

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**COMPOSIÇÃO FUNCIONAL E TAXONÔMICA DE ENZIMAS
CARBOHIDRASES QUE ATUAM NA DESCONSTRUÇÃO DA
LIGNOCELULOSE DE TORTA DE FILTRO**

Wellington Pine Omori

Tecnólogo em Biocombustíveis

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**COMPOSIÇÃO FUNCIONAL E TAXONÔMICA DE ENZIMAS
CARBOHIDRASES QUE ATUAM NA DESCONSTRUÇÃO DA
LIGNOCELULOSE DE TORTA DE FILTRO**

Wellington Pine Omori

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

Coorientador: Dr. Luciano Takeshi Kishi

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Microbiologia (Microbiologia Agropecuária)**

Omori, Wellington Pine
M499a Composição funcional e taxonômica de enzimas carbohidrases
que atuam na desconstrução da lignocelulose de torta de filtro /
Wellington Pine Omori. -- Jaboticabal, 2018
100 p: il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza

Banca examinadora: Maria Eugênia Guazzaroni, Alcides Lopes
Leao, Alessandro de Mello Varani, Manoel Victor Franco Lemos

Bibliografia

1. Actinobacteria. 2. Archaea. 3. Atividades Auxiliares (AAs). 4.
Bioetanol. 5. Celulose cristalina. 6. Hemicelulose. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.728.3:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria
Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMPOSIÇÃO FUNCIONAL E TAXONÔMICA DE ENZIMAS CARBOHIDRASES QUE ATUAM NA DESCONSTRUÇÃO DA LIGNOCELULOSE DE TORTA DE FILTRO

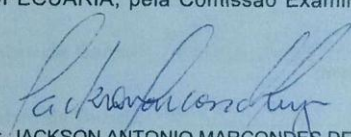
AUTOR: WELLINGTON PINE OMORI

ORIENTADOR: JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

COORDENADOR: LUCIANO TAKESHI KISHI

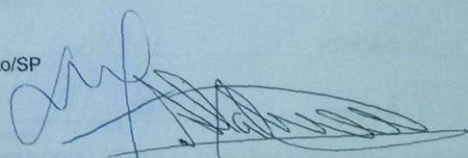
COORDENADOR: DANIEL GUARIZ PINHEIRO

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

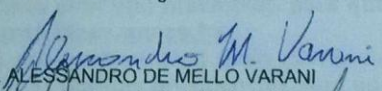


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

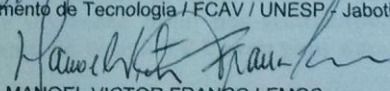
Profa. Dra. MARÍA EUGENIA GUAZZARONI
Departamento de Biologia / USP / Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. ALCIDES LOPES LEÃO
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP / Botucatu



Prof. Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 07 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Wellington Pine Omori - Nascido em 22 de Agosto de 1986 em Suzano-SP, possui graduação (2011) em Tecnologia de Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal-SP (FACTEC-JB) e mestrado (2014) em Microbiologia Agropecuária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-SP (FCAV/UNESP). Em 2017 concluiu o MBA em Administração de Redes Linux pela Universidade de Araraquara (UNIARA), Araraquara-SP. Ingressou (Março de 2014) no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-SP (FCAV/UNESP) com bolsa CAPES, sob orientação do Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza e coorientação do Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro e do Dr. Luciano Takeshi Kishi.

EPÍGRAFE

“Sempre há outra chance, uma outra amizade, um outro
amor. Para todo fim, um recomeço.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Jackson Antônio Marcondes de Souza, pelas longas conversas e conselhos sobre trabalho, amizade e imprevisto que a vida nos coloca;

À única família que me restou nesta vida: Mariah (estimada esposa) e Maria Fernanda (bijuzinho do papai);

A memória de meus pais Antônio Alvares Destro e Dina Adelina Pine, para os quais sempre fui um filho que se tornaria um Doutor;

Aos amigos que me acompanharam desde a Iniciação Científica, bem como os novos que fiz no final do Doutorado: Prof^a Eliana G. M. Lemos; Prof. Daniel; Prof^a Lúcia; João Carlos Campanharo, Camila C. Fernandes, Elisângela S. Gomes-Pepe, Mariana Rangel, Thaís Maester, Cláudio D. Pavani, Gabriela C. Cabral, Érica M. Lopes, Luciano T. Kishi, André F. Camargo, Luis G. Teherán, Cristiane Moretto, Milena Tavares, Rosmeriana Garcia, enfim, a todos que estão ou já seguiram nova vida após passarem a vida acadêmica no LBMP;

À Fapesp, CNPq, CAPES, Programa de Microbiologia Agropecuária e FCAV/UNESP, pela oportunidade de desenvolver pesquisa e permitir meu desenvolvimento científico.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Desenvolvimento do setor sucroenergético no Brasil	4
2.2 Caracterização da torta de filtro e seu uso <i>in natura</i> e na compostagem	5
2.3 Alterações no perfil de táxons microbianos com o amadurecimento da compostagem	6
2.4 Características físico-químicas e composição estrutural da lignocelulose	8
2.5 Enzimas com atividade lignocelulolítica e aplicação na produção de bioetanol	10
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivos específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Coleta de amostra e extração de DNA.....	14
4.2 Sequenciamento Illumina HiScanSQ	15
4.3 Trimagem dos dados e análises de bioinformática	15
4.4 Análises filogenéticas.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1 Composição bromatológica da torta de filtro estocada por 40 dias	18
5.2 Diversidade microbiana da torta de filtro e atribuição de papéis funcionais	20
5.3 Relação entre perfil taxonômico e funcional em microbiomas com elevada disponibilidade de biomassa vegetal.....	32
5.4 Montagem de <i>scaffolds</i> , predição das ORFs e identificação de táxons microbianos envolvidos na despolimerização da biomassa vegetal	37
5.5 Visão geral sobre as principais vias de degradação da lignocelulose e ciclos biogeoquímicos o nitrogênio e metano na FC40.....	58
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS.....	67

COMPOSIÇÃO FUNCIONAL E TAXONÔMICA DE ENZIMAS CARBOHIDRASES QUE ATUAM NA DESCONSTRUÇÃO DA LIGNOCELULOSE DE TORTA DE FILTRO

RESUMO - A torta de filtro apresenta bagaço residual oriundo do processo de extração do caldo de cana-de-açúcar e quando armazenada por longos períodos, se torna um *habitat* ideal para o desenvolvimento de comunidades microbianas que atuam na desconstrução da lignocelulose. Nossas análises de dados de sequenciamento de DNA metagenômico sugerem que a torta de filtro armazenada por 40 dias possui uma microbiota com características funcionais e ecológicas exclusivas em relação a outros ambientes com elevada disposição de material lignocelulósico. Assim como em ambientes de compostagem, os filos mais abundantes são Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Dentre os principais genes que estes micro-organismos possuem, estão Glicosiltransferases, Carboidrato Esterases e Glicosil Hidrolases, que atuando em conjunto, são passíveis de desconstruírem a lignocelulose e participarem na liberação de açúcares menores, ácidos orgânicos e outros nutrientes. Neste trabalho, identificamos novas enzimas da família AA10 que oxidam a celulose cristalina, demonstrando o potencial deste ambiente em possibilitar a adaptação de micro-organismos que expressam enzimas capazes de desestruturar a celulose altamente condensada, possibilitando a liberação de moléculas de glicose. A comunidade microbiana pode acessar nutrientes como Fósforo e Nitrogênio através da despolimerização da biomassa vegetal ou decomposição da microbiota morta. No ciclo biogeoquímico do nitrogênio, a evaporação de amônia é reduzida pela assimilação desta substância pela comunidade microbiana, sendo que a amônia é produzida pela via de amonificação de nitrato e nitrito. Outro ciclo biogeoquímico identificado na torta de filtro foi o do carbono, ocorrendo diminuição da emissão de metano e gás carbônico devido ao uso destas moléculas no metabolismo microbiano. Por apresentar muitas espécies de micro-organismos termofílicos e funções ecológicas similares a compostagens que alcançaram fase termofílica, a torta de filtro armazenada por 40 dias não aparenta conter micro-organismos patogênicos em elevada abundância, o que poderia ser um indício de sua segurança biológica se usado como adubo no solo. No entanto, recomenda-se que novos estudos sejam realizados neste tipo de ambiente agrícola, afim de avaliar como se comportam principalmente os fungos *Neosartorya fumigata* e *Paracoccidioides brasiliensis*, os quais são identificados como agentes patogênicos mas que também são encontrados vivendo na natureza como organismos saprofíticos e em interação com alguns mamíferos, sem causar doença.

Palavras-chave: Actinobacteria, Archaea, Atividades Auxiliares (AAs), Bioetanol, Celulose cristalina, Hemicelulose

FUNCTIONAL AND TAXONOMIC COMPOSITION OF CARBOHYDRATES ENZYMES THAT ACT IN THE DECLINE OF LIGNOCELLULOSE OF FILTER CAKE

ABSTRACT - The filter cake presents residual bagasse from the process of extracting the sugarcane juice and when stored for long periods, it becomes an ideal *habitat* for the development of microbial communities that act in the deconstruction of lignocellulose. Our analyzes of metagenomic DNA sequencing data suggest that the filter cake stored for 40 days has a microbiota with unique functional and ecological characteristics compared to other environments with high lignocellulosic material. Thus in composting environments, the most abundant phyla are Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes. Glycosyltransferases, Carbohydrate Estersases and Glycoside Hydrolases, which act together, are capable of deconstructing lignocellulose and participate in the release of smaller sugars, organic acids and other nutrients. In this work, we identify new enzymes of the AA10 family that oxidize crystalline cellulose, demonstrating the potential of this environment to enable the adaptation of microorganisms that express enzymes capable of destabilizing highly condensed cellulose, allowing the release of glucose molecules. The microbial community can access nutrients such as Phosphorus and Nitrogen through the depolymerization of the plant biomass or decomposition of the dead microbiota. In the biogeochemical cycle of nitrogen, the evaporation of ammonia is reduced by the assimilation of this substance by the microbial community, and ammonia is produced by ammonification of nitrate and nitrite. Another biogeochemical cycle identified in the filter cake was that of carbon, with a decrease in the emission of methane and carbon dioxide due to the use of these molecules in microbial metabolism. Because it contains many species of thermophilic microorganisms and ecological functions similar to composting that reached the thermophilic phase, the filter cake stored for 40 days does not appear to contain pathogenic microorganisms in high abundance, which could be an indication of its biological safety if used as soil fertilizer. However, it is recommended that new studies be carried out in this type of agricultural environment, in order to evaluate the behavior of the fungi *Neosartorya fumigata* and *Paracoccidioides brasiliensis*, which are identified as pathogens but are also found living in nature as saprophytic organisms and in interaction with some mammals, without causing disease.

Keywords: Actinobacteria, Archaea, Auxiliary Activities (AAs), Bioethanol, Crystalline cellulose, Hemicellulose

LISTA DE ABREVIATURAS

aa = aminoácidos

AA = Atividade Auxiliares

AICc = *Akaike Information Criterion correction*

ANDA = Associação Nacional para Difusão de Adubos

Ca = cálcio

CAZy = Carbohydrate-Active enZYmes Database

CAZymes = Carbohydrate-Active Enzymes

CE = Carboidrato Esterases

CETESB = Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CL = Celulose

CONAB = Companhia Nacional de Abastecimento

CONAMA = Conselho Nacional do Meio Ambiente

dbCAN = DataBase for automated Carbohydrate-active enzyme Annotation

g = gramas

GH = Glicosil Hidrolases

Gpb = giga pares de base

GT = Glicosiltransferases

LPOMs = Monooxygenases de Polissacarídeos Líticas

HM = Hemicelulose

K = potássio

kg = quilogramas

LG = Lignina

mg = miligramas

mL = mililitros

MO = matéria orgânica

MS = Matéria Seca

MM = Matéria Mineral

PB = Proteína Bruta

N = nitrogênio

NCBI = National Center for Biotechnology Information

°C = graus Celsius

ORFs = *Open Reading Frame*

P = fósforo

pb = pares de bases

PL = Polissacarídeo Lases

Proálcool = Programa Nacional do Álcool

Qphred = qualidade Phred

SRA = Sequence Read Archive

UNICA = União da Indústria de Cana-de-Açúcar

UV = ultra violeta

FC40 = Torta de Filtro armazenada por 40 dias

RSA = Consórcio Microbiano Adaptado com Palha de Arroz

ZC1 = Compostagem de resíduos do Zoológico de São Paulo com 8 dias de idade

ZC2 = Compostagem de resíduos do Zoológico de São Paulo com 60 dias de idade

SLMF = Floresta Subtropical da Base da Montanha

TCF = Floresta Temperada de Coníferas

TSF = Floresta Tropical/Subtropical

1. INTRODUÇÃO

Estudos de taxonomia realizados durante os anos em compostagens permitiram descobrir que de maneira geral existem aproximadamente 2.000 espécies bacterianas neste ambiente (PARTANEN et al., 2010; MARTINS et al., 2013). Em ambientes de compostagens que alcançaram a fase tardia (aproximadamente 30 dias), geralmente os três filos mais abundantes são Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes (TAKEBAYASHI et al., 2007; PARTANEN et al., 2010; WANG et al., 2016).

Uma vez que o uso de um produto que sofra alteração na estrutura de comunidades microbianas precisa apresentar segurança biológica para seu uso no ambiente é fundamental que sejam realizados estudos sobre sua composição microbiana para atestar sua segurança biológica (CHRONI et al., 2009; PARTANEN et al., 2010; MARTINS et al., 2013). No entanto, embora existam muitos estudos avaliando a aplicação segura da torta de filtro no solo, eles não exploram profundamente em nível molecular a diversidade microbiana presente neste resíduo, principalmente em torta de filtro que ficou estocada por longos períodos e que certamente passou por mudanças físicas, químicas e microbiológicas. De certa forma, isto pode levantar questionamentos acerca da segurança biológica deste produto e a sua disposição no ambiente como um agente para adubação. Geralmente, os trabalhos focam em explorar a microbiota de forma indireta, onde a partir de análises de solo/resíduos aferem a diversidade microbiana com uso de abordagens baseadas em respirometria, isolamento de cepas e análise físico-químicas (SÁNCHEZ-MONEDERO et al., 2001; GÓMEZ et al., 2006; CHRONI et al., 2009; LOU e NAIR, 2009), quando na verdade deveriam ser empregados também estudos em nível molecular, como por exemplo a metagenômica.

Do ponto de vista microbiano, mesmo apresentando menor estimativa de diversidade em relação ao solo, ambientes de compostagens são fontes inesgotáveis de enzimas microbianas, principalmente aquelas relacionadas a despolimerização da biomassa vegetal (PARTANEN et al., 2010; MARTINS et al., 2013; WANG et al., 2016). Neste sentido, por ser um ambiente ainda pouco explorado para tais finalidades, a torta de filtro pode conter enzimas com atividade lignocelulolíticas ainda

desconhecidas pela ciência. No entanto, o fator determinante para se estimar a presença de tais enzimas é o fato de que em algumas unidades produtivas de menor a médio porte é comum haver o estoque da torta de filtro na base úmida que não pode ser incorporada de imediato no solo, pois todas as áreas de plantio já tiveram a adição de torta de filtro necessária a reposição de nutrientes. Nesta situação, a torta de filtro na base úmida pode ficar estocada por mais 60 dias antes de seu uso com finalidades de adubação do solo, ocorrendo perda natural da umidade e intensificação da atividade microbiana nativa.

A busca por enzimas com atividade lignocelulolítica se deve ao fato de serem necessárias a produção de bioetanol, o qual deve substituir os combustíveis oriundos de fontes não renováveis de energia devido ao risco de escassez das jazidas de petróleo no mundo. Para a produção de etanol a partir de fontes vegetais são preferencialmente usadas duas metodologias para o pré-tratamento da biomassa vegetal: o uso de agentes físico-químicos para o rompimento da lignina e liberação da hemicelulose e celulose e, a seguir, o uso de enzimas microbianas ou microrganismos específicos para a obtenção dos açúcares fermentescíveis. Embora não seja totalmente viável, o uso de enzimas microbianas apresenta inúmeras vantagens em relação ao uso de agentes físico-químicos, sendo as três principais a eliminação da etapa de neutralização de agentes químicos intermediários oriundos do processo e que são danosos as peças dos veículos e ao ambiente, o aumento na recuperação de açúcares fermentescíveis e a consequente redução de custos (ADITIYA et al., 2016). Tanto o emprego de tratamentos físico-químicos bem como o emprego de enzimas microbianas no pré-tratamento da biomassa vegetal são necessários à superação da recalcitrância da lignocelulose, a qual é relacionada a paracristalinidade da celulose, complexidade molecular do revestimento da hemicelulose sobre as microfibrilas de celulose e a interpenetração e encapsulamento de componentes polissacarídeos pela lignina (CRAGG et al., 2015). Deste modo, as comunidade microbianas oriundas de resíduos agroindustriais são adaptadas a tais condições e por isso são capazes de produzir enzimas despolimerizadoras da lignocelulose extremamente eficientes sob condições fisiologicamente toleráveis (SÁNCHEZ, 2009; MHUANTONG et al., 2015; WANG et al., 2016).

Segundo dados coletados na usina Santa Fé S.A. que administra a Fazenda Itaquerê, em 2012 foram moídas 114.229,548 toneladas de cana-de-açúcar com produção de 37,93 kg de torta de filtro por tonelada de cana-de-açúcar moída. Na lavoura de cana-de-açúcar da Fazenda Itaquerê, a torta de filtro pode ser usada na base úmida para devolver nutrientes (fósforo principalmente) e umidade ao solo, principalmente em períodos secos como no inverno. Entretanto, ela também é usada na base seca, onde pode ficar armazenada por até 2 meses a partir da primeira semana de dezembro e início do mês de fevereiro. Quando armazenada, a torta de filtro permanece amontoadada em pilhas de forma desuniforme, uma vez que a quantidade de torta de filtro armazenada é uma “pequena” parte que sobra do montante que é aplicado nas áreas de plantio. Com este armazenamento, as condições nutricionais e de umidade da torta de filtro pode fornecer condições ideais ao desenvolvimento de micro-organismos nativos, sendo que na usina é relatado o desenvolvimento da fase termofílica e estacionária, esta última sendo detectada pela visualização de fungos brancos que se desenvolvem na superfície das pilhas.

Neste trabalho, demonstrou-se que a torta de filtro armazenada por 40 dias abriga micro-organismos capazes de atuar em todas as etapas da desconstrução da biomassa vegetal. Estes micro-organismos apresentam um conjunto de enzimas chave que permitem aos táxons microbianos sobreviverem a etapas críticas, similares às mudanças entre as fases mesofílicas-termofílicas-estacionária presentes em uma compostagem. Além disto, muitos táxons microbianos pertencentes a Actinobacteria e Proteobacteria, podem auxiliar na ciclagem de nutrientes neste ambiente, permitindo a comunidade microbiana acessar fontes de carbono e nitrogênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento do setor sucroenergético no Brasil

A partir da década de 1930, houve um incentivo a modernização do setor sucroalcooleiro nacional, o qual, passava por sérios problemas a época. Devido a crise do petróleo na década de 1970, o incentivo ao setor foi mais agressivo, uma vez que atrelado a elevação dos preços do barril do petróleo pelos países árabes, foi introduzido o conhecimento do risco iminente ao esgotamento das fontes desse combustível fóssil (OMORI et al., 2011). Por estas razões, os países começaram uma busca contínua por novas fontes de energia limpa, a qual dura até o momento. Dentre todos os benefícios alavancados pelo Programa Nacional do Álcool (Proálcool), o maior foi a modernização da indústria nacional e de seus processos (PAULILLO et al., 2007). Dessa forma, o Brasil pode formular estratégias para diminuir a dependência do petróleo estrangeiro a partir do aperfeiçoamento dos processos existentes, os quais envolviam a fabricação de etanol derivado da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e ainda, melhorar a fabricação do açúcar brasileiro (VEIGA FILHO e RAMOS, 2006; OMORI et al., 2011).

Segundo a União da Indústria de Cana de Açúcar (UNICA), até o momento na safra 2017/2018, o Brasil moeu um total de 585.000 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, apresentando projeção em produzir 35,2 milhões de toneladas de açúcar e 24,70 bilhões de litros de etanol (hidratado e anidro). Até a primeira quinzena de outubro, somente no estado de São Paulo houve moagem de 299.248 mil toneladas de cana-de-açúcar, com produção de 21.286 mil toneladas de açúcar e 10.686 milhões de litros de etanol hidratado e anidro (UNICA, 2017). Em termos de área plantada, São Paulo totaliza 52 % do total de 9.004,5 mil hectares tendo sofrido expansão na área de plantio de 133,7 mil hectares na temporada 2014/15 (CONAB, 2017).

2.2 Caracterização da torta de filtro e seu uso *in natura* e na compostagem

Na fabricação do açúcar, a clarificação do caldo extraído da cana-de-açúcar gera um resíduo conhecido como torta de filtro que é rico em matéria orgânica, fósforo, umidade (80 %), nitrogênio, cálcio e outros minerais. Além disto, este subproduto apresenta particulado residual de bagaço da cana-de-açúcar advindo do processo de moagem e extração do caldo (De FRAVET et al., 2010). Assim como a vinhaça, este resíduo pode ser utilizado como substituto de adubos químicos devido a sua riqueza nutricional. Muitos países utilizam a torta de filtro na adubação de solos, a qual é produzida na ordem de 30-40 kg por tonelada de cana-de-açúcar moída. Quando aplicada *in natura* no solo de áreas destinadas ao plantio de cana-de-açúcar, verifica-se aumento da produção da lavoura, o que é relacionado a melhora das características e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. No Brasil, recomenda-se aplicações entre 80 e 100 toneladas por hectare de torta de filtro no plantio. Além disso, a torta de filtro também pode ser utilizada na compostagem e, com o término do processo, o produto orgânico estabilizado pode ser aplicado no solo, atuando na reposição de nutrientes (PRADO et al., 2013).

Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), em 2014 foram entregues ao consumidor final brasileiro 32,2 milhões de toneladas de fertilizantes (nitrogenados, fosfatados e potássico) o que representa um aumento aproximado de 9,17 % em relação a 2012 (ANDA, 2015). Dos constituintes minerais mais importantes e mais caros, o fósforo é o que apresenta maior abundância na torta de filtro, sendo por isso muito usada como repositor deste elemento no solo, uma vez que solos tropicais apresentam baixa disponibilidade natural de fósforo (PERÉZ et al., 2007; de-BASHAN et al., 2012; BENEDUZI et al., 2013) devido a sua alta capacidade de adsorção aos colóides do solo e precipitação conjunta com óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio (PRADO et al., 2013).

Justamente por aumentar a disponibilidade de macronutrientes e micronutrientes importantes à absorção das plantas, além de estabilizar o composto através da redução na quantidade de micro-organismos patogênicos, a compostagem tem atraído atenção. A disposição final de lixo urbano e agroindustrial de forma que não ocorra a degradação do meio ambiente e da saúde humana é um procedimento

ideal, sendo esta operação prevista em lei por diversos países (SÁNCHEZ, 2009; PARTANEN et al., 2010; COTTA et al., 2015).

A compostagem é uma técnica que visa reciclar resíduos orgânicos em geral, como os produzidos na agroindústria, obtendo ao final do processo um composto com propriedades fertilizante agrícola e/ou corretor de solos degradados. Durante o processo, temperaturas muito elevadas são atingidas e, por este motivo, ocorre redução de micro-organismos patogênicos no processo (HECK et al., 2013). Esta característica permite que a qualidade microbiológica necessária do composto seja atingida, o que atende a Resolução 380/2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (CONAMA, 2006). Muitos trabalhos avaliam o desempenho do processo e qualidade microbiológica do composto, porém, em sua maioria, são estudos voltados à detecção de alguns indivíduos de determinada população patogênica, os quais inclusive podem ser favorecidos quando são usados métodos tradicionais de cultivo (GONÇALVES e MARIN, 2007; HAHN et al., 2012; HECK et al., 2013). Desta forma, tais estudos não consideram a grande porcentagem de micro-organismos que compõem os indivíduos não cultivados nas amostras, os quais só podem ser acessados por técnicas independentes de cultivo como a metagenômica (VOGEL et al., 2009; LEE e LEE, 2013).

