°T5 -1	32,99	0,33	9,00	105,07	18914,13	18,91	1,26	
20°T5 -2	31,88	0,32	9,00	114,02	20524,23	20,52	1,36	
20°T5 -3	32,71	0,33	9,00	92,55	16659,88	16,65	1,11	
Média	32,52	0,32	9,00	103,88	18699,41	18,69	1,24	-1,0
20°T10 -1	33,75	0,33	9,00	67,09	12076,66	12,07	0,80	
20°T10 -2	30,37	0,30	9,00	83,15	14967,54	14,96	0,99	
20°T10 -3	34,00	0,34	9,00	68,68	12362,17	12,36	0,82	
Média	32,70	0,32	9,00	72,97	13135,45	13,13	0,87	-11,6

Como observado na tabela 1, os dados mostram rendimento de 35% para os parâmetros observados no consórcio da semana 2 cultivado por 5 dias e valores negativos para as outras amostras, o que sugere a liberação de glicose no tempo inicial e o consumo nos tempos posteriores. Esses resultados, se forem analisados em conjunto com a diminuição dos teores de

celulose, que ocorrem no tempo 5 do consórcio da semana 2 (aproximadamente 27%) em relação aos teores do tempo 0, podem sugerir que nesse período (5 dias) e nesse conjunto de bactérias (consórcio da semana 2) temos degradação da celulose e liberação de glicose.

Pelo consórcio apresentar liberação de glicose e posterior consumo, é possível sugerir que esse conjunto de microrganismos possa ser usado não só, para degradação da celulose, mas também como pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, pois é possível notar potencial de degradação dessa matéria biológica (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Outros trabalhos demonstraram que a presença de gêneros bacterianos que liberam enzimas extra e intracelulares auxiliam e otimizam o processamento do etanol 2G (Okeke; Lu, 2011 e Cortes-Totalpa; Salles; Van Elsas, 2017). Segundo Paye e colaboradores (2016), cotratamentos realizados por microrganismos na fibra da biomassa podem ajudar na desconstrução da lignocelulose, atuando de forma eficiente aumentando o rendimento final da desconstrução.

O comportamento dos consórcio bacteriano estudado, além do auxílio para degradação da biomassa e liberação de glicose, pode ser importante para a recuperação de genes responsáveis pela codificação de enzimas para serem utilizadas no processo de hidrólise enzimática da lignocelulose, diminuindo alguns dos custos de produção de etanol 2G. Além disso, esse conjunto de microrganismos foram avaliados quanto à sua capacidade de produção de ácidos orgânicos, principalmente para aplicação biotecnológica.

Foram analisadas as liberações de ácidos orgânicos pelo consórcio através análises de cromatografia líquida (HPLC) no sobrenadante dos cultivos do consórcio com bagaço de cana-de-açúcar por 5 e 10 dias. Para ambas as semanas foram verificadas concentrações extremamente baixas e não significativas (Tabela 2).

As concentrações de ácidos orgânicos se apresentaram quase nulas ou extremamente baixas para praticamente todas as amostras, mostrando assim que os microrganismos dos consórcios praticamente não apresentaram a

capacidade de produzir e liberar os ácidos orgânicos nas condições de cultivo utilizadas.

Algumas bactérias podem estar relacionadas com a produção de ácidos orgânicos, mas que mesmo essa produção extremamente baixa ou nula, em alguns casos, não interfere no meio e no desenvolvimento de outras bactérias ali presentes.

Caso as concentrações encontradas de ácidos orgânicos tivessem se apresentado relativamente altas, poderíamos sugerir que existiria relação entre os ácidos disponíveis com o crescimento celular e das bactérias em relação a eles (Sacco, 2017), o que não ocorre.

Tabela 2. Concentração de ácidos presentes nas amostras para 2ª e 20ª semana de cultivo.

Tratamentos	Lático	Maleico	Cítrico	Oxalato	Málico	Tartárico
2º semana	mg/mL					
T01	0	0	0	0	0	0
T02	2,545	0,016	0	0,897	0	0
T03	**	**	**	**	**	**
T51	0	0	0	0	0	0
T52	1,825	0,01	0	*	0	0
T53	0	0	0	0	0	0
T101	1,23	0	0	0	0	0
T102	0	0	0,305	0	0	0
T103	0	0	0,105	0	0	0
20º semana						
T01	*	*	0	0	*	*
T02	*	*	1,104	0	*	0
T03	0	0	0	0	0	0
T51	0	0	0	0	0	0
T52	0	0	0	0	0	0
T53	0	0	*	0	0	0
T101	0	0	0	0	0	0
T102	0	0	0	0	0	0
T103	0	0	0	0	0	0

* são amostras com concentrações traços de cada elemento; ** amostras que não foram quantificadas por problemas técnicos. Resultado expresso no concentrado 15 vezes.

5.4 Extração do DNA

Na Tabela 3 se encontra os dados obtidos na análise com espectrofotômetro, em que foram analisadas as concentrações do DNA das fases líquidas e sólidas para a 2ª e 20ª semana. Esses resultados mostraram as concentrações e a qualidade (pureza) na relação 260/230 e 260/280. A maior parte das concentrações estão altas, trazendo qualidade adequada para as amostras e o índice de pureza está dentro do aceitável para as duas relações (260/230 e 260/280). O tempo zero, devido à baixa concentração de bactérias no meio de cultivo, não proporcionou DNA com qualidade e quantidade suficientes para o sequenciamento. Apenas foram realizadas nesse tempo as análises bioquímicas.

Tabela 3. Quantificação das amostras em espectrofotômetro NanoDrop da 2ª e 20ª semana para os tempos de 5 e 10 dias de cultivo.

Amostras	Fases	2ª Semana			20ª Semana		
		ng/uL	260/280	260/230	ng/uL	260/280	260/230
T5-1	Líquida	112,8	1,79	0,82	118,9	1,71	0,84
T5-1	Sólida	33,7	1,83	0,51	326,8	1,66	1,53
T5-2	Líquida	130,5	1,68	0,7	624,7	1,71	0,79
T5-2	Sólida	24,4	1,76	0,39	42,5	1,6	1,08
T5-3	Líquida	188,4	1,77	0,92	461,7	1,79	1,31
T5-3	Sólida	74,3	1,75	0,69	269	1,61	1,38
T10-1	Líquida	113,1	1,62	0,66	587,1	1,67	1,13
T10-1	Sólida	6,3	1,79	0,21	91,2	1,6	1,22
T10-2	Líquida	22,8	1,69	1,77	381,4	1,7	1
T10-2	Sólida	18,8	1,71	0,36	18	1,9	0,35
T10-3	Líquida	101,2	1,77	86	657,2	1,85	1,28
T10-3	Sólida	8	1,77	0,2	142	1,58	1,21

5.5 Análise da população bacteriana por sequenciamento do gene 16SrRNA

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA apresentou sequências com boa qualidade (Phred > 20) e as bibliotecas apresentaram número de leituras suficiente para a análise (superior a 20.000 leituras). O tamanho das leituras foi em média de 250 nucleotídeos (Carvalho, 2016). O número de sequências obtidas pelo sequenciamento parcial do gene de 16S rRNA, utilizado para a análise da população bacteriana aderidas às fibras de

bagaço de cana-de-açúcar (fase sólida) ou livres no meio de cultivo (fase líquida), durante 5 ou 10 dias (T5 ou T10), pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Número de leituras obtidas pelo sequenciamento do gene de 16S rRNA das amostras (em triplicata) do DNA obtido da fase líquida (bactérias do sobrenadante do cultivo) e sólida (bactérias aderida às fibras do bagaço) a partir do cultivo do consórcio por 5 e 10 dias.

	Fase sólida	Fase líquida
2° semana		
T5 -1	44.278	66.566
T5 -2	55.797	39.123
T5 -3	60.211	54.491
T10 -1	53.716	44.469
T10 -2	58.991	36.752
T10 -3	57.929	87.875
20 ° semana		
T5 -1	74.748	50.480
T5 -2	60.767	54.842
T5 -3	43.247	44.180
T10 -1	34.984	50.961
T10 -2	55.616	68.474
T10 -3	110.576	41.561

A análise dos dados e comparação das sequências no Banco de Dados Silva revelou a presença total de 74 gêneros diferentemente distribuídos para 2ª semana de cultivo entre os tempos 5 e 10 dias. E foram revelados 70 gêneros diferentemente distribuídos para as amostras de 5 e 10 dias de cultivo para 20ª semana. Com o auxílio da plataforma Microbiome Analyst, foram gerados gráficos para visualizar os gêneros mais abundantes (mais do que 1% de incidência) nas amostras estudadas (Figura 10 e Figura 11), bem como os gêneros menos abundantes com incidência igual ou menor que 1%.

