

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Igor Stelmach Pessi

**ESTUDO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS NA DEGRADAÇÃO DA  
CELULOSE**

Porto Alegre, 2009.

Igor Stelmach Pessi

**ESTUDO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS NA DEGRADAÇÃO DA  
CELULOSE**

Trabalho de conclusão de curso  
submetido ao curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
como requisito para obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Orientador: Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre, 2009.

Igor Stelmach Pessi

## **ESTUDO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS NA DEGRADAÇÃO DA CELULOSE**

Trabalho de conclusão de curso  
submetido ao curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
como requisito para obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Data de aprovação:

---

Dr. Marco Antônio Záchia Ayub  
ICTA/UFRGS

---

Dra. Adriana Seixas  
CBIOT/UFRGS

---

Dr. Alexandre José Macedo  
FACFAR/UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Alexandre José Macedo, pela orientação, críticas e conselhos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães, pelo apoio nas coletas e incentivo durante o projeto, bem como pelas importantes discussões neste período.

Aos colegas do Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas, especialmente à Dani e à Karine, pelo auxílio nos experimentos.

À Prof. Dra. Tiana Tasca e suas alunas, pela ajuda e empréstimos de equipamentos e materiais.

À minha família, por sempre ter estimulado e investido nos meus estudos. Tudo que eu adquiri até hoje eu devo a vocês.

À Natalia Buckowski, por ter estado comigo durante todo este tempo e me ajudado nos momentos difíceis.

À família da Natalia, pelo apoio, amizade e pelas inúmeras caronas.

Aos meus colegas de curso, pela amizade e momentos de diversão, jogatina e bebedeira. E pela ajuda nas disciplinas também.

Aos professores e funcionários da UFRGS, por terem contribuído de maneira inestimável à minha formação acadêmica.

Aos colegas da CIENTEC, pela amizade e apoio.

Ao pessoal da banda, pelos 7 anos de puro rock'n'roll.

Aos demais amigos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

## RESUMO

### **Estudo de consórcios microbianos na degradação da celulose**

A biomassa lignocelulósica é a fonte de energia renovável mais abundante no planeta, sendo fonte de açúcares que podem ser fermentados para a obtenção de etanol. No entanto, devido a sua alta recalcitrância, poucos microrganismos conseguem hidrolisar a celulose com alta eficiência. Na natureza, esta degradação é realizada por diferentes espécies de microrganismos atuando de modo sinérgico. O objetivo principal deste trabalho é verificar a degradação de celulose por consórcios microbianos. Vinte e sete microrganismos isolados do manguezal da Estação Ecológica de Carijós (Florianópolis, Brasil), foram agrupados em comunidades e cultivados utilizando como substratos bagaço de cana-de-açúcar, celobiose e carboximetilcelulose. Após o período de incubação, a geração de açúcares fermentáveis foi avaliada utilizando-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, assim como a formação de biofilme na biomassa lignocelulósica através de microscopia eletrônica de varredura. Para as comunidades crescidas em carboximetilcelulose, também foi determinada a atividade das enzimas celulolíticas, pelo método do papel filtro. As comunidades não demonstraram muita eficiência na degradação do bagaço de cana-de-açúcar e carboximetilcelulose, possivelmente devido à alta recalcitrância destes substratos. Por outro lado, as comunidades demonstraram capacidade de degradação de celobiose, acumulando uma quantidade de açúcar equivalente a até cerca de 60% do valor inicial. Os resultados relativos à atividade enzimática não foram conclusivos e novos experimentos serão realizados. Os experimentos apontaram a comunidade J e os isolados JAG02, JAG02BA e JAG06A como candidatos a novos estudos, envolvendo consórcios com um menor número de isolados.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica; hidrólise; açúcares fermentáveis; bioetanol; consórcios microbianos.

## **ABSTRACT**

### **Study of microbial consortia on the degradation of cellulose**

The lignocellulosic biomass is the main source of renewable energy available on the planet, providing sugars that can be fermented to produce ethanol. However, due to its high recalcitrance, few microorganisms are able to hydrolyse cellulose with high yields. In nature, this degradation is realized by different species of microorganisms acting synergistically. The main objective of this study is to verify degradation of cellulose by microbial consortium. Twenty seven microorganisms isolated from the Carijós Ecological Station's mangrove (Florianópolis, Brazil), were grouped in communities and cultivated using sugarcane bagasse, cellobiose and carboxymethylcellulose as substrates. After the incubation period, release of fermentable sugars was evaluated using the 3,5-dinitrosalicylic acid assay, as well as the biofilm formation over the lignocellulosic biomass by scanning electron microscopy. For the communities grown on carboxymethylcellulose, activity of cellulolytic enzymes was also determined, using the filter paper assay. The communities did not release high yields of fermentable sugars derived from the degradation of sugarcane bagasse and carboxymethylcellulose, probably due to the high recalcitrance of these substrates. However, the communities were able to degrade cellobiose, generating sugar on the quantity equivalent to 60% of the initial value. Results relative to the enzymatic activity were not conclusive and new experiments should be made. The experiments pointed community J and the isolates JAG02, JAG02BA e JAG06A as candidates to new studies, using consortia with fewer isolates.

**Keywords:** lignocellulosic biomass; hydrolysis; fermentable sugars; bioethanol; microbial consortia.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | <b>7</b>  |
| <b>1.1 A biomassa lignocelulósica</b>                                     | <b>8</b>  |
| <b>1.2 Conversão de material lignocelulósico em açúcares fermentáveis</b> | <b>9</b>  |
| <b>1.3 Diversidade de microrganismos celulolíticos</b>                    | <b>11</b> |
| <b>1.4 Objetivos</b>  | <b>12</b> |
| <b>2 METODOLOGIA</b>  | <b>14</b> |
| <b>2.1 Local de trabalho</b>  | <b>14</b> |
| <b>2.2 Isolados</b>   | <b>14</b> |
| <b>2.3 Preparo das suspensões celulares</b>                               | <b>14</b> |
| <b>2.4 Degradação de biomassa lignocelulósica</b>                         | <b>15</b> |
| <i>2.4.1 Visualização em microscopia eletrônica de varredura</i>          | <i>16</i> |
| <b>2.5 Degradação de celobiose</b>  | <b>16</b> |
| <b>2.6 Degradação de carboximetilcelulose</b>                             | <b>17</b> |
| <i>2.6.1 Atividade enzimática</i>   | <i>18</i> |
| <b>2.7 Quantificação de açúcares redutores</b>                            | <b>18</b> |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>20</b> |
| <b>3.1 Isolados</b>   | <b>20</b> |
| <b>3.2 Degradação de biomassa lignocelulósica</b>                         | <b>21</b> |
| <i>3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura</i>                          | <i>23</i> |
| <b>3.3 Degradação de celobiose</b>  | <b>26</b> |
| <b>3.4 Degradação de carboximetilcelulose</b>                             | <b>30</b> |
| <i>3.4.1 Atividade enzimática</i>   | <i>33</i> |
| <b>4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>  | <b>35</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>37</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda global de energia e a dificuldade para encontrar novas reservas de petróleo, aliadas a preocupações a respeito da concentração atmosférica de gases do efeito estufa, têm despertado o interesse no desenvolvimento de formas de energia alternativas, como o etanol produzido a partir da fermentação de carboidratos derivados de plantas como a cana-de-açúcar (HIMMEL et al., 2007). Entretanto, como este tipo de cultura também é utilizado para a produção de alimento, e como a redução na emissão de gases do efeito estufa a partir do uso destas fontes não é tão alta quanto desejável, a produção em larga escala de etanol dependerá da exploração da biomassa lignocelulósica, como resíduos florestais e agrícolas (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Portanto, a habilidade de fermentar açúcares derivados de material lignocelulósico é uma questão de grande importância, pois pode prover uma fonte de combustível não-dependente de petróleo, é capaz de reduzir emissões de gases do efeito estufa e não compete com os recursos necessários para a produção de alimento (PIENKOS e ZHANG, 2009).

A biomassa lignocelulósica é considerada o recurso biológico renovável mais abundante no planeta, sendo produzida pela natureza a uma taxa de  $0,85 \times 10^{11}$  ton/ano, o equivalente a mais de quatro vezes a energia consumida anualmente no mundo (LO et al., 2009). Em termos de custo inicial de matéria-prima, só não é mais barata que o carvão (\$50/ton para biomassa lignocelulósica e \$20/ton para carvão), sem considerar o custo antecipado do seqüestro de carbono, o que eleva o preço do carvão para \$106/ton. Em relação à produtividade, possui rendimento estimado em 135 GJ/ha, maior que o etanol derivado do milho (85 GJ/ha) e o biodiesel de soja (18 GJ/ha). Assim, o fator que impede a emergência de uma indústria que converta biomassa lignocelulósica em energia não é o custo ou disponibilidade da matéria-prima, mas sim o alto custo do processo de conversão desta biomassa em açúcares. Este processo é responsável por um aumento de 100% no valor final do produto, eliminando a sua vantagem sobre outras fontes de energia. Portanto, todos os benefícios potencialmente gerados pela produção em larga-escala de energia derivada de biomassa lignocelulósica dificilmente serão alcançados, a menos que novas tecnologias permitam a obtenção de açúcares destes estoques de uma



maneira economicamente mais competitiva (LYND et al., 2008).