2.3 Alterações no perfil de táxons microbianos com o amadurecimento da compostagem

De maneira geral um processo de compostagem é menos diverso do que o solo sendo identificadas um pouco mais de 2.000 espécies bacterianas (PARTANEN et al., 2010; MARTINS et al., 2013). Tal estimativa de diversidade é muito aquém do que se espera conter no solo, uma vez que um grama de solo contém entre 2.000 e 8,3 milhões de espécies procarióticas (GANS et al., 2005; SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006) e 1.000 gigapares de bases (Gpb) de sequências referentes a genomas microbianos (VOGEL et al., 2009). As características e qualidade do composto orgânico gerado ao final da compostagem depende de vários fatores, como condições de aeração, presença de misturas de substâncias complexas (presença de lixo urbano), composição de nutrientes, pH e temperatura. Quando esses fatores não

seguem um padrão próximo à idealidade, verifica-se a ineficiência na degradação da biomassa pela comunidade microbiana em compostagens contendo carcaças de animais e lixo urbano, resultando em um material imaturo mesmo após o alcance de fases tardias da compostagem (PARTANEN et al., 2010).

Basicamente existem três fases que uma compostagem passa até atingir sua maturação estando divididas entre inicial, intermediária e estacionária. Micro-organismos mesofílicos são observados no início do processo de compostagem, os quais assimilam fontes de carbono prontamente disponíveis e solúveis, tais como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos (PARTANEN et al., 2010). Devido as reações metabólicas exotérmicas, existe a liberação de calor, fazendo com que sejam atingidas temperaturas próximas a 40 graus Celsius (°C) e sinalize o final da fase inicial. Nesse momento, micro-organismos mesofílicos são inibidos quanto ao crescimento e, os endósporos de fungos e bactérias termofílicas são estimulados a germinar. Na fase termofílica, para compostagem de misturas de resíduos vegetais, as fontes de carbono facilmente assimiláveis já se esgotaram, restando polissacarídeos que fazem parte da constituição da biomassa, como celulose, hemicelulose e pectina, cuja degradação requer ação conjunta de enzimas extracelulares, ocasionando a elevação da temperatura para próximo de 70 °C (GOMES et al., 2007; VALENTE et al., 2009). Nesta fase, o esgotamento de moléculas facilmente assimiláveis e a presença massiva de lignocelulose contribuem para o aumento da recalcitrância do meio, tornando necessária a proliferação de micro-organismos que secretem enzimas capazes de superar esta barreira natural e tornar possível o acesso a estruturas de ácidos orgânicos, nitrogênio, polissacarídeos, dissacarídeos e monossacarídeos que compõem a biomassa vegetal (ZHAO et al., 2012; MARTINS et al., 2013; MHUANTONG et al., 2015; WANG et al., 2016). A recalcitrância da lignocelulose se dá por vários motivos, sendo os principais relacionados a paracristalinidade da celulose, complexidade molecular do revestimento da hemicelulose sobre as microfibrilas de celulose e a interpenetração e encapsulamento de componentes polissacarídeos devido a presença da lignina (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010; CRAGG et al., 2015).

2.4 Características físico-químicas e composição estrutural da lignocelulose

O bagaço da cana-de-açúcar apresenta cerca de 40-50 % de celulose, 25-35 % de hemicelulose e 15-35 % de lignina em sua constituição, além de conter pectina, amido, lipídeos, proteínas, dentre outros (de VRIES e VISSER, 2001; BIAN et al., 2012). A hemicelulose é um polímero complexo que forma a parede celular vegetal, o qual forma ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina, principalmente com as cadeias de éter benzílico. Além disto, a hemicelulose pode fazer outros tipos de ligações com a lignina, como as do tipo éster quando ocorre interações entre unidades acetil e de ácidos hidroxicinâmicos, o que fortalece a rigidez e maximiza a interação da hemicelulose com a matriz da parede celular (FAZILAH et al., 2009).

A celulose é um polímero linear que é constituído unicamente de unidades de glicose que se unem por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Por apresentar configuração linear, a glicose pode ser empacotada em numerosas cadeias de celulose até tomarem forma de fibrilas cristalinas. Esta forma de fibrila cristalina é extremamente estável devido a existência de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals entre as unidades de glicose vizinhas. Além disto, a elevada compactação das moléculas de glicose conferem a celulose alto peso molecular, fator este que resulta na insolubilidade da celulose em água (BRANDT et al., 2013). A hidrólise incompleta de celulose gera moléculas com duas subunidades de glicose, que constitui a celobiose, estrutura que sempre é verificada em soluções que envolvam a despolimerização de biomassa vegetal (MICHLMAYR e KNEIFEL, 2014).

A hemicelulose interage intensamente com a lignina, que por se encontrar envolvendo a hemicelulose, maximiza a resistência da fibra vegetal e dificulta o acesso de enzimas despolimerizadoras a esta estrutura. Dentre os açúcares neutros, a xilose é um dos principais componentes da hemicelulose (83,1-84,6 %), coexistindo com arabinose (11,0-12,1 %) e menores quantidades de glicose (2,1-3,1 %), ácidos urônicos (1,4-2,6 %) e galactose (0,5-0,7 %) (BIAN et al., 2012). O principal polímero que constitui a hemicelulose é a xilana que consiste em um esqueleto formado por monômeros de D-xilose unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e pode apresentar diferentes

cadeias laterais, tais como resíduos de L-arabinose, D-galactose, acetil, feruloyl, *p*-cumarilo e ácido glucorônico. Galactomananas e galactoglucomananas formam o segundo grupo com maior identificação na hemicelulose. Galactomananas consistem em um esqueleto de resíduos de D-manose unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, podendo ser substituídos por resíduos de D-galactose unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$. Galactoglucomanas consistem em um esqueleto de D-manose e D-glicose que formam ligações $\beta(1\rightarrow4)$ com grupos laterais de D-galactose (de VRIES e VISSER, 2001).

Caracterizado como um polímero fenólico ou polímero aromático amorfo, a lignina é encontrada na lamela média de vegetais vasculares. A lignina confere rigidez e resistência a parede celular dos vegetais, permitindo a planta tolerar ataques de patógenos e outros danos físicos. Esse polímero é sintetizado a partir de três monômeros, álcoois coniferil, sinapil e *p*-coumaril (DEOBALD et al., 2002). Após a incorporação destes monômeros na lignina, as subunidades são identificadas pela estrutura de anel aromático e agora são chamadas guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil. A diferença na composição destas três estruturas tem grande efeito sobre a rigidez da parede celular conferida pela lignina, sendo portanto um fator importante para a despolimerização da lignocelulose. As unidades de guaiacil são mais propensas a efetuarem ligações cruzadas de C-C na posição C-5 do anel, enquanto que a posição C-5 do anel da unidade de siringil está substituída, não podendo participar de reações de substituições. A lignina de madeira macia é constituída quase que exclusivamente de unidades de guaiacil e, por isto, existem muitas ligações do tipo cruzada C-C entre estas unidades. Desta forma, como ligações cruzadas C-C não podem ser hidrolisadas por ação de ácidos e bases, a despolimerização de madeira macia é mais difícil do que a despolimerização de carvalho e gramíneas (BRANDT et al., 2013).

Considerado um heteropolissacarídeo coloidal e hidrossolúvel em água, a pectina tem função aglutinante em tecidos vegetais estando localizada na lamela média da parede celular vegetal. A pectina junto da celulose, lignina e hemicelulose contribui para a resistência da parede celular vegetal, sendo que a pectina apresenta ramificações e seu esqueleto consiste de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. Nas regiões que apresentem especificamente ramificações, o esqueleto de ácido galacturônico é interrompido por resíduos de L-ramnose e fazem

ligações $\alpha(1\rightarrow2)$. Além disto, os resíduos de L-ramnose podem estar ligados a longas cadeias laterais que são constituídas principalmente de L-arabinose e D-galactose, podendo ocorrer a presença de ácido felúrico (de VRIES e VISSER, 2001).

Desta forma, fica evidente que os constituintes da pectina, hemicelulose, celulose e lignina são fontes de hexoses, pentoses e ácidos orgânicos variados, os quais podem ser usados pelos micro-organismos em seus metabolismos para produção de energia e manutenção de funções básicas das células.

2.5 Enzimas com atividade lignocelulolítica e aplicação na produção de bioetanol

Embora as características físico-químicas da biomassa vegetal criem barreiras naturais que dificultam a ação de enzimas que atuam sobre carboidratos, a ação sinérgica destas enzimas expressas pelos micro-organismos são altamente eficazes em desconstruir a lignocelulose sob condições fisiologicamente toleráveis (CRAGG et al., 2015). De fato, os carboidratos podem ocorrer na natureza em uma ampla gama de combinações o que ocorre devido a grande variedade estereoquímica dos grupos hidroxila, permitindo a ligação entre grupos de monossacarídeos que podem formar oligossacarídeos e polissacarídeos. Desta forma, carboidratos complexos são precursores de múltiplas reações biológicas nos seres vivos, intermediando metabolismo de reserva de carbono, desempenho de papéis como moléculas estruturais, ação como moléculas de reconhecimento de sinais intracelular e moléculas de reconhecimento de troca de sinais entre organismos. A diversidade de carboidratos complexos é controlada pelas enzimas Glicosiltransferases (GT), as quais estão envolvidas na montagem destas estruturas e, a degradação de tais moléculas, é realizada pelas Glicosil Hidrolases (GH), Polissacarídeo Liasas (PL) e Carboidrato Esterases (CE) (LOMBARD et al., 2014).

Os organismos possuem inúmeros mecanismos capazes de despolimerizar a lignocelulose, sendo os mais conhecidos ação oxidativa, produção de hemicelulases e celulases (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). Recentemente foi descoberto um novo grupo de enzimas que podem clivar as ligações de polissacarídeos e são denominadas Monooxigenases de Polissacarídeos Líticas (LPOMs). Este grupo de

enzimas integram uma família de enzimas denominadas enzimas de Atividade Auxiliares (AA) e através da ação oxidativa direta à cadeia de polímeros de lignocelulose, podem superar a recalcitrância da fibra vegetal e abrir fissuras nesta estrutura complexa, o que permite a ação conjunta as GHs, PLs e CEs na desconstrução da fibra vegetal e liberação de estruturas menos complexas (KJAERGAARD et al., 2014; CRAGG et al., 2015). Além disto, outro mecanismo de ação usado na desconstrução da celulose é o não enzimático, onde através da reação de Fenton dependente de ferro os fungos podem degradar a madeira durante o desenvolvimento da podridão marrom (ARANTES et al., 2014).

Enzimas capazes de desconstruir a lignocelulose apresentam ampla aplicação na produção de bioetanol, pois a partir da disponibilização de açúcares, outras enzimas microbianas podem atuar na produção de etanol através da fermentação. A busca por enzimas com atividade lignocelulolítica se deve ao fato de serem necessárias à produção de bioetanol, o combustível renovável que deverá substituir os combustíveis oriundos de fontes não renováveis de energia devido ao risco de escassez das jazidas de petróleo no mundo. Antes de iniciar a fase de fermentação dos açúcares oriundos da biomassa vegetal é necessário a realização do pré-tratamento das fontes vegetais (ADITIYA et al., 2016). Este tratamento tem como finalidade desconstruir a fibra vegetal, permitindo liberar porções da hemicelulose e celulose, as quais podem originar grande quantidade de açúcares que podem ser usados na fermentação e obtenção de etanol. São usadas duas metodologias para o pré-tratamento da biomassa vegetal: o uso de agentes físico-químicos e o uso de enzimas microbianas (CRAGG et al., 2015).

O uso de enzimas microbianas apresenta inúmeras vantagens em relação ao uso de agentes físico-químicos, sendo as três principais a eliminação da etapa de neutralização de agentes químicos intermediários oriundos do processo e que são danosos as peças dos veículos e ao ambiente, o aumento na recuperação de açúcares fermentescíveis e a consequente redução de custos (ADITIYA et al., 2016). Entretanto, alguns desafios ainda precisam ser superados para que a produção de bioetanol seja implementada em larga escala e de forma competitiva, sendo imprescindíveis ações que visem reduzir o custo de produção enzimática, o escalonamento efetivo da produção de coquetéis (de mg para toneladas) bem como

a otimização da composição enzimática para aumento da eficiência de ação enzimática que será possível através da realização de novas descobertas e caracterização cinética de novas enzimas (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012).

Uma vez que algumas unidades de produção de cana-de-açúcar podem estocar grandes quantidades de torta de filtro por volta de 60 dias, estas pilhas de torta de filtro expostas ao ambiente podem naturalmente permitir o desenvolvimento de processos de degradação da biomassa vegetal por ação da microbiota nativa, que por apresentar características ambientais similares a compostagens (GOMES et al., 2007; VALENTE et al., 2009; PRADO et al., 2013), pode encadear condições não ideais, como proliferação de micro-organismos patogênicos e perdas nutricionais (MARTINS et al., 2013).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como finalidade avaliar *in silico* a presença de genes relacionados a desconstrução de componentes da biomassa vegetal e táxons participantes de ciclos biogeoquímicos em torta de filtro estocada por 40 dias.

3.1 Objetivos específicos

1) devido à ausência de carcaças de animais, existe baixa prevalência de organismos patogênicos, pois com as elevadas temperaturas que são atingidas naturalmente com o avanço do dia 1 até 40, estes podem ser inibidos quanto ao crescimento;

2) por este motivo, existe a prevalência de grupos de organismos benéficos ao sistema de plantio da agroindústria, o que acarreta em adição de micro-organismos que auxiliam na ciclagem de nutrientes no solo;

3) devido a presença de celulose, hemicelulose e lignina, a torta de filtro armazenada por longos períodos pode ser um celeiro de micro-organismos que atuam ativamente na degradação destes componentes, o que representa disponibilidade de nutrientes a toda comunidade microbiana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas (LBMP), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV) da UNESP. As técnicas usadas neste trabalho não oferecem riscos para o meio ambiente e a saúde humana, enquadrando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

4.1 Coleta de amostra e extração de DNA

Duas amostras foram coletadas da superfície da pilha de torta de filtro (primeiros 20 centímetros [cm], aproximadamente 393 mL) que tinha aproximadamente 40 dias de armazenamento. A coleta ocorreu na Fazenda Itaquerê localizada na cidade de Nova Europa (21°49'08.3"S e 48°36'51.4"W), interior de São Paulo (Brasil) em Janeiro de 2013. Na região de Nova Europa, a temperatura média do mês de janeiro de 2013 foi de 25,21 °C e a precipitação média do mesmo mês foi de 282,40 mm. Segundo a classificação de Köeppen, a região de Nova Europa está relacionada ao tipo Aw, que é caracterizado pelo clima tropical chuvoso (chuvas no verão) com inverno seco e mês mais frio com temperatura média superior a 18 °C.

Após a coleta aleatória dos dois pontos, as amostras foram transportadas imediatamente ao laboratório. Após homogeneização das amostras em *pool*, foram pesados 250 miligramas (mg) de amostra para extração do DNA metagenômico total usando *Fast DNA® kit for Soil* (MP Biomedical, LLC), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e concentração do DNA foi analisado por *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific – Uniscience) e *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies) com *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit* (Invitrogen®), seguindo-se as recomendações dos fabricantes. Uma parcela da amostra foi encaminhada para análise bromatológica no Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-SP, seguindo protocolo pré-estabelecido (SILVA e QUEIROZ, 2002). A coluna usada para análise de proteínas foi LECO FP528.

4.2 Sequenciamento Illumina HiScanSQ

A biblioteca de DNA metagenômico foi preparada de acordo com o protocolo *TruSeq® DNA Sample Preparation v2* (Illumina®), conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento da biblioteca *shotgun* da torta de filtro (~1 µg de DNA) foi realizado em plataforma Illumina®, equipamento HiScanSQ com uso dos kits *Paired-End Cluster Generation Kit v3* (Illumina®) e *TruSeq™ SBS Kit v3 - 200 Cycles* (Illumina®), seguindo as recomendações do fabricante.

4.3 Trimagem dos dados e análises de bioinformática

Para realizar-se as análises de abundância taxonômica e de perfil funcional da comunidade microbiana da torta de filtro, submeteu-se os dados brutos do sequenciamento *paired-end* para processamento no *pipeline* automático (*default*) do servidor *on-line* de análises metagenômicas MG-RAST v.4.0 (MEYER et al., 2008). As sequências com tamanho médio de 113 pares de base (pb) foram analisadas por busca de similaridade entre sequências nos bancos de dados de proteínas do GenBank e Subsystems (nível 2 e 3), com identidade mínima de 60 %, corte de *e-value* mínimo 10^{-5} , alinhamento de pelo menos 30 aminoácidos (aa) e contagem maior que 100 *hits* (abril de 2017). Os gráficos de comparação entre os ambientes de torta de filtro, compostagens e solo de florestas disponíveis no MG-RAST foram gerados no Stamp v.2.1.3 (PARKS et al., 2014) e METAGENassist (ARNDT et al., 2012), sendo desconsiderados em ambas análises sequências identificadas como não classificadas. Antes da realização das análises, os dados gerados pelo MG-RAST foram normalizados para 25.000.000 de sequências, aplicando-se a fórmula abaixo:

$$NAMB = \left(\frac{25.000.000}{\sum AMB} \right) \times ABF$$

Onde:

NAMB = Normalização por ambiente

$\sum AMB$ = Soma de todos os táxons/vias do ambiente

ABF = Abundância individual de cada táxons/via identificada no ambiente

Os gráficos de Análise de Componentes Principais (PCA) gerados com Stamp tiveram aplicação de *Multiple Test Correction Benjamini-Hochberg FDR* e observação de características que apresentaram *q-value* < 0,001 %. Para as análises no METAGENassist usou-se distância de Pearson, normalização das colunas com log2, algoritmo de clusterização Ward e aplicação de T-test/ANOVA. Para comparar as diferenças nas abundâncias dos táxons microbianos presente entre a torta de filtro e outros ambientes, usou-se os dados de sequenciamento públicos disponíveis no MG-RAST. Todos os índices de diversidade e riqueza de espécies foram calculados com PAST v.3.17 (HAMMER et al., 2001). Os acessos são 4529793.3 (torta de filtro com 40 dias de armazenamento, FC40, dados privados), 4513787.3 (compostagem de microbiota adaptada a palha de arroz, RSA), 4479361.3 (compostagem de resíduos do zoológico, ZC1, oito dias de compostagem), 4479944.3 (compostagem de resíduos do zoológico, ZC2, 60 dias de compostagem), 4477876.3 (solo de floresta de conífera 1, TCF1), 4477877.3 (solo de floresta de conífera 2, TCF2), 4477899.3 (solo de floresta de conífera 3, TCF3), 4477807.3 (solo de floresta tropical/subtropical, TSF), 4446153.3 (solo de floresta subtropical da base da montanha, SLMF).

Para filtragem de adaptadores na posição 3' usou-se Scythe v.0.991 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>) e, para posição 5', Cutadapt v.1.7.1 (MARTIN, 2011). Prinseq-lite stand-alone v.0.20.4 (SCHMIEDER e EDWARDS, 2011) foi usado para aparar as *reads* de baixa qualidade Phred (Qphred<20) e comprimento menor do que 50 pb. Para montagem de *scaffolds*, submeteu-se as *reads* restantes ao montador IDBA-UD v.1.1.1 (PENG et al., 2012). A seguir, para fechar *gaps* e aumentar a extensão dos *scaffolds*, usou-se GapFiller v.1.10 (BOETZER e PIROVANO, 2012) e CAP3 (HUANG e MADAN, 1999). Os *scaffolds* foram submetidos a predição das *Open Reading Frame* (ORFs) usando MetaProdigal v.2.6.1 (HYATT et al, 2012). As análises

de controle de qualidade das *reads* dos dados brutos, das *reads* após as etapas de eliminação de sequências indesejáveis e da montagem dos *scaffolds* foram realizadas com MetaQuast v.4.6.0 (MIKHEENKO et al., 2016). Para avaliar a qualidade da montagem, estimou-se a profundidade da cobertura de sequenciamentos através do mapeamento das *reads* contra os *scaffolds* usando Bowtie v.2.2.6 (LANGMEAD e SALZBERG, 2012) e visualizou-se os resultados com SAMtools v.0.1.19 (LI et al., 2009).

As ORFs também foram submetidas para busca por HMMs 5.0 de padrões para famílias de proteínas CAZymes no servidor *on-line* DataBase for automated Carbohydrate-active enzyme Annotation (dbCAN, banco de dados CAZyDB 07/15/2016) (YIN et al., 2012). As sequências fastas das ORFs identificadas para cada família das Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes) foram identificadas quanto a filiação taxonômica (*best hit*) com blastp v.2.2.28+ (ALTSCHUL et al., 1997) contra o banco de dados não redundante de proteínas do Refseq e a taxonomia foi acessada com MEGAN v.6.6.7 (HUSON et al., 2016), conforme informações contidas no banco de dados *Taxonomy* do NCBI (*default*).

4.4 Análises filogenéticas

Todas as sequências da família AA10 foram recuperadas a partir do banco de dados CAZy e, junto de todas as ORFs identificadas desta mesma família na FC40, foi realizado o alinhamento múltiplo de sequências com o programa MAFFT v.7.215 (KATO e STANDLEY, 2013). IQ-TREE v. 1.5.5 (NGUYEN et al., 2015) foi usado para estimar o melhor modelo evolutivo para ajuste das taxas de mutações dos alinhamentos de sequências de aminoácidos, conforme *Akaike Information Criterion correction* AICc. A árvore não enraizada de Máxima Verossimilhança foi construída a partir do modelo evolutivo identificado por AICc, com *bootstrap* para 1.000 réplicas e otimização de Máxima Verossimilhança. Em seguida, o dendrograma foi editado com a ferramenta *on-line* Interactive Tree Of Life (iTOL) (LETUNIC e BORK, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição bromatológica da torta de filtro estocada por 40 dias

A análise da composição bromatológica da torta de filtro estocada por 40 dias (FC40) apresentou 34,50 % de Matéria Mineral (MM), 9,40 % de Lignina (LG), 8,18 % de Hemicelulose (HM) e 25,63 % de Celulose (CL). Estes valores são maiores do que aqueles quantificados em outra amostra de torta de filtro, porém, com exceção da MM e HM, são ligeiramente similares ao que é verificado no bagaço de cana-de-açúcar (LG = 8,04 %, e CL = 30,30 %) (Tabela 1). Os valores verificados para a FC40, provavelmente variaram devido a esta torta de filtro ter ficado armazenada por 40 dias, fazendo com que ela perdesse algumas de suas características originais. Considerando que a torta de filtro é rica em nutrientes e apresenta entre 70-80 % de umidade ao ser produzida na indústria (PRADO et al., 2013), quando estocada por longos períodos estas características podem culminar no desenvolvimento de fases similares às aquelas que ocorrem em uma compostagem (MARTINS et al., 2013). Nestas condições, o metabolismo desenvolvido pela comunidade microbiana presente neste subproduto da fabricação do açúcar acarreta na redução das características nutricionais da torta de filtro fresca conforme ocorre o avanço dos dias. Com isto, assim como ocorre na fase inicial de uma compostagem, açúcares, ácidos orgânicos, polissacarídeos de menor complexidade, etc, podem ser consumidos nos primeiros dias de armazenamento da torta de filtro (PARTANEN et al., 2010) e, com o passar dos dias, ocorre um aumento da disponibilidade de estruturas mais recalcitrantes como a lignocelulose e minerais (CRAGG et al., 2015).

Representando a categoria de carboidratos altamente solúveis, tais como amido, pectina, açúcares, etc, Extrativo Não Nitrogenado (EEN) representou 7,71 % na torta de filtro com 40 dias de armazenamento. Outros componentes tais como macro e micronutrientes, ureia, amônia, amônio, aminoácidos e bases nitrogenadas, foram identificados como Matéria Mineral (MM), Matéria Orgânica (MO) e Proteína Bruta (PB), os quais foram identificados em 34,50 %, 24,15 % e 5,52 % da composição da torta de filtro (Tabela 1), respectivamente. Estes resultados demonstram que a torta

de filtro é um ambiente com potencial de fornecer ampla gama de carboidratos contidos em estruturas complexas como lignocelulose, pectina e amido, todos derivados do bagaço de cana-de-açúcar residual advindo do processo de extração do caldo de cana-de-açúcar (De FRAVET et al., 2010). Além disto, devido a riqueza de MO e PB, o microbioma nativo da torta de filtro pode acessar muitos substratos usados no metabolismo de uréia, amônia, amônio, aminoácidos, bases nitrogenadas, etc (DETMANN e VALADARES FILHO, 2010). Além disto, uma parcela de MO e PB podem ter como fonte a desconstrução da própria biomassa microbiana morta devido a senescência celular (MA et al., 2015), bem como o aumento da Matéria Mineral (MM) ser oriunda do processo de mineralizando da MO do bagaço residual presente na torta de filtro (PRADO et al., 2013; PINTO et al., 2015).