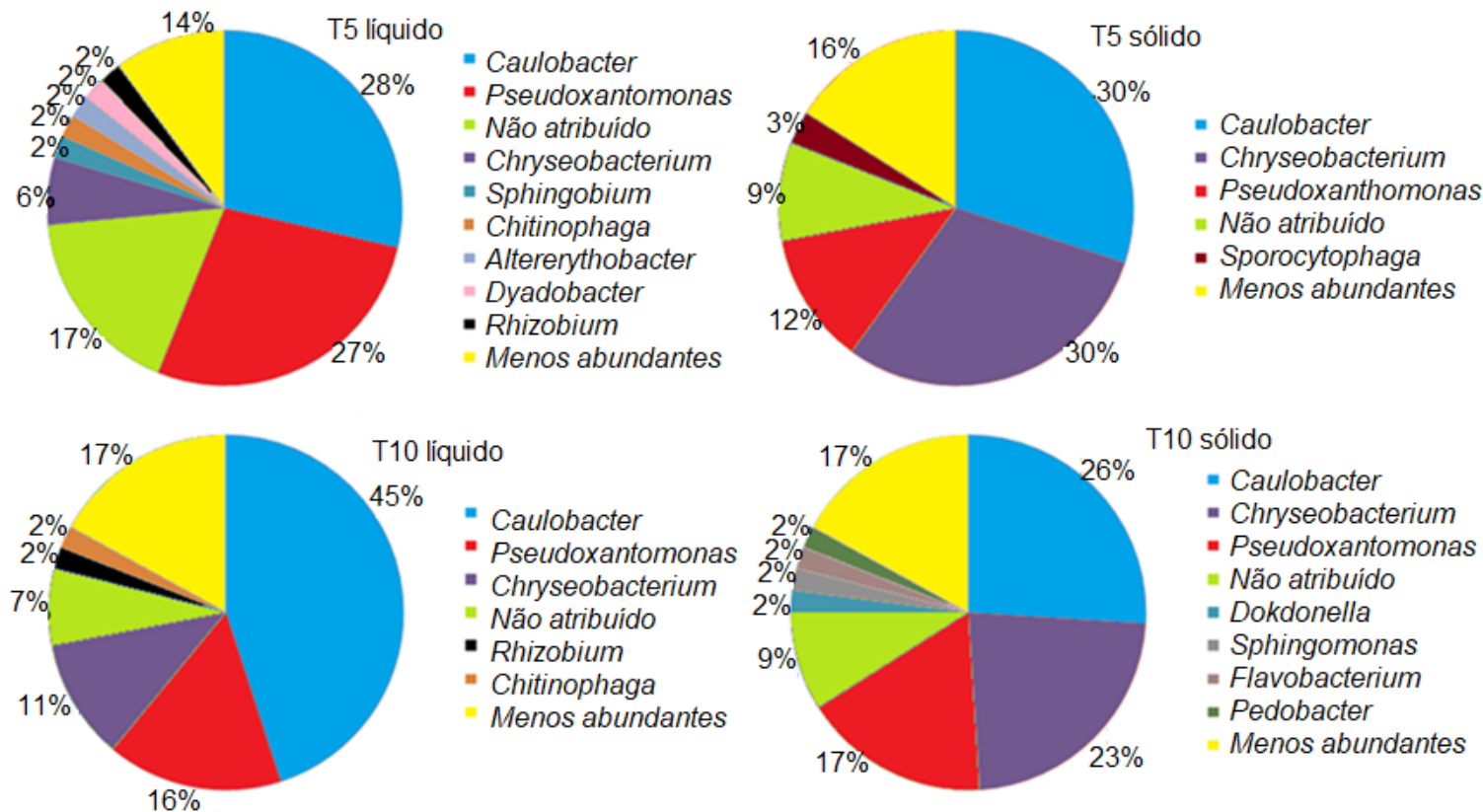


Figura 10. Diversidade dos gêneros mais abundantes presentes nos tempos de 5 (T5) e 10 (T10) dias de cultivo do consórcio da 2ª semana, expressos em porcentagem. Referente ao banco de dados SILVA pela plataforma Microbiome Analyst amostra T5 fase líquida (sobrenadante); amostra T5 sólida (aderidas); amostra T10 líquido (sobrenadante); amostra T10 sólida(aderidas).

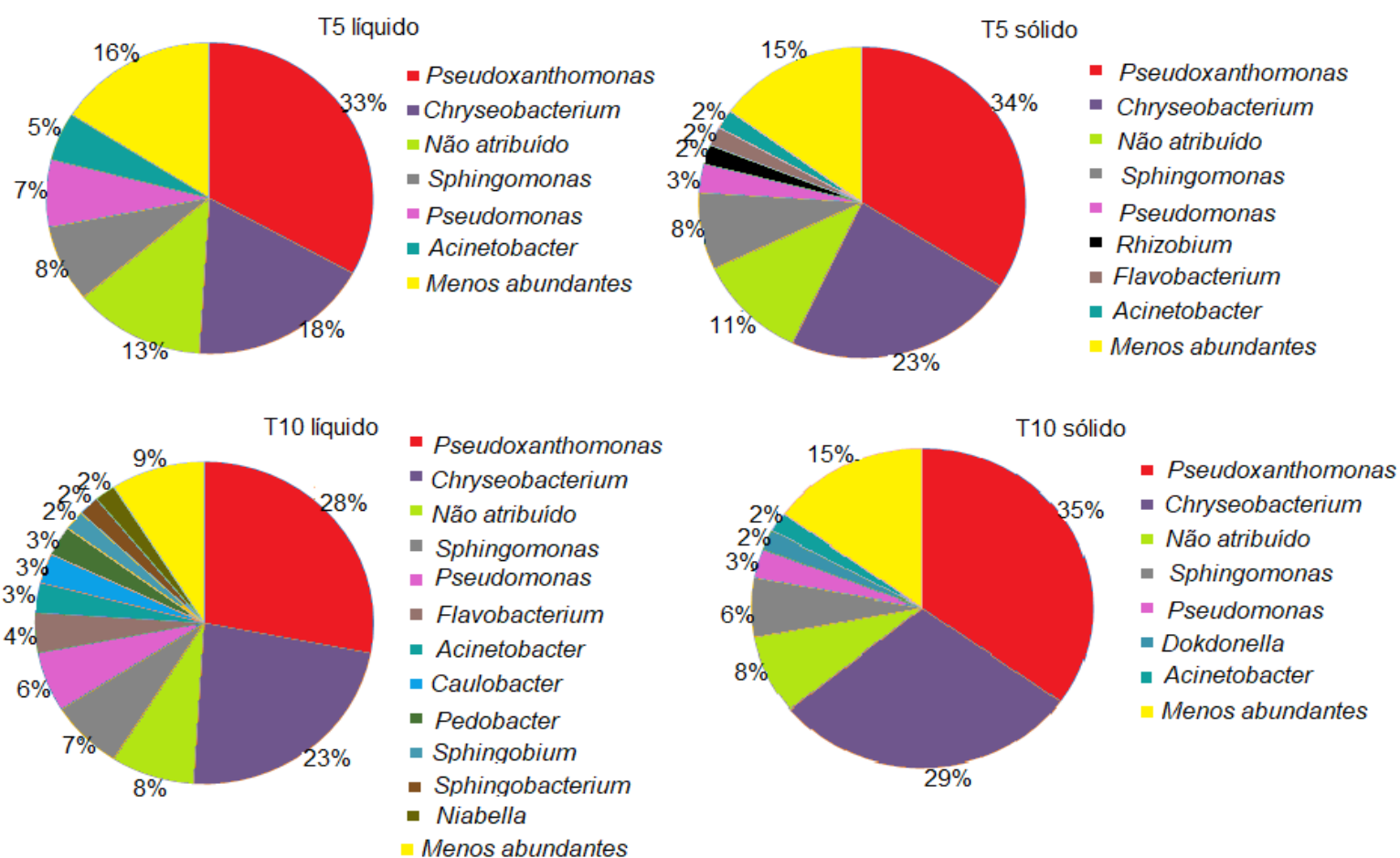


Figura 11. Diversidade dos gêneros mais abundantes presentes nos tempos de 5 e 10 dias de cultivo do consórcio da 20ª semana, expressos em porcentagem. Referente ao banco de dados SILVA pela plataforma Microbiome Analyst. amostra T5 fase líquida (sobrenadante); amostra T5 sólida (aderidas); amostra T10 líquido (sobrenadante); amostra T10 sólido (aderidas).

Pela comparação das sequências com as depositadas no banco de dados observou que em todas as amostras existia porcentagem de organismos não classificados que variaram entre 19% para T5 líquido, 9% para T5 e T10 sólido e 7% para T10 líquido para 2ª semana (Figura 10) e de 13% para T5 líquido, 11% para T5 sólido, 8% para T10 líquido e sólido para a 20ª semana (Figura 11).

Além disso, observou, em todas as amostras que aproximadamente 15% dos gêneros bacterianos presentes aparecem com menos 1% de abundância. Portanto, estão constituindo grupo denominado de menos abundantes. Esse grupo de bactérias menos abundantes é constituído por 55 gêneros do total de 74 encontrados para 2ª semana e 45 gêneros do total de 70 para 20ª semana pelo Banco de Dados tabelas 5 e 6.

Na comparação dos tempos de cultivo 5 e 10 dias nas fases líquidas e sólidas, dois gêneros bacterianos (*Pseudoxanthomonas* e *Chryseobacterium*), foram encontrados como mais abundantes para todos os tratamentos, sendo que, na fase líquida, observou menor abundância de *Chryseobacterium* que na fase sólida. *Pseudoxanthomonas* é encontrada com maior abundância para a 20ª semana em todos os tratamentos em comparação com a 2ª semana. O gênero *Caulobacter* aparece como abundante junto com os outros dois citados acima para a 2ª semana, e se apresenta em maior porcentagem para todos os tratamentos. Outro gênero encontrado como abundante é *Sphingomonas* para 20ª semana, que se apresenta com aproximadamente 8%.

Pseudoxanthomonas apareceu com 27% das sequências em T5 líquido, e entre 12 a 17% nas outras amostras para 2ª semana e com 28% das sequências em T10 líquido e entre 33% a 35% nas outras amostras da 20ª semana. Algumas espécies deste gênero auxiliam na degradação da celulose, liberando enzimas como β -glicosidase, xilanase e β -xilosidase (Okeke e Lu, 2011). A presença deste gênero no consórcio contribui para a degradação da celulose presente na biomassa, o que é possível visualizar por meio da análise realizada na fibra do bagaço (Figura 8).

Chryseobacterium aparece para várias amostras com 30% na T5 sólido, 23% para T10 sólido e 11% em T10 líquido da 2ª semana (Figura 10) e com

18% em T5 líquido, 23% para T5 sólido e T10 líquido e 29% em T10 sólido da 20ª semana (Figura 11). Este gênero está fortemente associado à alta capacidade de hidrólise da celulose (Thakur et al., 2018), com a capacidade de hidrolisar celulose, podendo gerar glicose e celobiose (um dímero de glicose). Esse gênero bacteriano também corrobora os dados de degradação da biomassa.

O gênero mais abundante encontrado para as amostras estudadas da 2ª semana foi o *Caulobacter*. Esse gênero aparece com 45% das sequências em T10 líquido entre 26 e 30% nas outras amostras (T5 sólido e líquido e T10 sólido) (Figura 10) e como menos abundante para 20ª semana em T10 líquido (Figura 11). Esse gênero possui espécies importantes envolvidas na degradação de biomassa vegetal, sendo que segundo Lee e colaboradores (2018) alguns isolados produzem xilose desidrogenase, uma enzima envolvida no processamento de carboidratos (Stephens et al., 2007). Além disso, existem os isolados de *Caulobacter*, que também codificam enzimas β -glicosidase, o que tem relação com a degradação de glico-oligossacarídeos (Presley et al., 2014).

Exemplificando o elevado potencial do consórcio para o processamento da biomassa, *Sphingomonas* pode ter auxiliado na produção de enzimas que degradam a lignina, LigD, LigF e LigG estão envolvidas na clivagem das ligações entre os componentes da ligninas (Mnich et al., 2017).

O consórcio para ambos os tempos, apresentaram outros gêneros com abundância relativa de aproximadamente 2%, e esses gêneros são característicos de cada amostra. Para a 2ª semana, estão presentes *Sphingobium*, *Chitinophaga*, *Altererythbacter*, *Dyadobacter*, *Rhizobium* para T5 líquido, *Rhizobium* e *Chitinophaga* para T10 líquido, *Sporocyphaga* para T5 sólido, *Dokdonella*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium* e *Pedobacter* em T10 sólido (Figura 10). Para a 20ª semana, *Pseudomonas* e *Acineobacter* aparecem para todos os tratamentos, *Rhizobium* e *Flavobacterium* para T5 sólido, *Flavobacterium*, *Caulobacter*, *Pedobacter*, *Sphingobium*, *Sphingobacterium* e *Niabella* para T10 líquido e *Dokdonella* para T10 sólido (Figura 11).