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos resíduos agro-industriais mais gerados no mundo todo, como resultado da quebra e extração de açúcar (PANDEY et al., 2000). Só no Brasil, de acordo com o Balanço Energético Nacional, realizado pela Empresa de Pesquisa Energética, foram geradas mais de 143 bilhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar no ano de 2008 (BRASIL, 2009). Grande parte deste material é utilizada pelas próprias indústrias como combustível; entretanto, recentemente tem-se observado uma tendência cada vez maior para uma utilização mais eficiente dos resíduos agro-industriais. Uma das alternativas, portanto, é utilizar essa biomassa como fonte de celulose para a produção de bioetanol.

A produção de biocombustíveis no Brasil data de 1975, com o início do Programa Nacional do Alcool (Pró-Alcool). Este programa foi implantado com o foco no desenvolvimento de tecnologias para a substituição da gasolina por etanol como combustível veicular. Como resultado, o Brasil agora conta com capacidades institucionais e tecnológicas para o uso deste tipo de energia em larga escala, sendo o maior exportador e segundo maior produtor de bioetanol depois dos Estados Unidos (BALAT e BALAT, 2009).

## **1.1 A biomassa lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica é um complexo heterogêneo de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose, polissacarídeo mais abundante na natureza, é um polímero linear formado por moléculas de glicose conectadas por ligações  $\beta$ -(1,4)-glicosídicas e ordenadas em uma estrutura cristalina insolúvel e resistente à despolimerização. A hemicelulose – polímero ramificado de glicose ou xilose, podendo conter arabinose, xilose, galactose, fucose, manose, glicose ou ácido glicurônico nas cadeias laterais – se liga às microfibrilas de celulose, formando uma rede que faz parte do esqueleto da parede celular das plantas. Na biomassa lignocelulósica, este esqueleto está conectado a moléculas de lignina – um polímero complexo de subunidades de fenilpropanol – proporcionando uma maior resistência contra ataques e doenças (MOSIER et al., 2005).

Celulose e hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentáveis. No entanto, diversos fatores contribuem para a recalcitrância da biomassa lignocelulósica: (i) o tecido epidérmico da planta, particularmente a cutícula e ceras epicuticulares; (ii) o arranjo e densidade dos feixes vasculares; (iii) a quantidade relativa de tecido esclerenquimatoso; (iv) o grau de lignificação; (v) a heterogeneidade estrutural e complexidade dos constituintes da parede celular como microfibrilas e polímeros da matriz; (vi) insolubilidade; e (vii) os inibidores de fermentação que ocorrem naturalmente na parede celular ou são formados durante o processo de conversão (HIMMEL et al., 2007). Assim, a questão central na conversão de biomassa celulósica em biocombustíveis é o desenvolvimento de tecnologias que suplantem a recalcitrância deste material (LYND et al., 2008). A descoberta de novos microrganismos com a habilidade de converter de modo eficiente os componentes da biomassa lignocelulósica em açúcares é, portanto, de grande importância (YANG et al., 2009).

## **1.2 Conversão de material lignocelulósico em açúcares fermentáveis**

O processamento de material lignocelulósico em etanol consiste de quatro operações principais: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e separação/purificação do produto, conforme a Figura 1 (MOSIER et al., 2005).

O pré-tratamento é o passo mais caro do processo de conversão de biomassa em combustível e é conduzido para reduzir a recalcitrância através da despolimerização e solubilização da hemicelulose, convertendo-a em mono e oligossacarídeos. A remoção da hemicelulose das microfibrilas expõe o núcleo cristalino celulósico, que se torna mais acessível às enzimas que convertem este polímero em açúcares fermentáveis (HIMMEL et al., 2007).

A hidrólise compreende a conversão dos polímeros de carboidratos em açúcares monoméricos. Glicose, galactose e manose – açúcares de seis carbonos (hexoses) – são imediatamente fermentadas em etanol por muitos microrganismos, mas as pentoses xilose e arabinose são fermentadas por algumas poucas linhagens e geralmente com baixo rendimento (MOSIER et al., 2005). A hidrólise enzimática da celulose é realizada sinergicamente por um grupo de enzimas chamadas coletiva-

mente de celulases, constituído por três componentes principais: endo- $\beta$ -glucanases, que atacam regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica, originando extremidades livres; exo- $\beta$ -glucanases (ou celobio-hidrolases), que removem unidades de celobiose das extremidades livres; e  $\beta$ -glicosidases, que hidrolisam celobiose gerando glicose (CHAMPAGNE e LI, 2009). Também participam da hidrólise da parede celular de plantas hemicelulases e outras enzimas acessórias – incluindo nessa classe tanto enzimas que desramificam a hemicelulose quanto enzimas que degradam e/ou modificam a lignina (HIMMEL et al., 2007). Após a hidrólise e fermentação dos carboidratos liberados, o etanol é então recuperado através de destilação ou destilação/adsorção (MOSIER et al., 2005).

Atualmente, o pré-tratamento do material lignocelulósico é realizado por diferentes métodos químicos e físicos. Entretanto, além de serem custosos e apresentarem baixa eficiência, tipicamente geram diversos compostos que inibem o crescimento dos microrganismos utilizados na fermentação (PIENKOS e ZHANG, 2009). A nossa hipótese é que comunidades microbianas seriam capazes de superar as dificuldades impostas pela insolubilidade e toxicidade da lignina, visto que na natureza essa degradação efetivamente ocorre.

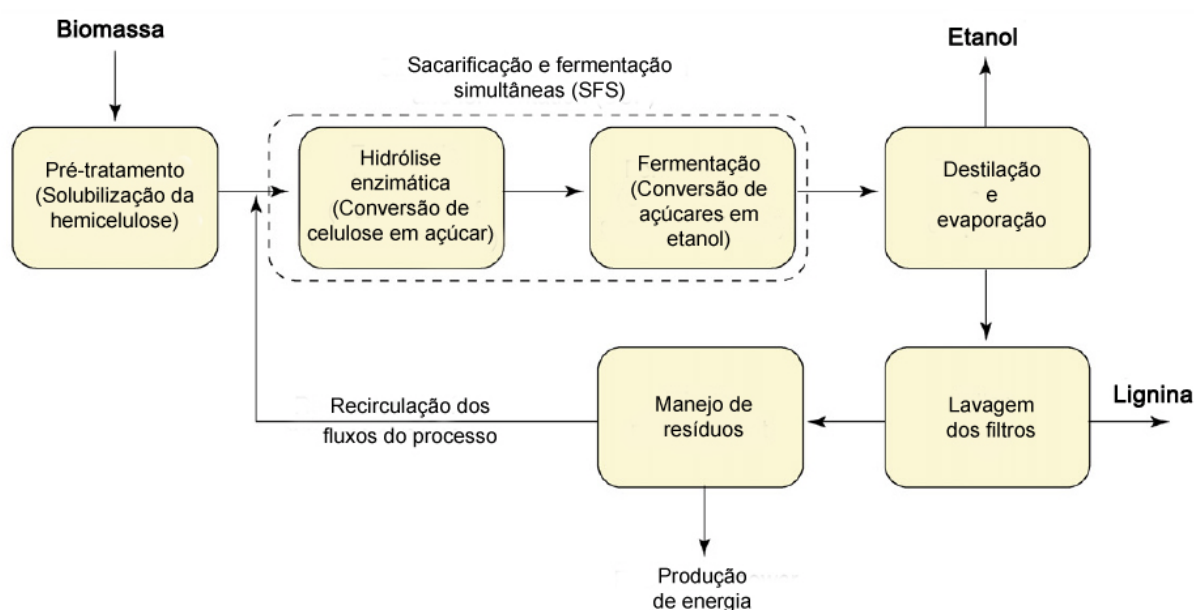


Figura 1. Representação esquemática da conversão de biomassa em etanol (adaptado de HAHN-HÅGERDAL et al., 2006).

### 1.3 Diversidade de microrganismos celulolíticos

A habilidade de digerir celulose é amplamente distribuída entre muitos gêneros do domínio *Bacteria* e em fungos do domínio *Eukarya*, embora nenhum microrganismo celulolítico do domínio *Archaea* tenha sido identificado. Dentre as eubactérias, principalmente as ordens *Actinomycetales* (filó *Actinobacteria*) e *Clostridiales* (filó *Firmicutes*) apresentam alta concentração de espécies celulolíticas. Do ponto de vista fisiológico, a capacidade celulolítica pode ser observada em três grupos principais: (i) bactérias anaeróbias fermentativas, normalmente Gram-positivas (*Clostridium*, *Ruminococcus* e *Caldicellulosiruptor*), mas também algumas Gram-negativas (*Butyrivibrio*, *Acetivibrio* e *Fibrobacter*); (ii) bactérias Gram-positivas aeróbias (*Cellulomonas* e *Thermobifida*); e (iii) bactérias deslizantes aeróbias (*Cytophaga* e *Sporocytophaga*) (LYND et al., 2002).

A microbiologia das últimas décadas vem privilegiando o isolamento dos microrganismos de seus habitats. No entanto, muitos microrganismos não podem ser cultivados em laboratório, dificultando o estudo e a caracterização de uma variedade de parâmetros e processos microbianos. Por outro lado, o estudo de comunidades muito complexas é dificultado pela inexistência de tecnologias capazes de medir a enormidade de interações que ocorrem simultaneamente. Deste modo, o conhecimento das estratégias utilizadas pelos microrganismos para superar as dificuldades enfrentadas em seus ambientes é limitado.