Tabela 1. Composição bromatológica da torta de filtro armazenada por 40 dias e de torta de filtro e bagaço de cana-de-açúcar recuperados da literatura.

Índices	FC40 (%) ^a	Torta de Filtro (%) ^b	Bagaço (%) ^c
Umidade (UM)	41,35	82,42	59,89
Matéria Seca (MS)	58,65	17,58	40,11
Matéria Seca (MS)			
Matéria Mineral/Cinzas (MM)	34,50	3,90	1,22
Matéria Orgânica (MO)	24,15	13,68	38,89
Matéria Orgânica (MO)			
Extrato Etéreo (EE)	0,00	1,06	0,07
Proteína Bruta (PB)	5,52	1,83	2,32
Matéria Fibrosa (MF)	10,92	^d -	-
Extrato Não Nitrogenado (ENN)	7,71	8,75	-
Fibra de Detergente Neutro (FDN)			
Lignina (LG)	9,40	0,98	8,04
Celulose (CL)	25,63	4,11	30,30
Hemicelulose (HM)	8,18	6,55	20,68

^a Torta de filtro estocada por 40 dias

^b Belai et al. (2013)

^c De Carvalho et al. (2006)

^d Dados não declarados

5.2 Diversidade microbiana da torta de filtro e atribuição de papéis funcionais

Segundo dados obtidos pelas análises no servidor do MG-RAST, foram produzidos um total de 27.791.106 *reads paired-end* pelo sequenciamento de DNA metagenômico da FC40, sendo que somente 20.883.203 *reads* foram filiadas nos domínios Bacteria (~99,03 %), Eukaryota (~0,62 %), Archaea (~0,14 %) e Viruses (~0,21 %) (Tabela 2). Por considerar-se que o ambiente de FC40 é similar a ambientes de compostagens, comparamos as abundâncias dos táxons microbianos deste microbioma contra outros três ambientes de compostagem.

Tabela 2. Abundância de domínios microbianos identificados na FC40 e ambientes de compostagens^a disponíveis no MG-RAST. Resultados obtidos com a identificação de sequências de aminoácidos contra o banco de dados do GenBank.

TÁXONS	FC40	ZC1	ZC2	RSA
Bacteria	24.757.393	24.425.972	24.595.813	24.667.703
Eukaryota	155.941	125.511	77.877	139.029
Viruses	52.404	31.382	91.036	14.931
Archaea	34.265	417.139	235.279	178.341

^aFC40 = Torta de Filtro armazenada por 40 dias; ZC1 = Compostagem de resíduos do Zoológico de São Paulo com 8 dias de idade; ZC2 = Compostagem de resíduos do Zoológico de São Paulo com 60 dias de idade; RSA = Consórcio Microbiano Adaptado com Palha de Arroz.

Martins e colaboradores (2013) também relataram abundância similar destes domínios microbianos, onde os autores reforçam a importância do domínio Bacteria na manutenção e equilíbrio de nutrientes em sistemas de compostagens. Além disto, com exceção de ZC1, todas as outras amostras são referentes a compostagens tardias, demonstrando que embora menos abundantes em relação a bactérias, fungos certamente contribuem para a eficiência na desconstrução do material lignocelulósico em fases tardias da compostagem. Isto se deve à presença de sistemas enzimáticos altamente eficientes no genoma destes organismos, os quais são identificados como sistema hidrolítico e sistema lignolítico. No primeiro sistema, são produzidas hidrolases responsáveis por degradar polissacarídeos e, no segundo sistema, ocorre

oxidação extracelular da lignina, permitindo a abertura de anéis de fenilo e habilitando a ação de enzimas microbianas antes inibidas pela lignina (SÁNCHEZ, 2009). Embora não muito bem estabelecido os papéis ecológicos de vírus e arqueas em sistemas que contenham elevada quantidade de biomassa vegetal, provavelmente são oriundos do microbioma da cana-de-açúcar, podendo ser hospedeiros de partes externas da planta ou do sacaroma (PACHECO et al., 2003; PAGÁN et al., 2007; SOUZA et al., 2016). No caso de vírus, o genoma destas partículas podem estar inseridos dentro das células bacterianas (bacteriófagos) do microbioma da torta de filtro, bem como estarem integrados aos genomas dos organismos que habitavam as estruturas de cana-de-açúcar antes de a cana-de-açúcar ser moída na indústria (MARBOUTY et al., 2017).

Um total de 27 filos bacterianos foram identificados na FC40, sendo que os filos predominantes foram Actinobacteria (~52,68 %), Proteobacteria (~28,81 %), Firmicutes (~9,42 %), Bacteroidetes (~4,13 %) e Chloroflexi (~1,43 %). Em nível de filo, apenas o ambiente Compostagem de Microbiota Adaptada a Palha de Arroz (RSA) apresentou perfil taxonômico similar a FC40, os quais apresentaram abundância de filos microbianos muito diferente daquelas verificadas em ZC1 e ZC2 (Tabela 3). Com o término da fase termofílica, Actinobacteria desempenha papéis ecológicos fundamentais no ambiente da compostagem, além de atuar ativamente sobre a degradação de compostos recalcitrantes, como a lignocelulose (HERRMANN e SHANN, 1997; HIRAISHI et al., 2003; STEGER et al., 2007; VARGAS-GARCÍA et al., 2010). Considerando estas características, a elevada abundância de Actinobacteria no ambiente FC40 pode ser devido à grande disponibilidade de biomassa vegetal e, devido a recalcitrância, este filo microbiano deve ser importante na disponibilização de quantidades necessárias de açúcares e nutrientes na torta de filtro armazenada por longos períodos, garantindo a sobrevivência de muitos grupos microbianos. Estudos sugerem que os filos Actinobacteria e Proteobacteria alternem em abundância durante as fases iniciais e estacionária da compostagem, sendo que Proteobacteria e Bacteroidetes são identificados durante todos os estágios do processo (TAKEBAYASHI et al., 2007). Firmicutes é relacionado a processos fundamentais de desconstrução da biomassa vegetal na fase termofílica, além de produzir ácidos orgânicos (PARTANEN et al., 2010). Por sua vez, Chloroflexi aparenta

ter abundância aumentada quando o processo de compostagem atinge a fase termofílica (NEHER et al., 2013).

Tabela 3. Abundância dos 15 filos bacterianos mais abundantes identificados na FC40 e três ambientes de compostagens disponíveis no MG-RAST. Resultados obtidos com a identificação de sequências de aminoácidos contra o banco de dados do GenBank.

Filos	FC40	ZC1	ZC2	RSA
Actinobacteria	13.169.595	883.768	1.668.225	12.332.189
Proteobacteria	7.202.266	11.408.552	3.569.202	6.171.549
Firmicutes	2.354.723	7.725.948	17.703.467	2.808.551
Bacteroidetes	1.033.660	2.959.080	1.181.463	1.012.669
Chloroflexi	356.783	161.268	58.626	1.288.237
Verrucomicrobia	178.725	64.994	32.339	77.453
Planctomycetes	98.531	35.315	21.297	75.796
Acidobacteria	93.754	61.289	28.558	177.270
Cyanobacteria	84.542	119.056	51.177	193.147
Deinococcus-Thermus	58.787	88.721	25.427	263.557
Tenericutes	49.502	58.688	23.805	1
Chlorobi	34.716	72.600	28.845	58.953
Spirochaetes	24.906	198.316	81.020	48.322
Thermotogae	18.100	244.338	33.561	71.654
Fusobacteria	12.954	144.359	120.244	1
Outros	55.611	249.905	73.632	142.351

Estes resultados mostram que após 40 dias, FC40 apresentou dentre os filos bacterianos mais abundantes aqueles relacionados a estágios termofílicos de processos de compostagem, sendo que nestes ambientes, micro-organismos termofílicos formam uma comunidade microbiana mista com os mesofílicos (PARTANEN et al., 2010). Com base nisto, embora não tenha-se realizado medições de temperaturas desde o primeiro dia de armazenamento da torta de filtro até o quadragésimo dia de armazenamento, pode-se sugerir que quando armazenada e exposta a condições ambientais, a torta de filtro fornece condições propícias ao desenvolvimento da comunidade nativa que a habita. Por permanecer como um sistema estático até o momento de seu uso como adubo no período de entressafra, estágios similares ao de uma compostagem podem se desenvolver, significando que ocorre oscilação da temperatura. Segundo relatos coletados no dia da coleta das

amostras, após cerca de 30 dias observa-se a formação de estruturas esbranquiçadas sobre as pilhas da torta de filtro armazenada (Figura 1), sendo este um indicativo do desenvolvimento de fungos e sinalização de que este produto está pronto para ser usado como um adubo (MARAGNO et al., 2007).



Figura 1. Foto registrada no dia da coleta das amostra da FC40. A formação de estruturas esbranquiçadas na torta de filtro, como a mostrada acima, indica a proliferação de fungos, os quais só conseguem maior sucesso em colonizar ambientes de compostagens após o final da fase termofílica do processo (MARAGNO et al., 2007). Na Usina Santa Fé, assim como o indicado na literatura, o desenvolvimento de fungos (aproximadamente 30 dias) sinaliza o momento em que o produto pode ser usado como adubo no solo.

Foram observadas 1.536 espécies de bactérias na FC40, sendo que as cinco mais abundantes foram *Thermomonospora curvata* (~15,07 %), *Salinispora tropica* (~3,83 %), *Pseudoxanthomonas suwonensis* (~2,31 %), *Thermobifida fusca* (~2,29 %) e *Nocardioides* sp. JS614 (~2,27 %) (Tabela 4). *T. curvata* é uma bactéria aeróbia facultativa, termofílica e durante os anos tem sido isolada de compostagens que tem

como material de partida resíduos vegetais (HENSSEN, 1957; HENSSEN e SCHNEPF, 1967; CHERTKOV et al., 2011). Esta espécie bacteriana é produtora de muitos compostos de importância para a agricultura, indústria, farmácia e outras biomoléculas de interesse biotecnológico (SHIVLATA e SATYANARAYANA, 2015). Dentre essas moléculas, destaca-se a produção de antimicrobianos e celulases (CHERTKOV et al., 2011), além de enzimas poliéster hidrolases que podem degradar poly(ε-caprolactona) e polietileno tereftalato (PET) (WEI et al., 2014). *S. tropica* é de grande importância na síntese de agentes antitumorais e anticancerígenos naturais, sendo a salinisporamida A uma das moléculas anticancerígenas mais conhecidas (GOODFELLOW, 2010). Dentre as cinco espécies de bactéria identificadas como as mais abundantes na FC40, *P. suwonensis* é a única Proteobacteria, sendo descrita como gram-negativa, aeróbica, não formadora de esporos e degradadora de celulose (CHERTKOV et al., 2011). Esta bactéria foi identificada em compostagem de resíduo de algodão (WEON et al., 2006) e solo enriquecido com serrapilheira (HOU et al., 2015). *Pseudoxanthomonas* é um gênero relacionado a degradação de hidrocarbonetos monoaromáticos, tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e *o*-xileno, *m*-xileno e *p*-xileno, chamados coletivamente de BTEX (CHOI et al., 2013). Os compostos topoestatina e isoauroestatina produzidos por *Thermobifida* e *Thermomonospora*, possuem potencial para aplicação em ação antiviral, pois estes compostos inibem a DNA topoisomerase, interferindo na replicação, transcrição e tradução em processos celulares destinados à síntese de partículas virais (SHIVLATA e SATYANARAYANA, 2015). *Nocardioides* sp. JS614, apresenta interesse de aplicação na área de biorremediação e biocatálise de compostos de eteno e cloreto de vinila (CV), sendo que CV é um composto persistente e carcinogênico (COLEMAN et al., 2011).

Apenas cinco filos foram identificados como pertencentes ao domínio Archaea nos ambientes FC40, RSA, ZC1 e ZC2, os quais apresentaram perfil de abundância similares entre eles (Tabela 5). Os filos mais abundantes na FC40 foram Euryarchaeota (~0,12 %), Crenarchaeota (~0,01 %), Thaumarchaeota (menor que 0,01 %), Korarchaeota (menor que 0,01 %) e Nanoarchaeota (menor que 0,01 %). Euryarchaeota e Crenarchaeota são os dois filos mais abundantes entre as arqueas nos quatro ambientes e são relacionadas a membros produtores de metano, sendo

que arqueas pertencentes a estes grupos microbianos são classificadas como halófilos extremos, termoacidófilos e alguns são hipertermófilos que são predominantes nas mais variadas condições de compostagem (CAHYANIL et al., 2004; BROCHIER-ARMANET et al., 2008; LEE et al., 2010; NEHER et al., 2013). Thaumarchaeota é formado por membros mesofílicos os quais estão dispersos em ecossistemas de solo a oceano, sendo de grande importância para os ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio e oxidação de amônia. Anteriormente, membros deste filo eram classificados como Crenarchaeota, mas análises filogenéticas baseadas em sequências de rRNA permitiram verificar a existência de micro-organismos mesofílicos e termofílicos que eram muito diferentes, o que culminou na criação de um novo grupo taxonômico: Thaumarchaeota (BROCHIER-ARMANET et al., 2008). Korarchaeota e Nanoarchaeota são frequentemente encontrados habitando o interior de biorreatores anaeróbios usados para produção de metano (WONG et al., 2013).

Tabela 4. As 15 espécies do domínio Bacteria mais abundantes na FC40 e outros ambientes de compostagens disponíveis no MG-RAST. Resultados obtidos com a identificação de sequências de aminoácidos contra o banco de dados do GenBank.

Espécies	FC40	ZC1	ZC2	RSA
<i>Thermomonospora curvata</i>	3.768.475	15.217	9.797	1.620.826
<i>Salinispora tropica</i>	958.499	17.574	14.784	1.088.542
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>	576.931	213.321	41.194	22.396
<i>Thermobifida fusca</i>	572.842	53.198	16.198	795.825
<i>Nocardioides</i> sp. JS614	568.525	19.584	24.025	288.144
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	428.931	6.338	5.455	484.971
<i>Streptosporangium roseum</i>	400.014	22.992	14.405	1.010.789
<i>Salinispora arenicola</i>	368.525	6.870	6.073	469.357
<i>Micromonospora</i> sp. ATCC 39149	358.138	4.820	3.321	358.484
<i>Cellulomonas flavigena</i>	291.660	6.830	14.153	41.164
<i>Thermobispora bispora</i>	270.530	20.462	9.658	1.201.307
<i>Conexibacter woesei</i>	251.005	6.990	6.932	325.207
<i>Xanthomonas campestris</i>	218.555	428.038	51.659	24.131
<i>Rhodococcus jostii</i>	210.952	16.176	28.961	248.085
<i>Gordonia bronchialis</i>	202.364	3.715	8.888	26.339
Outros	15.439.907	23.757.288	24.534.648	16.994.459

Tabela 5. Abundância de filos de arqueias identificados na FC40 e outros ambientes de compostagens disponíveis no MG-RAST. Resultados obtidos com a identificação de sequências de aminoácidos contra o banco de dados do GenBank.

Filos	FC40	ZC1	ZC2	RSA
Euryarchaeota	30.007	394.608	226.203	143.031
Crenarchaeota	3.316	19.406	7.661	31.617
Thaumarchaeota	567	1.709	1.286	1
Korarchaeota	245	1.893	1	1
Nanoarchaeota	32	1	1	1

Thaumarchaeota é o filo de arquea que mais pode contribuir para ciclagem de carbono e nitrogênio na FC40. Estas moléculas provavelmente estão inacessíveis ao microbioma e, por isto, devem ser mineralizadas para permitir o uso dessas estruturas no metabolismo da comunidade microbiana mista. Assim como no solo, em processos de compostagem ocorre o ciclo do nitrogênio, onde este composto é transformado em diferentes formas no decorrer da maturação da compostagem. Formas do nitrogênio como amônio ($\text{NH}_4\text{-N}$), nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) e nitrogênio orgânico (N_{org}), são oriundos da degradação da MO, sendo que o tipo de material de partida da compostagem influencia na taxa de disponibilização destes compostos (SÁNCHEZ-MONEDERO et al., 2001).

Foram observadas 58 espécies relacionadas ao domínio Archaea, sendo as mais abundantes *Methanosarcina mazei* (~0,01 %), *Methanosarcina acetivorans* (~0,01 %), *Methanospirillum hungatei* (~0,01 %), *Methanosarcina barkeri* (~0,01 %) e *Methanoculleus marisnigri* (~0,01 %) (Tabela 6). Pertencente ao filo Euryarchaeota, *M. mazei* é uma arquea acetoclástica que a partir do consumo do ácido acético ou metanol produz metano (TOWN e DUMONCEAUX, 2016). *M. acetivorans* é capaz de metabolizar monóxido de carbono e gerar acetato e formato (ROTHER e METCALF, 2004). Outra habilidade desta arquea é oxidar monóxido de carbono em dióxido de carbono, que devido a atividade microbiana pode converter esta última molécula em metano (LESSNER et al., 2006) que é um dos principais gases responsáveis por promover o fenômeno do efeito estufa (AMLINGER et al., 2008; LOU e NAIR, 2009; ROCKSTRÖM et al., 2009). *M. hungatei* tem como habilidade a capacidade de usar hidrogênio, dióxido de carbono e/ou formato como fonte de energia, sendo que seu papel ecológico é o controle de íons H^+ (GUNSALUS et al., 2016), que se não

consumidos, podem acidificar o meio e impossibilitar a sobrevivência de muitos membros da comunidade microbiana.

Tabela 6. Espécies do domínio Archaea mais abundantes na FC40 e outros ambientes de compostagens disponíveis no MG-RAST^a. Resultados obtidos com a identificação de sequências de aminoácidos contra o banco de dados do GenBank.

Espécies	FC40	ZC1	ZC2
<i>Methanosarcina mazei</i>	2.862	10.638	4.760
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	2.689	12.249	7.285
<i>Methanospirillum hungatei</i>	1.602	6.125	9.103
<i>Methanosarcina barkeri</i>	1.599	11.689	6.376
<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1.437	9.959	10.870
<i>Methanoregula boonei</i>	1.219	4.740	10.416
<i>Methanosaeta thermophila</i>	1.030	5.592	3.397
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	1.020	7.563	4.053
<i>Methanococcoides burtonii</i>	995	7.536	3.990
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	886	30.686	10.391
<i>Haloarcula marismortui</i>	792	3.116	1.541
<i>Methanococcus vanniellii</i>	726	5.646	2.892
<i>Methanococcus maripaludis</i>	703	11.144	5.076
<i>Methanosphaerula palustres</i>	691	3.409	7.096
<i>Methanoplanus petrolearius</i>	684	3.063	7.272
Outros	13.433	267.487	115.384

^aRSA não apresentou identificações para espécies de arqueas.

Durante a conversão da MO, *M. barkeri*, *M. mazei* e *Methanosaeta harundinacea*, podem produzir metano via metabolismo de acetato, hidrogênio e formato, entretanto, os membros destes gêneros também podem aceitar elétrons diretamente da bactéria *Geobacter metallireducens* (menos de 1 % de abundância na FC40, dados não mostrados) para reduzir dióxido de carbono a metano. Isto ocorre porque a família Geobacteraceae pode reduzir ferro(III) usando o acetato ou etanol como molécula doadora de elétrons (ZHENG et al., 2015). *Methanoculleus marisnigri* foi identificada em área sob cultivo de arroz, no período de pós-colheita, onde aparentemente tinha sua abundância alterada conforme perturbações oriundas da ação de colheita do arroz eram introduzidas no ambiente. Segundo os autores da pesquisa, este fenômeno se deve ao fato de alguns grupos metanogênicos serem dominantes e outros recessivos durante os estágios de cultivo, contribuindo para a

variação da comunidade metanogênica ao longo do período de cultivo (SINGH et al., 2012).

Outro tipo de interação entre arqueas e bactérias se deu quanto a transformação das formas de amônia no ambiente. O processo de nitrificação é dividido em duas etapas, sendo a primeira aquela onde as bactérias e arqueas oxidam a amônia em nitrito, para que bactérias oxidantes de nitrito possam transformar esta molécula em nitrato (PINTO et al., 2015). Estas transformações microbianas da amônia e nitrato são importantes pois tais moléculas podem ser assimiladas pelas plantas (BENEDUZI et al., 2013). No entanto, uma espécie da bactéria *Nitrospira* (gênero com menos de 1 % de abundância, dados não mostrados) pode fazer este processo sem atuar em parceria com algum outro micro-organismo, oxidando completamente a amônia em nitrato (PINTO et al., 2015). No entanto, vale ressaltar que o aumento da nitrificação também é apontada como um dos pontos chave para gerar o gás de efeito estufa óxido nitroso, o qual é 298 vezes mais danoso do que o dióxido de carbono (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013).

Foram identificados 42 filos pertencentes a Eukaryota, dos quais os mais frequentes foram Ascomycota (~0,28 %), Streptophyta (~0,10 %), Basidiomycota (~0,05 %), Arthropoda (~0,03 %) e Chordata (~0,03 %) (Tabela 7). Ascomycota e Basidiomycota estão dentre os filos de eucariotos mais abundantes em amostras de compostagem (NEHER et al., 2013; LANGARICA-FUENTES et al., 2015), provavelmente por estes fungos contarem com um secretoma completo de enzimas extracelulares relacionadas à despolimerização da lignocelulose com ação de oxidases, hidrolases e peptidases (WÖSTEN, 2001). Streptophyta engloba principalmente algas verdes e azuis, as quais são agentes autotróficos e de grande interesse para aplicações biotecnológicas, principalmente para produção de biocombustíveis, alimentos e outros materiais (BECKER e MARIN, 2009), sendo identificado amplamente em amostras de compostagens variadas (HAN et al., 2014; LIN et al., 2014; BUELOW et al., 2016). Streptophyta parece responder positivamente ao aumento da MO (BUELOW et al., 2016), auxiliando na biodisponibilização de fósforo (P) e fixação de nitrogênio (N), além de realizar interações ecológicas com bactérias e fungos para possibilitar a maximização da degradação de compostos fenólicos da lignina (LIN et al., 2014) e permitir a comunidade microbiana acessar a

HM e CL. Arthropoda e Chordata foram verificados em amostras com aumento de MO, podendo ser derivadas de sequências contaminantes (humanas) (BUELOW et al., 2016) ou de animais que habitam a região de plantio de cana-de-açúcar, no caso deste estudo.

Tabela 7. Abundância de filos eucariotos identificados na FC40 e outros ambientes de compostagens disponíveis no MG-RAST. Resultados obtidos com a identificação de sequências de aminoácidos contra o banco de dados do GenBank.