Conforme mencionado, além dos gêneros mais abundantes, foram identificados outros gêneros com menor abundância nos tratamentos estudados, observados nas Tabelas 5 e 6. Dentre esses gêneros, alguns apresentam evidências na literatura como degradadores de biomassa e estão presentes para um único tratamento, para ambas as semanas de estudo.

Na 2ª semana foram encontrados 55 gêneros menos abundantes, que aparecem pra um único tratamento, como: *Cupriavidus*, que auxilia na degradação da lignina (Yan et al., 2017), *Klebsiella*, que auxilia na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (Sharma et al., 2019) e *Microbaterium*, o qual auxilia na degradação de celulose e hemicelulose (Wang et al., 2013), que aparecem para os tempos T5 líquido e T10 líquido. Para os outros tratamentos não houve diferença de gêneros (Tabela 5).

Para 20ª semana dentre os 45 gêneros menos abundantes, vistos na Tabela 6, os que apresentam evidências na literatura como degradadores de biomassa e estão presentes para um único tratamento, são: *Chitinophaga*, que apresenta capacidade de degradar carboidratos derivados de plantas (Kishi et al., 2017), *Hirschia*, que auxilia na hidrólise da celulose (Kim et al., 2008), *Klebsiella*, que atua na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (lignina) (Xu et al., 2019) e *Reyranella*, que hidrolisa celulose (Wang et al., 2013). Esses gêneros aparecem para os tempos T10 líquido e T5 sólido, enquanto para os outros tratamentos não houve diferença de gêneros.

Todos os gêneros encontrados foram analisados se possuíam descrição de espécies que apresentam ou não capacidade de degradação da biomassa lignocelulósica. Os resultados desta avaliação (Figuras 12A e 12B) mostram que a porcentagem de gêneros degradadores presentes no consórcio é superior à de não degradadores em todos os tratamentos realizados e a proporção entre esses se mantém na população aderida à fibra e não aderida. A proporção entre gêneros com potencial degradador da biomassa (D) e não degradador (ND) ficou em torno de 70% x 22% no consórcio da segunda semana e 65% x 25% no consórcio da vigésima semana.

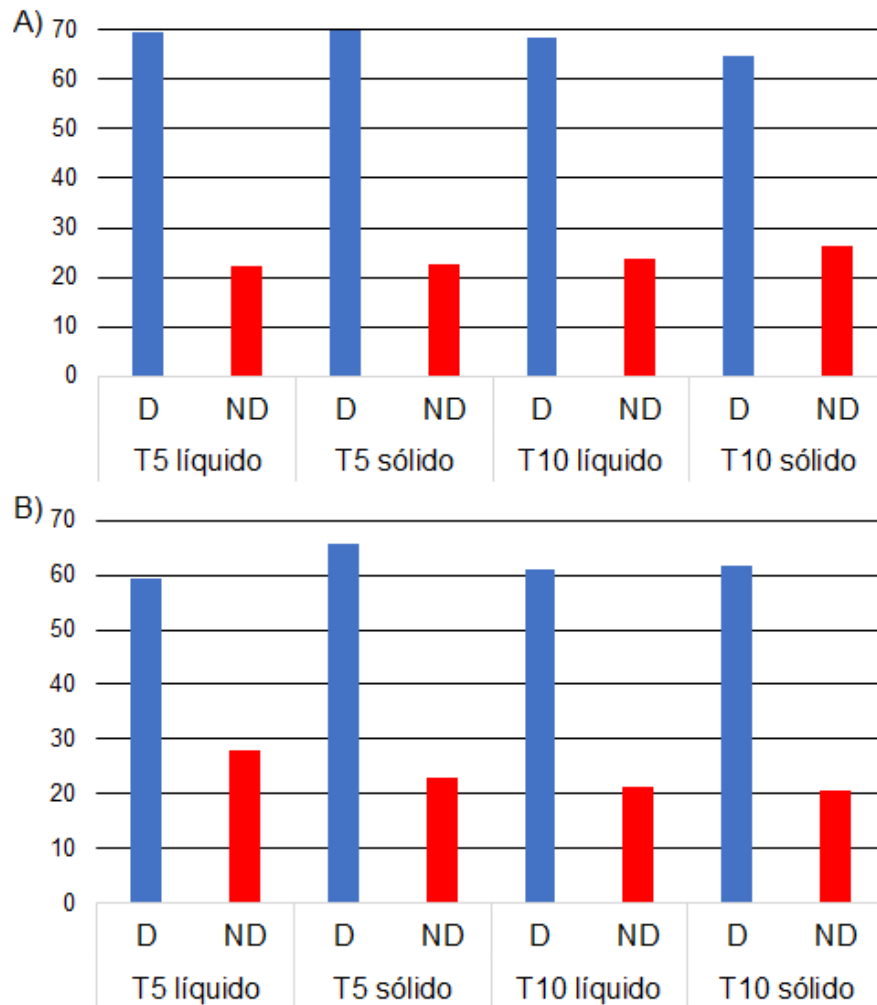


Figura 12. Porcentagem de organismos com características de degradação da lignocelulose (D) ou não degradadores (ND) da 2ª semana de cultivo (A) e na 20ª semana de cultivo (B).

Alguns gêneros classificados como não degradadores exercendo função como: fixadores de nitrogênio (*Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Devosia* e *Ensifer*), potencial para biorremediação (*Niabella*, *Terrimicrobium*), capacidade para remoção de cromo (*Acinetobacter*) ou de nitrato (*Siphonobacter*), e alguns apresentarem potencial para assimilação de etanol (*Hyphomicrobium*, *Rhizomicrobium*).

Tabela 5. Gêneros menos abundantes presentes na 2ª semana em todos os tratamentos do consórcio, segundo o banco de dados SILVA. (D) potencialmente degradador (ND) não degradador. *não amostrado. ** gêneros não classificados.

T5 líquido	T5 sólido	T10 líquido	T10 sólido	D/N D	Referências
<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter</i>	D	Romano et al., 2013
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	ND	Srivastava e Thakur, 2007
<i>Arthrobacter</i>	<i>Altererythrobacter</i>	<i>Altererythrobacter</i>	<i>Altererythrobacter</i>	D	Yuan et al., 2017
*	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter</i>	D	Thakur et al., 2018
<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bdellovibrio</i>	ND	Martínez et al., 2012
<i>Bosea</i>	<i>Bosea</i>	<i>Bosea</i>	<i>Bosea</i>	D	Houfani et al., 2017
*	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	ND	Dary et al., 2010
*	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	D	Lee e Jeon, 2018
<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i>	D	Carlos et al., 2018
*	<i>Chitinophaga</i>	*	<i>Chitinophaga</i>	D	Kishi et al., 2017
<i>Chthoniobacter</i>	<i>Chthoniobacter</i>	<i>Chthoniobacter</i>	<i>Chthoniobacter</i>	D	Kant et al., 2011
<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	*	D	Cortes-Topala et al., 2017
<i>Cohnella</i>	<i>Cohnella</i>	*	*	D	Wang et al., 2013
<i>Cupriavidus</i>	*	*	*	D	Yan et al., 2017
<i>Devosia</i>	<i>Devosia</i>	<i>Devosia</i>	*	ND	Xu et al., 2018
<i>Dokdonella</i>	<i>Dokdonella</i>	*	*	D	Bascoa e Inoune, 2015
*	<i>Dyadobacter</i>	<i>Dyadobacter</i>	*	D	Debode et al., 2016
<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer</i>	ND	Epstein et al., 2018
<i>Flavitalea</i>	<i>Flavitalea</i>	<i>Flavitalea</i>	<i>Flavitalea</i>	D	Epstein et al., 2018
<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	D	Thakur et al., 2018
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	ND	Baytshtok et al., 2008
<i>Kaistia</i>	<i>Kaistia</i>	<i>Kaistia</i>	<i>Kaistia</i>	D	Lee e Jeon, 2018

*	*	<i>Klebsiella</i>	*	D	Xu et al., 2019
*	<i>Labrys</i>	<i>Labrys</i>	<i>Labrys</i>	D	Qu et al., 2018
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	D	Tian et al., 2016
<i>Microbacterium</i>	*	*	*	D	Wang et al., 2013
<i>Niabella</i>	<i>Niabella</i>	<i>Niabella</i>	<i>Niabella</i>	ND	Hua et al., 2017
<i>Others</i>	<i>Others</i>	<i>Others</i>	<i>Others</i>	**	
<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i>	D	Jiménez et al., 2018
<i>Patulibacter</i>	<i>Patulibacter</i>	<i>Patulibacter</i>	<i>Patulibacter</i>	D	Gundlapally et al., 2009
<i>Pedobacter</i>	<i>Pedobacter</i>	<i>Pedobacter</i>	<i>Pedobacter</i>	D	Lópes-Mondéjar et al., 2016
<i>Phenylobacterium</i>	*	<i>Phenylobacterium</i>	*	D	Xiong et al., 2017
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	D	Carlos et al., 2018
*	<i>Rhizobium</i>	*	<i>Rhizobium</i>	D	Jackson et al., 2017
*	*	*	<i>Rhizomicrobium</i>	ND	Kodama e Watanabe, 2011
<i>Rhodanobacter</i>	<i>Rhodanobacter</i>	<i>Rhodanobacter</i>	<i>Rhodanobacter</i>	ND	Green et al., 2012
<i>Siphonobacter</i>	<i>Siphonobacter</i>	<i>Siphonobacter</i>	<i>Siphonobacter</i>	ND	Táncsis et al., 2010
<i>Sorangium</i>	<i>Sorangium</i>	*	*	D	Mohr et al., 2018
<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i>	D	Cortes-Topala et al., 2017
*	<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingobium</i>	D	Cortes-Topala et al., 2017
<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>	*	D	Mnich et al., 2016
<i>Sphingopyxis</i>	<i>Sphingopyxis</i>	<i>Sphingopyxis</i>	<i>Sphingopyxis</i>	D	García-Romero et al., 2016
<i>Sporocytophaga</i>	*	<i>Sporocytophaga</i>	<i>Sporocytophaga</i>	D	Taillefer et al., 2018
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	*	D	Tian et al., 2016
<i>Uncultured</i>	<i>uncultured</i>	<i>uncultured</i>	<i>Uncultured</i>	**	

Tabela 6. Gêneros menos abundantes presentes na 20ª semana em todos os tratamentos do consórcio, segundo o banco de dados SILVA. (D) potencialmente degradador (ND) não degradador. * não amostrado. ** gêneros não classificados.