A elucidação do processo de hidrólise da celulose pode ser feito com diversas abordagens: a partir do estudo do sistema enzimático da celulase ou de parte dele, de culturas puras de microrganismos celulolíticos ou de culturas mistas (co-culturas). Assim, apesar de muito ainda precisar ser elucidado no nível de componentes enzimáticos e dos processos genéticos envolvidos, o entendimento da hidrólise em culturas puras é mais limitado ainda, e a hidrólise em co-culturas é a menos entendida de todas (LYND et al., 2002). Neste contexto, projetos que envolvam o estudo da estrutura, dinâmica, metabolismo e controle de consórcios microbianos modelos – buscando elucidar a função de cada microrganismo dentro da comunidade – têm recebido atenção especial recentemente (KIM et al., 2008). Considerando a importância desse tipo de estudo, a interação entre distintas espécies, e até mesmo gêneros de microrganismos – via construção de

comunidades microbianas artificiais – tem sido cada vez mais aceita como uma importante ferramenta biotecnológica na busca de soluções para problemas como a degradação de substratos insolúveis em água e de alta recalcitrância.

Na natureza, a degradação da celulose é realizada não por culturas puras de microrganismos, mas por múltiplas espécies celulolíticas coexistindo umas com as outras e com muitas espécies não-celulolíticas. Enquanto espécies celulolíticas competem diretamente por celulose, tanto espécies celulolíticas como não-celulolíticas competem pelos produtos da hidrólise da celulose e na produção de compostos inibitórios. De fato, a maioria das espécies de bactérias aeróbias celulolíticas comumente encontradas em solos é classificada dentro de gêneros bem conhecidos por um distinto metabolismo secundário, incluindo a formação de estruturas de latência (*Bacillus*, *Micromonospora* e *Thermobifida*) e/ou produção de antibióticos (*Bacillus* e *Micromonospora*) e outros metabólitos secundários. Embora não tenha sido investigada sistematicamente, é possível que a produção de tais compostos e estruturas pode prover uma vantagem seletiva para compensar a baixa taxa de crescimento com substratos celulósicos (LYND et al., 2002).

De modo geral, a remoção de certos polissacarídeos da parede celular da planta por uma espécie ou grupo de microrganismos pode aumentar o acesso de um segundo grupo à celulose ou hemicelulose. Neste sentido, é interessante o fato de algumas bactérias celulolíticas serem capazes de despolimerizar certas hemiceluloses e pectinas, mas não poderem utilizar efetivamente os monossacarídeos e oligossacarídeos formados, mesmo em culturas puras (isto é, na ausência de competição com espécies não-celulolíticas) (LYND et al., 2002).

#### 1.4 Objetivos

- Estudar a capacidade de comunidades microbianas oriundas do manguezal da Estação Ecológica de Carijós de degradar biomassa lignocelulósica;
- Avaliar a geração de açúcares fermentáveis a partir da degradação de material celulósico;

- Verificar a formação de biofilmes microbianos sobre a biomassa lignocelulósica;
- Avaliar a utilização de substratos purificados – celobiose e carboximetilcelulose – por consórcios microbianos e por microrganismos em cultura pura.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Local de trabalho**

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia da UFRGS, entre agosto e novembro de 2009.

### **2.2 Isolados**

Neste trabalho, foram utilizados 27 microrganismos pertencentes à coleção do laboratório, isolados previamente a partir de amostras de solo e sedimento coletados no manguezal da Estação Ecológica de Carijós, no município de Florianópolis, Brasil, em maio de 2008. As características fenotípicas básicas dos isolados foram obtidas por visualização em lupa com aumento de 40x, em ágar nutriente com 48h de crescimento, e em microscópio óptico com aumento de 1000x, depois de submetidos à coloração de Gram.

### **2.3 Preparo das suspensões celulares**

Os isolados foram mantidos em ágar nutriente e repicados semanalmente. Previamente à inoculação, as células de uma cultura de 48h foram suspendidas em solução salina 0,5%, utilizando-se uma concentração correspondente ao padrão 1 da escala de MacFarland ( $3,0 \times 10^8$  UFC/mL).

## 2.4 Degradação de biomassa lignocelulósica

Neste experimento, foram montadas comunidades artificiais de microrganismos, de modo a analisar a biodegradação da biomassa lignocelulósica. Para isso, foram utilizados como substrato fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar.

As comunidades foram montadas de modo aleatório (Tabela 1). Cada comunidade foi cultivada em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 1 mL da suspensão de cada isolado participante, três fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar de cerca de 0,5 cm<sup>2</sup> (esterilizados separadamente em autoclave) e água destilada no volume final de 75 mL. As culturas foram incubadas à temperatura ambiente com agitação por nove dias. Três frascos foram utilizados como controles negativos: dois mantidos não inoculados (C-A e C-B) e um mantido não inoculado e sem adição de água (C-C). No momento da inoculação e após dois, seis e nove dias foram coletadas duas alíquotas de 1 mL para quantificação dos açúcares redutores, mantidas congeladas a - 20 °C até a realização do ensaio.

Tabela 1. Composição das comunidades utilizadas no experimento de degradação de biomassa lignocelulósica.

| Comunidade | Isolados  |
|------------|---|
| 1          | JAG02BA, JAG04  |
| 2          | JAG02BA, JAG07B, JAG09, JAG11   |
| 3          | JAG07B, JAG09, JAG15  |
| 4          | Todos   |
| 5          | JAG01A, JAG02, JAG02BA, JAG04B, JAG06A, JAG09, JAG10, JAG11, JAG11A, JAG13, JAG14 |
| 6          | JAG01B, JAG09, JAG10, JAG13   |
| 7          | JAG05, JAG06B, JAG08, JAG11B  |
| 8          | JAG09, JAG11B, JAG13  |
| 9          | JAG05, JAG08, JAG12   |
| 10         | JAG04B, JAG10, JAG14  |



### 2.4.1 Visualização em microscopia eletrônica de varredura

Para visualizar a formação de biofilme e o grau de deterioração da biomassa lignocelulósica, os fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar das comunidades 4 e 6, assim como dos controles C<sub>-A</sub> e C<sub>-C</sub>, foram, após o término da incubação, submetidos a processo de fixação para visualização em microscopia eletrônica de varredura, de acordo com o seguinte protocolo:

1. Imersão em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 100 mM (ajustado para pH 7,2) por 2h30min;
2. Lavagem com tampão cacodilato de sódio (2x);
3. Imersão em solução de tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato de sódio por 2h;
4. Lavagem com tampão cacodilato de sódio (3x);
5. Imersão em soluções de acetona 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100% por 5 minutos cada;
6. Manutenção das amostras em acetona 100%.

Após a fixação, as amostras foram submetidas ao processo de Ponto Crítico, no qual ocorre a completa desidratação e substituição da acetona por CO<sub>2</sub> líquido. As amostras foram então metalizadas e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura. Todas as etapas após a fixação foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

## 2.5 Degradação de celobiose

Neste experimento, os microrganismos foram comparados em relação à degradação de celobiose quando cultivados isoladamente e em consórcios. Para isso, foram montadas dez comunidades artificiais (Tabela 2) utilizando-se onze microrganismos, um de cada grupo fenotípico com exceção do grupo B<sub>9</sub> (ver Tabela 3, seção Resultados).

Cada comunidade foi cultivada em um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 1 mL da suspensão de cada isolado participante, 0,1% de celobiose e água destilada no volume final de 50 mL. Adicionalmente, os onze isolados foram cultivados isoladamente nas mesmas condições. Os frascos foram incubados com agitação a 30 °C por nove dias. Dois frascos foram mantidos não inoculados como controle negativo (C-A e C-B). No momento da inoculação e após um, quatro e nove dias foram coletadas duas alíquotas de 1 mL para quantificação dos açúcares reductores. As alíquotas foram mantidas congeladas a - 20 °C até a realização do ensaio.

Tabela 2. Composição das comunidades utilizadas nos experimentos de degradação de celobiose e degradação de carboximetilcelulose.

| Comunidade | Isolados |       |       |       |         |        |       |       |       |        |        |
|------------|----------|-------|-------|-------|---------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|
|            | JAG01A   | JAG13 | JAG02 | JAG11 | JAG02BA | JAG11A | JAG10 | JAG14 | JAG09 | JAG19A | JAG06A |
| A          | +        | +     | +     | +     | +       | +      | +     | +     | +     | +      | +      |
| B          | -        | +     | +     | +     | +       | +      | +     | +     | +     | +      | +      |
| C          | -        | -     | +     | +     | +       | +      | +     | +     | +     | +      | +      |
| D          | -        | -     | -     | +     | +       | +      | +     | +     | +     | +      | +      |
| E          | -        | -     | -     | -     | +       | +      | +     | +     | +     | +      | +      |
| F          | -        | -     | -     | -     | -       | +      | +     | +     | +     | +      | +      |
| G          | -        | -     | -     | -     | -       | -      | +     | +     | +     | +      | +      |
| H          | -        | -     | -     | -     | -       | -      | -     | +     | +     | +      | +      |
| I          | -        | -     | -     | -     | -       | -      | -     | -     | +     | +      | +      |
| J          | -        | -     | -     | -     | -       | -      | -     | -     | -     | +      | +      |

(+) = presente; (-) = ausente.