Filos	FC40	ZC1	ZC2	RSA
Ascomycota	70.592	18.644	17.854	84.494
Streptophyta	24.309	32.373	18.578	19.191
Basidiomycota	10.317	3.942	2.197	1
Arthropoda	7.660	9.552	6.526	1
Chordata	7.355	11.391	6.601	1
Chlorophyta	5.625	4.074	4.729	1
Cnidaria	3.762	5.690	1.810	1
Nematoda	2.948	17.106	4.218	1
Bacillariophyta	2.760	1.459	1	1
Apicomplexa	1.254	1.998	1.486	1
Placozoa	468	1	1	1
Phaeophyceae	466	1	1	1
Chytridiomycota	176	1	1	1
Platyhelminthes	166	1	1	1
Microsporidia	119	1	1	1
Outros	755	11	11	11

Na FC40 foram identificadas 58 espécies de fungos (Tabela 8), sendo os mais abundantes *Neosartorya fumigata* (~0,06 %), *Neurospora crassa* (~0,03 %), *Paracoccidioides brasiliensis* (~0,02 %), *Chaetomium globosum* (~0,02 %) e *Coprinopsis cinerea* (~0,01 %). Com abundância menor do que 0,10 % no microbioma, também foram identificados outras espécies de organismos, como vírus, algas, protozoários, nematoides e plantas (dados não mostrados). *Neosartorya fumigata*, a forma teleomorfa de *Aspergillus fumigatus*, é um patógeno humano oportunista em indivíduos imunocomprometidos, sendo considerado um fungo saprofítico cujo esporos são ubíquos na atmosfera. Ele causa infecções altamente invasivas que evoluem para fatalidade, com taxa de mortalidade humana de 50 %, estando associado a asma grave e sinusite. No entanto, ele está amplamente disperso pelo

ambiente, participando na reciclagem de nutrientes em solos e em detritos orgânicos (O'GORMAN et al., 2009). *Neurospora crassa* possui celulase nativa que foi considerada comercialmente viável, uma vez que em processos industriais é mais fácil a adequação de cepas nativas do que geneticamente modificadas (LI et al., 2014). *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo patogênico dimórfico, causador etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a mais importante micose sistêmica da América Latina. Este micro-organismo não foi associado a um ambiente em específico, sendo que os isolados que se tem conhecimento foram obtidos esporadicamente de solo, morcego (*Artibeus literatus*), pinguins (*Pygoscelis adeliae*) e fezes e comida de cães (FRANCO et al., 2000). *Chaetomium globosum* foi identificado em fase madura de processo de compostagem de bagaço de cana-de-açúcar (de GANNES et al., 2013) e *Coprinopsis cinerea* é um fungo identificado como cogumelo comestível, pertencente a ordem Agaricales (PUKKILA, 2011).

Desta forma, FC40 aparenta possuir diversidade microbiana similar a ambientes de compostagens, o que pode ter relação com as características físico-químicas da torta de filtro assim que é produzida na indústria, a qual possui grande teor de umidade e nutrientes (De FRAVET et al., 2010; PRADO et al., 2013) que podem ser similares as condições iniciais de uma compostagem em sua fase inicial do processo (CHRONI et al., 2009; MARTINS et al., 2013).

Tabela 8. Espécies de fungos (Eukaryota) mais abundantes na FC40^a. Resultados obtidos com a identificação de sequências de aminoácidos contra o banco de dados do GenBank.

Espécies	FC40
<i>Neosartorya fumigata</i>	14.689
<i>Neurospora crassa</i>	7.754
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	5.462
<i>Chaetomium globosum</i>	4.544
<i>Coprinopsis cinérea</i>	3.952
<i>Candida tropicalis</i>	3.098
<i>Penicillium marneffe</i>	2.673
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	2.559
<i>Magnaporthe oryzae</i>	2.542
<i>Phytophthora infestans</i>	2.532
<i>Emericella nidulans</i>	1.759
<i>Neosartorya fischeri</i>	1.725
<i>Ustilago maydis</i>	1.647
<i>Talaromyces stipitatus</i>	1.605
<i>Aspergillus flavus</i>	1.560
Outros	23.761

^aZC1, ZC2 e RSA não apresentaram identificações para espécies de eucariotos.

Os micro-organismos da FC40 participam de diferentes processos metabólicos que visam a contínua transformação das moléculas disponíveis neste ambiente em moléculas menos complexas, as quais são úteis na geração de energia em processos de oxiredução ou assimilação pelo microbioma para manutenção de funções celulares vitais. Grande parte das espécies, como os fungos *Chaetomium globosum* e *Coprinopsis cinérea*, são mesofílicos e, junto da identificação de muitas bactérias termofílicas, mostram como se comporta a comunidade microbiana frente ao aumento da recalcitrância do meio logo após o término da fase termofílica, a qual caracteriza o consumo de quase todos os nutrientes e minerais facilmente metabolizáveis pelo microbioma. Além disto, os resultados demonstram que muitas arqueas metanogênicas podem estar atuando nas emissões de metano e, em alguns casos, atuam em associação com outros membros da comunidade, tal como os membros da família Geobacteraceae. No entanto, as arqueas podem participar de múltiplos processos, como a oxidação da amônia em nitrito, onde espécies de bactéria podem atuar em sinergismo ou sozinhas para oxidá-lo em nitrato. Outro fato importante é a

verificação da existência de fungos com capacidade de realizar os primeiros danos a lignina por meio de enzimas oxidativas, onde devido a esta desestabilização, existe a possibilidade da ação de enzimas lignocelulíticas que agora podem superar a barreira da recalcitrância, iniciando o processo de despolimerização da lignocelulose e liberação de moléculas menos complexas no meio. Um fato que chama a atenção é a existência de duas espécies de fungos patogênicos ubíquos, *Neosartorya fumigata* e *Paracoccidioides brasiliensis*, demonstrando que existe a necessidade da recomendação de um monitoramento ostensivo para verificar como estas taxas se comportam em curto e longo prazo em resíduos da agroindústria.

5.3 Relação entre perfil taxonômico e funcional em microbiomas com elevada disponibilidade de biomassa vegetal

A análise de agrupamento entre os ambientes com elevada disponibilidade de biomassa vegetal (FC40, RSA, ZC1 e ZC2) e os ambientes com baixa disponibilidade de biomassa vegetal (TCF1, TCF2, TCF3, TSF e SLMF), verificou-se que quanto ao perfil metabólico, esses dois ambientes formam dois grupos distintos (Figura 2A). De forma geral, solos de florestas (TCF1, TCF2, TCF3, TSF e SLMF) tendem a sofrer menos ação perturbadora (principalmente pela ação humana) em relação a ambientes constituídos por resíduos da agricultura (FC40, RSA) e resíduos vegetais/animais de zoológico (ZC1 e ZC2). Entretanto, embora apresentem diferenças quanto a táxons microbianos (Figura 2B), a ação de fatores seletivos bióticos e/ou abióticos não selecionam táxons, apenas funções. Por este motivo, comunidades microbianas de deserto podem ser muito semelhantes aquelas presentes em florestas, diferindo apenas quanto as funções codificadas pelos táxons microbianos devido a exposição a luz ultra violeta (UV), ocorrência de plantas superiores, conteúdo de areia e argila de cada ambiente (PACCHIONI et al., 2014).

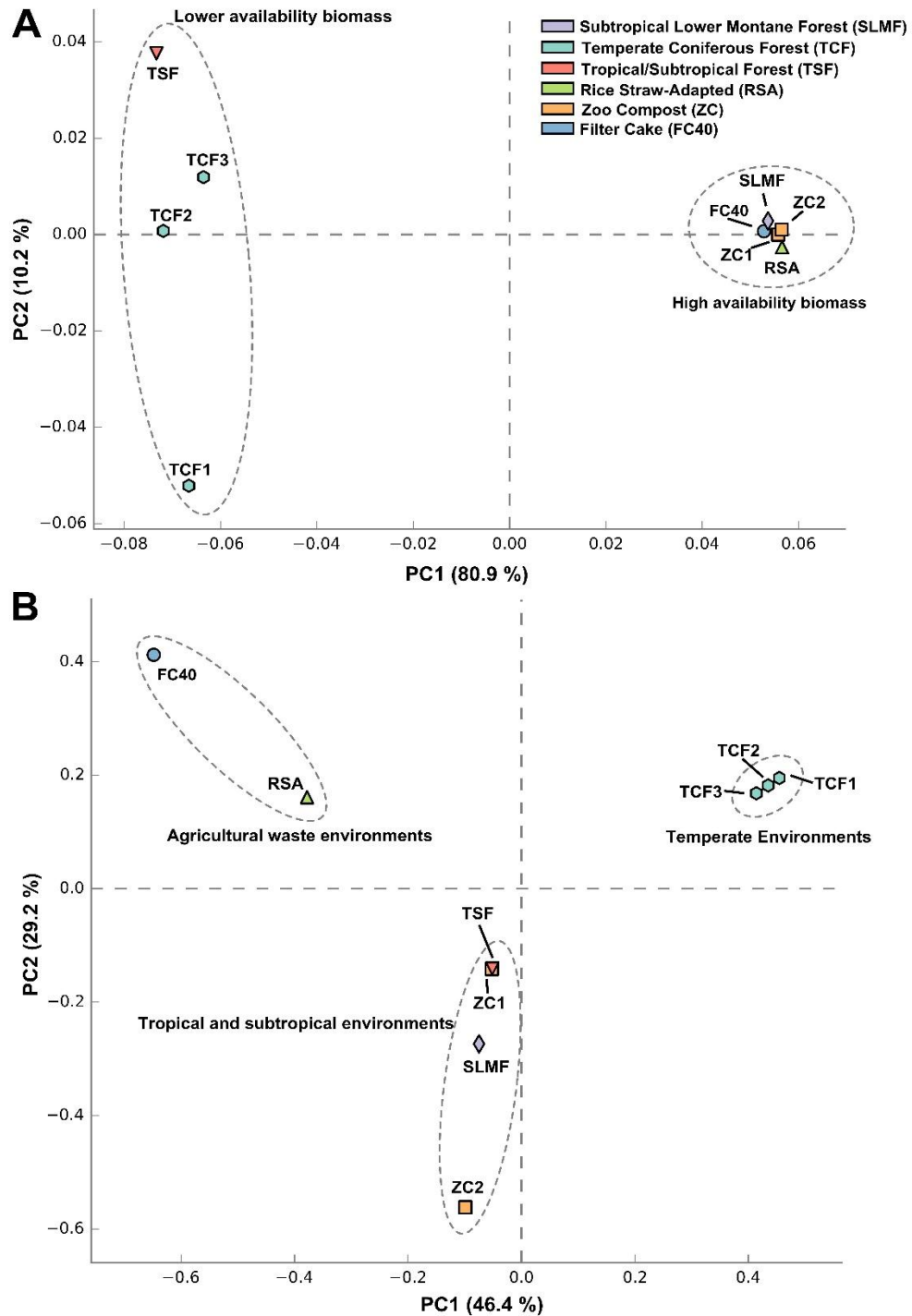


Figura 2. Perfil de agrupamento funcional e taxonômico gerados no MG-RAST de ambientes com elevada disponibilidade de biomassa vegetal (FC40, RSA, ZC1 e ZC2) e baixa disponibilidade de biomassa vegetal (TSF, SLMF, TCF1, TCF2 e TCF3). **(A)** Agrupamento entre ambientes com disponibilidade de biomassa vegetal baseado no perfil de vias metabólicas (SEED nível 3). **(B)** Agrupamento de ambientes com disponibilidade de biomassa vegetal baseado na abundância de espécies microbianas. Análises de Componentes Principais (PCA) realizadas no STAMP usando opção de múltiplos grupos, teste de ANOVA, método de confiança de intervalo teste Games-Howell post hoc e correção Benjamin-Hochberg FDR.

As funções ecológicas expressas por um microbioma são específicas do ambiente onde se inserem as espécies microbianas e, por isto, mesmo com a perda de táxons microbianos devido a ação de pressões seletivas, a redundância de funções contidas no genoma de diversas espécies microbianas permanece no ambiente, permitindo que mesmo ambientes moderadamente impactados possam apresentar resiliência e retornar à condição de estado saudável (de-BASHAN et al., 2012). Por serem constituídos de resíduos da agricultura, os ambientes FC40 e RSA apresentaram elevada similaridade de funções ecológicas (Figura 2A) e moderada similaridade de táxons microbianos (Figura 2B). Isto demonstrou que a comunidade microbiana de ambos os ambientes está adaptada às condições de elevada oferta de biomassa vegetal e reduzida disponibilidade de nutrientes, os quais são ocasionados pelo armazenamento prolongado da FC40 (aproximadamente 40 dias) e à idade avançada da compostagem de resíduo de palha de arroz (superior a 30 dias) que originou o consórcio microbiano RSA (WANG et al., 2016).

Quanto ao perfil de agrupamento entre os metagenomas de solos de floresta SLMF foi o único que diferiu destes, sendo verificado similaridade com ambientes contendo elevada disponibilidade de biomassa vegetal (Figura 2A), demonstrando que SLMF contém em comum com ambientes tropicais e subtropicais apenas espécies microbianas (Figura 2B). Localizado em uma reserva florestal no município de Luquillo, Porto Rico, SLMF contém dentre os três maiores tipos de vegetação: floresta de tabonuco, floresta de colorado e floresta anãs), que devido a diferenças no tipo de vegetação e elevação, alteram as características de umidade e nutrição do solo. Por estar localizada em uma região inferior ao pico da montanha (sopé da montanha), a deposição de MO e demais nutrientes ocorre pelo processo de lixiviação, fenômeno que se desenvolve no sentido do pico da montanha para a parte baixa da montanha (COX et al., 2002). Esta característica topográfica que permite a elevada deposição de MO na floresta localizada no cume da montanha, explica a presença de abundância de biomassa vegetal oriunda de folhas e galhos mortos oriundos da vegetação do local, que junto da umidade, podem favorecer o desenvolvimento de comunidades microbianas presentes em solos de florestas tropicais e subtropicais (Figura 2B), mas que conservem funções de micro-organismos encontrados em ambientes com

elevada abundância de biomassa vegetal (Figura 2A). Juntas, as Figuras 2A e 2B explicam 91,1 % e 75,6 % da variação dos dados, respectivamente.

Mesmo contendo funções microbianas próximas a RSA, FC40 apresentou menor riqueza de espécies em relação aos ambientes com elevada disposição de biomassa vegetal (Tabela 9). No entanto, nenhum ambiente de elevada disponibilidade de biomassa vegetal teve maior riqueza de espécies microbianas do que os ambientes de solos. Naturalmente, solos apresentam maior diversidade microbiana e funcional do que qualquer ambiente conhecido, sendo caracterizado como um ambiente muito mais complexo em estruturação e disposição de nutrientes (COX et al., 2002; VOGEL et al., 2009; de-BASHAN et al., 2012; LEE e LEE, 2013) do que a torta de filtro (PRADO et al., 2013) e compostagem (CHRONI et al., 2009 et al., 2009; MARTINS et al., 2013; WANG et al., 2016). Ao contrário do que foi verificado na comparação entre funções, FC40 e RSA se mostraram muito diferentes na composição de espécies microbianas (Figura 3), demonstrando que mesmo pequenas diferenças de estruturação físico-química entre os ambientes mais similares podem culminar na diferença de abundância entre muitos táxons microbianos, contribuindo para a existência de táxons aparentemente melhores adaptados a FC40 e menos adaptados as condições ambientais da RSA. Segundo o índice de Equitabilidade, que expressa a maneira pela qual o número de indivíduos está distribuído entre as diferentes espécies de um ambiente, a comunidade microbiana de FC40 é a que apresentou abundância de espécies mais uniforme dentre os ambientes analisados, indicando que as diferentes espécies de micro-organismos de FC40 possuem abundância (número de indivíduos) semelhantes (Tabela 9).

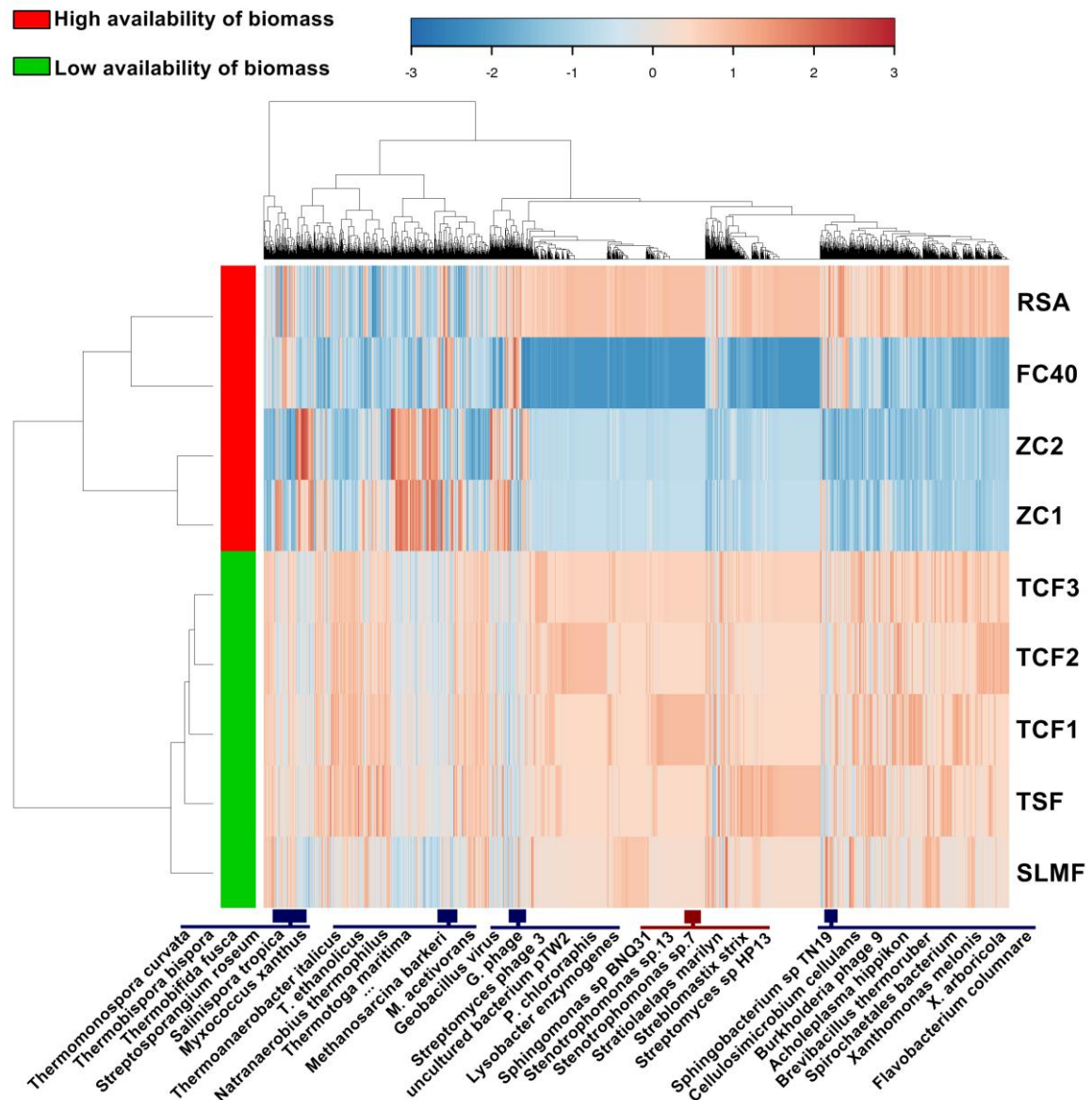


Figura 3. Dendrograma mostrando o agrupamento entre ambientes com elevada disponibilidade de biomassa vegetal (FC40, RSA, ZC1 e ZC2) e baixa disponibilidade de biomassa vegetal (TSF, SLMF, TCF1, TCF2 e TCF3). Os resultados de abundância de espécies microbianas foram gerados no MG-RAST e usados para construção do *heatmap* no METAGENassist. Espécies mais abundantes na FC40 estão destacadas em azul, as espécies menos abundantes na FC40 estão destacadas em vermelho. *Heatmap* gerado com exclusão de *reads* não mapeadas e/ou não classificadas, método de distância de Pearson, algoritmo de clusterização “Ward” e T-test/ANOVA.

Tabela 9. Índices de diversidade e equitabilidade de espécies calculados para as nove amostras metagenômicas que são comparadas neste estudo.

Amostra	Índices de diversidade,			
	Riqueza (S)	Simpson (D)	Shannon (H)	Equitabilidade (J)
FC40	9.381	0,9716	5,315	0,5810
ZC1	9.381	0,9949	6,261	0,6845
ZC2	9.381	0,9894	5,735	0,6270
RSA	9.381	0,9882	5,793	0,6334
TCF1	9.381	0,9912	6,402	0,6999
TCF2	9.381	0,9925	6,365	0,6958
TCF3	9.381	0,9925	6,394	0,6991
TSF	9.381	0,9955	6,531	0,7141
SLMF	9.381	0,9925	6,189	0,6766

5.4 Montagem de *scaffolds*, predição das ORFs e identificação de táxons microbianos envolvidos na despolimerização da biomassa vegetal

Embora análises baseadas em sequências não montadas de dados metagenômicos possam ser usados para acessar informações sobre abundância de espécies, apenas dados resultantes de montagem de *scaffolds* permitem acessar informações mais precisas sobre identificações de genes. Por este motivo, em nossas análises, também realizamos a montagem de *scaffolds*, estratégia esta que melhora a qualidade na identificação de sequências de proteínas quando consultamos buscas de similaridade em bancos de dados especializados, embora ocorra perda de informações relacionadas a abundância devido a realização da etapa de montagem (SEGATA et al., 2013).

Após as etapas de eliminação de sequências indesejáveis, restaram 25.928.314 *reads paired-end* (~94 % dos dados iniciais) com tamanho entre 50 e 100 pb e média de Qphred 35 passíveis de continuarem as análises nas etapas seguintes (Tabela 10). Não foram usados os dados *singletons*, pois estes além de aumentarem o tempo de processamento dos dados (*reads* muito curtas e sem sobreposição) não produziram *scaffolds* com maior qualidade do que quando os consideramos nas análises de montagem com IDBA-UD. Segundo a comparação entre as montagens, a melhor foi a que utilizou kmer de 124 (Tabela 11), pois além de ela produzir os maiores *scaffolds* (≥ 500 pb e ≥ 1.000 pb), obteve menos contagens de N's a cada 100 kpb.

Tabela 10. Resultados gerados durante as etapas de remoção das sequências de adaptadores e de baixa qualidade dos dados de sequenciamento *paired-end* pelos programas Scythe, Cutadapt e Prinseq. Os dados referentes ao número de *reads*, comprimento e quantidade de *reads* remanescentes após eliminação de sequências indesejáveis, foram gerados com o *software* FastQC.

Programa	Arquivos ^a	No. Reads	Comprimento	Total recuperado	%Retido
Dados brutos	R1	27.791.106	100	b ₋	-
	R2	27.791.106	100	-	-
Scythe ^c	R1	27.791.106 (10,36 %)	1-100	27.791.106	100
	R2	27.791.106 (10,02 %)	1-100	27.791.106	100
Cutadapt ^c	R1	27.791.106 (1,29 %)	15-100	27.431.430	98,71
	R2	27.791.106 (0,84 %)	15-100	27.557.049	99,16
Prinseq ^d					
<i>paired-end</i>	R1	27.431.430 (5,48 %)	50-100	25.928.314	94,52
	R2	27.557.049 (5,91 %)	50-100	25.928.314	94,09
<i>Singleton</i>	R1	-	50-100	1.151.710	-
	R2	-	50-100	962,429	-

^aArquivos R1 e R2 são referentes aos arquivos gerados pelo sequenciamento *paired-end*, ou seja, contém sequências complementares (*paired-end*) e sequências únicas que não apresentam sobreposição <= 100 pb (*singletons*).

^bDados não encontrados.

^cTaxa de remoção de adaptadores.

^dTaxa de remoção de sequências menores do que 50 pb e com Qphred < 20.

Tabela 11. Avaliação da qualidade da montagem dos *scaffolds* com IDBA-UD. Os resultados da avaliação foram gerados pelo programa MetaQUAST^a.

Métricas	kmer's utilizados na reconstrução dos segmentos gênicos ^b					
	level-2_pes_k90	scaffold_pe_k70	level-2_pes_k70*	level-2_pes_k70	level-2_pes_k50	scaffold_pe_k124
<i>Scaffolds</i> >=500pb	3.468	17.764	18.046	18.046	70.525	163.847
<i>Scaffolds</i> >=1000pb	994	7.707	7.654	7.654	19.372	58.558
Maior <i>scaffolds</i>	38.019	91.608	86.597	86.597	80.903	296.041
Comprimento total	3.463.709	38.207.066	38.806.791	38.806.791	91.665.764	224.321.451
N50 ^c	1.012	4.964	5.159	5.159	1.525	1.618
GC (%)	66,88	69,01	68,96	68,96	65,38	62,54
N's	352	2.886	2.766	2.766	11.092	3.031
N's por 100kpb	10,16	7,55	7,13	7,13	12,10	1,35

^aDados organizados do pior (esquerda) para o melhor montagem (direita).

^blevel-2_pes = dados *paired-end* + *single reads*; pe = somente dados *paired-end*; k50/k70/k124 = tamanho do kmer usado durante a montagem com IDBA-UD.

^cRepresenta o comprimento do *scaffold* tal que o uso de um ou mais *scaffolds* produzam a metade/igual (50 %) das bases de todo conjunto de dados. Normalmente, não existe um valor que produz exatamente 50 % do comprimento dos *scaffolds*, de modo que a definição técnica é o comprimento máximo "x" tal que o uso do comprimento "x" dos *scaffolds* representem pelo menos 50 % do comprimento total do conjunto de dados.