T5 líquido	T5 sólido	T10 líquido	T10 sólido	D/ND	Referências
------------	-----------	-------------	------------	------	-------------

<i>Acidibacter</i>	*	<i>Acidibacter</i>	<i>Acidibacter</i>	D	Falagán e Johnson, 2014
<i>Altererythrobacter</i>	<i>Altererythrobacter</i>	<i>Altererythrobacter</i>	<i>Altererythrobacter</i>	D	Yuan et al., 2017
<i>Azospirillum</i>	*	<i>Azospirillum</i>	*	ND	Cicatelli et al., 2017
<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bdellovibrio</i>	ND	Martínez et al., 2012
*	*	<i>Bosea</i>	<i>Bosea</i>	D	Houfani et al., 2017
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	ND	Dary et al., 2010
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	D	Lee e Jeon, 2018
*	<i>Caulobacter</i>	*	<i>Caulobacter</i>	D	Lee et al., 2018
<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i>	D	Carlos et al., 2018
*	*	<i>Chitinophaga</i>	*	D	Kishi et al., 2017
<i>Chthoniobacter</i>	<i>Chthoniobacter</i>	<i>Chthoniobacter</i>	<i>Chthoniobacter</i>	D	Kant et al., 2011
<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	D	Cortes-Topala et al., 2017
<i>Cohnella</i>	<i>Cohnella</i>	<i>Cohnella</i>	*	D	Wang et al., 2013
<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus</i>	D	Yan et al., 2017
<i>Devosia</i>	<i>Devosia</i>	<i>Devosia</i>	<i>Devosia</i>	ND	Xu et al., 2018
<i>Dokdonella</i>	<i>Dokdonella</i>	<i>Dokdonella</i>	*	D	Bascoa e Inoune, 2015
<i>Dyadobacter</i>	<i>Dyadobacter</i>	<i>Dyadobacter</i>	<i>Dyadobacter</i>	D	Debode et al., 2016
<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer</i>	*	*	ND	Epstein et al., 2018
<i>Flavitalea</i>	<i>Flavitalea</i>	<i>Flavitalea</i>	<i>Flavitalea</i>	D	Epstein et al., 2018
<i>Flavobacterium</i>	*	*	<i>Flavobacterium</i>	D	Thakur et al., 2018
*	*	<i>Hirschia</i>	*	D	Park e Yoon, 2013

<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	ND	Baytshtok et al., 2008
*	<i>Iamia</i>	*	<i>Iamia</i>	D	Kurahashi et al., 2009
*	<i>Kaistia</i>	*	<i>Kaistia</i>	D	Lee e Jeon, 2018
*	*	<i>Klebsiella</i>	*	D	Xu et al., 2019
<i>Labrys</i>	<i>Labrys</i>	<i>Labrys</i>	<i>Labrys</i>	D	Qu et al., 2018
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	D	Tian et al., 2016
<i>Niabella</i>	<i>Niabella</i>	*	<i>Niabella</i>	ND	Hua et al., 2017
*	<i>Others</i>	<i>Others</i>	<i>Others</i>	**	
*	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i>	D	Jiménez et al., 2018
<i>Patulibacter</i>	<i>Patulibacter</i>	<i>Patulibacter</i>	*	D	Gundlapally et al., 2009
<i>Pedobacter</i>	<i>Pedobacter</i>	*	<i>Pedobacter</i>	D	Lópes-Mondéjar et al., 2016
*	<i>Planctomyces</i>	<i>Planctomyces</i>	<i>Planctomyces</i>	D	Liu et al., 2008
*	<i>Reyranella</i>	*	*	D	Lee e Wang, 2014
<i>Rhizobium</i>	*	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>	D	JACKSON et al., 2017
<i>Rhizomicrobium</i>	<i>Rhizomicrobium</i>	<i>Rhizomicrobium</i>	<i>Rhizomicrobium</i>	ND	Kodama e Watanabe, 2011
<i>Siphonobacter</i>	<i>Siphonobacter</i>	<i>Siphonobacter</i>	<i>Siphonobacter</i>	ND	Táncsics et al., 2010
*	<i>Solirubrobacter</i>	<i>Solirubrobacter</i>	<i>Solirubrobacter</i>	ND	Wei et al., 2014
<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i>	*	<i>Sphingobacterium</i>	D	Cortes-Topala et al., 2017
<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingobium</i>	*	<i>Sphingobium</i>	D	CorteS-Topala et al., 2017
<i>Sporocytophaga</i>	<i>Sporocytophaga</i>	<i>Sporocytophaga</i>	<i>Sporocytophaga</i>	D	Taillefer et al., 2018
<i>Terrimicrobium</i>	*	*	*	ND	Hemmat-Jou et al., 2018
<i>uncultured</i>	<i>uncultured</i>	<i>uncultured</i>	<i>Uncultured</i>	**	
<i>uncultured_bacterium</i>	<i>uncultured_bacterium</i>	<i>uncultured_bacterium</i>	<i>uncultured_bacterium</i>	**	

Para classificar a proximidade de todos os gêneros presentes nas semanas estudadas e similaridades, foi avaliada a beta diversidade (β), que traz a variação da composição das espécies ali presentes. Esses gráficos foram gerados através da plataforma Microbiome Analyst, em que cada amostra possui uma biblioteca metagenômica e todas possuem códigos numéricos que as identificam, mostrando as bactérias aderidas e livres no sobrenadante (Tabela 7).

Tabela 7. Códigos numéricos referentes às amostras da 2ª e 20ª semana de cultivo.

2ª semana	T5	T10
Líquido	4, 5, 6	7, 8, 9
Sólido	22, 23, 24	25, 26, 27
20ª semana	T5	T10
Líquido	13, 14, 15	16, 17, 18
Sólido	31, 32, 33	34, 35, 36

A Figura 13 traz a comparação da população bacteriana do consórcio nos tempos (5 e 10 dias) e nas fases (líquida e sólida) da 2ª semana.

Através dessa análise (Figura 13A) é possível notar que existe similaridade em relação à beta diversidade entre os tempos de cultivo para as amostras aderidas às fibras nos tempos 5 (22, 23, 24) e 10 (25, 26 e 27) de cultivo.

Em comparação às fases (Figura 13B), só as amostras 9, referente ao tempo de 10 dias líquido e 25 e 26, no tempo de 10 dias sólido, apresentam similaridade em relação à beta diversidade, enquanto as outras amostras que estão presentes na análise mas apresentam diferenças em relação a esse parâmetro apesar de se relacionarem entre si.

A Figura 14 traz a comparação da população bacteriana do consórcio nos tempos (5 e 10 dias) e, nas fases (líquida e sólida) da 20ª semana.

Através dessa análise (Figura 14A) é possível observar que não existe similaridade em relação à beta diversidade entre as amostras 16 e 34, que pertencem ao tempo de 10 dias de cultivo. Aos tempos líquido e sólido,

respectivamente, entre as outras amostras não há similaridade em relação a beta diversidade.

Em comparação entre as fases sólida e líquida (Figura 14B), somente as amostras 14, 15, 16 referentes ao tempo de 5 dias líquido e 34 ao tempo de 10 dias sólido não apresentam similaridade em relação à beta diversidade, o restante das amostras apresentam similaridade em relação à beta diversidade.

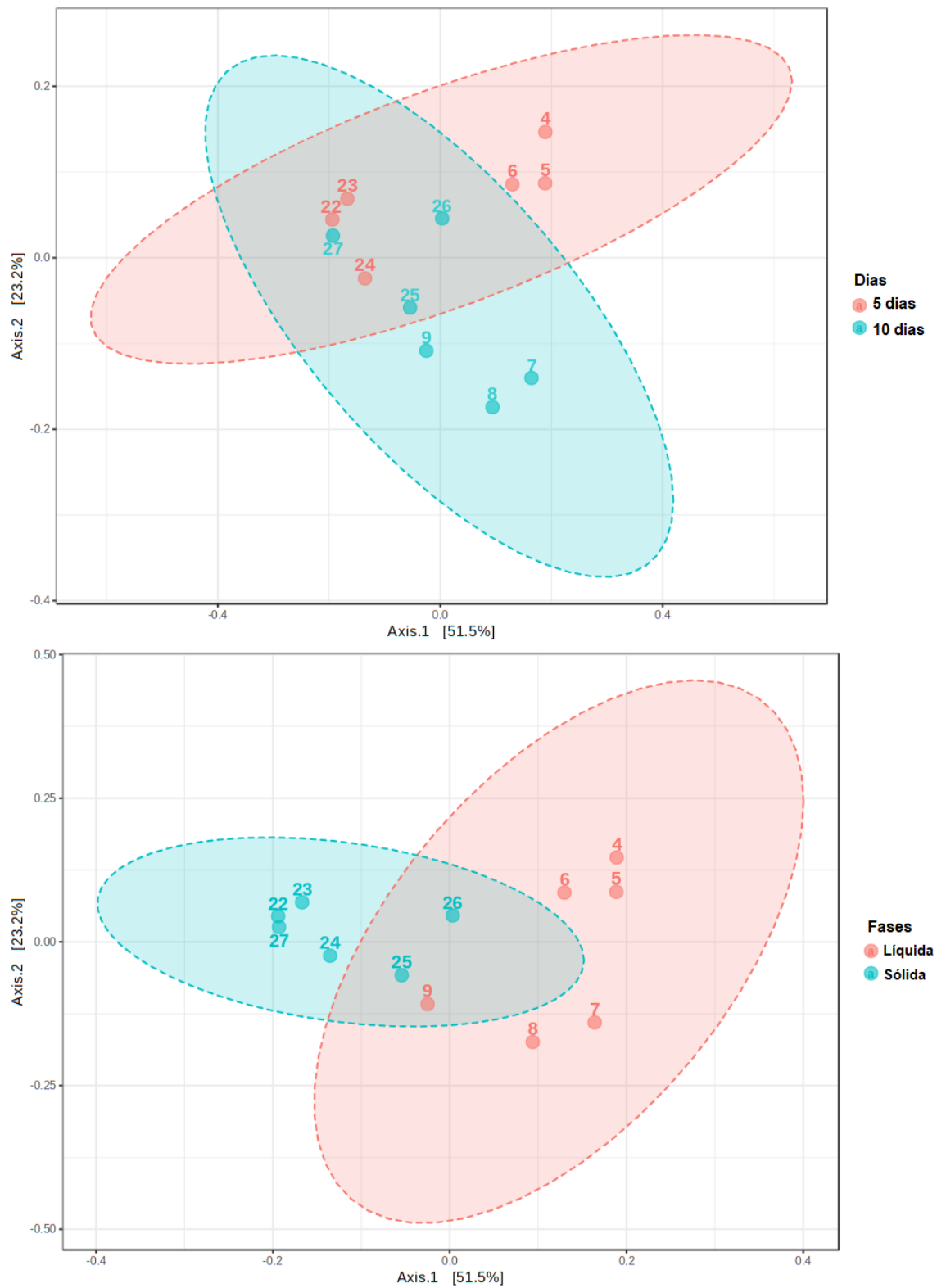


Figura 13. Relação entre as amostras entre os tempos (T5 e T10 dias) e para as fases (L= líquida e S= sólida) da 2ª semana. Análise realizada pelo programa Microbiome Analyst. As amostras 4, 5 e 6 são referentes a T5 líquida; as 7, 8 e 9 são referentes a T10 líquida; as amostras 22, 23 e 24 são referentes a T5 sólido e 25, 26 e 27 referentes a T10 sólido.