## 2.6 Degradação de carboximetilcelulose

Este experimento foi realizado de modo semelhante ao anterior, porém, neste caso, foram utilizados carboximetilcelulose como substrato e um meio de cultura

consideravelmente mais rico. As comunidades foram cultivadas em frascos Erlenmayer de 125 mL contendo 1 mL da suspensão de cada isolado participante, 1% de carboximetilcelulose, 0,1% de glicose anidra, 0,1% de  $\text{KNO}_3$  e água destilada no volume final de 75 mL. A composição das comunidades e as condições de incubação foram as mesmas do experimento anterior (Tabela 2), com exceção do tempo de incubação que, neste experimento, foi de seis dias. No momento da inoculação e após um, quatro e seis dias foram coletadas duas alíquotas de 1,5 mL para quantificação de açúcares redutores e atividade enzimática, mantidas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até a realização dos ensaios.

### *2.6.1 Atividade enzimática*

Para a quantificação da atividade de celulase, uma alíquota de 1,5 mL de cada cultura foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . Em um tubo de ensaio contendo uma tira de 1 x 6 cm de papel filtro Whatman nº 1, foi adicionado 1 mL do sobrenadante e 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (com o pH ajustado em 7,0). Após incubação em banho-maria a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos, foi coletada uma alíquota de 1 mL para quantificação dos açúcares redutores, mantida congelada a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até a realização do ensaio. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mg de glicose em 30 minutos.

## **2.7 Quantificação de açúcares redutores**

A quantidade de açúcares redutores originados da degradação da biomassa lignocelulósica e dos carboidratos foram estimados através da técnica do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O reagente DNS foi preparado como segue: 25 mg de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 75 g de tartarato de sódio e potássio em 50 mL de NaOH 2M, e água destilada até o volume final de 250 mL. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  da amostra, em duplicata, foi adicionada a um volume igual do reagente DNS em

um microtubo, e fervida em banho-maria por 5 minutos. Após o resfriamento da solução à temperatura ambiente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 575 nm. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se uma curva padrão de glicose. O valor resultante para cada cultura em cada tempo analisado foi obtido através da média das duas repetições.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Isolados

Após a visualização em lupa e microscópio óptico, os 27 isolados foram agrupados em 12 grupos de acordo com suas características fenotípicas básicas, como morfologia colonial e tipo de célula (Figura 2, Tabela 3). Esta abordagem foi utilizada com a finalidade de evitar a repetição de espécies na montagem das comunidades.

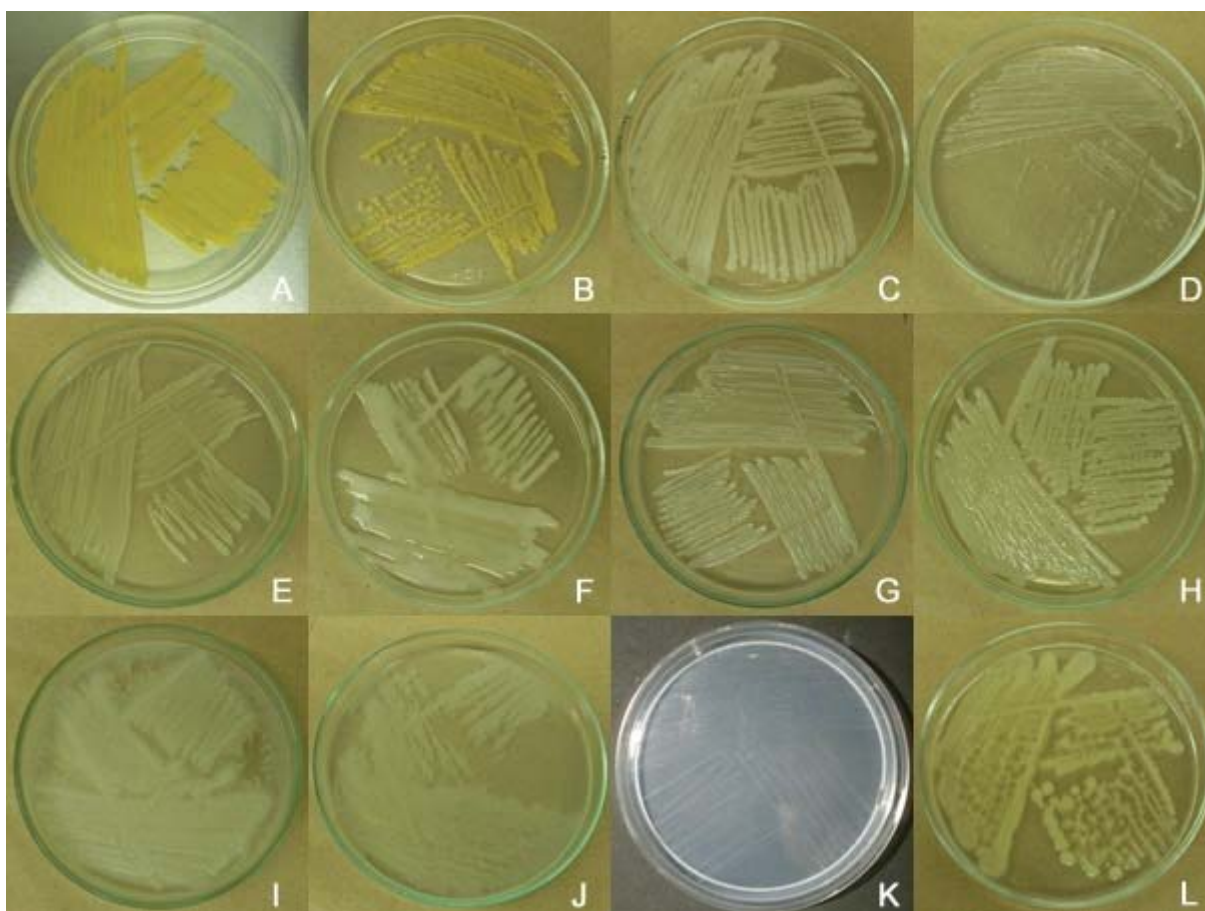


Figura 2. Isolados representantes de cada grupo fenotípico. (A) isolado JAG01A – grupo A<sub>1</sub>; (B) JAG13 – A<sub>2</sub>; (C) JAG02 – B<sub>1</sub>; (D) JAG11 – B<sub>2</sub>; (E) JAG02BA – B<sub>3</sub>; (F) JAG 11A – B<sub>4</sub>; (G) JAG10 – B<sub>5</sub>; (H) JAG14 – B<sub>6</sub>; (I) JAG09 – B<sub>7</sub>; (J) JAG19A – B<sub>8</sub>; (K) JAG04B – B<sub>9</sub>; (L) JAG06A – C.

Tabela 3. Agrupamento fenotípico dos isolados.

| <b>Grupo</b>   | <b>Morfologia colonial *</b> | <b>Tipo de célula</b>      | <b>Isolados</b>                        |
|----------------|------------------------------|----------------------------|--|
| A <sub>1</sub> | amarela                      | bastonete Gram -           | JAG01A, JAG01B, JAG05, JAG07, JAG07B   |
| A <sub>2</sub> | amarela                      | bastonete Gram +           | JAG13                                  |
| B <sub>1</sub> | branca                       | bastonete comprido Gram +  | JAG02, JAG03, JAG06B, JAG12            |
| B <sub>2</sub> | branca                       | levedura                   | JAG02C, JAG11, JAG11B                  |
| B <sub>3</sub> | branca                       | bastonete pequeno Gram -   | JAG02BA, JAG04, JAG08, JAG11AB, JAG14A |
| B <sub>4</sub> | branca                       | bastonete comprido Gram -  | JAG11A, JAG19B                         |
| B <sub>5</sub> | branca                       | coco Gram +                | JAG10                                  |
| B <sub>6</sub> | branca                       | bastonete pequeno Gram +   | JAG14                                  |
| B <sub>7</sub> | branca, irregular            | bastonete em cadeia Gram + | JAG09                                  |
| B <sub>8</sub> | branca, irregular            | bastonete Gram +           | JAG19A                                 |
| B <sub>9</sub> | branca, fastidiosa           | bastonete grande Gram -    | JAG04B                                 |
| C              | creme                        | bastonete Gram -           | JAG06A, JAG15                          |

\* Em ágar nutriente, com 48 h de crescimento.

### 3.2 Degradação de biomassa lignocelulósica

Como é possível observar na Tabela 4, as comunidades 2 e 4 foram as únicas que apresentaram a maior quantidade de açúcar no nono dia. As comunidades 3, 5, 8 e 9 obtiveram o valor mais alto no sexto dia enquanto que a comunidade 10 apresentou a maior quantidade de açúcar no segundo dia. As comunidades 1, 6 e 7 apresentaram, em todos os pontos, menor quantidade de açúcar do que no início do experimento.

Se considerarmos o rendimento (R), neste trabalho calculado pela equação

$$R = Q_{máx} - Q_0 \quad \text{Equação 1}$$

onde  $Q_{máx}$  é igual ao valor máximo de açúcar obtido e  $Q_0$  a quantidade de açúcar

existente no início do experimento, podemos observar que na comunidade 4 ocorreu o maior acúmulo de açúcar (0,038 mg de glicose/mL), sendo que nas comunidades 1, 6 e 7 o rendimento foi negativo (Tabela 4). É possível que a não-adição de fontes de nitrogênio e outros nutrientes essenciais ao meio de cultura tenha limitado o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a degradação da biomassa lignocelulósica. Em adição, mesmo com uma rápida clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas, a hidrólise da celulose pode ser impedida pela incapacidade das enzimas de acessarem o substrato. Isto pode ser principalmente atribuído ao fato de muitas cadeias de celulose estarem inacessíveis no interior das microfibrilas (LYND et al., 2002).