A profundidade de cobertura do sequenciamento da FC40 visualizada com SAMtools foi de 63,58 % e, uma vez que profundidades de cobertura de sequenciamento de dados metagenômicos inferiores a 50 % podem ser consideradas como baixas (LAI et al., 2015), a profundidade de cobertura do sequenciamento dos *scaffolds* (kmer = 124) que foram recuperados pode ser considerada como média. Além disto, diferente do que ocorre com dados de genoma obtido a partir de cultura pura (PENG et al., 2012), elevadas profundidades de cobertura de sequenciamento em dados metagenômicos dependem da heterogeneidade de organismos que habitam o ambiente analisado. Neste sentido, um ambiente com elevada diversidade como o solo tende a apresentar menor profundidade de cobertura de sequenciamento do que um ambiente menos diverso (ALBERTSEN et al., 2013), como o que se espera para a torta de filtro (Tabela 9). Baseado nestes dados, pode-se esperar que além da menor riqueza em espécies microbianas, grande parte dos segmentos de *scaffolds* que representam fragmentos de DNA genômicos da população de micro-organismos que habitam a torta de filtro podem apresentar muitas sequências montadas de forma correta, o que permitirá recuperar informações com elevado grau de confiança sobre taxonomia e função das espécies.

A identificação de famílias de enzimas com atividade sobre carboidratos no dbCAN permitiu identificar, em ordem de abundância, 3.057 genes de Glicosiltransferases (GT), 2.020 genes de Carboidrato Esterases (CE), 2.010 genes para Módulos de Ligação a Carboidratos (CBM), 215 genes de Polissacarídeo Lases (PL), 119 genes de SLH, 98 genes pertencentes a classe das Glicosil Hidrolases (GH), 9 de dockerin e 4 de cohesin. Tais achados auxiliam a entender como funciona a ecologia deste ambiente, pois uma vez que bactérias são os organismos mais abundantes na FC40 (Tabela 4), provavelmente estas taxas são os maiores responsáveis por liberar os nutrientes que estão contidos na biomassa vegetal oriundos do bagaço residual presente na FC40 (Tabela 1).

GTs são enzimas que atuam na montagem de carboidratos complexos diversos nas células vivas, sendo que a degradação destas estruturas é realizada pela ação conjunta das GHs, PLs e CEs (LOMBARD et al., 2014). As cinco espécies bacterianas portadoras de GHs mais abundantes na FC40 foram *Thermobacillus composti* (Firmicutes, 39 ORFs), *Thermomonospora curvata* (Actinobacteria, 27 ORFs), *Bacillus*

coagulans (Firmicutes, 18 ORFs), *Niastella koreensis* (Bacteroidetes, 16 ORFs) e *Caldibacillus debilis* (Firmicutes, 15 ORFs). Destes, apenas *T. curvata* figura entre os 25 táxons bacterianos mais abundantes no microbioma da FC40, apresentando aproximadamente 15 % de abundância (Tabela 4), enquanto que as outras espécies fazem parte de filos microbianos que tiveram abundância menor do que 0,1 % (Tabela 2). Mesmo se considerássemos as 13 espécies mais abundantes dentro das classes de GHs, apenas *Conexibacter woesei* (Actinobacteria, 12 ORFs) estaria inserida dentre as 25 espécies mais abundantes na comunidade bacteriana. O gênero *Thermobacillus* foi proposto por Touzel e colaboradores (2000) e engloba bactérias termofílicas, gram-negativas, formadoras de esporos, aeróbicas, não móveis e com forma de haste. *Thermobacillus composti* é capaz de crescer em temperaturas de 50 °C e pode metabolizar moléculas de D-celobiose, D-frutose, D-galactose, D-xilose, D-manose, D-glicose, maltose, sacarose, dextrina, lactose, melibiose, amido e xilana (WATANABE et al., 2007). *T. curvata* produz antimicrobianos e celulases, podendo crescer em temperaturas de 65 °C (CHERTKOV et al., 2011). *Bacillus coagulans* é uma bactéria do ácido láctico capaz de produzir ácidos orgânicos a partir de glicose e xilose. *Bacillus* são os principais produtores de proteases e ao degradar proteínas auxiliam no aumento do pH do meio. Em ambientes de compostagem, as espécies mais abundantes são Actinobacteria e *Bacillus*, os quais atuam ativamente na degradação da lignina, hemicelulose e celulose (PARTANEN et al., 2010). *Niastella koreensis* é uma bactéria aeróbia, formadora de esporos e é grande produtora de celulases (BAILEY et al., 2013). *Caldibacillus debilis* e *Clostridium thermocellum*, podem atuar na degradação da celulose ao mesmo tempo em um ambiente aeróbio, pois a presença de *C. debilis* possibilita a existência de um microambiente anaeróbico e permite a fermentação por parte de *C. thermocellum*, embora o macroambiente permaneça aeróbico (WUSHKE et al., 2015).

Na natureza, a degradação enzimática da CL e HM é realizada através da ação coletiva de múltiplas enzimas codificadas por uma variedade de espécies que estão amplamente distribuídas pela árvore da vida (CRAGG et al., 2015). Estas enzimas atuam como um coquetel enzimático ideal, as quais possuem atividades complementares, atividades sinérgicas e modos de ação específicos. As GHs são enzimas com funções primárias, agindo na quebra de ligações glicosídicas presente

dentro/entre CL e HM, sendo assistidas quanto à função por AAs e PLs, permitindo que as GHs atuem sobre a HM (van den BRINK e de VRIES, 2011). A Figura 4 ilustra onde atuam as principais GHs e AAs durante a despolimerização da lignocelulose e metabolismo dos polissacarídeos e monossacarídeos oriundos desta atividade na FC40. Na mesma figura também é mostrada a abundância dos principais filos bacterianos identificados em cada família de enzimas com atividade sobre carboidratos.

Em ambientes com elevada oferta de biomassa vegetal, vias de despolimerização da lignocelulose são os principais mecanismos de acesso a nutrientes e minerais (PARTANEN et al., 2010; CRAGG et al., 2015; WANG et al., 2016), as quais são importantes para obter principalmente polissacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos (pentoses e hexoses), ácidos orgânicos e álcoois (MHUANTONG et al., 2015). Na FC40, Actinobacteria teve a maior contagem de genes em relação a outros filos bacterianos, sendo este um indício de sua grande participação no processo de desconstrução da biomassa vegetal. No entanto, algumas etapas da despolimerização na FC40 parecem contar com ação sinérgica de outros indivíduos da comunidade bacteriana, como Firmicutes durante a conversão de galactana oriunda da hemicelulose para dímeros de polissacarídeos e ação conjunta entre Firmicutes e Bacteroidetes durante a conversão de dímeros de polissacarídeos para manose (Figura 4). Proteobacteria também aparenta ocupar posição de destaque durante a ação sobre a pectina e lignina, tendo menor participação na conversão da xilana para xilose, de manana para dímeros de polissacarídeos, de dímeros de polissacarídeos para galactose e de celulose para glicose (Figura 4). Este perfil de contribuição funcional dos quatro filos bacterianos é apoiado pelo perfil de abundância total, onde a análise das sequências sem a montagem de *scaffolds* permitiu verificar que estes eram os filos mais abundantes na FC40 (Tabela 3), mostrando que os filos bacterianos mais abundantes em torta de filtro armazenada por longos períodos pode estar relacionada com o sucesso da comunidade microbiana em obter nutrientes oriundos da desconstrução da biomassa vegetal.

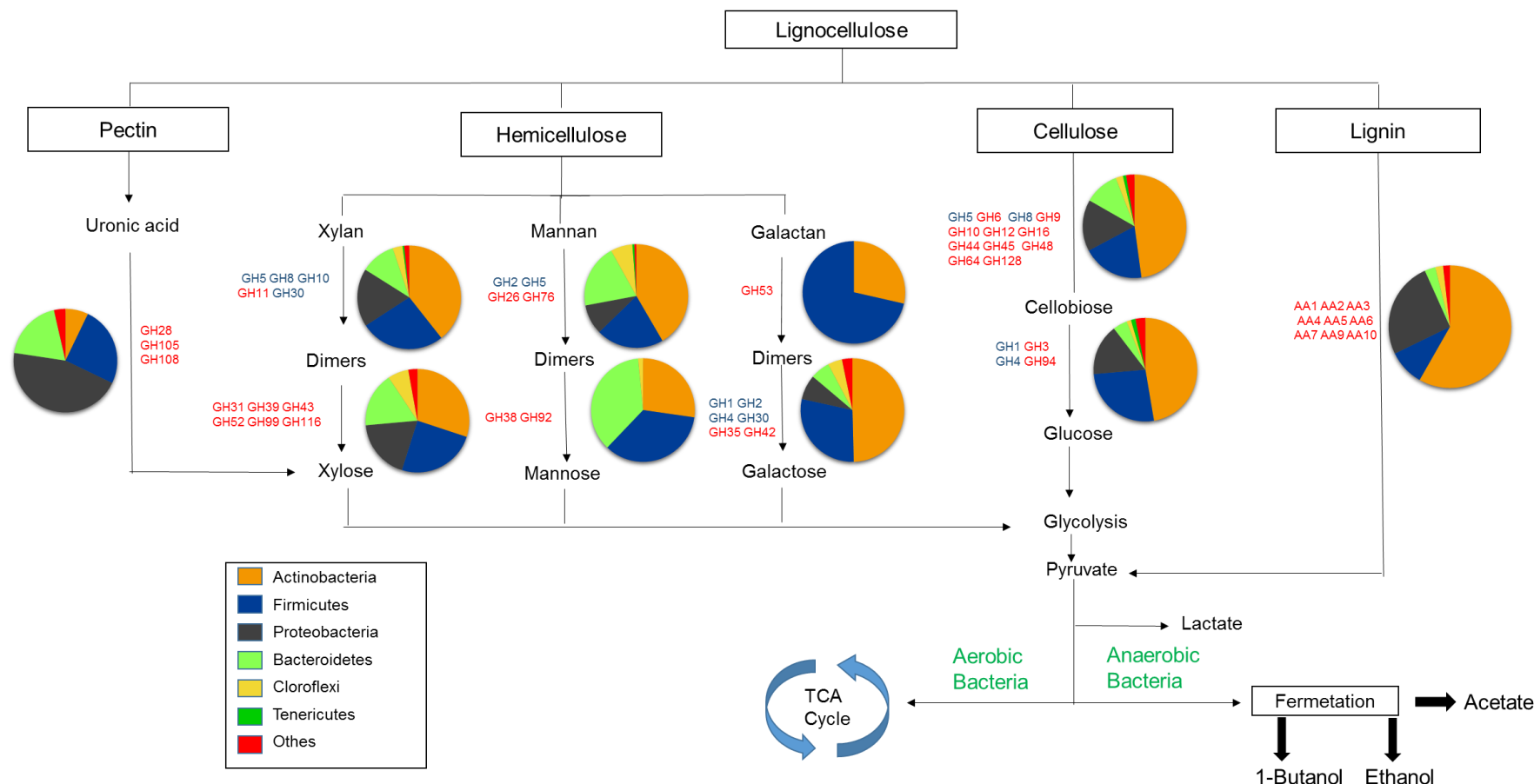


Figura 4. Reconstrução de vias de despolimerização da lignocelulose hipotéticas identificadas na comunidade bacteriana da FC40. Estas vias estão envolvidas na obtenção de polissacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos (pentoses e hexoses), ácidos orgânicos e álcoois. Actinobacteria é identificada como o grupo de maior participação no processo de desconstrução da biomassa vegetal, no entanto, algumas etapas são desempenhada principalmente por outros membros da comunidade microbiana, como Firmicutes durante a conversão de galactana oriunda da hemicelulose para dímeros de polissacarídeos. Famílias de enzimas com ação sobre carboidratos em azul representam que elas atuam em mais de uma via da despolimerização da lignocelulose, enquanto que a cor vermelha representa as que atuam em apenas uma via.

A hemicelulose contém uma grande variedade de carboidratos em sua composição e, desta forma, requer uma variedade de enzimas que atuem sobre a xilana, manana e galactana (MHUANTONG et al., 2015). Devido a presença de ligações β em D-galactose terminal na xilana, xiloglucano e galactoglucomannanas, existe a sugestão de que as β -galactosidases possam atuar na desconstrução da hemicelulose (SIMS et al., 1997; van den BRINK e de VRIES, 2011). Xilanas é um grupo diversificado de polissacarídeos que tem característica de espinha dorsal de resíduos de xilose fazendo ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Esses polissacarídeos podem conter em sua estrutura glucuronoxilanas, arabinoxilanas e glucuronoarabinoxilanas (SCHELLER e ULVSKOV, 2010), sendo que endo-1,4- β -xylanases são passíveis de atuarem na degradação de xilanas (MHUANTONG et al., 2015). β -xylosidases e α -L-arabinofuranosidases são enzimas que atuam como tipo exo GHs e hidrolisam o conteúdo de arabinofuranosil. β -xylosidases hidrolisam pequenos xilooligômeros em unidades de xilose, sendo que esta enzima pode reconhecer D-xilopirranose e L-arabinofuranose, levando a bifuncionalidade das enzimas xilanases e arabinosidases. Enzimas α -L-arabinofuranosidases possuem substrato específico, atuando em porções únicas ou duplas das moléculas que constituem o arabinofuranosídeo, tais como xilanas, xilo-oligômeros e arabinanas (SHALLOM e SHOHAM, 2003). α -L-arabinofuranosidases possuem potencial para aplicações que envolvam a conversão de vários substratos hemicelulósicos em açúcares fermentescíveis, os quais podem ser posteriormente convertidos a etanol combustível. Atuando em sinergismo com xilanases e xilosidases, α -L-arabinofuranosidases degradam a xilana em seus açúcares e outros constituintes, tais como xilose, arabinose, ácido glucurônico, éter 4-O-metil e ácidos acético, ferúlico e *p*-cumárico (SAHA, 2000; RAHMAN et al., 2003). Na FC40, pode-se supor estes tipos de reações metabólicas, pois dentre as enzimas mais representativas que foram identificadas estão β -galactosidases (GH1, GH2 e GH42), endo-1,4- β -xylanases (GH10 e GH11), β -xylosidases (GH39 e GH43) e non-reducing end α -L-arabinofuranosidases (GH43, GH51 e GH62). Outras famílias de GHs, PLs e CEs com atividade hemicelulolíticas, não discutidas neste trabalho, são identificadas na Figura 4 e Tabela 12.

A celulose consiste em cadeias lineares de D-glicopirranose que fazem ligações $\beta(1\rightarrow4)$, as quais estão condensadas por ligações de hidrogênio em estruturas

cristalinas, chamadas microfibrilas. Essas microfibrilas são formadas por cadeias de até 250 moléculas de glicose que estão ligadas com a hemicelulose. Além desta estrutura cristalina, a celulose contém regiões não cristalinas (amorfas) dentro das microfibrilas, sendo que as quantidades relativas de celulose cristalina e não cristalina variam e são dependentes da espécie do vegetal (de VRIES e VISSER, 2001; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010; CRAGG et al., 2015). A degradação da celulose pode ser dividida em três etapas de ação enzimática: 1) endoglucanases catalisam aleatoriamente a quebra de ligações internas na cadeia de celulose; 2) cellobiohydrolases que agem sobre o terminal de cadeias para disponibilizar celobiose no meio; e 3) β -glucosidases que agem sobre os celo-oligossacarídeos e celobiose, disponibilizando glicose (WANG et al., 2016). A celobiose é um dissacarídeo composto de duas moléculas de glicose, o qual é um composto da hidrólise incompleta da celulose. Como a enzima que cliva a celobiose em duas moléculas de glicose é uma enzima que se localiza no citoplasma, primeiro os micro-organismos necessitam realizar uma modificação transducional na molécula de celobiose a fim de transportá-la para o seu citoplasma. A seguir, a enzima phospho- β -glucosidase (GH1) pode então realizar a clivagem da ligação glicosídica que une as duas moléculas de glicose (MICHLMAYR e KNEIFEL, 2014). Na FC40, identificou-se estas três classes de enzimas, sendo que as mais relevantes foram β -glucosidases (GH1 e GH3) e endo- β -1,4-glucanases (GH5, GH10 e GH45) (Tabela 12).

O sinergismo é um processo muito importante de ser observado entre enzimas em uma reação bioquímica, pois assim há uma otimização no tempo de reação e formação de reagentes específicos (CRAGG et al., 2015). β -galactosidases e α -galactosidases, ambas identificadas na FC40 (Tabela 12), atuam em conjunto na remoção de resíduos de D-galactose que constituem os polissacarídeos estruturais da parede celular vegetal. Enquanto as β -galactosidases disponibilizam os terminais dos resíduos de galactose que constituem a galactana e pectina, as α -galactosidases atuam na remoção da galactose do esqueleto de manose presente na galactoglucomanana. Galactano é um oligossacarídeo formado pela união de 10 moléculas de monossacarídeos formados por ligações entre galactose e frutose. Pectina é formada por um grupo de heteropolissacarídeos e consistem em uma espinha dorsal de resíduos de ácido D-galacturônico fazendo ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ entre

si, a qual é interrompida por resíduos de L-ramnose que fazem ligações $\alpha(1\rightarrow2)$. Cadeias laterais longas da pectina são constituídas principalmente de resíduos de L-arabinose e D-galactose, os quais ainda podem estar ligados a resíduos de ramnose (de VRIES e VISSER, 2001).

Considerando as 20 espécies bacterianas mais abundantes da FC40, verificou-se que as famílias de enzimas com atividade sobre carboidratos mais usadas pela comunidade bacteriana são principalmente GTs, CEs e GHs (Figura 5). Algumas bactérias e fungos do rúmen usam uma estrutura multi-modular que contém inúmeras unidades catalíticas montadas em um grande reunião de proteínas, conhecida como celulosoma, o qual “hospeda” várias celulasas e, devido à esta característica, ocorre aumento da atividade de despolimerização. Por outro lado, muitas espécies procarióticas e eucarióticas no ambiente (solo), secretam enzimas livres que se difundem e atuam de forma independente. No entanto, algumas enzimas podem interpolar entre esses perfis de ação, permitindo que uma única proteína atue em mais de um local no substrato, como por exemplo enzimas multimodulares com domínios similares as GH5, GH6, CBM5 e CBM10 (EKBORG et al., 2007; CRAGG et al., 2015). Celulosomas precisam de várias proteínas que quando montadas podem atuar sobre materiais lignocelulósicos, sendo que as proteínas de ligação da maior parte das estruturas são as SLH, dockerin e cohesin (DOI, 2008). Por ser muito diferente do que ambiente do rúmen, o qual não está imerso em solução, celulosoma não é uma estrutura que se forma na FC40, sendo um forte indício para esta suposição a baixa abundância de genes de ligação SLH que contou 119 genes, dockerin com 9 genes e cohesin com 4 genes (Figura 5).

As espécies bacterianas mais abundantes na FC40, também foram identificadas como as que mais apresentavam contagens para genes relacionados a desconstrução da biomassa vegetal. Dentre as espécies bacterianas identificadas com maior frequência, como Actinobacteria e Proteobacteria, também foram identificados outros filos menos abundantes, tais como Bacteroidetes e Cyanobacteria (Figura 4). Deste modo, assim como estimado para ocorrer em outros ambientes de compostagem, um filo menos abundantes como Bacteroidetes (TAKEBAYASHI et al., 2007; PARTANEN et al., 2010) pode participar ativamente dos processos de desconstrução da biomassa vegetal na FC40, sendo que este perfil de ação

metabólica pode ser reforçado com a identificação de muitas contagens para genes relacionados a desconstrução de estruturas de monossacarídeos, dissacarídeos, celulose, xiloglucana, xilana, pectina e amido para este filo na FC40 (Tabela 12).

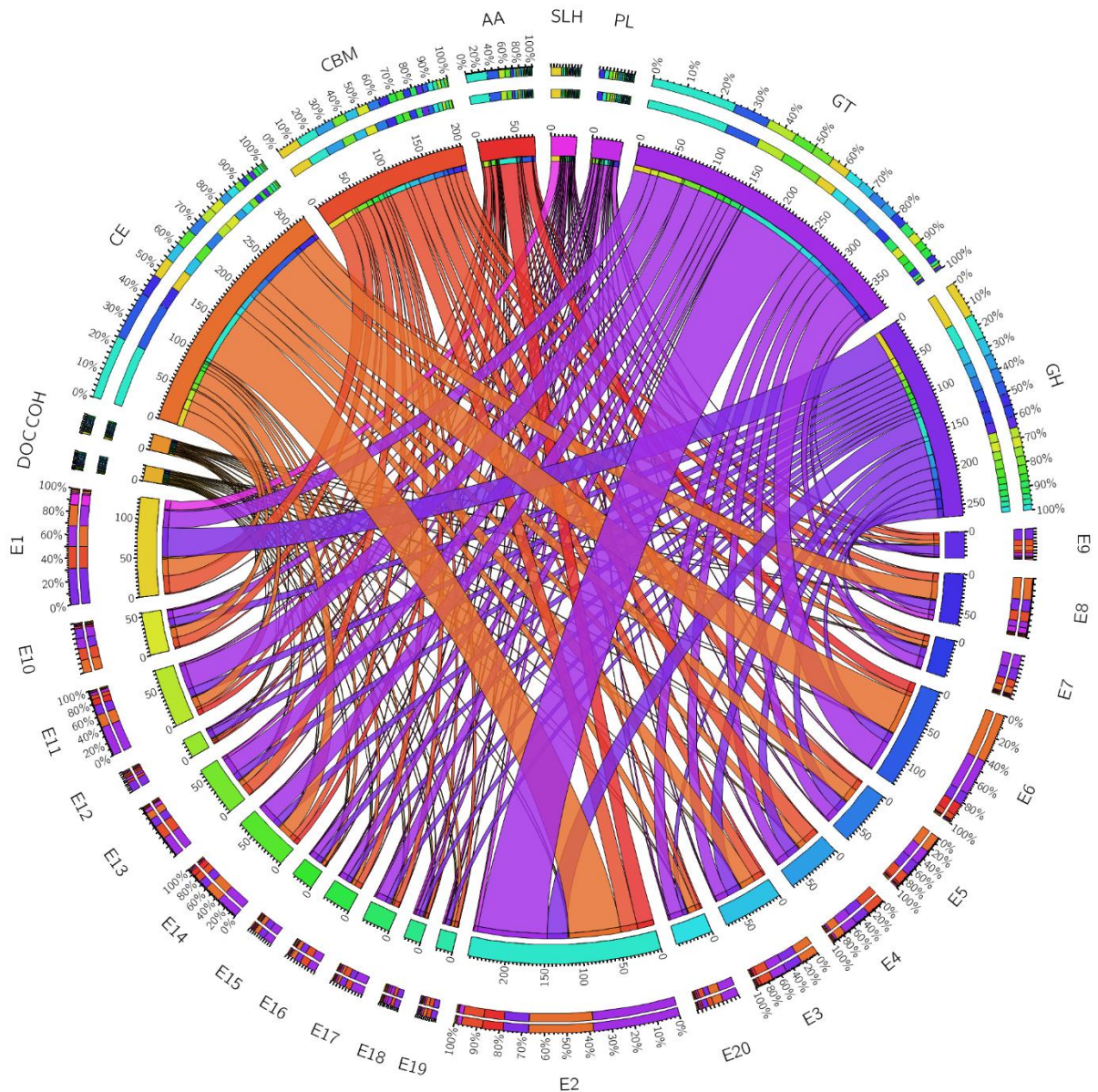


Figura 5. Abundância das famílias de enzimas com ação sobre carboidratos dentre as 20 espécies bacterianas mais abundantes da FC40. As principais classes usadas pela comunidade bacteriana são GTs, CEs, GHs, AAs, PL, dockerin (DOC), cohesin (COH) e SLH. E1: *Thermobacillus composti*; E2: *Thermomonospora curvata*; E3: *Bacillus coagulans*; E4: *Niastella koreensis*; E5: *Caldibacillus debilis*; E6: *Nocardia farcinica*; E7: *Conexibacter woesei*; E8: *Sorangium cellulosum*; E9: *Actinomadura madurae*; E10: *Bacillus thermoamylovorans*; E11: *Chelatococcus sambhunathii*; E12: *Cellulomonas massiliensis*; E13: *Hassallia byssoidea*; E14: *Pseudomonas thermotolerans*; E15: bacterium JKG1; E16: *Caldicoprobacter oshimai*; E17: *Herpetosiphon geysericola*; E18: *Clostridium* sp. BNL1100; E19: *Paenibacillus* sp. oral taxon 786; e E20: *Sandaracinus amylolyticus*.