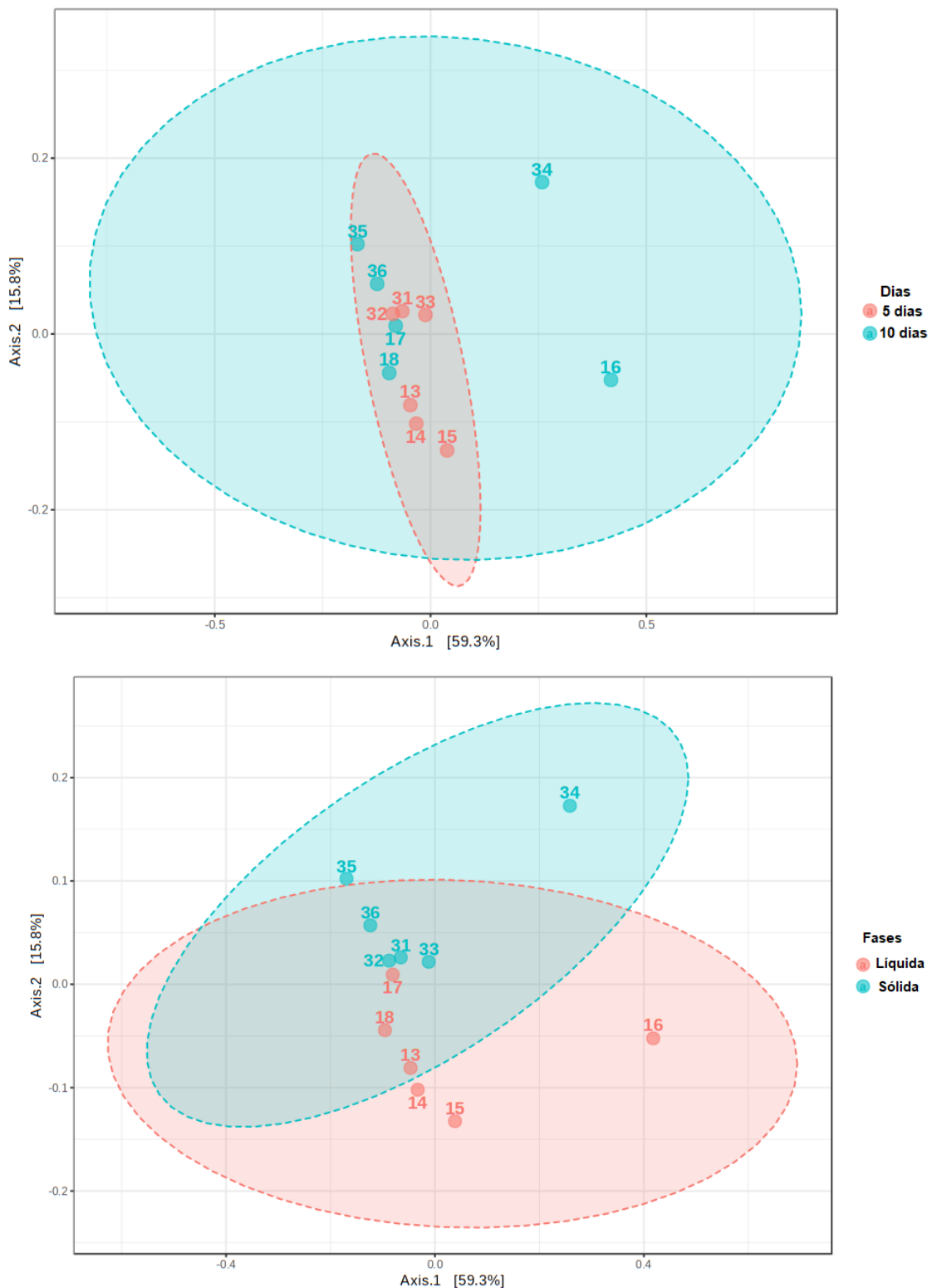


Figura 14. Relação entre as amostras entre os tempos (T5 e T10 dias) e para as fases (L= líquida e S= sólida) da 20ª semana. Análise realizada pelo programa Microbiome Analyst. As amostras 13, 14 e 15 são referentes a T5 líquido; as 16, 17, 18 são referentes a T10 líquido; as amostras 31, 32 e 33 são referentes a T5 sólido e 34, 35 e 36 referentes a T10 sólido.

A despeito de diferenças pontuais, o teste realizado mostrou que existe congruência entre algumas amostras, pois estão localizadas no mesmo quadrante mostrando assim que estão próximas, apresentando similaridade independentemente de pertencerem a tempos distintos (5 ou 10 dias) ou a fase de cultivo (líquida/sólida) ser diferente.

As diferenças e similaridades entre as amostras, podem ser decorrentes da dinâmica da população. Segundo Jiménez e colaboradores (2017) existe uma dinâmica em que o consórcio é moldado para maximizar o processo de sacarificação. Mas, à liberação diferenciada de molécula, a estrutura do substrato, os fluxos nutricionais presentes, as interações entre os organismos e as condições físico-químicas, podem acarretar modificações influenciando as populações presentes no consórcio.

5.5 Eficiência do consórcio para produção de etanol a partir de biomassa

Foram feitos testes para verificar a eficiência do consórcio para produção de etanol, com o emprego do consórcio S1 (1ª semana) e levedura SA-1. A levedura foi adicionada no 8ª dia de cultivo (mimetizando o consórcio estudado da semana 2). O processo fermentativo foi realizado e avaliado com 8, 12 e 16 dias. Com esse ensaio, esperava-se que qualquer concentração de açúcar fosse transformada pela levedura em etanol, mas não foi observado nem a liberação de glicose ou qualquer outra molécula estudada, nem a produção de etanol em nenhum dos tempos de cultivo (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação do processo fermentativo do consórcio da semana 2 e leveduras SA-1 cultivados em meio BHB por 8, 12 e 16 dias. Resultados expressos em g/L.

	Glicose	Xilose	Lactato	Glicerol	Acetato	Etanol
Padrão	25,00	25,00	1,01	6,05	1,00	10,12
S2 T8 CONLEV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2 T8 CONS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2 T12 CONLEV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2T12 CONS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2T16 CONLEV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2 T16 CONS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

CONLEV= consórcio + levedura; CONS= consórcio; S2 = 2ª semana de cultivo.

O estoque do consórcio S1 foi reutilizado, resultando no consórcio S2 (2ª semana). Neste caso observou-se a presença de glicerol proveniente da solução de estoque, e o decréscimo ao longo dos dias 1, 2 e 5, chegando a zero no dia 6, porém nenhuma produção de etanol Figura 15.

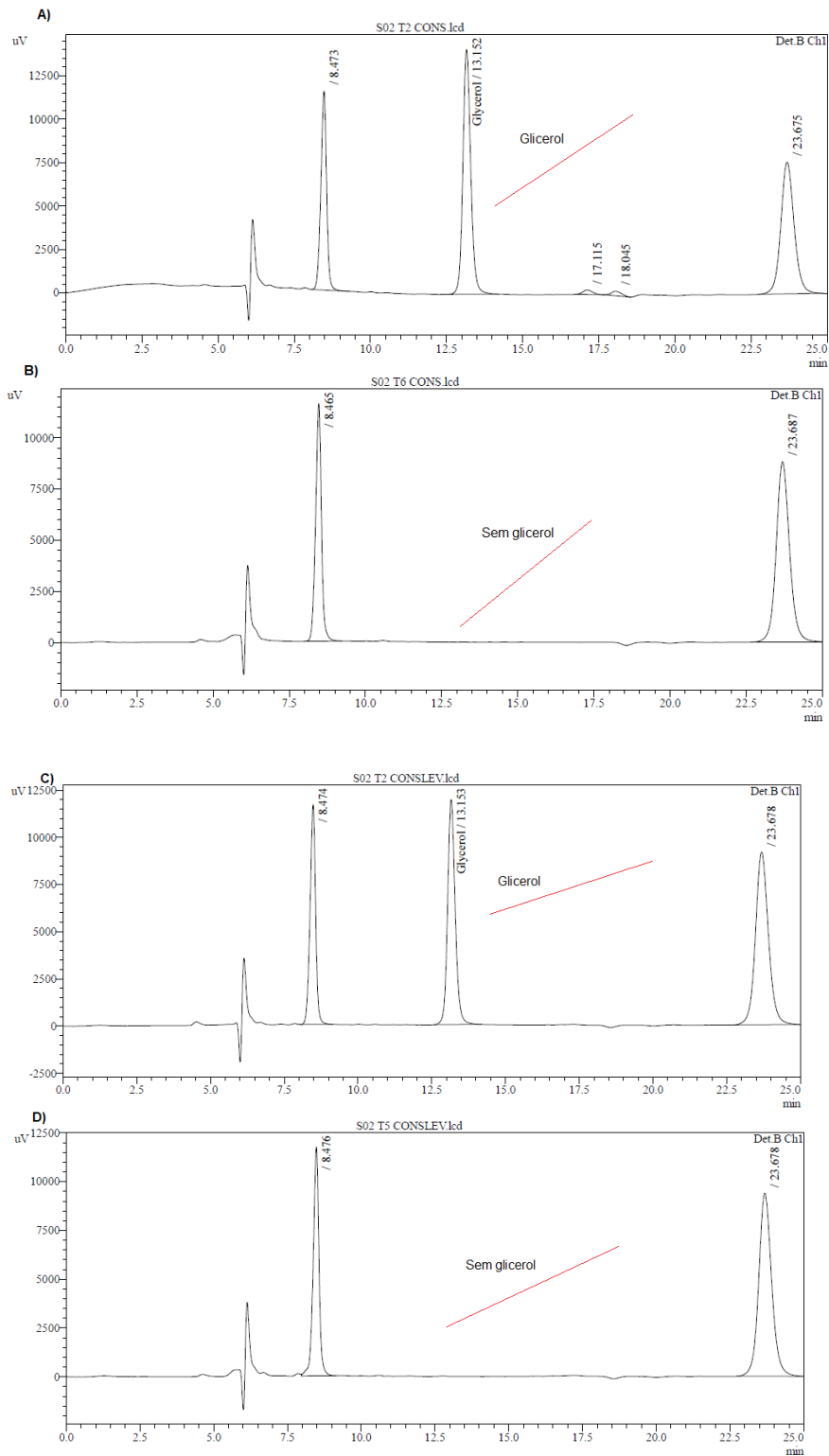


Figura 15. Os perfis cromatográficos A e B são referentes ao cultivo do consórcio em meio BHB da 2ª semana, as cromatografias C e D são referentes ao cultivo do consórcio em BHB com levedura da 2ª semana.