Tabela 4. Quantidade de açúcares redutores (em mg de glicose/mL) em cada ponto amostrado, produzidos pelas comunidades a partir da degradação de bagaço de cana-de-açúcar.

| Comunidade | Tempo  |              |              |              | R      |
|------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------|
|            | 0 dias | 2 dias       | 6 dias       | 9 dias       |        |
| 1          | 0,052  | 0,025        | 0,023        | <u>0,051</u> | -0,001 |
| 2          | 0,028  | 0,004        | 0,020        | <u>0,034</u> | 0,006  |
| 3          | 0,037  | 0,031        | <u>0,039</u> | 0,025        | 0,002  |
| 4          | 0,045  | 0,053        | 0,053        | <u>0,083</u> | 0,038  |
| 5          | 0,044  | 0,025        | <u>0,046</u> | 0,039        | 0,002  |
| 6          | 0,027  | 0,011        | 0,020        | <u>0,024</u> | -0,003 |
| 7          | 0,021  | 0,007        | <u>0,018</u> | <u>0,018</u> | -0,003 |
| 8          | 0,020  | 0,023        | <u>0,030</u> | 0,015        | 0,010  |
| 9          | 0,011  | 0,025        | <u>0,032</u> | 0,028        | 0,021  |
| 10         | 0,037  | <u>0,039</u> | 0,037        | 0,027        | 0,002  |
| C-A        | 0,058  | 0,024        | <u>0,044</u> | 0,024        | -0,014 |
| C-B        | 0,008  | 0,014        | <u>0,042</u> | 0,021        | 0,034  |
| C-C        | ND     | ND           | ND           | ND           | ND     |

R = rendimento (ver Equação 1); ND = não determinado. Os valores sublinhados correspondem ao valor máximo obtido em cada cultura.

É sabido que as taxas de hidrólise da celulose são inibidas pelo acúmulo dos produtos de hidrólise assim como dos produtos de fermentação, em um processo de “feedback” negativo. Este mecanismo atua no sentido de priorizar a utilização de açúcares mais facilmente metabolizados, como a glicose (LYND et al., 2002). Assim, com o acúmulo de monossacarídeos gerados a partir da degradação da biomassa lignocelulósica, é possível que tenha ocorrido uma diminuição na taxa de hidrólise da celulose, até que uma grande parte dos açúcares simples tenha sido consumida pelos microrganismos. Este mecanismo pode ter sido responsável pelo padrão de degradação obtido, onde se pode observar uma alta variação na quantidade de açúcares redutores com o tempo, alternando períodos de maior geração de açúcares com períodos de maior consumo.

É importante salientar que o valor observado em cada ponto representa a quantidade de açúcar gerada a partir da degradação da biomassa lignocelulósica diminuída da quantidade incorporada à biomassa microbiana, ou seja, da fração de açúcares gerados que foi utilizada para o crescimento celular. Portanto, desconhecendo-se a porcentagem da biomassa original que foi degradada, não é possível determinar a quantidade total de açúcar que foi gerada em cada comunidade.

Os resultados obtidos para os controles C<sub>A</sub> e C<sub>B</sub> foram diferentes do esperado, pois houve uma diminuição na quantidade de açúcares em alguns dos pontos amostrados. A ocorrência de contaminação dos controles pode ser descartada, pois as culturas não apresentaram nenhum sinal de turvação ao final do experimento. Ao que tudo indica, estes valores alterados podem ter sido consequência de um erro amostral na realização do ensaio para a quantificação dos açúcares. Devido a isto, os rendimentos foram mantidos inalterados, sem descontar o valor correspondente aos controles.

### *3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura*

Ao final do experimento, não foi possível notar uma diferença aparente nos graus de degradação do material lignocelulósico entre as comunidades e os controles, fato confirmado pela visualização em microscópio eletrônico de varredura.



Como mostra a Figura 3, não há diferença entre os fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar utilizados na comunidade 4 (Figura 3 A) e nos controles C-A (Figura 3 B) e C-C (Figura 3 C).

Nas duas comunidades cujos fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar foram visualizados em microscópio eletrônico de varredura, foi possível verificar a formação de biofilme sobre a matéria lignocelulósica (Figura 3 D-F), embora de maneira não muito pronunciada. Segundo Lynd et al. (2002), apesar de muitas bactérias aeróbias aderirem à celulose, o contato físico entre as células e a celulose não parece ser necessário para a hidrólise. De fato, a separação entre as células e a celulose, através de uma camada de ágar ou membranas, pode aumentar a hidrólise da celulose. As bactérias anaeróbias, por outro lado, apresentam uma maior tendência (ou uma necessidade, em alguns casos) de aderir à celulose.

Foi possível observar nas comunidades 4 e 6 a presença de estruturas arredondadas, de diversos tamanhos, mas geralmente medindo cerca de 1  $\mu\text{m}$  (Figura 3 G-H). De acordo com a escassa bibliografia disponível, aparentemente se trata de polímeros de lignina que foram liberados do material lignocelulósico (CARVALHO e FROLLINI, 1999; KUMAR et al., 2009).

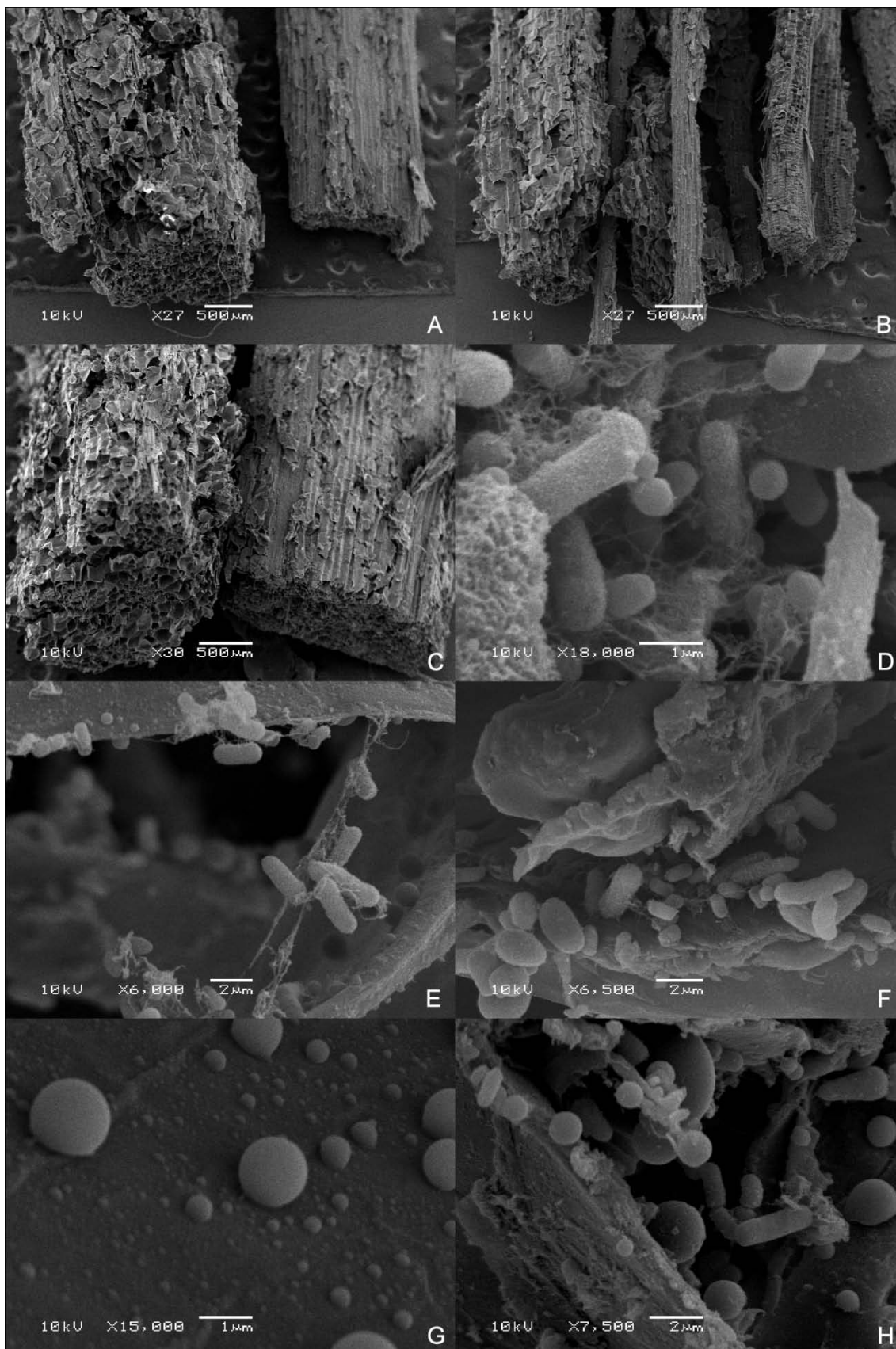


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar ao final do experimento. (A) comunidade 4, (B) C-A e (C) C-C; (D)-(E) formação de biofilme nas comunidades 4 e (F) 6; (G)-(H) estruturas esféricas encontradas nas comunidades 4 e 6, provavelmente polímeros de lignina.