	α -1,4-glucan: phosphate α -maltosyltransferase	GH13	13	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	α -amylase	GH13, 57, 95	34	19	9	14	5	3	0	0	0	0	5
	Glucoamylase	GH15	11	14	1	2	0	0	0	0	0	0	0
	α,α -trehalase	GH15, 37	6	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	endo-1,3- β -glucanase	GH16, 128	17	0	5	2	0	0	0	0	1	0	1
	glucan 1,3- β -glucosidase	GH17	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	β -mannanase	GH26	5	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Invertase	GH32	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
	endo-levanase	GH32	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase	GH32	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	β -2,6-fructan 6-levanbiohydrolase	GH32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dextranase	GH49	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	β -1,3-glucanase	GH64	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	kojibiose phosphorylase	GH65	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	maltose phosphorylase	GH65	0	0	5	1	1	0	0	0	0	0	0
	trehalose-6-phosphate phosphorylase	GH65	3	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	Levansucrase	GH68	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	cellobiose phosphorylase	GH94	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1
Celulose	β -glucosidase	GH1, 3, 4	14	6	14	0	1	1	0	0	0	0	1
	glucan 1,4- β -glucosidase	GH3	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	endo-1,4- β -D-glucanase	GH5, 6, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45	23	16	6	7	1	0	0	0	0	0	0
	Cellobiohydrolase	GH6, 48	14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	kojibiose phosphorylase	GH65	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	cellobiose phosphorylase	GH94	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1
Xiloglucana	β -galactosidase	GH1, 2, 4, 35, 42, 43	75	11	31	6	0	7	3	2	0	0	7
	α -galactosidase	GH4, 27, 36, 110	10	3	21	3	0	4	1	0	0	0	1
	reducing-end-xylose releasing exo-oligoxylanase	GH8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	α -L-fucosidase	GH29, 95	1	0	12	11	1	3	0	0	0	1	2
	α -xylosidase	GH31	12	7	5	0	0	1	0	0	0	0	0
	α -L-arabinofuranosidase	GH43, 51, 54, 62	25	14	19	9	0	3	1	1	2	0	1
	Xyloglucanase	GH74	9	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0

Xilana	β -galactosidase	GH1, 2, 4, 35, 42, 43	75	11	31	6	0	7	3	2	0	0	1	7
	α -galactosidase	GH4, 27, 36, 110	10	3	21	3	0	4	1	0	0	0	0	1
	endo- β -1,4-xylanase	GH5, 8, 10, 11, 30, 43	33	12	19	10	1	0	0	0	0	0	0	5
	reducing-end-xylose releasing exo-oligoxylanase	GH8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	β -xylosidase	GH39, 43, 52, 116	13	21	13	5	0	0	1	0	0	0	0	0
	α -L-arabinofuranosidase	GH43, 51, 54, 62	25	14	19	9	0	3	1	1	2	0	0	1
	α -glucuronidase	GH67	2	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1
	Xyloglucanase	GH74	9	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	feruloyl esterase	CE1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Acetyl xylan esterase	CE4, 7	7	2	2	3	0	2	0	0	0	0	0	3
Galactomanana	β -galactosidase	GH1, 2, 4, 35, 42, 43	75	11	31	6	0	7	3	2	0	0	1	7
	β -mannosidase	GH2, 5, 26	7	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	α -galactosidase	GH4, 27, 36, 110	10	3	21	3	0	4	1	0	0	0	0	1
	mannan endo- β -1,4- mannosidase	GH5	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	β -mannanase	GH26	5	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	kojibiose phosphorylase	GH65	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	α -1,6-mannanase	GH76	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	mannan endo-1,2- α -mannanase	GH99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pectina	β -galactosidase	GH1, 2, 4, 35, 42, 43	75	11	31	6	0	7	3	2	0	0	1	7
	exo-polygalacturonosidase	GH28	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Polygalacturonase	GH28	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	β -xylosidase	GH39, 43, 52, 116	13	21	13	5	0		1	0	0	0	0	0
	Endoarabinanase	GH43	4	1	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	Exoarabinanase	GH93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	α -L-arabinofuranosidase	GH43, 51, 54, 62	25	14	19	9	0	3	1	1	2	0	0	1
	endo- β -1,4-galactanase	GH53	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	α -L-rhamnosidase	GH33, 78, 106	5	0	9	10	0	2	2	0	0	0	0	1
	unsaturated glucuronyl hydrolase	GH88, GH105	0	0	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	unsat. Rhamnogalacturonan hydrolase	GH105	0	0	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	pectate lyase	PL1, 3, 9, 10	11	6	2	4	0	0	0	0	0	0	0	1
	pectin methylesterase	CE8, 10	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1

Amido	rhamnogalacturonan acetylsterase	CE12	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
	β -glucosidase	GH1, 3, 4	14	6	14	0	1	1	0	0	0	0	1
	endo-1,4- β -D-glucanase	GH5, 6, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45	23	16	6	7	1	0	0	0	0	0	0
	α -glucosidase	GH4, 13, 31, 63, 97	16	6	23	7	1	4	1	0	0	0	2
	maltose-6-phosphate glucosidase	GH4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	4- α -glucanotransferase	GH13, 77	15	7	2	4	1	1	0	0	0	0	2
	amylase- α -1,6-glucosidase	GH13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Pullulanase	GH13	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	1,4- α -glucan branching enzyme	GH13, 57	11	9	1	1	0	1	0	0	0	0	3
	Cyclomaltodextrinase	GH13	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	malto-oligosyltrehalose synthase	GH13	11	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	GH13	11	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0
	oligo- α -glucosidase	GH13	2	0	7	1	0	0	0	0	0	0	1
	sucrose phosphorylase	GH13	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	trehalose synthase	GH13	19	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1
	trehalose-6-phosphate hydrolase	GH13	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	α -1,4-glucan: phosphate α - maltosyltransferase	GH13	13	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	α -1,6-glucosidase	GH13	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	α -amylase	GH13, 57, 95	34	19	9	14	5	3	0	0	0	0	5
	Glucoamylase	GH15	11	14	1	2	0	0	0	0	0	0	0
	α , α -trehalase	GH15, 37	6	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	endo-1,3- β -glucanase	GH16, 128	17	0	5	2	0	0	0	0	1	0	1
	glucan 1,3- β -glucosidase	GH17	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Invertase	GH32	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
	endo-levanase	GH32	4	0	2		0	0	0	0	0	0	0
	β -2,6-fructan 6- levanbiohydrolase	GH32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dextranase	GH49	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	β -1,3-glucanase	GH64	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	maltose phosphorylase	GH65	0	0	5	1	1	0	0	0	0	0	0
	Levansucrase	GH68	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Outros carboidratos	β -galactosidase	GH1, 2, 4, 35, 42, 43	75	11	31	6	0	7	3	2	0	0	1

[illegible]

mannosyl-glycoprotein endo- β -N-acetylglucosaminidase	GH73	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -1,6-mannanase	GH76	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyaluronidase	GH84	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mycodextranase	GH87	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -1,2-mannosidase	GH92	5	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0
exo- α -L-1,5-arabinanase	GH93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
mannan endo-1,2- α -mannanase	GH99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
peptidoglycan lytic transglycosylase	GH102	0	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
endo- α -1,4-polygalactosaminidase	GH114	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a AC: Actinobacteria, PT: Proteobacteria, FM: Firmicutes, BT: Bacteroidetes, CY: Cyanobacteria, CF: Chloroflexi, VC: Verrucomicrobia, SP: Spirochaetes, AS: Ascomycota, DI: Dictyoglomi, EU: Euryarchaeota, OT (Outros): Armatimonadetes, Deinococcus-Thermus, Planctomycetes, Thermotogae, Fibrobacteres, Ignavibacteriae, Calditrichaeota, Fusobacteria, Tenericutes, Acidobacteria, Chlamydiae, Chlorobi, Nitrospirae, Bacteria não classificada.

CBMs são desprovidos de ação catalítica e são associados a GHs, PLs, GTs e expansinas de parede celular (GEORGELIS et al., 2011). Embora a literatura sobre a ação biológica das expansinas seja escassa, sabe-se que tais enzimas aparentam estar relacionadas com o reconhecimento de estruturas localizadas na parede celular vegetal, podendo atuar como uma âncora que penetra o interior da parede celular vegetal e causa aderência, auxiliando na colonização celular ou causa de doenças em tecidos de vegetais (KERFF et al., 2008; MARTINEZ-ANAYA, 2016). As expansinas bacterianas parecem enfraquecer as interações moleculares dos constituintes da membrana vegetal e, *in vitro*, essas enzimas fazem ligação com a celulose (GEORGELIS et al., 2015). Identificou-se na FC40 CBMs com três tipos de especificidade de substrato: 1) celulose sendo relacionados os CBM2, CBM4, CBM6, CBM37 e CBM59; 2) xilana, sendo relacionados os CBM2, CBM4, CBM6, CBM37, CBM54 e CBM59; e 3) outros polímeros de membrana (beta-glucanas, pectinas, mananas, etc), sendo relacionados os CBM4, CBM6, CBM35 e CBM59 (dados não mostrados).

Recentemente, verificou-se a necessidade de criar uma classe de famílias CAZyme que agrupasse enzimas que atuam sobre a lignina, celulose cristalina e quitina. Isto foi necessário, pois além de ocorrer a presença de lignina interagindo com polissacarídeos da parede celular de vegetais, fragmentos de lignina são suscetíveis à ação de monooxigenases líticas de polissacarídeo (LPMOs). Desta forma, nasceu a nova família de enzimas com atividade sobre carboidratos chamada Atividades Auxiliares (AA). A família de AAs acomoda ampla gama de mecanismos enzimáticos e substratos que são relacionados à conversão da lignocelulose em moléculas menos complexas (LEVASSEUR et al., 2013; LOMBARD et al., 2014). Atualmente no banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>), existem 13 famílias de AAs e um grupo não classificado. Nossas análises apontaram que existem 430 genes na FC40 que são relacionados as classes de AAs, os quais foram distribuídos entre as famílias AA1-7 e AA9-10. Destas, 224 ORFs eram pertencentes a Actinobacteria, 98 a Proteobacteria e 37 a Firmicutes (Figura 4). A maior contagem de ORFs para Actinobacteria e Proteobacteria provavelmente se deve ao fato de que muitas espécies bacterianas capazes de oxidar a lignina são relacionados a estes filos, sendo que as classes α -Proteobacteria e γ -Proteobacteria são as que mais detém esta característica no filo

Proteobacteria (BUGG et al., 2011). Até recentemente, as enzimas de procariotos responsáveis pela degradação da lignina eram pouco compreendidas, mas atualmente sabe-se que a maior parte delas possuem a ação de peroxidases (AHMAD et al., 2011; BROWN et al., 2012; RAHMANPOUR e BUGG, 2015; GRAGG et al., 2015).

Por ser uma classe recentemente criada, a descoberta e relato de novas AAs ambientais representa acréscimo de conhecimento sobre esta família de enzimas ainda não bem compreendidas. Membros das famílias CBM33 e GH61, foram recentemente reclassificados como LPMOs, sendo que os membros de CBM33 atualmente são classificados dentro da classe AA10. Identificou-se 27 ORFs de AA10 filiadas ao filo Actinobacteria e apenas uma foi atribuída a Proteobacteria (dados não mostrados). Estas proteínas que possuem ação oxidativa são dependentes de cobre, onde algumas dessas enzimas atuam sobre a quitina e outras sobre a celulose (LEVASSEUR et al., 2013). Na análise filogenética entre as 27 ORFs da classe AA10 e sequências de proteínas recuperadas do banco de dados CAZy, indica a existência de dois grupos funcionais de AA10 que atuam na FC40 (Figura 6), os quais contribuem ativamente para degradação da estrutura de quitina (destacado em azul) e celulose/quitina (destacado em vermelho). Grupos de LPOMs que atuam sobre a quitina, podem representar enzimas microbianas que contribuem para decomposição de estruturas microbianas mortas, mais precisamente estruturas derivadas da parede celular de fungos e exoesqueleto de artrópodes. Estas estruturas representam fonte direta de acesso a nitrogênio (PAVLOVIČ et al., 2016), nutriente escasso em fibras vegetais (MCDONALD et al., 2012) e em processos de compostagens que passaram da fase termofílica (SÁNCHEZ-MONEDERO et al., 2001; STEGER et al., 2005).

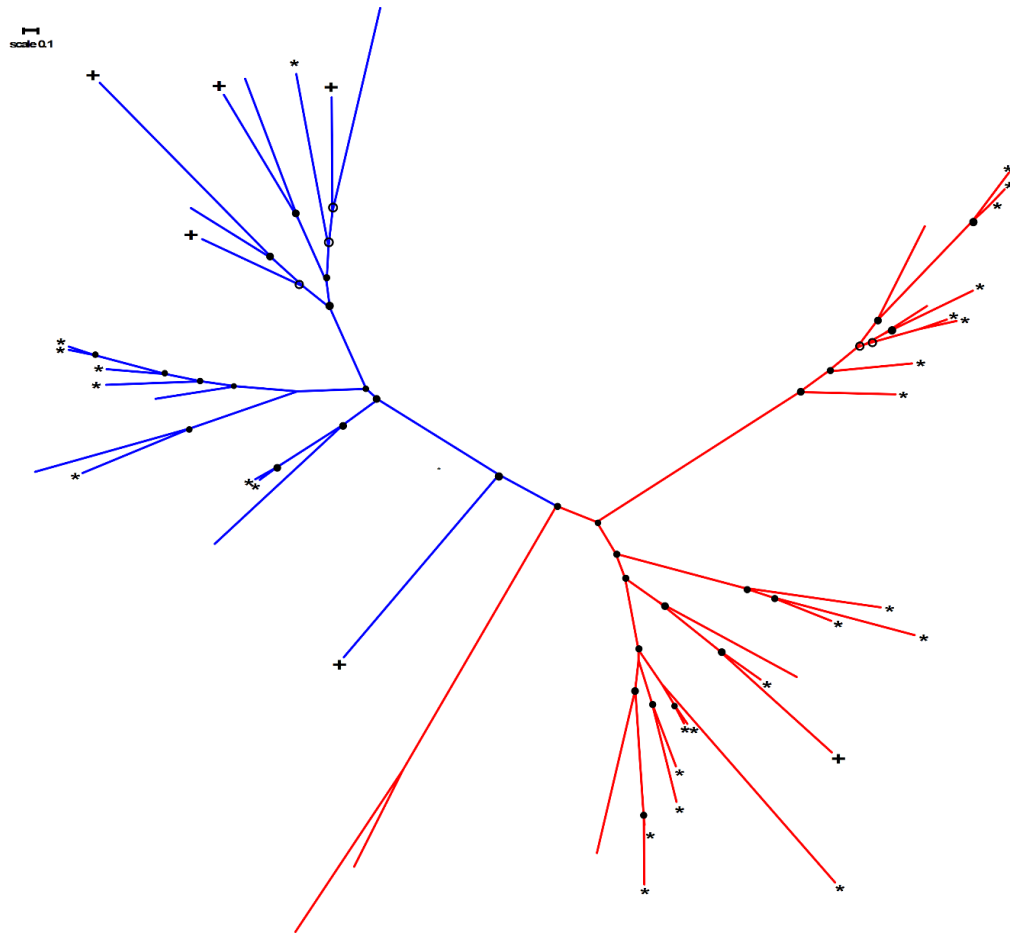


Figura 6. Árvore filogenética não enraizada de Máxima Verossimilhança construída com IQ-TREE, usando modelo evolutivo WGA+G+I com quatro categorias. O grupo representado em azul na árvore filogenética é referente as LPOMs que atuam sobre a quitina e, o grupo identificado em vermelho, representam as LPOMs que atuam sobre a celulose e quitina. Sinal de + representam LPOMs disponíveis no banco de dados CAZy que não possuem discriminação quanto a preferência de quitina ou celulose. Sinal de * representam ORFs da FC40 que representam novas AA10. Bola cheia (●) presente nos nós que conectam os ramos na árvore filogenética, representam suporte para os ramos com *bootstrap* entre 80-100 %. Bola vazia (○) representa suporte para os ramos com *bootstrap* entre 50-79 %.

Archaea pode ser encontrada em uma infinidade de ambientes, como em compostagens (MARTINS et al., 2013) e tripas de térmitas (BOUCIAS et al., 2013) No entanto, em relação a bactérias, os mecanismos de desconstrução da lignocelulose usados por Archaea são muito menos explorados (CRAGG et al., 2015). A enzima 1,4-benzoquinone reductase (EC. 1.6.5.6) está classificada dentro da família AA6, sendo membro único desta família de enzimas com atividade sobre carboidratos. Nas espécies de arqueas, esta enzima possui ação intracelular e está envolvida na biodegradação de compostos aromáticos, tais como aqueles encontrados na lignina

e, em fungos, está ligada à proteção celular contra compostos reativos de quinona (LOMBARD et al., 2014). Archaea apresentou 0,14 % de abundância nas análises (Tabela 2), sendo que foi identificado uma ORF para a enzima 1,4-benzoquinone reductase pertencente ao filo Euryarchaeota, indicando que este filo pode estar participando da decomposição da lignina (dados não mostrados).

De fato os papéis ecológicos do microbioma verificados na FC40 aparentam ser bem versáteis, onde os primeiros mecanismos atuam sobre a lignina, seguindo para a ação na despolimerização de hemicelulose e celulose. Neste sentido, as enzimas das classes de AAs podem atuar em conjunto com outros mecanismo de fungos e demais micro-organismos na desestabilização primária à lignina (MARTINS et al., 2013; STEGER et al., 2005; LOMBARD et al., 2014; CRAGG et al., 2015). Devido a especificidade de tais reações, as enzimas que atuam sobre a despolimerização da lignocelulose são de grande interesse para pesquisas envolvendo a produção de biocombustíveis, pois elas podem auxiliar no rompimento de barreiras tecnológicas que inviabilizam a obtenção e fermentação de estruturas menos complexas, tais como hexoses e pentoses (de VRIES e VISSER, 2001; DOI, 2008; LI et al., 2009; WANG et al., 2016).

5.5 Visão geral sobre as principais vias de degradação da lignocelulose e ciclos biogeoquímicos o nitrogênio e metano na FC40

Segundo as avaliações realizadas, a comunidade microbiana da FC40 possui grande potencial em atuar na despolimerização da lignocelulose (**Figuras 4**). Baseado nestas observações, buscou-se identificar vias bioquímicas que fossem ativas após a disponibilização de estruturas menores e que são constituintes da biomassa vegetal. Com a identificação de tais vias, fica mais evidente que de fato a comunidade microbiana da FC40 apresenta genes de enzimas que despolimerizam a lignocelulose. Baseado nestas observações, realizou-se a identificação da abundância total de vias bioquímicas (MG-RAST, SEED nível 3) presentes em três ambientes com elevada disponibilidade de biomassa vegetal (ZC1, ZC2 e RSA) e da FC40, seguindo para análises comparativas destes resultados.

Pectina, um polissacarídeo constituído principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose, está presente na lamela média na parede celular de células vegetais (CONVERTI et al., 1999; de VRIES e VISSER, 2001; CRAGG et al., 2015). Quando a pectina é fermentada por micro-organismos em pH ácido, ocorre maior produção de ácido acético e menores quantidades de metanol, acetona, butanol e ácido butírico (HOLT et al., 1988; SIROTEK et al., 2004). No entanto, em pH 7, verifica-se elevadas concentrações de ácidos acético e butírico (HOLT et al., 1988). A hemicelulose, um polímero complexo que forma ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalente com a lignina (principalmente com éter benzílico) é um precursor da síntese de ácidos láctico e succínico. Além disto, a hemicelulose também faz ligações éster com grupos acetil (presentes nas cadeias laterais da hemicelulose) e ácidos hidroxicinâmicos, sendo que grupos acetil são precursores da síntese de ácido acético (CONVERTI et al., 1999). A hemicelulose possui como principal composto de ramificação a arabinoxilana, estrutura que é constituída por xilose, arabinose, glicose, ácidos urônicos, galactose, arabinofuranosil e carboxilato de ácido urônico (MELLINGER-SILVA et al., 2011; BIAN et al., 2012). Butanol pode ser obtido a partir da fermentação de hemicelulose devido a ação de enzimas xilanases (XIN et al., 2017). Indícios de que tais vias metabólicas são ativas na FC40 podem ser identificadas na Figura 7.

A partir da desconstrução da pectina, hemicelulose e celulose, fica evidente que estruturas menos complexas são disponibilizadas no ambiente. Uma das vias que pode ser ativa neste momento é o subsistema do ciclo serine-glyoxylate, o qual é considerado uma via alternativa para conversão de acetil-CoA em compostos anapleuróticos e gluconeogênicos. Por este motivo, esta via é considerada uma alternativa para assimilação de compostos di carbono (C2) e acetilação de acetato em bactérias. No metabolismo de moléculas mono carbono (C1), o succinato é convertido a malil-CoA, que após ser clivado, forma acetil-CoA e glioxilato. O glioxilato é então usado como suporte no ciclo da serina para assimilação de C1, processo este fundamental no metabolismo de micro-organismos metilotróficos (ENSIGN, 2006). Micro-organismos metilotróficos são representados por bactérias, leveduras, fungos e arqueas, os quais são capazes de assimilar metano/metanol como única fonte de carbono e energia, sendo micro-organismos importantes na reciclagem de carbono

como o metano e dióxido de carbono. Tal atividade microbiana pode resultar na diminuição significativa dos impactos ambientais nas emissões de gases do efeito estufa na atmosfera. Entretanto, tais micro-organismos também podem crescer em meio contendo compostos multicarbono, como os metanotróficos facultativos, os quais podem assimilar ácidos orgânicos (acetato) e etanol (IGUCHI et al., 2015). Desta forma, no metagenoma FC40, tais vias aparentam ser muito ativas, significando que os micro-organismo deste ambiente são capazes de realizar tais metabolismos (Figura 8).

As hexoses e pentoses oriundas da despolimerização da biomassa vegetal são importantes para produção de energia nos seres vivos (CRAGG et al., 2015). Na Figura 7, são mostrados os oligossacarídeos e monossacarídeos que podem ser os mais disponíveis na FC40. Estruturas menos complexas como triose e celobiose podem ser convertidas em glicose dentro do citoplasma microbiano através da reação catalisada pela enzima phospho- β -glucosidase (GH1) (MICHLMAYR e KNEIFEL, 2014), podendo seguir para vias metabólicas produtoras de energia tais como glicólise e gliconeogênese, Entner Doudoroff, entre outras (Figura 9). Além de ser relacionada ao catabolismo de glicose para piruvato, a via Entner-Doudoroff também é associada a degradação da pectina. O produto metabólico mais significativo desta reação é o acetato, sendo observado a diminuição de formato, lactato, fumarato e succinato (DUSKOVÁ e MAROUNEK, 2001; SIROTEK et al., 2004). Apenas a via YgfZ está relacionada ao metabolismo de formato na FC40. YgfZ é uma proteína dependente de folato que está relacionada ao metabolismo de moléculas de mono carbono (C1) em processos celulares importantes, tais como biossíntese de nucleotídeos, vitaminas e aminoácidos. As unidades C1 derivadas do catabolismo de três moléculas doadoras, como serina, glicina e formato, são ativadas por ligação ao tetraidrofolato (THF) (TEPLYAKOV et al., 2004).

Além de açúcares oriundos da desconstrução da biomassa vegetal, a comunidade microbiana também necessita ter acesso a fontes de N e P, nutrientes dos quais a torta de filtro é muito rica (PRADO et al., 2013). No entanto, devido a ação dos micro-organismos, a torta de filtro armazenada por longos períodos pode apresentar queda na disponibilidade destes nutrientes (SÁNCHEZ-MONEDERO et al., 2001; MCDONALD et al., 2012; LIN et al., 2014), fazendo com que os micro-

organismos sintetizem enzimas capazes de decompor estruturas microbianas mortas para acessar fontes destes e de outros nutrientes (PAVLOVIČ et al., 2016).