Nas cromatografias A e C é possível notar picos de glicerol, as figuras B e D mostram que o glicerol que estava disponível foi consumido, sendo possível prever que o consórcio, ao invés de degradar a biomassa, consumiu o glicerol disponível.

A partir do consórcio S1, cultivado por uma semana e sem glicerol foram realizados repiques em novos frascos contendo o meio BHB e bagaço ou Avicel. Não foi observada a produção de etanol nos dias 2, 4 e 8 de cultivo, tanto para os frascos contendo bagaço de cana quanto para os frascos contendo Avicel (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação do processo fermentativo do consórcio em BHB, do consórcio em BHB com levedura e do consórcio em BHB com Avicel nos tempos (T) 0, 2, 4 e 8 dias. Resultados expressos em g/L.

	Glicose	Xilose	Lactato	Glicerol	Acetato	Etanol
Padrão	25,00	25,00	1,01	6,05	1,00	10,12
S2b T0 CONS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T0 CONSAVC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T0 CONSLEV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T0 CONSLEVAVC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T4 CONS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T4 CNSAVC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T4 CONSLEV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T4 CONSLEVAVC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T8 CONS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T8 CONSLEV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T8 CONSAVC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S2b T8 CONSLEVAVC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

CONS= consórcio em meio BHB; CONSLEV= consórcio e levedura em meio BHB; CONSAVC= consórcio em meio de avicel; CONSLEVAVC= consórcio em meio avicel com levedura; S2b = 2ª semana de cultivo com 0, 2, 4 e 8 dias de cultivo.

Embora não tenha sido possível notar inicialmente o aumento da glicose no sobrenadante nos ensaios realizados em não foi observado. Esse resultado controverso não pode ser explicado no presente ensaio. Com os resultados apresentados anteriormente, foi possível verificar a presença das bactérias aderidas às fibras de lignocelulose e descamação delas, além de grupos

bacterianos aderidos entre si, sugerindo dessa forma que existe degradação da biomassa pelos microrganismos. Dados de quantificação de glicose no meio de cultivo e diminuição de celulose no consórcio da semana 2 com 5 dias de cultivo também sugerem a desconstrução da biomassa lignocelulósica.

Entretanto não foi possível se obter a fermentação simultânea ou não diretamente do meio de cultivo ou usando os consórcios.

Vários fatores podem estar envolvidos nesse resultado. Essa inibição poderia ser pelo uso competitivo da glicose pelos microrganismos que estão se desenvolvendo no consórcio? Os microrganismos estariam produzindo algum elemento/molécula que inibiria a fermentação ou as leveduras? A quebra da lignocelulose estaria liberando no meio de cultivo oligômeros de glicose que inibiriam o processo fermentativo? Várias são as hipóteses, mas para resolvê-las novos ensaios precisarão ser realizados.

6 CONCLUSÃO

O consórcio degrada a biomassa lignocelulósica causando diminuição os níveis de celulose, hemicelulose e lignina presente nessa matéria-prima assim como a liberação de glicose no meio de cultivo. O tempo de 5 dias foi o momento de maior atividade hidrolíticas no consórcio da segunda semana

A desconstrução da biomassa e a baixa concentração de glicose disponível no meio de cultivo, provavelmente, decorrente do uso dessas moléculas como fonte de carbono pela própria população que participa do consórcio, levanta a possibilidade de utilização dos organismos do consórcio em um processo de cotratamento. Os organismos do consórcio atuam na estrutura de lignocelulose, facilitando a atuação de enzimas adicionais, que hidrolisariam a celulose e hemicelulose liberando açúcares para a produção do etanol 2G.

Através dos estudos realizados se verifica que o consórcio possui bactérias que são degradadoras de biomassa e que existem algumas diferenças de composição dos consórcios entre as semanas de isolamento (2 e 20), entre os tempos de cultivos (5 e 10 dias) e entre as fases (líquida e sólida).

A riqueza dos gêneros presentes mostra que o consórcio apresenta plasticidade pelo fato dos gêneros estarem presentes em ambas as fases, livres no meio de cultivo e aderidas às fibras de lignocelulose.

Além disso, o consórcio bacteriano estudado apresenta potencialidade para ser explorada, principalmente, quanto ao fato de ser uma importante fonte de genes/enzimas microbianas que podem auxiliar biotecnologicamente na desconstrução de biomassa lignocelulósica e utilização dos açúcares liberados em processos fermentativos de produção de etanol.

7 REFERÊNCIAS

Andrade TCC, Siqueira LN, Souza DA, Silva FV, Guarda PM, Guarda EA (2018) Análise Da Influência Do Pré-Tratamento Químico E Físico Sob a Caracterização Das Frações Celulose E Lignina De Diferentes Biomassas E Seu Potencial Para Produção De Etanol De Segunda Geração. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, 11:3. <http://dx.doi.org/10.17765/2176-9168.2018v11n3p955-974>

Almeida MLM. (2011) **Diversidade Bacteriana de Um Consórcio Degradador de Resíduo Celulósico da Biomassa**. Trabalho de graduação para obtenção do título de tecnólogo em biocombustíveis – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal.

Bacosa HP, Inoue C (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. **Journal of Hazardous Materials**, 238:689-697. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.068>

Basso LC, Amorim HV de, Oliveira AJ de, Lopes ML (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, 8:7:1155–1163. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>

Baytshtok V, Lu H, Park H, Kim S, Yu R (2008) CHANDRAN, K. Impact of varying electron donors on the molecular microbial ecology and biokinetics of methylotrophic denitrifying bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, 106:6. <https://doi.org/10.1002/bit.22213>

Braga RS (2018) **Desenvolvimento de filme polimérico à base de hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar**. Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de engenheira química da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul. <https://repositorio.ucs.br/11338/4382>

Borges CP (2018) **Estudo do Processo Organosolv Aplicado ao Bagaço de Cana-de- Açúcar para a Geração de Etanol de Segunda Geração**. Dissertação para obtenção do título em mestre em inovação tecnológica – Universidade Federal do Triângulo Mineiro , Uberabara. <http://bdtd.ufmt.edu.br/handle/tede/592>

Brienzo M, Tyhoda L, Benjamin Y, Görgens J (2015) Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse

varieties for bioethanol production. **New biotechnology**, 32(2):253-262.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.12.007>

Bushnell LD and Haas HF (1941) The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal Bacteriology**, 41:653-673.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374727/>

Bowman JL, Floyd SK, Sakakibara K (2007) Green Genes—Comparative Genomics of the Green Branch of Life. **Cell**, 129(2):229-234.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.004>

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK., Fierer N, Peña A G, Goodrich JK, Gordon JL, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ruth ERK (2011) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, 7(5):1–12.
doi:[10.1038/nmeth.f.303](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303)

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, 6(8):1621–1624.
<https://www.nature.com/articles/ismej20128>

Carlos C, Fan H, Currie CR (2018) Substrate Shift Reveals Roles for Members of Bacterial Consortia in Degradation of Plant Cell Wall Polymers. **Frontiers in Microbiology**, 9:364. [10.3389/fmicb.2018.00364](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00364)

Carvalho JÁ, Borges WMS, Carvalho MZ, Arantes ACC, Bianchi ML (2017) Bagaço de Cana-de-Açúcar como Fonte de Glicose: Pré-tratamento Corona. **Revista Virtual de Química**, 9:9-106. [10.21577/1984-6835.20170009](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170009)

Carvalho RA De (2016) **Avaliação do Método de Sequenciamento de Nova Geração no Diagnóstico Genético de Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1**. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em ciências – Universidade de São Paulo, São Paulo.
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5135/tde-10012017-111320/pt-br.php>

Cicatelli A, Guarino F, Baldan E, Castiglione S (2017) Genetic and biochemical characterization of rhizobacterial strains and their potential use in combination with chelants for assisted phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(9):8866-8878. [10.1007/s11356-016-7982-5](https://doi.org/10.1007/s11356-016-7982-5)

Chen Z, Wang Y, Xia D, Jiang X, Fu D, Shen L, Wang H, Li Q (2016) B. Enhanced bioreduction of iron and arsenic in sediment by biochar amendment influencing microbial community composition and dissolved organic matter content and composition. **Journal of Hazardous Materials**, 311:20-29. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.02.069>

Cola, P (2018) **Respostas Fisiológicas De Leveduras Da Produção De Etanol A Inibidores Provenientes Do Pré-Tratamento Do Material Lignocelulósicos Do Baaço Da Cana-De-Açúcar**. Dissertação apresentada à Escola Politécnica, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, São Paulo. [10.11606/D.3.2019.tde-30012019-144117](https://doi.org/10.11606/D.3.2019.tde-30012019-144117)

Corcoll N, Osterlund T, Sinclair L, Eiler A, Kristiansson E, Backhaus T, Eriksson M (2017) Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, 364(14):1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx139>

Cortes-Topala L, Jiménez DJ, Brossi MJ de, Salles JF, Elsas JDV, (2016) Different inocula produce distinctive microbial consortia with similar lignocellulose degradation capacity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100:7713-7725. [10.1007/s00253-016-7516-6](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7516-6)

Cortes-Topala L, Salles JF, Elsas JDV (2017) Bacterial Synergism in Lignocellulose Biomass Degradation – Complementary Roles of Degradation As Influenced by Complexity of the Carbon Source. **Frontiers in Microbiology**, 8:1628. [10.3389/fmicb.2017.01628](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01628)

Costa EC (2017) **Avaliação da associação entre biofilmes bacterianos , bactérias intracelulares e superantígenos estafilocócicos em pacientes com rinossinusite crônica** 78 f. Tese para obtenção do título de doutor ciências - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. [10.11606/T.17.2018.tde-10042018-141217](https://doi.org/10.11606/T.17.2018.tde-10042018-141217)

Dantas CP (2016) **Utilização de protótipo de biorreator de imersão temporária na biodegradação de petróleo em sedimento de manguezal**. Dissertação para obtenção do título de mestre em geoquímica do petróleo e meio ambiente – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador. <http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/25762>