A lignina é um polímero heterogêneo composto principalmente de subunidades de fenilpropanol conectadas por ligações éter que protege eficientemente as plantas dos ataques de microrganismos, sendo que apenas alguns fungos e bactérias são capazes de degradá-la (SAHA e BOTHAST, 1997). *Phanerochaete chrysosporium*, um fungo de degradação branca (“white-rot fungi”), é o mais estudado organismo lignolítico (BRODA et al., 1996; BRUMER et al., 1999; BAK et al., 2009), embora existam alguns estudos também com actinobactérias (GODDEN et al., 1992; TUNCER et al., 2004; GOTTSCHALK et al., 2008). Nestes organismos, a remoção da lignina é realizada, principalmente, pelas enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase. Outra enzima, celobiose desidrogenase, parece estar associada tanto com a degradação de lignina quanto de celulose (HENRIKSSON et al., 2000). Mais recentemente, uma enzima descoberta em fungos do gênero *Pleurotus* foi nomeada de peroxidase versátil, por combinar as funções catalíticas das enzimas lignina e manganês peroxidases (MARTÍNEZ et al., 2005). As lacases, presentes em muitas bactérias (CLAUS, 2004), possuem baixo potencial redox, e somente degradam lignina e outros compostos recalcitrantes na presença de mediadores redox (RUIZ-DUEÑAS e MARTÍNEZ, 2009).

Certos compostos resultantes da solubilização da lignina – principalmente ácidos orgânicos e compostos fenólicos – possuem potencial de inibir a fermentação (HIMMEL et al., 1997). Em adição, a lignina pode atuar como um adsorvente para as celulases, competindo com a celulose e resultando em uma diminuição nas taxas de hidrólise (LYND et al., 2002). Assim, é possível que a remoção de lignina pelos microrganismos, apesar de ter contribuído para a exposição das microfibrilas de celulose, tenha também atuado como inibidora da hidrólise e da fermentação da biomassa.

### **3.3 Degradação de celobiose**

Como é possível observar na Tabela 5, todas as comunidades, com exceção das comunidades A, B e D, assim como todos os isolados, com exceção de JAG01A, apresentaram a maior quantidade de açúcar no nono dia. As comunidades A e B e o isolado JAG01A obtiveram o valor mais alto no quarto dia, enquanto que a

comunidade D apresentou a maior quantidade de açúcar no primeiro dia.

A celobiose (Figura 4) é um dissacarídeo constituído de duas moléculas de glicose unidas por uma ligação  $\beta$ -(1,4)-glicosídica. O carbono anomérico (C<sub>1</sub>, em destaque na figura) faz parte de um grupo hemiacetal, conferindo à celobiose o caráter de açúcar redutor. Logo, os valores obtidos para a quantidade de açúcares redutores no início do experimento correspondem à quantidade de celobiose que foi adicionada como substrato.

O rendimento ficou entre 0,026 mg de glicose/mL (comunidade D) e 0,515 mg de glicose/mL (comunidade J) (Tabela 5). Se considerarmos o rendimento proporcional ( $R_{prop}$ ), calculado pela equação

$$R_{prop} = \frac{Q_{m\acute{a}x} - Q_0}{Q_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde  $Q_{m\acute{a}x}$  é igual ao valor máximo de açúcar obtido e  $Q_0$  a quantidade de açúcar existente no início do experimento, podemos observar que a quantidade de açúcar acumulada pelas comunidades D e J, no nono dia, corresponde, respectivamente, a 2,0% e 62,0% do valor inicial. Se levarmos em conta que uma parte do açúcar gerado foi consumida pelas populações microbianas em crescimento, embora esta fração não tenha sido estimada, é possível concluir que, de modo geral, tanto as comunidades quanto os isolados obtiveram um bom desempenho no acúmulo de açúcares.

Na comunidade J, na qual foi obtido o melhor desempenho neste experimento, estavam presentes os isolados JAG19A e JAG06A. Se somarmos os rendimentos proporcionais obtidos por estes isolados em cultura pura (15,6% e 41,0%, respectivamente) e compararmos com o rendimento da comunidade J, podemos observar uma diferença de 5,4%. Assim, é possível atribuir esta pequena diferença à ação sinérgica dos isolados. A comunidade I, por outro lado, que difere da comunidade J apenas pela presença do isolado JAG09, obteve um rendimento proporcional inferior (13,6%), apesar do rendimento do isolado JAG09 quando cultivado em cultura pura ter sido relativamente alto (24,3%). Neste caso, a competição entre os microrganismos pode ter prevalecido, aumentando a demanda

energética da comunidade.

Tabela 5. Quantidade de açúcares redutores (em mg de glicose/mL) em cada ponto amostrado, produzidos pelas comunidades e pelos isolados a partir da degradação de celobiose.

| Comunidade/Isolado | Tempo  |              |              |              | R     | R <sub>prop</sub><br>(%) | R <sub>líq</sub> |
|--------------------|--------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------------------|------------------|
|                    | 0 dias | 1 dia        | 4 dias       | 9 dias       |       |                          |                  |
| A                  | 1,186  | 1,189        | <u>1,274</u> | 1,258        | 0,088 | 7,4                      | -3,2             |
| B                  | 1,285  | 1,235        | <u>1,403</u> | 0,570        | 0,118 | 9,2                      | -1,4             |
| C                  | 1,090  | 0,973        | 1,153        | <u>1,496</u> | 0,406 | 37,3                     | 21,8             |
| D                  | 1,284  | <u>1,310</u> | 1,287        | 1,183        | 0,026 | 2,0                      | -2,2             |
| E                  | 1,080  | 1,132        | 1,142        | <u>1,510</u> | 0,430 | 39,8                     | 24,3             |
| F                  | 1,249  | 1,345        | 1,310        | <u>1,435</u> | 0,186 | 14,9                     | -0,6             |
| G                  | 1,200  | 1,268        | 1,318        | <u>1,391</u> | 0,191 | 15,9                     | 0,4              |
| H                  | 1,303  | 1,290        | 1,348        | <u>1,373</u> | 0,070 | 5,4                      | -10,1            |
| I                  | 1,227  | 1,309        | 1,355        | <u>1,394</u> | 0,167 | 13,6                     | -1,9             |
| J                  | 0,830  | 1,183        | 1,232        | <u>1,345</u> | 0,515 | 62,0                     | 46,5             |
| JAG01A             | 1,260  | 1,336        | <u>1,386</u> | 1,284        | 0,126 | 10,0                     | -0,6             |
| JAG13              | 1,115  | 1,266        | 1,402        | <u>1,556</u> | 0,441 | 39,5                     | 24,0             |
| JAG02              | 1,244  | 1,236        | 1,325        | <u>1,496</u> | 0,252 | 20,3                     | 4,8              |
| JAG11              | 1,263  | 1,323        | 1,416        | <u>1,583</u> | 0,320 | 25,3                     | 9,8              |
| JAG02BA            | 1,247  | 1,258        | 1,377        | <u>1,556</u> | 0,309 | 24,8                     | 9,3              |
| JAG11A             | 1,219  | 1,273        | 1,285        | <u>1,537</u> | 0,318 | 26,1                     | 10,6             |
| JAG10              | 1,405  | 1,441        | 1,556        | <u>1,592</u> | 0,187 | 13,3                     | -2,2             |
| JAG14              | 1,262  | 1,337        | 1,410        | <u>1,547</u> | 0,285 | 22,6                     | 7,1              |
| JAG09              | 1,232  | 1,310        | 1,381        | <u>1,531</u> | 0,299 | 24,3                     | 8,8              |
| JAG19A             | 1,151  | 1,181        | 1,285        | <u>1,331</u> | 0,180 | 15,6                     | 0,1              |
| JAG06A             | 0,945  | 1,191        | 1,266        | <u>1,332</u> | 0,387 | 41,0                     | 25,5             |
| C-A                | 1,180  | 1,246        | 1,318        | <u>1,370</u> | 0,191 | 16,1                     |                  |
| C-B                | 1,206  | 1,241        | 1,321        | <u>1,386</u> | 0,180 | 14,9                     |                  |

R = rendimento (ver Equação 1); R<sub>prop</sub> = rendimento proporcional (ver Equação 2); R<sub>líq</sub> = rendimento líquido (ver Equação 3). Os valores sublinhados correspondem ao valor máximo obtido em cada cultura.

Foi possível observar que a quantidade de açúcares redutores nos controles negativos aumentou com o tempo (Tabela 5). Apesar de não ter sido encontrada nenhuma referência na literatura, é possível que esta degradação tenha sido causada pela agitação. Assim, o rendimento líquido ( $R_{liq}$ ), representado pela equação

$$R_{liq} = R_{prop} - R_{cont} \quad \text{Equação 3}$$

onde  $R_{cont}$  é a média dos rendimentos proporcionais dos controles no período considerado para o cálculo de  $R_{prop}$ , ilustra a fração da degradação que pode ser atribuída à atividade microbiana. Deste modo, levando-se em conta o efeito da ação física na degradação do substrato, observa-se que as comunidades A, B, D, F, H e I, assim como os isolados JAG01A e JAG10, obtiveram um rendimento inferior ao resultante da degradação física.

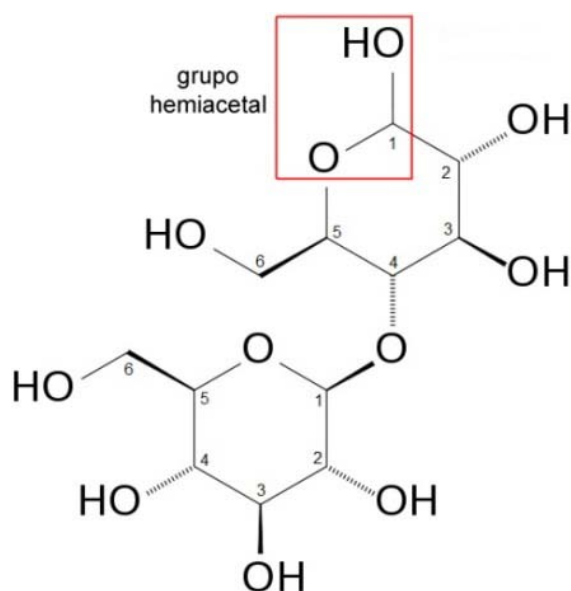


Figura 4. Estrutura química da celbiose.