Foram identificadas um total de 15 vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio. Destas, somente subunidades de urease, decomposição de ureia e assimilação de amônia são mais abundantes em FC40 (Figura 10). Como as vias metabólicas para amonificação de nitrito e nitrato e assimilação de amônia são relacionadas, pode-se assumir que existe pouca disponibilidade de amônia para volatilizar na FC40, devido a esta ser utilizada na síntese proteica ou produção de energia pelos micro-organismos anaeróbios. A respiração anaeróbia é um dos principais meios utilizados pelas bactérias para participarem diretamente dos ciclos biogeoquímicos, gerando uma força motora de prótons, onde estes prótons podem ser assimilados como elétrons por ampla variedade de moléculasceptoras, incluindo compostos inorgânicos como o nitrato e nitrito (CRUZ-GARCÍA et al., 2007). Na amonificação respiratória o nitrato é reduzido a nitrito, o qual é convertido a amônia (SIMON, 2002). Embora a via de assimilação de amônia seja mais abundante na FC40, amonificação de nitrato e nitrito é a via mais abundante somente nos outros três ambientes (Figura 10). No entanto, juntas essas vias mostram que na FC40 existe o ciclo de N, possibilitando a comunidade microbiana acessar fontes de N que podem ser usadas em seus metabolismos.

Embora não sejam os únicos indivíduos capazes de produzir metano, as arqueias metanogênicas são um dos principais grupos que atuam no ciclo global do carbono através da metanogênese (YOON et al., 213). Neste tipo de metabolismo, alguns dos produtos finais produzidos por estes micro-organismos são as moléculas de H_2 , CO_2 e acetato, as quais podem ser usadas na produção de metano (CH_4) (ROTHER e METCALF, 2004; LESSNER et al., 2006; GUNSALUS et al., 2016). Além destas vias metabólicas, a Figura 11 mostra todas as vias metabólicas relacionadas a produção de metano identificadas na FC40.

M. mazei é uma arqueia metanogênica usada como organismo padrão no entendimento do ciclo do metano, pois pode crescer hidrogenotroficamente, metilotróficamente e acetilclásticamente (WELTE e DEPPENMEIER, 2011). Sua cadeia respiratória compreende três sistemas oxidoredutase de conservação de energia que levam à formação de um gradiente eletroquímico de prótons e síntese de

ATP pela ação da A1Ao ATP sintase (DEPPENMEIER e MÜLLER, 2008). Estes sistemas de transdução de energia são: 1) $F_{420}H_2$: heterodisulfureto oxidoreductase (onde $F_{420}H_2$ é a forma reduzida de F_{420}); 2) H_2 : heterodisulfureto oxidoreductase e ferredoxina e; 3) Fd: heterodisulfureto oxidoreductase. O Fd é reduzido durante a metanogênese metilotrófica e acetilclática e é oxidado por Ech hidrogenase como parte do sistema Fd: heterodisulfureto oxidoreductase. $F_{420}H_2$ é formado por F_{420} hidrogenase (Frh) no decurso da oxidação do grupo metilo na via metilotrófica, ou no citoplasma de micro-organismos metanogênicos que crescem hidrogenotróficamente. Frh oxida o H_2 com a concomitante redução de F_{420} , disponibilizando $F_{420}H_2$ que pode ser então reduzido por CO_2 (WELTE e DEPPENMEIER, 2011). No entanto, embora contribuam em menor escala do que em relação aos outros três ambientes de elevada disponibilização de biomassa vegetal, existem outras vias metabólicas para geração de elétrons, que na comunidade da FC40 aparenta ser realizado pelas arqueas dos ordens Methanococcales, Methanobacteriales e Methanopyrales (Figura 11).

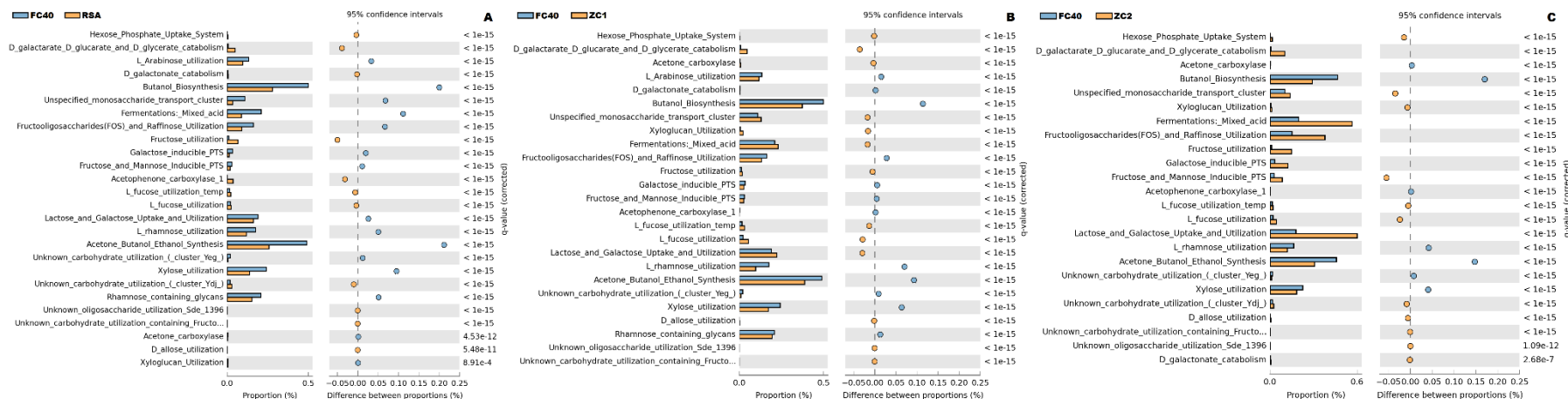


Figura 7. Vias metabólicas relacionadas a degradação de pectina e hemicelulose identificadas no banco de dados SEED nível 3 (q -value < 0,001, plataforma MG-RAST) apenas para os ambientes de elevada biomassa vegetal (FC40, RSA, ZC1 e ZC2). **A)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e RSA; **B)** Abundâncias de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC1; **C)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC2. Gráfico de barras de erros estendidas construído no STAMP usando opção de comparação entre duas amostras, teste estatístico G-test (w/Yates') com Fisher's, Two-sided com método CI (intervalo de 95%) e múltipla correção Benjamin-Hochberg FDR.

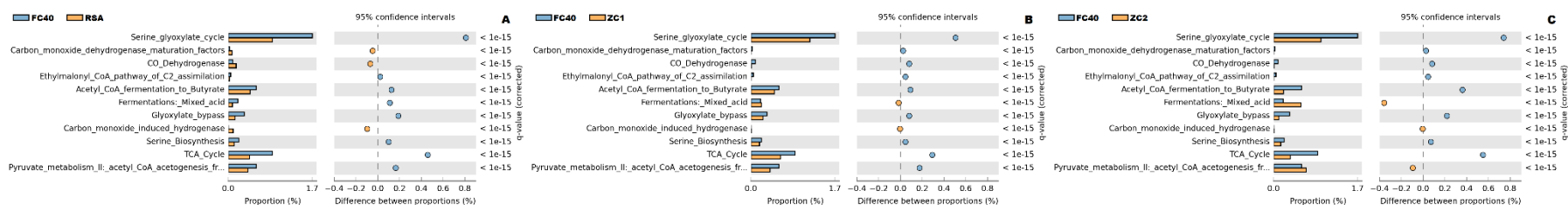


Figura 8. Vias metabólicas relacionadas ao ciclo serine-glyoxylate e subsistemas acessórios identificadas no banco de dados SEED nível 3 (q -value < 0,001, plataforma MG-RAST) apenas para os ambientes de elevada biomassa vegetal (FC40, RSA, ZC1 e ZC2). **A)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e RSA; **B)** Abundâncias de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC1; **C)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC2. Gráfico de barras de erros estendidas construído no STAMP usando opção de comparação entre duas amostras, teste estatístico G-test (w/Yates') com Fisher's, Two-sided com método CI (intervalo de 95%) e múltipla correção Benjamin-Hochberg FDR.

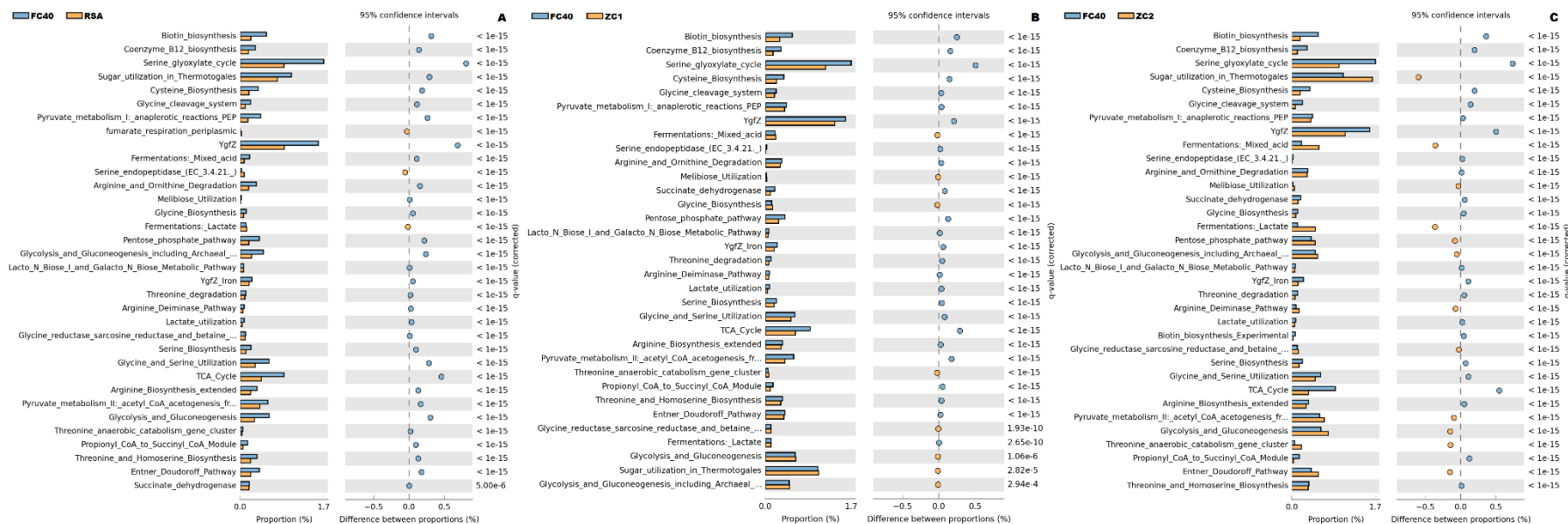


Figura 9. Vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de polissacarídeos, dissacarídeos e monossacarídeos identificadas no banco de dados SEED nível 3 (q -value < 0,001, plataforma MG-RAST) apenas para os ambientes de elevada biomassa vegetal (FC40, RSA, ZC1 e ZC2). **A)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e RSA; **B)** Abundâncias de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC1; **C)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC2. Gráfico de barras de erros estendidas construído no STAMP usando opção de comparação entre duas amostras, teste estatístico G-test (w/Yates') com Fisher's, Two-sided com método CI (intervalo de 95%) e múltipla correção Benjamin-Hochberg FDR.

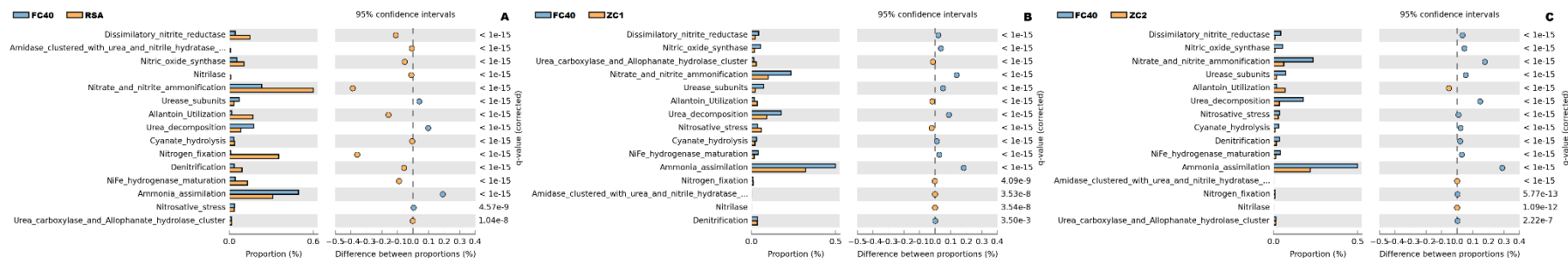


Figura 10. Vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio identificadas no banco de dados SEED nível 3 (q -value $< 0,001$, plataforma MG-RAST) apenas para os ambientes de elevada biomassa vegetal (FC40, RSA, ZC1 e ZC2). **A)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e RSA; **B)** Abundâncias de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC1; **C)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC2. Gráfico de barras de erros estendidas construído no STAMP usando opção de comparação entre duas amostras, teste estatístico G-test (w/Yates') com Fisher's, Two-sided com método CI (intervalo de 95%) e múltipla correção Benjamin-Hochberg FDR.

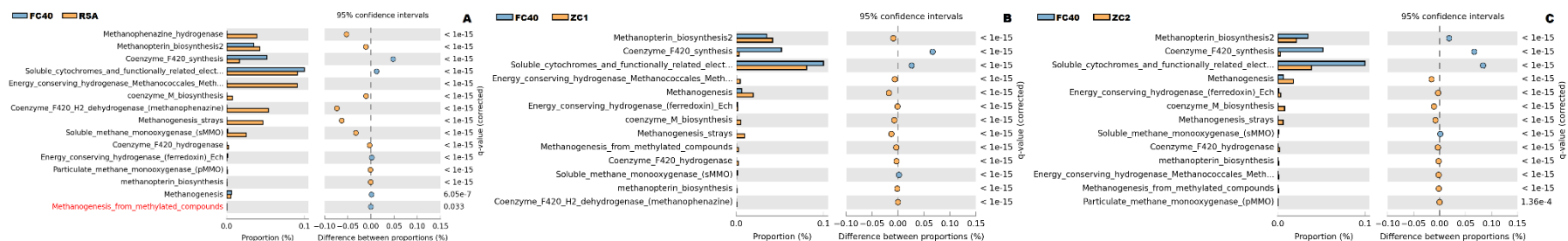


Figura 11. Vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de metano identificadas no banco de dados SEED nível 3 (q -value $< 0,001$, plataforma MG-RAST) apenas para os ambientes de elevada biomassa vegetal (FC40, RSA, ZC1 e ZC2). **A)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e RSA; **B)** Abundâncias de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC1; **C)** Abundância de vias metabólicas identificadas em FC40 e ZC2. Gráfico de barras de erros estendidas construído no STAMP usando opção de comparação entre duas amostras, teste estatístico G-test (w/Yates') com Fisher's, Two-sided com método CI (intervalo de 95%) e múltipla correção Benjamin-Hochberg FDR. Vias metabólicas marcadas em vermelho representam resultados com valor de q -value $> 0,001$, mas que são importantes de mostrar quanto a presença no ambiente FC40.

6. CONCLUSÃO

As análises realizadas mostraram que a torta de filtro estocada por longos períodos é um ambiente propício ao desenvolvimento de uma comunidade microbiana bem adaptada à despolimerização de estruturas como pectina, amido, xilana, galactomanana, oligômeros da desconstrução de outros componentes da hemicelulose e celulose. Dentre as classes de enzimas com atividade sobre carboidratos mais importantes a produção de bioetanol, foram identificadas GHs, CEs, PLs e AAs. Desta forma, a comunidade microbiana demonstrou ser capaz de sintetizar enzimas que podem desestabilizar a lignina, permitindo então que outras enzimas microbiana atuem sobre a desestruturação da hemicelulose e celulose. Embora FC40 seja *habitat* de organismos relacionados aos domínios Eukaryota, Viruses e Archaea, os filos microbianos mais abundantes neste ambiente são Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Os filos bacterianos e arqueas relacionados a desconstrução da biomassa vegetal, além de participarem dos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio e metano. FC40 apresentou 0,62 % de abundância total de eucariotos, sendo que dentre estes indivíduos foram identificados os fungos patogênicos *Neosartorya fumigata* e *Paracoccidioides brasiliensis*. No entanto, tais espécies são identificadas em várias amostras ambientais onde podem viver como organismos saprofíticos ou interagindo com mamíferos. Por este motivo, pode-se sugerir que tal ambiente não apresenta perigo a saúde humana. No entanto, a abordagem usada neste estudo não pode assegurar a segurança biológica de um ambiente, sendo apenas um meio de acessar táxons e vias metabólicas hipotéticas de uma comunidade microbiana. Por este motivo, recomenda-se que ambientes de torta de filtro estocada por longos períodos sejam monitorados ostensivamente por meio de outras análises de monitoramento ambiental de micro-organismos, visando melhorar o entendimento de como se comportam estes fungos patogênicos neste tipo de ambiente.

7. REFERÊNCIAS

ADITIYA, H.B.; MAHLIA, T.M.I.; CHONG, W.T.; NUR, H.; SEBAYANG, A.H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>>.

AHMAD, M.; ROBERTS, J.N.; HARDIMAN, E.M.; SINGH, R.; ELTIS, L.D.; BUGG, T.D.H. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. **Biochemistry**, v. 50, n. 23, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi101892z>>.

ALBERTSEN, M.; HUGENHOLTZ, P.; SKARSHEWSKI, A.; NIELSEN, K. L.; TYSON, G. W.; NIELSEN, P. H. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 31, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2579>>.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, 1997.

AMLINGER, F.; PEYR, S.; CUHLS, C. Green house gas emissions from composting and mechanical biological treatment. **Waste Management & Research**, v. 26, n. 1, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0734242X07088432>>.

ANDA – ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. Principais indicadores do setor de fertilizantes. Disponível em: <http://www.anda.org.br/estatistica/Principais_Indicadores_2015.pdf>. Acessado em: 09 nov. 2017.

ARANTES, V.; GOODELL, B. Current Understanding of Brown-Rot Fungal Biodegradation Mechanisms: A Review. D.D. NICHOLAS, B. GOODELL, T.P. SCHULTZ (Eds.), **Biodeterioration and Protection of Sustainable Biomaterials**, ACS Symposium Series, Oxford University Press, 2014. p. 147-158.

ARNDT, D.; XIA, J.; LIU, Y.; ZHOU, Y.; GUO, A. C.; CRUZ, J. A.; SINELNIKOV, I.; BUDWILL, K.; NESBØ, C. L.; WISHART, D. S. METAGENassist: a comprehensive web server for comparative metagenomics. **Nucleic Acids Research**, 40:W88-W95. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gks497>>.

BAILEY, V. L.; FANSLER, S. J.; STEGEN, J. C.; MCCUE, L. A. Linking microbial community structure to β -glucosidic function in soil aggregates. **The ISME Journal**, v. 7, n. 10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.87>>.

BECKER, B.; MARIN, B. Streptophyte algae and the origin of embryophytes. **Annals of Botany**, v. 103, n. 7, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/aob/mcp044>>.

BELAI, H. T.; RAMOS, F. T.; MAIA, J. C. S. Alterações físico-químicas em um neossolo quartzarênico órtico pela aplicação de subprodutos de indústria sucroalcooleira. **Global Science and Technology**, v. 6, n. 2, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14688/1984-3801.v06n02a10>>.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.08.010>>.

BIAN, J.; PENG, F.; PENG, XIAO-PENG; XU, F.; SUN, RUN-CANG; KENNEDY, J. F. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.107>>.

BIANA, J.; PENG, F.; PENG, XIAO-PENG; XUA, F.; SUN, RUN-CANG; KENNEDY, J. F. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.010>>.

BOETZER, M.; PIROVANO, W. Toward almost closed genomes with GapFiller. **Genome Biology**, v. 13, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r56>>.

BOUCIAS, D. G.; CAI, Y.; SUN, Y.; LIETZE, V. U.; SEN, R.; RAYCHOUDHURY, R.; SCHARF, M. E. The hindgut lumen prokaryotic microbiota of the termite *Reticulitermes flavipes* and its responses to dietary lignocellulose composition. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 7 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/mec.12230>>.

BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C2GC36364J>>.

BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1852>>.

BROWN, M.E.; BARROS, T.; CHANG, M.C.Y. Identification and characterization of a multifunctional dye peroxidase from a lignin-reactive bacterium. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 12, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/1021/cb300383y>>.

BUELOW, H. N.; WINTER, A. S.; VAN HORN, D. J.; BARRETT, J. E.; GOOSEFF, M. N.; SCHWARTZ, E.; TAKACS-VESBACH, C. D. Microbial Community Responses to Increased Water and Organic Matter in the Arid Soils of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01040>>.

BUGG, T.D.H.; AHMAD, M.; HARDIMAN, E.M.; RAHMANPOUR, R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c1np00042j>>.

BUTTERBACH-BAHL, K.; BAGGS, E. M.; DANNENMANN, M.; KIESE, R.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 368, n. 1621, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>>.

CAHYANIL, V. R.; MATSUYA, K.; ASAKAWA, S.; KIMURA, M. Succession and phylogenetic profile of methanogenic archaeal communities during the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 50, n. 4, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2004.10408512>>.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. Norma Técnica, P4.231, 3ª edição:15 pág., 2014.

CHAN, C. S.; CHAN, KOK-GAN; TAY, YEA-LING; CHUA, YI-HENG; GOH, K. M. Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00177>>.

CHERTKOV, O.; SIKORSKI, J.; NOLAN, M.; LAPIDUS, A.; LUCAS, S.; DEL RIO, T. G.; TICE, H.; CHENG, JAN-FANG; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; LIOLIOS, K.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; OVCHINNIKOVA, G.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; DJAO, O. D. N.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, YUN-JUAN; JEFFRIES, C. D.; BRETTIN, T.; HAN, C.; DETTER, J. C.; ROHDE, M.; GÖKER, M.; WOYKE, T.; BRISTOW, J.; EISEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KLENK, HANS-PETER; KYRPIDES, N. C. Complete genome sequence of *Thermomonospora curvata* type strain (B9T). **Standard in Genomic Sciences**, v. 4, n. 1, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.4056/sigs.1453580>>.

CHOI, E. J.; JIN, H. M.; LEE, S. H.; MATH, R. K.; MADSEN, E. L.; JEON, C. O. Comparative genomic analysis and benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-xylene (BTEX) degradation pathways of *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.02809-12>>.

CHRONI, C.; KYRIACOU, A.; GEORGAKI, I.; MANIOS, T.; KOTSOU, M.; LASARIDI, K. Microbial characterization during composting of biowaste. **Waste Management**, V. 29, n. 5, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.12.012>>.

COLEMAN, N. V.; WILSON, N. L.; BARRY, K.; BRETTIN, T. S.; BRUCE, D. C.; COPELAND, A.; DALIN, E.; DETTER, J. C.; DEL RIO, T. G.; GOODWIN, L. A.; HAMMON, N. M.; HAN, S.; HAUSER, L. J.; ISRANI, S.; KIM, E.; KYRPIDES, N.; LAND, M. L.; LAPIDUS, A.; LARIMER, F. W.; LUCAS, S.; PITLUCK, S.; RICHARDSON, P.; SCHMUTZ, J.; TAPIA, R.; THOMPSON, S.; TICE, H. N.; SPAIN, J. C.; GOSSETT, J. G.; MATTES, T. E. Genome sequence of the ethene- and vinyl chloride-oxidizing Actinomycete *Nocardioides* sp. strain JS614. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.05109-11>>.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Perfil do Setor do Açúcar e do Etanol no Brasil. Safra 2014/15, v3, 2017.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Gestão de resíduos e produtos – Uso. Resolução Conama nº 380, 2006. 2 p.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, J. M. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 82, n. 2, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1385/ABAB:82:2:141>>.

COTTA, J. A. O.; CARVALHO, N. L. C.; BRUM, T. S.; REZENDE, M. O. O. Composting versus vermicomposting: comparison of techniques using vegetal waste, caste manure and sawdust. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522015020000111864>>.

COX, S. B.; WILLIG, M. R.; SCATENA, F. N. Variation in nutrient characteristics of surface soils from the Luquillo Experimental Forest of Puerto Rico: A multivariate perspective. **Plant and Soil**, v. 247, n. 2, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1021488313783>>.