Dar MA, Shaikh AA, Pawar KD, Pandit RS (2018) Exploring the gut of *Helicoverpa armigera* for cellulose degrading bacteria and evaluation of a potential strain for lignocellulosic biomass deconstruction. **Process Biochemistry**, 73:142-153, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.001>

Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares AJ, Pajuelo E (2010) "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, 177:323-330. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.035>

Debode J, Tender CDe, Soltaninejad S, Malderghem CV, Haegeman A, Linden IVD, Cottyn B, Heyndrickx M, MAes M (2016) Chitin Mixed in Potting Soil Alters Lettuce Growth, the Survival of Zoonotic Bacteria on the Leaves and Associated Rhizosphere Microbiology. **Frontiers in Microbiology**. [10.3389/fmicb.2016.00565](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00565)

Desiderato JJ, Alvareng DO, Constancio MTL, Alves LMC, Varani AM (2017) The genome sequence of *Dyella jiangningensis* FCAV SCS01 from a lignocellulose-decomposing microbial consortium metagenome reveals potential for biotechnological applications. **Genetics and Molecular Biology**, 41(2):507-513. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0155>

Epstein B, Abou-Shanab RAI, Shamseldin A, Taylor MR, Guhlin J, Burghardt LT, Nelson M, SandwoskY MJ, Tiffin P (2018) Genome-Wide Association Analyses in the Model Rhizobium *Ensifer meliloti*. **American Society for Microbiology**. [10.1128/mSphere.00386-18](https://doi.org/10.1128/mSphere.00386-18)

Falagán C, Johnson DB (2014) *Acidibacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic ferric iron-reducing gamma proteo bacterium. **Extremophiles**, 18(6):1067-1073. [10.1007/s00792-014-0684-3](https://doi.org/10.1007/s00792-014-0684-3)

Francis IM, Jochimsen KN, Vos PD, Bruggen AHCV (2014) Reclassification of rhizosphere bacteria including strains causing corky root of lettuce and proposal of *Rhizorhapis suberifaciens* gen. nov., comb. nov., *Sphingobium mellinum* sp. nov., *Sphingobium xanthum* sp. nov. and *Rhizorhabdus argentea* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64:1340-1350. [10.1099/ijs.0.058909-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.058909-0)

Fernandes ES (2018) **Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido, acessibilidade, superfície exposta da lignina e sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/156008>

Freitas FP, Márcia A, Carneiro A, Gomes AG, Pereira M (2017) Decomposição térmica de resíduos lignocelulósicos visando seu aproveitamento para fins energéticos. **Revista Ciência da Madeira - RCM**, 8(1):29–35, 2017 [10.12953/2177-6830/rcm.v8n1p29-35](https://doi.org/10.12953/2177-6830/rcm.v8n1p29-35)

García-Romero I, Pérez-Pulido AJ, González-Flores YE, Reyes-Ramírez F, Santero E, Floriano B (2016) Genomic analysis of the nitrate-respiring *Sphingopyxis granuli* (formerly *Sphingomonas macrogoltabida*) strain TFA. **BMC Genomics**, 17:93. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2411-1>

Goering HK, Van SOEST PJ, (1970) Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). **Agricultural Handbook**, 379, Washington, DC: USDA
<https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT87209099/PDF>

Gross E, Pires M, Fernandes V (2014) **Curso teórico prático de técnicas em microscopia eletrônica**. Universidade Estadual De Santa Cruz - Ilhéus, Bahia.
http://www.uesc.br/centros/cme/arquivos/apostila_curso_cme.pdf

Ghosh S, Chowdhury R, Bhattacharya P (2016) Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100(10):4283–4295. [10.1007/s00253-016-7448-1](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7448-1)

Hartmann C (2017) **Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica por macrofungos regionais para posterior produção de etanol de segunda geração**. Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul <https://repositorio.ucs.br/handle/11338/3334>

Hemmat-Jou MH, Safari-Sinegani AA, Mirzaie-Asl A, Tahmourespour A (2018) Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. **Ecotoxicology**, 27:1281-1291.
<https://doi.org/10.1007/s10646-018-1981-x>

Hua J, Feng Y, Jiang Q, Bao X, Yin Y (2017) Shift of bacterial community structure along different coastal reclamation histories in Jiangsu, Eastern China. **Scientific Reports**, 7:10096. [10.1038/s41598-017-10608-3](https://doi.org/10.1038/s41598-017-10608-3)

Houfani AA, Vetrovský T, Baldrian P, Benallaoua S (2017) Efficient screening of potential celulasas and hemicellulasas produced by *Bosea* sp. FBZP-16 using the combination of enzyme assays and genome analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2198-x>

Isaac A, Felipe AF, Antunes RC, Montoro LA, Malacias A, Massara P, Kitten G, Markotter H, Manke I (2018) Unveiling 3D physicochemical changes of sugarcane bagasse during sequential acid/alkali pretreatments by synchrotron phase-contrast imaging. **Industrial Crops & Products**, 114:19–27.

Isikgor FH, Becer CR (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, 6:4497- 4559. [10.1039/c5py00263j](https://doi.org/10.1039/c5py00263j)

Jackson CA, Couger MB, Prabhakaran M, Ramachandriya KD, Canaan P, Fathepure BZ (2017) Isolation and characterization of *Rhizobium* sp. strain YS-1r that degrades lignin in plant biomass. **Journal of Applied Microbiology**, 122(4). <https://doi.org/10.1111/jam.13401>

Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, 45(9):2761-2764. [10.1128/JCM.01228-07](https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07)

Janssen PH (2006) Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(10):1719-1728. [10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006)

Jiménez DJ, Dini-Andreote D, Deangelis KM, Singer SW, Salles JF, Elsas JDV (2017) Ecological Insights into the Dynamics of Plant Biomass-Degrading Microbial Consortia. **Trends in Microbiology**, 25:788-796 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.012>

Jiménez DJ, Mares MCD, Salles JF (2018) Temporal Expression Dynamics of Plant Biomass-Degrading Enzymes by a Synthetic Bacterial Consortium Growing on Sugarcane Bagasse. **Frontiers in Microbiology**. [10.3389/fmicb.2018.00299](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00299)

Kant R, Passel MWJV, Palva A, Lucas S, Lapidus A, Rio TGD, Dalin E, Tice H, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Larimer FW, Land ML, Hauser L, Sangwan PVWM, Janssen PH, Smidt H (2011) Genome Sequence of *Chthoniobacter flavus* Ellin428, an Aerobic Heterotrophic Soil Bacterium. **Journal of Bacteriology**, 193:2902-2903. [10.1128/JB.00295-11](https://doi.org/10.1128/JB.00295-11)

kim SJ, Ahn JH, WeON HY, Hong SB, Seok SJ, Kim JS, Kwon SW (2016) *Flavitalea soli* sp. nov. isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 66:562-56 [10.1099/ijsem.0.000754](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000754)

Kishi LT, Lopes EM, Fernandes CC, Fernandes GC, Sacco LP, Alves LMC, Lemos EGM (2017) Draft Genome Sequence of a *Chitinophaga* Strain Isolated from a Lignocellulose Biomass-Degrading Consortium. **Genome Announcements**. [10.1128/genomeA.01056-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.01056-16)

Kodama Y, Watanabe K (2011) *Rhizomicrobium electricum* sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative, prosthecate bacterium isolated from a

cellulose-fed microbial fuel cell. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 61:1781-1785. [10.1099/ijs.0.023580-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.023580-0)

Koleff P, Gaston KJ, Lennon JJ (2003) Measuring beta diversity for presence-absence data. **Journal of Animal Ecology**, 72:367-382
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00710.x>

Kreutel S, Kuhn A, Kiefer D (2010) The photosensor protein Ppr of *Rhodocista centenaria* is linked to the chemotaxis signalling pathway. **BMC Microbiology**, 10:281 [10.1186/1471-2180-10-281](https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-281)

Kurahashi M, Fukunaga Y, Sakiyama Y, Harayama S, Yokota A (2009) *Iamia majanohamensis* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from sea cucumber *Holothuria edulis*, and proposal of *Iamiaceae* fam. nov. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, 59:869-873. [10.1099/ijs.0.005611-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.005611-0)

Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Thurber RLV, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, 31:814-821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

Lee Y, Jeon CO (2018) *Paraburkholderia aromaticivorans* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium, isolated from gasoline-contaminated soil. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, 68:1251-1257. [10.1099/ijsem.0.002661](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002661)

Liu S, Yang F, Gong Z, Meng F, Chen H, Xue Y, Furukawa K (2008) Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal. **Bioresource Technology**, 99(15):6817-6825. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.054>

Lima MT (2014) **Análise funcional de um consórcio microbiano de solo e prospecção de genes envolvidos na desconstrução da biomassa**. p. 53. Dissertação para obtenção de título de mestre em microbiologia agropecuária – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/121846>

López-Mondéjar R, Zuhlke D, Becher D, Riedel K, Baldrian P (2016) Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. **Scientific Reports**, 6:252-279. [10.1038/srep25279](https://doi.org/10.1038/srep25279)

Lorenzi BR, Andrade THN (2019) O Etanol De Segunda Geração No Brasil: Políticas E Redes Sociotécnicas. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, 34(100) <http://dx.doi.org/10.1590/3410014/2019>

Lu X, Zhang Y, Angelidaki I (2009) Optimization of H₂SO₄ catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. **Bioresour. Technol.** 100:3048-3053 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.008>

Lynd RL, Weimer PJ, Zyl WHV, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Bioresource Technology**, 66(3):506–577. [10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002](https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002)

Maitan-Alfenas GP, GUIMARÃES VM (2015) Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, 1:44-49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>

Martínez V, Jurkevitch E, García LJ, Prieto MA (2013) Reward for *Bdellovibrio bacteriovorus* for preying on a polyhydroxyalkanoate producer. **Environmental Microbiology**, 15:1204-1215. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12047>

MINICH E, VANHOLME R, OYARCE P, LIU S, LU F, GOEMINNE G, JORGENSEN B, MOTAWIE MS, BOERJAN W, RALPH J, ULVSKOV P, MOLLER BL, BJARNHOLT N, HARHOLT J (2016) Degradation of lignin β -aryl ether units in *Arabidopsis thaliana* expressing *LigD*, *Lig* and *LigG* from *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. **Plant Biotechnology journal**, 15 581-593: [10.1111/pbi.12655](https://doi.org/10.1111/pbi.12655)

Mohr K, Wolf C, Nubel U, Szafráńska AK, Steglich M, Hennessen F, Gemperlein K, Kampfer P, Martin K, Muller R, Wink J (2018) A polyphasic approach leads to seven new species of the cellulose-decomposing genus *Sorangium*, *Sorangium ambruticinum* sp. nov., *Sorangium arenae* sp. nov., *Sorangium bulgaricum* sp. nov., *Sorangium dawidii* sp. nov., *Sorangium kenyense* sp. nov., *Sorangium orientale* sp. nov. and *Sorangium reichenbachii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 67:3576-3586. [10.1099/ijsem.0.003034](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003034)

Mori NR (2015) **Etanol celulosico a partir da palha e do bagaco de cana de acucar pre tratamento e conversao biotecnologica nao convencionais**. P. 198. Tese para obtenção do título de doutor em biotecnologia industrial – Universidade de São Paulo, Lorena.