### 3.4 Degradação de carboximetilcelulose

Como é possível observar na Tabela 6, apenas as comunidades G e J, assim como o isolado JAG13, apresentaram a maior quantidade de açúcar no sexto dia. Os isolados JAG02, JAG11, JAG02BA, JAG14, JAG09 e JAG19A obtiveram o valor mais alto no quarto dia. As comunidades B, D, F e H, assim como o isolado JAG06A, apresentaram a maior quantidade de açúcar no primeiro dia. As comunidades A, C, E e I, assim como os isolados JAG01A, JAG11A e JAG10, apresentaram, em todos os pontos, menor quantidade de açúcar do que no início do experimento.

A carboximetilcelulose é um polímero de moléculas de glicose, unidas por ligações  $\beta$ -(1,4)-glicosídicas, com a substituição parcial de grupos hidroxila por grupos carboximetil ( $\text{CH}_2\text{COOH}$ ). Como a celobiose, o carbono da última molécula de glicose do polímero faz parte de um grupo redutor hemiacetal. No entanto, a carboximetilcelulose apresenta proporcionalmente menos grupos redutores em relação à celobiose, pelo fato de ser formada por muitas moléculas de glicose. Portanto, descontando o valor correspondente à glicose que foi adicionada como substrato (1 mg/mL), a quantidade de açúcares redutores restante medida no início do experimento corresponde à quantidade de carboximetilcelulose que foi adicionada como substrato.

Em relação ao rendimento, podemos observar que na comunidade F ocorreu o maior acúmulo de açúcar (0,195 mg de glicose/mL, correspondente a 13,6% do valor inicial), sendo que nas comunidades A, C, E e I, assim como nos isolados JAG01A, JAG11A e JAG10, o rendimento foi negativo (Tabela 6). Não foi observado neste experimento o fenômeno de sinergia observado na comunidade J do experimento anterior. É possível que a maior recalcitrância da carboximetilcelulose tenha estimulado uma competição mais acentuada entre os microrganismos. Desse modo, uma quantidade maior de energia teria sido consumida pela comunidade, devido ao custo energético da ativação de mecanismos de defesa, como a produção de metabólitos secundários.

Tabela 6. Quantidade de açúcares redutores (em mg de glicose/mL) em cada ponto amostrado, produzidos pelas comunidades e pelos isolados a partir da degradação de carboximetilcelulose.

| Comunidade/Isolado | Tempo  |              |              |              | R      | R <sub>prop</sub> (%) |
|--------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------|-----------------------|
|                    | 0 dias | 1 dia        | 4 dias       | 6 dias       |        |                       |
| A                  | 1,610  | <u>1,496</u> | 1,066        | 1,269        | -0,114 | -7,1                  |
| B                  | 1,534  | <u>1,572</u> | 1,293        | 1,288        | 0,038  | 2,5                   |
| C                  | 1,671  | <u>1,657</u> | 1,217        | 1,315        | -0,014 | -0,8                  |
| D                  | 1,440  | <u>1,474</u> | 1,214        | 1,284        | 0,034  | 2,4                   |
| E                  | 1,595  | <u>1,562</u> | 1,266        | 1,345        | -0,033 | -2,1                  |
| F                  | 1,432  | <u>1,627</u> | 1,342        | 1,384        | 0,195  | 13,6                  |
| G                  | 1,581  | 1,531        | 1,337        | <u>1,592</u> | 0,011  | 0,7                   |
| H                  | 1,551  | <u>1,570</u> | 1,466        | 1,468        | 0,019  | 1,2                   |
| I                  | 1,660  | <u>1,658</u> | 1,529        | 1,633        | -0,002 | -0,1                  |
| J                  | 1,512  | 1,545        | 1,369        | <u>1,611</u> | 0,099  | 6,5                   |
| JAG01A             | 1,810  | <u>1,728</u> | 1,723        | 1,618        | -0,082 | -4,5                  |
| JAG13              | 1,614  | 1,515        | 1,633        | <u>1,660</u> | 0,046  | 2,8                   |
| JAG02              | 1,592  | 1,655        | <u>1,734</u> | 1,551        | 0,142  | 8,9                   |
| JAG11              | 1,644  | 1,482        | <u>1,660</u> | 1,377        | 0,016  | 1,0                   |
| JAG02BA            | 1,477  | 1,408        | <u>1,640</u> | 1,537        | 0,163  | 11,0                  |
| JAG11A             | 1,695  | 1,430        | <u>1,649</u> | 1,635        | -0,046 | -2,7                  |
| JAG10              | 1,712  | 1,504        | <u>1,591</u> | 1,468        | -0,121 | -7,1                  |
| JAG14              | 1,622  | 1,537        | <u>1,668</u> | 1,474        | 0,046  | 2,8                   |
| JAG09              | 1,647  | 1,555        | <u>1,693</u> | 1,592        | 0,046  | 2,8                   |
| JAG19A             | 1,643  | 1,658        | <u>1,748</u> | 1,594        | 0,105  | 6,4                   |
| JAG06A             | 1,569  | <u>1,729</u> | 1,550        | 1,460        | 0,160  | 10,2                  |
| C-A                | 1,860  | <u>1,868</u> | 1,603        | 1,863        | 0,008  | 0,4                   |
| C-B                | 1,709  | <u>1,890</u> | 1,851        | 1,542        | 0,181  | 10,6                  |

R = rendimento (ver Equação 1); R<sub>prop</sub> = rendimento proporcional (ver Equação 2). Os valores sublinhados correspondem ao valor máximo obtido em cada cultura.

Segundo Lynd et al. (2002), as necessidades nutricionais para o crescimento de espécies celulolíticas incluem nitrogênio, fósforo e enxofre, além de outros macro e micronutrientes e vitaminas. Apesar de nutrientes adicionais presentes em meios complexos (peptonas e extrato de levedura, por exemplo) não serem normalmente necessários, freqüentemente estimulam o crescimento de algumas linhagens de



microrganismos, em alguns casos dramaticamente. Assim é possível que os rendimentos obtidos tenham sido baixos devido à deficiente suplementação nutricional dos meios de cultura utilizados, aliada à alta recalcitrância do substrato. Entretanto, se compararmos os valores obtidos a partir da degradação de carboximetilcelulose com os obtidos com celobiose (Tabela 7), é possível concluir que a recalcitrância do substrato foi o fator determinante para o desempenho dos microrganismos, visto que os rendimentos foram maiores a partir da degradação de celobiose, mesmo em um meio de cultura com menos nutrientes.

Além da comunidade J citada anteriormente, a Tabela 7 também evidencia alguns isolados que obtiveram rendimentos acima da média nos dois experimentos, quando cultivados em cultura pura, tais como JAG02, JAG02BA e JAG06A. Estes microrganismos podem ser alvos de novas investigações, juntamente com o isolado JAG19A pertencente à comunidade J.

Tabela 7. Comparação entre os rendimentos proporcionais (em mg de glicose/mL) obtidos com celobiose e carboximetilcelulose.

| <b>Comunidade</b> | <b>R<sub>prop</sub> celobiose</b> | <b>R<sub>prop</sub> CMC</b> | <b>Isolado</b> | <b>R<sub>prop</sub> celobiose</b> | <b>R<sub>prop</sub> CMC</b> |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| A                 | 7,4                               | -7,1                        | JAG01A         | 10,0                              | -4,5                        |
| B                 | 9,2                               | 2,5                         | JAG13          | 39,5                              | 2,8                         |
| C                 | 37,3                              | -0,8                        | JAG02          | 20,3                              | 8,9                         |
| D                 | 2,0                               | 2,4                         | JAG11          | 25,3                              | 1,0                         |
| E                 | 39,8                              | -2,1                        | JAG02BA        | 24,8                              | 11,0                        |
| F                 | 14,9                              | 13,6                        | JAG11A         | 26,1                              | -2,7                        |
| G                 | 15,9                              | 0,7                         | JAG10          | 13,3                              | -7,1                        |
| H                 | 5,4                               | 1,2                         | JAG14          | 22,6                              | 2,8                         |
| I                 | 13,6                              | -0,1                        | JAG09          | 24,3                              | 2,8                         |
| J                 | 62,0                              | 6,5                         | JAG19A         | 15,6                              | 6,4                         |
|                   |                                   |                             | JAG06A         | 41,0                              | 10,2                        |

R<sub>prop</sub> = rendimento proporcional (ver Equação 2); CMC = carboximetilcelulose.

### 3.4.1 Atividade enzimática

Como é possível observar na Tabela 8, a maior atividade enzimática da maioria das culturas foi obtida no momento da inoculação. Este resultado não era esperado, visto que os microrganismos tinham sido mantidos em ágar nutriente, sem a adição de substrato celulósico. Portanto, as enzimas celulolíticas presentes no estágio inicial foram possivelmente produzidas no pré-inóculo. Nenhuma cultura obteve maior atividade enzimática no sexto dia, nem mesmo aquelas que obtiveram o melhor desempenho na degradação de carboximetilcelulose neste mesmo dia.