CRAGG, S. M.; BECKHAM, G. T.; BRUCE, N. C.; BUGG, T. D.; DISTEL, D. L.; DUPREE, P.; ETXABE, A. G.; GOODELL, B. S.; JELLISON, J.; MCGEEHAN, J. E.; MCQUEEN-MASON, S. J.; SCHNORR, K.; WALTON, P. H.; WATTS, J. E.; ZIMMER, M. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 29, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018>>.

CRUZ-GARCÍA, C.; MURRAY, A. E.; KLAPPENBACH, J. A.; STEWART, V.; TIEDJE, J. M. Respiratory Nitrate Ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 2, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.01194-06>>.

De CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; MAGALHÃES, A. F.; FREIRE, M. A. L.; SILVA, F. F.; SILVA, R. R.; De CARVALHO, B. M. A. Valor nutritivo de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de ureia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000100017>>.

De FRAVET, P. R. F.; SOARES, R. A. B.; LANA, R. M. Q.; LANA, A. M. Q.; KORNDÖRFER, G. H. Efeito de doses de torta de filtro e modo de aplicação sobre a produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000300013>>.

de GANNES, V.; EUDOXIE, G.; HICKEY, W. J. Insights into fungal communities in composts revealed by 454-pyrosequencing: implications for human health and safety. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00164>>.

de VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. n. 65, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>>.

de-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, JUAN-PABLO; BASHAN, Y. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – a comprehensive evaluation. **Applied Soil Ecology**, v. 61, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003>>.

DEOBALD, L. A.; CRAWFORD, D. L. Lignocellulose biodegradation. In: HURST, C. J.; CRAWFORD, R. L. **Manual of environmental microbiology**. 2. ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2002. cap. 83, p. 925-933.

DEPPENMEIER, U.; MÜLLER, V. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy. **Bioenergetics. Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 45, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/400_2006_026>.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000400030>>.

DOI, R. H. Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome and noncellulosome producers. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1125, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1196/annals.1419.002>>.

DUSKOVÁ, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00970.x>>.

EKBORG, N. A.; MORRILL, W.; BURGOYNE, A. M.; LI, L.; DISTELL, D. L. CelAB a multifunctional cellulase encoded by *Teredinibacter turnerae* T7902(T), a culturable symbiont isolated from the wood-boring marine bivalve *Lyrodus pedicellatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 23, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.00876-07>>.

ENSIGN, S. A. Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 2, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05247.x>>.

FAZILAH, A.; AZEMI, M. N. M.; KARIM, A. A.; NORAKMA, M. N. Physicochemical Properties of Hydrothermally Treated Hemicellulose from Oil Palm Frond. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf8028013>>.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, 2000.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v. 309, n. 5739, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1112665>>.

GEORGELIS, N.; TABUCHI, A.; NIKOLAIDIS, N.; COSGROVE, D. J. Structure-Function Analysis of the Bacterial Expansin EXLX1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 9, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225037>>.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GÓMEZ, R. B.; LIMA, F. V.; FERRER, A. S. The use of respiration indices in the composting process: a review. **Waste Management & Research**, v. 24, n. 1, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0734242X06062385>>.

GONÇALVES, V. P.; MARIN, J. M. Fate of non O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* in composted cattle manure. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000400001>>.

GOODFELLOW, M. Selective isolation of actinobacteria. IN: BALTZ, R.; DEMAÏN, A.; DAVIES, J.; BULL, A.; JUNKER, B.; KATZ, L.; LYND, L.; MASUREKAR, P.; REEVES, C.; ZHAO, H. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 3 ed. ASM Press, Washington, DC, 2010. cap 2. p. 13-27.

GUNSALUS, R. P.; COOK, L. E.; CRABLE, B.; ROHLIN, L.; MCDONALD, E.; MOUTTAKI, H.; SIEBER, J. R.; POWELEIT, N.; ZHOU, H.; LAPIDUS, A. L.; DALIGAULT, H. E.; LAND, M.; GILNA, P.; IVANOVA, N.; KYRPIDES, K.; CULLEY, D. E.; MCINERNEY, M. J. Complete genome sequence of *Methanospirillum hungatei* type strain JF1. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40793-015-0124-8>>.

HAHN, L.; PADILHA, M. T. S.; PADILHA, J. C. F.; POLI, A.; RIEFF, G. G. Persistência de patógenos e do antibiótico salinomicina em pilhas de compostagem de cama de aviário. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 234, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922012000200012>>.

HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T., RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HAN, W.; CLARKE, W.; PRATT, S. Composting of waste algae: A review. **Waste Management**, v. 34, n. 7, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.01.019>>.

HECK, K.; MARCO, E. G.; HAHN, A. B. B.; KLUGE, M.; SPILKI, F. R.; SAND, S. T. V. D. Temperatura de degradação de resíduos em processo de compostagem e qualidade microbiológica do composto final. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662013000100008>>.

HENSSEN, A. Beitræge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 26, n. 4, 1957. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00407588>>.

HENSSEN, A.; SCHNEPF, E. Zur Kenntnis thermophiler Actinomyceten. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 57, n. 3, 1967. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00405948>>.

HERRMANN, R. F.; SHANN, J. F. Microbial Community Changes During the Composting of Municipal Solid Waste. **Microbial Ecology**, v. 33, n. 1, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s002489900010>>.

HIRAISHI, A.; NARIHIRO, T.; YAMANAKA, Y. Microbial community dynamics during start-up operation of flowerpot-using fed-batch reactors for composting of household biowaste. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00473.x>>.

HOLT, R. A.; CAIRNS, A. J.; MORRIS, J. G. Production of butanol by *Clostridium puniceum* in batch and continuous culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00251761>>

HOU, L.; JIANG, J.; XU, Z.; ZHOU, Y.; LEUNG, F. Chi-Ching Complete genome sequence of *Pseudoxanthomonas suwonensis* strain J1, a cellulose-degrading bacterium isolated from leaf- and wood-enriched soil. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/genomeA.00614-15>>

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, 1999.

HUSON, D. H.; BEIER, S.; FLADE, I.; GÓRSKA, A.; EL-HADIDI, M.; MITRA, S.; RUSCHEWEYH, HANS-JOACHIM; TAPPU, R. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 6, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957>>.

HYATT, D.; LOCASCIO, P. F.; HAUSER, L. J.; UBERBACHER, E. C. Gene and translation initiation site prediction in metagenomic sequences. **Bioinformatics**, v. 28, n. 17, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts429>>.

IGUCHI, H.; YURIMOTO, H.; SAKAI, Y. Interactions of Methylophs with Plants and Other Heterotrophic Bacteria. **Microorganisms**, v. 3, n. 2, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms3020137>>.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>>.

KERFF, F.; AMOROSO, A.; HERMAN, R.; SAUVAGE, E.; PETRELLA, S.; FILÉE, P.; CHARLIER, P.; JORIS, B.; TABUCHI, A.; NIKOLAIDIS, N.; COSGROVE, D. J. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, n. 44, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0809382105>>.

KJAERGAARD, C. H.; QAYYUM, M. F.; WONG, S. D.; XU, F.; HEMSWORTH, G. R.; WALTON, D. J.; YOUNG, N. A.; DAVIES, G. J.; WALTON, P. H.; JOHANSEN, K. S.; HODGSON, K. O.; HEDMAN, B.; SOLOMONA, E. I. Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 24, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1408115111>>.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B. A.; BLANCH, H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Bioresource Bioprocess**, v. 109, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bit.24370>>.

LAI, B.; WANG, F.; WANG, X.; DUAN, L.; ZHU, H. InteMAP: Integrated metagenomic assembly pipeline for NGS short reads. **BMC Bioinformatics**, v. 16, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12859-015-0686-x>>.

LANGARICA-FUENTES, A.; FOX, G.; ROBSON, G. D. Metabarcoding analysis of home composts reveals distinctive fungal communities with a high number of unassigned sequences. **Microbiology**, v. 161, n. 10, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/mic.0.000153>>.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, 9, n. 4, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>>.

LEE, M. H.; LEE, SEON-WOO Bioprospecting potential of the soil metagenome: novel enzymes and bioactivities. **Genomics & Informatics**, v. 11, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5808/GI.2013.11.3.114>>.

LEE, Y. H.; KIM, S. K.; KIM, Y. H.; JEONG, Y. S.; YUN, M. G.; CHO, J. J.; KIM, J. M.; YUN, H. D.; KIM, H. Archaeal diversity during composting of pig manure and mushroom cultural waste based on 16S rRNA sequence. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, n. 2, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.036>>.

LESSNER, D. J.; LI, L.; LI, Q.; REJTAR, T.; ANDREEV, V. P.; REICHLIN, M.; HILL, K.; MORAN, J. J.; KARGER, B. L.; FERRY, J. G. An unconventional pathway for reduction of CO₂ to methane in CO-grown *Methanosarcina acetivorans* revealed by proteomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, n. 47, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0608833103>>.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Bioinformatics**, v. 23, n. 1, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>>.

LEVASSEUR, A.; DRULA, E.; LOMBARD, V.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>>.

LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>>.

LI, Q.; NG, W. T.; WU, J. C. Isolation, characterization and application of a cellulose-degrading strain *Neurospora crassa* S1 from oil palm empty fruit bunch. **Microbial Cell Factories**, v. 13, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-014-0157-5>>.

LIN, X.; TFAILY, M. M.; GREEN, S. J.; STEINWEG, J. M.; CHANTON, P.; IMVITTAYA, A.; CHANTON, J. P.; COOPER, W.; SCHADT, C.; KOSTKA, J. E. Microbial metabolic potential for carbon degradation and nutrient (nitrogen and phosphorus) acquisition in an ombrotrophic peatland. **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, n. 11, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.00206-14>>.

LOMBARD, V.; RAMULU, H. G.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>>.

LOU, X. F.; NAIR, J. The impact of landfilling and composting on greenhouse gas emissions – a review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 16, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.006>>.

MA, T.; TU, Y.; ZHANG, N. F.; DENG, K. D.; DIAO, Q. Y. Effect of the ratio of non-fibrous carbohydrates to neutral detergent fiber and protein structure on intake, digestibility, rumen fermentation, and nitrogen metabolism in lambs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5713/ajas.15.0025>>.

MARAGNO, E. S.; TROMBIN, D. F.; VIANA, E. O uso da serragem no processo de minicompostagem. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 72, n. 4, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522007000400001>>.

MARBOUTY, M.; BAUDRY, L.; COURNAC, A.; KOSZUL, R. Scaffolding bacterial genomes and probing host-virus interactions in gut microbiome by proximity ligation (chromosome capture) assay. **Science Advances**, v. 3, n. 2, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/sciadv.1602105>>.

MARIANO, A. P.; CRIVELARO, S. H. R.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. The use of vinasse as an amendment to *ex-situ* bioremediation of soil and groundwater contaminated with diesel oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000400030>>.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet J**, v. 17, n. 1, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200>>.

MARTINEZ-ANAYA, C. Understanding the structure and function of bacterial expansins: a prerequisite towards practical applications for the bioenergy and agricultural industries. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 6, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12377>>.

MARTINS, L. F.; ANTUNES, L. P.; PASCON, R. C.; de OLIVEIRA, J. C. F.; DIGIAMPIETRI, L. A.; BARBOSA, D.; PEIXOTO, B. M.; VALLIM, M. A.; VIANANIERO, C.; OSTROSKI, E. H.; TELLES, G. P.; DIAS, Z.; CRUZ, J. B.; JULIANO, L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; SILVA, A. M.; SETUBAL, J. C. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo Zoo Park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061928>>.

MCDONALD, R.; SCHREIER, H. J.; WATTS, J. E. M. Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. **PLoS One**, v. 7, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048018>>.

MELLINGER-SILVA, C.; SIMAS-TOSIN, F. F.; SCHIAVINI, D. N.; WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; DA SILVA, L. M.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. Isolation of a gastroprotective arabinoxylan from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.107>>.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>>.

MHUANTONG, W.; CHAROENSAWAN, V.; KANOKRATANA, P.; TANGPHATSORNRUANG, S.; CHAMPREDA, V. Comparative analysis of sugarcane bagasse metagenome reveals unique and conserved biomass-degrading enzymes among lignocellulolytic microbial communities. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0200-8>>.

MICHLMAYR, H.; KNEIFEL, W. β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. **FEMS Microbiology Letters**, v. 353, n. 1, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12348>>.

MIKHEENKO, A.; SABELIEV, V.; GUREVICH, A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. **Bioinformatics**, v. 32, n. 7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv697>>.

NEHER, D. A.; WEICHT, T. R.; BATES, S. T.; LEFF, J. W.; FIERER, N. Changes in Bacterial and Fungal Communities across Compost Recipes, Preparation Methods, and Composting Times. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079512>>.

NGUYEN, LAM-TUNG; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>>.

O'GORMAN, C. M.; FULLER, H. T.; DYER, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 457, n. 7228, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature07528>>.

OMORI, W. P.; PIRES, R. T.; OGASSAVARA, F. O.; FRIGIERI, M. C. Emprego de cepas de *Zymomonas mobilis* em processos fermentativos. **Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 28-40, 2011.

PACCHIONI, R. G.; CARVALHO, F. M.; THOMPSON, C. E.; FAUSTINO, A. L.; NICOLINI, F.; PEREIRA, T. S.; SILVA, R. C.; CANTÃO, M. E.; GERBER, A.; VASCONCELOS, A. T.; AGNEZ-LIMA, L. F. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. **Microbiologyopen**, v. 3, n. 3, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mbo3.169>>.

PACHECO, D. A.; REZENDE, J. A. M.; PIEDADE, S. M. S. Biomass, virus concentration, and symptomatology of cucurbits infected by mild and severe strains of *Papaya ringspot* virus. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162003000400013>>.

PAGÁN, I.; ALONSO-BLANCO, C.; GARCÍA-ARENAL, F. The Relationship of Within-Host Multiplication and Virulence in a Plant-Virus System. **PLoS ONE**, v. 2, n. 8, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000786>>.

PARKS, D. H.; TYSON, G. W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R. G. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>>.

PARTANEN, P.; HULTMAN, J.; PAULIN, L.; AUVINEN, P.; ROMANTSCHUK, M. Bacterial diversity at different stages of the composting process. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 94, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-94>>.

PAULILLO, L. F.; VIAN, C. E. F.; SHIKIDA, P. F. A.; MELLO, F. T. Álcool combustível e biodiesel no Brasil: quo vadis? **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 45, n. 3, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-20032007000300001>>.

PAVLOVIČ, A.; KRAUSKO, M.; ADAMEC, L. A carnivorous sundew plant prefers protein over chitin as a source of nitrogen from its traps. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.008>>.

PENG, Y.; LEUNG, H.C.; YIU, S.M.; CHIN, F.Y. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, n. 11, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>>.

PÉREZ, E.; SULBARÁN, M.; BALL, M. M.; YARZÁBAL, L. A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, n. 11, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.017>>.

PFISTER, C. A.; MEYER, F.; ANTONOPOULOS, D. A. Metagenomic profiling of a microbial assemblage associated with the California mussel: a node in networks of carbon and nitrogen cycling. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010518>>.

PINTO, A. J.; MARCUS, D. N.; IJAZ, U. Z.; BAUTISTA-DE LOSE SANTOS, Q. M.; DICK, G. J.; RASKIN, L. Metagenomic evidence for the presence of comammox *Nitrospira*-like bacteria in a drinking water system. **mSphere**, v. 1, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mSphere.00054-15>>.

PRADO, R. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2013, Article ID 581984, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/581984>>.

PUKKILA, P. J. *Coprinopsis cinerea*. **Current Biology**, v. 21, n. 16, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.042>>.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002, 235p.

RAHMAN, A. K.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase, alpha-L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/w02-114>>.

RAHMANPOUR, R.; BUGG, T.D.H. Characterisation of Dyp-type peroxidases from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: oxidation of Mn(II) and polymeric lignin by Dyp1B. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 574, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.022>>.

ROCKSTRÖM, J.; STEFFEN, W.; NOONE, K.; PERSSON, Å.; CHAPIN III, F. S.; LAMBIN, E. F.; LENTON, T. M.; SCHEFFER, M.; FOLKE, C.; SCHELLNHUBER, H. J.; NYKVIST, B.; DE WIT, C. A.; HUGHES, T.; VAN DER LEEUW, S.; RODHE, H.; SÖRLIN, S.; SNYDER, P. K.; COSTANZA, R.; SVEDIN, U.; FALKENMARK, M.; KARLBERG, L.; CORELL, R. W.; FABRY, V. J.; HANSEN, J.; WALKER, B.; LIVERMAN, D.; RICHARDSON, K.; CRUTZEN, P.; FOLEY, J. A. A safe operating space for humanity. **Nature**, v. 461, 2009.

ROTHER, M.; METCALF, W. W. Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: an unusual way of life for a methanogenic archaeon. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, n. 48, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0407486101>>.

SAHA, B. C. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00044-6)>.

SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; PAREDES, C.; BERNAL, M. P. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixture. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00031-1)>.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>>.

SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; PAREDES, C.; BERNAL, M. P. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00031-1)>.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>>.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 7, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020092>>.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>>.

SEGATA, N.; BOERNIGEN, D.; TICKLE, T. L.; MORGAN, X. C.; GARRET, W. S.; HUTTENHOWER, C. Computational meta'omics for microbial community studies. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 1, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/msb.2013.22>>.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)>.

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>>.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014>>.

SIMON, J. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00616.x>>.

SIMS, I. M.; CRAIK, D. J.; BACIC, A. Structural characterisation of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. **Carbohydrate Research**, v. 303, n. 1, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00144-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00144-4)>.

SINGH, A.; SINGH, R. S.; UPADHYAY, S. N.; JOSHI, C. G.; TRIPATHI, A. K.; DUBEY, S. K. Community structure of methanogenic archaea and methane production associated with compost-treated tropical rice-field soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 1, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01411.x>>.

SIROTEK, K.; SLOVÁKOVÁ, L.; KOPEČNÝ, J.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bacteroides caccae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01492.x>>.

SOUZA, R. S. C.; OKURA, V. K.; ARMANHI, J. S. L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; SILVA, M. J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; DE ARAÚJO, L. M.; VERZA, N. C.; BAGHERI, H. C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep28774>>.

STEGER, K.; EKLIND, Y.; OLSSON, J.; SUNDH, I. Microbial community growth and utilization of carbon constituents during thermophilic composting at different oxygen levels. **Microbial Ecology**, v. 50, n. 2, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00248-004-0139-y>>.

STEGERa, K.; JARVIS, Á.; VASARA, T.; ROMANTSCHUK, M.; SUNDH, I. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 7, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.05.006>>.

STEGERb, K.; SJÖGREN, A. M.; JARVIS, A.; JANSSON, J. K.; SUNDH, I. Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 2, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03271.x>>.

TAKEBAYASHI, S.; NARIHIRO, T.; FUJII, Y.; HIRAISHI, A. Water availability is a critical determinant of a population shift from Proteobacteria to Actinobacteria during start-up operation of mesophilic fed-batch composting. **Microbes and Environments**, v. 22, n. 3, 2007. Disponível em: <<http://doi.org/10.1264/jsme2.22.279>>.

TEPLYAKOV, A.; OBMOLOVA, G.; SARIKAYA, E.; PULLALAREVU, S.; KRAJEWSKI, W.; GALKIN, A.; HOWARD, A. J.; HERZBERG, O.; GILLILAND, G. L. Crystal structure of the YgfZ protein from *Escherichia coli* suggests a folate-dependent regulatory role in one-carbon metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7134-7140.2004>>.

THEODORO, R. C.; CANDEIAS, J. M.; ARAÚJO, J. P. JR, BOSCO, S. M.; MACORIS, S. A.; PADULA, L. O.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, 2005.

TOUZEL, J. P.; O'DONOHUE, M.; DEBEIRE, P.; SAMAIN, E.; BRETON, C. *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-1-315>>.

TOWN, J. R.; DUMONCEAUX, T. J. Laboratory-scale bioaugmentation relieves acetate accumulation and stimulates methane production in stalled anaerobic digesters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 2, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7058-3>>.

ÚNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Acompanhamento quinzenal da safra na região Centro-Sul, posição até 16/10/2017. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=63>>. Acesso em: 08 nov. 2017.

VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; HORN, S. J.; LIU, Z.; ZHAI, H.; SØRLIE, M.; EIJSINK, V. G. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, n. 6001, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1192231>>.

VALENTE, B. S.; XAVIER, E. G.; MORSELLI, T. B. G. A.; JAHNKE, D. S.; BRUM JR., B. S.; CABRERA, B. R.; MORAES, P. O.; LOPES, D. C. N. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 59-85, 2009.

van den BRINK, J.; de VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 91, n. 6, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2>>.

VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; LÓPEZ, M. J.; MORENO, J. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. **Waste Management**, v. 30, n. 5, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.12.019>>.

VEIGA FILHO, A. A.; RAMOS, F. Proálcool e evidências de concentração na produção e processamento de cana-de-açúcar. **Informações econômicas**, v. 36, n. 7, p. 48-61, 2006.

VOGEL, T. M.; SIMONET, P.; JANSSON, J. K.; HIRSCH, P. R.; TIEDJE, J. M.; VAN ELSAS, J. D.; BAILEY, M. J.; NALIN, R.; PHILIPPOT, L. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature**, v. 7, p. 252, 2009.

WANG, C.; DONG, D.; WANG, H.; MÜLLER, K.; QIN, Y.; WANG, H.; WU, W. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0440-2>>.

WATANABE, K.; NAGAO, N.; YAMAMOTO, S.; TODA, T.; KUROSAWA, N. *Thermobacillus composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64672-0>>.

WEI, R.; OESER, T.; THEN, J.; KÜHN, N.; BARTH, M.; SCHMIDT, J.; ZIMMERMANN, W. Functional characterization and structural modeling of synthetic polyester-degrading hydrolases from *Thermomonospora curvata*. **AMB Express**, 4:44, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-014-0044-9>>.

WELTE, C.; DEPPENMEIER, U. Re-evaluation of the function of the F420 dehydrogenase in electron transport of *Methanosarcina mazei*. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 8, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08048.x>>.

WEON, H. Y.; KIM, B. Y.; KIM, J. S.; LEE, S. Y.; CHO, Y. H.; GO, S. J.; HONG, S. B.; IM, W. T.; KWON, S. W. *Pseudoxanthomonas suwonensis* sp. nov., isolated from cotton waste composts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 3, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63749-0>>.

WONG, M. T.; ZHANG, D.; LI, J.; HUI, R. K. H.; TUN, H. M.; BRAR, M. S.; PARK, TAE-JIN; CHEN, Y.; LEUNG, F. C. Towards a metagenomic understanding on enhanced biomethane production from waste activated sludge after pH 10 pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-38>>.

WÖSTEN, H. A. Hydrophobins: multipurpose proteins. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.625>>.

WUSHKE, S.; LEVIN, D. B.; CICEK, N.; SPARLING, R. Facultative anaerobe *Caldibacillus debilis* GB1: characterization and use in a designed aerotolerant, cellulose-degrading coculture with *Clostridium thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00735-15>>.

XIN, F.; CHEN, T.; JIANG, Y.; DONG, W.; ZHANG, W.; ZHANG, M.; WU, H.; MA, J.; JIANG, M. Strategies for improved isopropanol-butanol production by a *Clostridium* strain from glucose and hemicellulose through consolidated bioprocessing. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0805-1>>.

XU, Z.; HANSEN, M. A.; HANSEN, L. H.; JACQUIOD, S.; SØRENSEN, S. J. Bioinformatic approaches reveal metagenomic characterization of soil microbial community. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093445>>.

YIN, Y.; MAO, X.; YANG, J. C.; CHEN, X.; MAO, F.; XU, Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gks479>>.

YOON, S. H.; TURKARSLAN, S.; DAVID J. REISS, D. J.; PAN, M.; BURN, J. A.; COSTA, K. C.; LIE, T. J.; SLAGEL, J.; MORITZ, R. L.; HACKETT, M.; LEIGH, J. A.; BALIGA, N. S. A systems level predictive model for global gene regulation of methanogenesis in a hydrogenotrophic methanogen. **Genome Research**, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/gr.153916.112>>.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 6, n. 4, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/bbb.1331>>.

ZHENG, S.; ZHANG, H.; LI, Y.; ZHANG, H.; WANG, O.; ZHANG, J.; LIU, F. Co-occurrence of *Methanosarcina mazei* and Geobacteraceae in an iron (III)-reducing enrichment culture. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00941>>.