Odega TL, Petri DFS (2010) Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, 33(7):1549-1549 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000700023

Okeke BC, Lu J (2011) Characterization of a Defined Cellulolytic and Xylanolytic Bacterial Consortium for Bioprocessing of Cellulose and Hemicelluloses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 163:869-881. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-010-9091-0>

Paixão D, Dimitrov M, Pereira R, Accorsini F, Vidotti M, Lemos EGM (2010) Molecular analysis of bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 43:773–781 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832010000300019>

Pavani CD (2017) **Potencial biotecnológico do metagenoma de rúmen bovino da raça nelore (*Bos tauros indicus*), visando à desconstrução da biomassa vegetal**. 160f . Tese para obtenção do título em doutor em microbiologia agropecuária – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/151118/pavani_cd_dr_jabo.pdf?sequence=5

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 74(1):69–80. [10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X)

Rabelo SC (2015) **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 447 f. Tese para obtenção do título de doutor em engenharia química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Park S, Yoon JH (2013) *Hirschia litorea* sp. nov., isolated from seashore sediment, and emended description of the genus *Hirschia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 63:1684-1689. [10.1099/ijs.0.044297-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.044297-0)

Patel AK, Pandey A (2019) Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, 279:385-392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>

Paye JMD, Guseva A, Hammer SK, Gjersing E, Davis MF, Davison BH, Olstad J, Donohoe BS, Nguyen TY, Wyman CE, Pattahil S, Hahn MG, Lynd LR (2016) Biological lignocellulose solubilization: Comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. **Biotechnology for Biofuels**, 9(1):1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0412-y>

Pereira JRA; Rossi PJ (1995). Manual pratico de avaliacao nutricional de alimentos. 34 f.

PesSI SI (2009) **Estudo de Consórcios Microbianos na Degradação da Celulose**. Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título em Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/18641>

Pin TC, Nakasu PYS, matedi S, Rabelo SC, Costa AC (2019) Screening of protic ionic liquids for sugarcane bagasse pretreatment. **Fuel**, 235:1506–1514. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.08.122>

Presley GN, Payea MJ, Hurts LR, Egan AE, Martin BS, Periyannan GR (2014) Extracellular gluco-oligosaccharide degradation by *Caulobacter crescentus*. **Microbiology**, 160(3):635-645. [10.1099/mic.0.072314-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.072314-0)

Proskurina S, Junginger M, HEinimo J, Tekinel B, Vakkilainen E (2019) Global biomass trade for energy- Part 2: Production and trade streams of wood pellets, liquid biofuels, charcoal, industrial roundwood and emerging energy biomass. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 13(2):371–387 <https://doi.org/10.1002/bbb.1858>

Rabelo SC (2010) **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese ara obtenção do titulo de doutora em engenharia química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas. <http://pct.capes.gov.br/teses/2010/33003017034P8/TES.PDF>

Qu Y, Wang J, Ma Q, Shen W, Pei X, You S, Yin Q, Li X (2018) A novel environmental fate of graphene oxide: Biodegradation by a bacterium Labrys sp. WJW to support growth. **Water Research**, 14:260-269. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.070>

Reddy GSN, Garcia-Pichel F (2009) Description of Patulibacter americanus sp. nov., isolated from biological soil crusts, emended description of the genus Patulibacter Takahashi et al. 2006 and proposal of Solirubrobacterales ord. nov. and Thermoleophilales ord. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 59:87-94 [10.1099/ijs.0.64185-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.64185-0)

Romano N, Gioffré A, Sede SM, Campos E, CATALdi A (2013) Characterization of Cellulolytic Activities of Environmental Bacterial Consortia from an Argentinian Native Forest. **Current Microbiology**, 67:138-147 [10.1007/s00284-013-0345-2](https://doi.org/10.1007/s00284-013-0345-2)

Sacco LP (2017) **Potencial de isolados bacterianos para uso em processos biotecnológicos e agroindustriais**. Tese obtenção do título em doutora em Microbiologia Agropecuária da Universidade Estadual Paulist, Jaboticabal <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150947>

Santos AMD (2018) **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA: Potencial da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Dissertação para obtenção do título de mestre em Energia da Biomassa – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo – AL. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/3510>

Sawatdeenarunat C, Surendra KC, Takara D, Oechsner H, Khanal SK (2015) Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. **Bioresour Technol**, 178:178-186 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.103>

Sharma HK, Xu C, Qin W (2019) Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass Valorization**, 10(2):235–251 <https://dx.doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>

Silva CDDSRD (2014) **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol por fermentação pelo consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT1891**. Dissertação para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto. <http://hdl.handle.net/11449/110507>.

Srivastava S, Thakur IS (2007) Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter* sp. for removal of hexavalent chromium from tannery effluent. **Biodegradation**, 18:637-646 <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9096-0>

Stephens C, Christen B, Fuchs T, Sundaram V, Watanabe K, Jenal U (2007) Genetic Analysis of a Novel Pathway for Xylose Metabolism in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, 189(5):2181-2185 [10.1128/JB.01438-06](https://doi.org/10.1128/JB.01438-06)

Taillefer M, Arntzen MO, Henrissat B, Pope PB, Larsbrink J (2018) Proteomic Dissection of the Cellulolytic Machineries Used by Soil-Dwelling Bacteroidetes. **American Society for Microbiology**, 3(6) [10.1128/mSystems.00240-18](https://doi.org/10.1128/mSystems.00240-18)

Tan H, Miao R, Liu T, Yang L, Yang Y, Chen C, Lei J, Li Y, He J, Sun Q, Peng W, Gan B, Huang Z (2018) A bifunctional cellulase–xylanase of a new *Chryseobacterium* strain isolated from the dung of a straw-fed cattle. **Microbial Biotechnology**, 11(2):381–398. [0.1111/1751-7915.13034](https://doi.org/10.1111/1751-7915.13034)

Táncsics A, Kéki Z, Márialigete K, Schumann P, Tóth EM (2010) *Siphonobacter aquaeclarae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family 'Flexibacteraceae', phylum Bacteroidetes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 60:2567-2571. [10.1099/ijs.0.019398-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.019398-0)

Thakur V, Kumar V, Singh D (2018) Diverse culturable bacterial communities with cellulolytic potential revealed from pristine habitat in Indian trans-Himalaya. **Canadian Journal of Microbiology**, 64(11):798-808. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0754>

Tian J, Pourcher AM, Peu P (2016) Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin and lignin-related compounds. **Letters in Applied Microbiology**, 63:30-36. <https://doi.org/10.1111/lam.12581>

Taniguchi M, Takahashi D, Watanabe D, Sakai K, Hoshino K, KOuya T, Tanaka T, (2010) Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw. **J. Biosci. Bioeng.** 110: 449-452 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.04.014>

Wanapaisan P, Laothamteep N; Vejarano F; Chakraborty J; Shintani M; Muangchinda C; Morita T; Zuzuki-Minakuchi C; Inoue K; Nojiri H; Pinyalong O (2018) Synergistic degradation of purene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. **Journal of Hazardous Materials.** [10.1016/j.jhazmat.2017.08.062](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.062)

Wang Y, Liu Q, Yan L, Gao Y, Wang Y, Wang W (2013) A novel lignin degradation bacterial consortium for efficient pulping. **Bioresource Technology**, 139:113-119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.033>

Wang H, Jiang K, Zhu Z, Jiang W, Yang Z, Zhu S, Qiu J, Yan X, He J, He Q, Hong Q (2018) Optimization of fed-batch fermentation and direct spray drying in the preparation of microbial inoculant of acetochlor-degrading strain *Sphingomonas* sp. DC-6. **3 Biotech**, 8:294 <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1324-x>

Wei L, Ouyang S, Wang Y, Shen X, Zhang L (2014) *Solirubrobacter phytolaccae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from roots of *Phytolacca acinosa* Roxb. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64:858-862. [10.1099/ijs.0.057554-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.057554-0)

Wongwilaiwalin S, Ukrit R, Laothanachareon T, Euwilaichitr L, Igarashi Y, Champreda V (2010) Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system.

Xiong J, An T, Li G, Peng P (2017) Accelerated biodegradation of BPA in water-sediment microcosms with *Bacillus* sp. GZB and the associated bacterial community structure. **Chemosphere**, 184:120-126
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.163>

Xu B, Dai L, Deng M, Miao H, Zhou J, Mu Y, Wu Q, Tang X, Yang Y, Ding J, Han N, Huang Z (2016) Molecular and Biochemical Characterization of a Novel Xylanase from *Massilia* sp. RBM26 Isolated from the Feces of *Rhinopithecus bieti*. **Journal Microbiology Biotechnol**, 26(1) [10.4014/jmb.1504.04021](https://doi.org/10.4014/jmb.1504.04021).

Xu L, Yi H, Guo E, Zhang A (2018) Manure and mineral fertilization change enzyme activity and bacterial community in millet rhizosphere soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 34:8.
<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2394-3>

Xu L, Zhou H, Chen X, Wang B, Jin Z, Ji F (2019) Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized *Klebsiella* sp. in soil washing effluent. **Chemosphere**, 233:140-147.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.196>

Yan X, Wang Z, Zhang K, Si M, Liu M, Chai L, Liu X, Shi Y (2017) Bacteria-enhanced dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 245:419-425 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.037>

Yamamoto E, Muramatsu H, Nagai K (2014). *Vulgatibacter incomptus* gen. nov., sp. nov. and *Labilithrix luteola* gen. nov., sp. nov., two myxobacteria isolated from soil in Yakushima Island, and the description of *Vulgatibacteraceae* fam. nov., *Labilithrichaceae* fam. nov. and *Anaeromyxobacteraceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64:3360-3368. [10.1099/ijs.0.063198-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.063198-0)

Yuan N, Zeng Y, Feng H, Yu Z, Huang Y (2017) *Altererythrobacter xixiisoli* sp. nov., isolated from wetland soil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, 67(9):3655-3659. [10.1099/ijsem.0.002](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002)

Zhu Y, Malten M, Torry-Smith M, Mcmillan JD, StickeL JJ (2011) Calculating sugar yields in high solids hydrolysis of biomass. **Bioresource Technology**, 102:2897-2903. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.134>