Segundo Lynd et al. (2002), em diversos microrganismos a produção de enzimas para a utilização de celulose é induzida na presença do substrato e inibida quando açúcares mais facilmente utilizáveis, como glicose, estão presentes. Assim, a adição de glicose no meio de cultura pode ter inibido a produção de enzimas celulolíticas pelos microrganismos.

Os resultados obtidos para os controles C<sub>A</sub> e C<sub>B</sub> nos ensaios de quantificação de açúcares redutores e atividade enzimática foram diferentes do esperado. Eventualmente pode ter ocorrido a contaminação dos controles – embora não tenha sido observado visualmente. Devido a isto, os dados referentes aos controles não puderam ser levados em conta na interpretação dos resultados, e novos experimentos serão realizados a fim de complementar estas informações.

Tabela 8. Atividade enzimática (em U/mL) do sobrenadante das culturas sobre papel filtro.

| Comunidade/Isolado | Tempo        |              |              |        |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------|
|                    | 0 dias       | 1 dia        | 4 dias       | 6 dias |
| A                  | <u>1,594</u> | 1,515        | 1,134        | 1,027  |
| B                  | <u>1,562</u> | 1,377        | 1,210        | 1,292  |
| C                  | <u>1,726</u> | 1,241        | 1,084        | 1,106  |
| D                  | 1,314        | <u>1,550</u> | 1,166        | 1,128  |
| E                  | 1,386        | <u>1,452</u> | 1,229        | 1,014  |
| F                  | <u>1,578</u> | 1,364        | 1,210        | 1,103  |
| G                  | <u>1,326</u> | 1,175        | 1,247        | 1,323  |
| H                  | 1,487        | <u>1,619</u> | 1,329        | 1,090  |
| I                  | <u>1,688</u> | 1,622        | 1,556        | 1,166  |
| J                  | 1,515        | 1,210        | <u>1,559</u> | 1,373  |
| JAG01A             | <u>1,852</u> | 1,597        | 1,540        | 1,588  |
| JAG13              | <u>1,635</u> | 1,540        | 1,550        | 1,446  |
| JAG02              | 1,506        | 1,166        | <u>1,534</u> | 1,380  |
| JAG11              | <u>1,638</u> | 1,351        | 1,427        | 1,553  |
| JAG02BA            | <u>1,681</u> | 1,386        | 1,430        | 1,386  |
| JAG11A             | <u>1,629</u> | 1,581        | 1,484        | 1,370  |
| JAG10              | <u>1,723</u> | 1,433        | 1,503        | 1,332  |
| JAG14              | 1,493        | <u>1,566</u> | 1,348        | 1,458  |
| JAG09              | <u>1,603</u> | 1,433        | 1,320        | 1,556  |
| JAG19A             | 1,490        | <u>1,588</u> | 1,484        | 1,329  |
| JAG06A             | <u>1,613</u> | 1,512        | 1,443        | 1,370  |
| C-A                | <u>1,720</u> | 1,575        | 1,685        | 1,468  |
| C-B                | <u>1,814</u> | 1,745        | 1,528        | 1,427  |

Os valores sublinhados correspondem à atividade enzimática máxima de cada cultura.

#### 4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- As comunidades não foram muito eficientes na degradação do bagaço de cana-de-açúcar e geração de açúcares fermentáveis. A comunidade 4 foi a que obteve o melhor rendimento, gerando 0,038 mg de glicose/mL após nove dias. Destacam-se quatro fatores que podem ter sido responsáveis pelo baixo rendimento observado: (1) baixo nível de nutrientes do meio de cultura; (2) impossibilidade das enzimas de acessarem a celulose; (3) inibição da hidrólise pelo acúmulo do produto; e (4) inibição pela solubilização da lignina.
- Na análise por microscopia eletrônica, não foi possível observar diferença significativa na estrutura dos fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar utilizados nas comunidades e nos controles. Nas comunidades 4 e 6, foi possível observar a formação de biofilme e liberação de estruturas esféricas de cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, provavelmente pequenos oligômeros de lignina. Novos ensaios se fazem necessários para confirmar esta importante hipótese, visto que poucos relatos na literatura demonstram a capacidade de bactérias de decompor eficientemente a lignina.
- Tanto as comunidades quanto os isolados demonstraram capacidade de hidrólise de celobiose e geração de glicose. A comunidade J, no nono dia, acumulou o equivalente a 62,0% do valor de açúcares redutores correspondente ao início do experimento. Uma fração deste rendimento (5,4%) pode ser atribuída à ação sinérgica dos dois isolados presentes (JAG19A e JAG06A). Por outro lado, a comunidade I, que difere da comunidade J somente pela presença do isolado JAG09, obteve um rendimento inferior (13,6%). Este experimento apontou os isolados presentes na comunidade J como candidatos para novos estudos, assim como outros isolados que obtiveram rendimentos individuais acima da média, como JAG02, JAG02BA e JAG06A.
- Os rendimentos obtidos a partir da degradação de carboximetilcelulose foram inferiores aos obtidos com celobiose, provavelmente devido à maior

recalcitrância do substrato.

- Os resultados relativos à atividade enzimática não foram conclusivos, e novos experimentos serão realizados. Especula-se que a adição de glicose no meio de cultura possa ter inibido a produção de enzimas celulolíticas.
- O uso de comunidades microbianas tem-se mostrado em diversos estudos como uma boa alternativa aos estudos envolvendo culturas puras. No entanto, a complexidade das interações entre os microrganismos torna-se um fator importante e de difícil elucidação. Ainda assim, temos convicção que os estudos de comunidades é uma alternativa interessante para a degradação de compostos recalcitrantes, visto que este evento ocorre desta maneira na natureza. Neste sentido, seria interessante, em um próximo estudo, diminuir o número de isolados na construção de novas comunidades artificiais.
- Os estudos de comunidades microbianas contribuem, sobretudo, para o entendimento dos processos de degradação que ocorrem na natureza, buscando elucidar as interações microrganismo-microrganismo e microrganismo-planta, resultado de milhões de anos de co-evolução. Cabe salientar que os resultados aqui obtidos não são muito promissores para aplicações industriais, devendo ser considerados como uma contribuição para estudos de interações microbianas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAK, J. S.; KO, J. K.; CHOI, I.-G.; PARK, Y.-C.; SEO, J.-H.; KIM, K. H. Fungal Pretreatment of Lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to Produce Ethanol From Rice Straw. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, p. 471-482, 2009.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balço Energético Nacional 2009 – Ano base 2008: Resultados Preliminares**. Rio de Janeiro: EPE, 2009.

BRODA, P.; BIRCH, P. R. J.; BROOKS, P. R.; SIMS, P. F. G. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 923-932, 1996.

BRUMER, H.; SIMS, P. F. G.; SINNOTT, M. L. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium* : purification and characterization of the main  $\alpha$ -galactosidase. **Biochemical Journal**, v. 339, p. 43-53, 1999.

CARVALHO, G. D.; FROLLINI, E. Lignina em Espumas Fenólicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 1, p. 66-75, 1999.

CHAMPAGNE, P.; LI, C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5700-5706, 2009.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, v. 35, p. 93-96, 2004.

GODDEN, B.; BALL, A. S.; HELVENSTEIN, P.; MCCARTHY, A. J.; PENNINGCKX, M. J. Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 2441-2448, 1992.

GOTTSCHALK, L. M. F.; BON, E. P. S.; NOBREGA, R. Lignin Peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: Enzyme Concentration Using Ultrafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 23-32, 2008.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 93-113, 2000.

HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S.; BAKER, J. O.; ELANDER, R.; MCMILLAN, J. D.; NIEVES, R. A.; SHEEHAN, J. J.; THOMAS, S. R.; VINZANT, T. B.; ZHANG, M. Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective. In: SAHA, B. C.; WOODWARD, J. (Org.). **Fuels and Chemicals from Biomass**. Washington: American Chemical Society, 1997, chapter 1.

HIMMEL, M. E.; DING, S.-Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

KIM, H. J.; BOEDICKER, J. Q.; CHOI, J. W.; ISMAGILOV, R. F. Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. **PNAS**, v. 105, n. 47, p. 18188-18193, 2008.

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAND, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3948-3962, 2009.

LO, Y.-C.; SARATALE, G. D.; CHEN, W.-M.; BAI, M.-D.; CHANG, J.-S. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 417-425, 2009.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, D.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J. D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C. E. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169-172, 2008.

MARTÍNEZ, Á. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; RÍO, J. C. D. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195-204, 2005.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**, v. 16, p. 743-762, 2009.

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 164-177, 2009.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Enzymes in Lignocellulosic Biomass. In: SAHA, B. C.; WOODWARD, J. (Org.). **Fuels and Chemicals from Biomass**. Washington: American Chemical Society, 1999, chapter 2.

TUNCER, M.; KURU, A.; ISIKLI, M.; SAHIN, N.; ÇELENK, F. G. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 783-791, 2004.

YANG, S.-J.; KATAEVA, I.; HAMILTON-BREHM, S. D.; ENGLE, N. L.; TSCHAPLINSKI, T. J.; DOEPPKE, C.; DAVIS, M.; WESTPHELING, J.; ADAMS, M. W. W. Efficient Degradation of Lignocellulosic Plant Biomass, without Pretreatment, by the Thermophilic Anaerobe "*Anaerocellum thermophilum*" DSM 6725. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4762-4769, 2009.