

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

# **Análise funcional e da diversidade de um consórcio microbiano capaz de degradar lignina**

**Autora:** Ísis Viana Mendes

**Orientador:** Dr. Ricardo Henrique Krüger

Brasília

2019

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

**Análise funcional e da diversidade de um consórcio microbiano capaz de degradar lignina**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Aluna: Ísis Viana Mendes  
Orientador: Dr. Ricardo Henrique Krüger

Brasília  
2019

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo, gostaria de agradecer a vida, por ter me dado paciência e conhecimento para aproveitar todos os momentos felizes que eu pude experimentar ao longo dessa jornada.

Agradeço aos meus pais, por todo apoio e incentivo.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Henrique Krüger pela oportunidade.

À Dra. Betania Ferraz Quirino pela ideia do projeto de pesquisa e por todos os anos de orientação.

Aos meus parceiros de bancada, antigos e atuais, Carol Bitencourt, Betúlia Moraes, Andressa Rezende, Mariana Garcia e Valquíria Lacerda

Agradecimentos especiais ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular.

Aos meus professores de curso que tanto me ensinaram e tornaram essa jornada bem mais divertida.

Agradecimentos ao Joint Genome Institute (JGI) pelos dados analisados no âmbito desse trabalho.

À Vitor Chagas, por sempre inventar nomes engraçados e atribuí-los a algo referente a minha pesquisa.

Aos avaliadores Eliane Noronha, João Ricardo e Renata Santana que contribuíram para a construção desse trabalho.

As instituições que estão envolvidas na pesquisa, Universidade de Brasília, EMBRAPA Agroenergia e CAPES.

E a todos que estiveram presentes comigo durante todo o percurso, muito obrigada!

## **EPÍGRAFE**

“Tudo o que somos é o resultado do que pensamos”

Buda

## RESUMO

Dentro de um modelo de biorrefinarias, o melhor aproveitamento da biomassa lignocelulósica requer a degradação da lignina e o seu uso como matéria-prima na geração de bioprodutos. A lignina é a maior fonte de compostos fenólicos na natureza. A recalcitrância à conversão enzimática ainda é uma das etapas limitantes no processo de valorização da lignina. Na natureza, fungos e bactérias conseguiram driblar a recalcitrância da lignina e são capazes de degradá-la por meio de enzimas oxirredutases. No primeiro capítulo dessa dissertação, foi analisada a diversidade microbiana de quatro consórcios enriquecidos para microrganismos capazes de degradar lignina. Os consórcios foram obtidos a partir de solo comercial, cultivados a 30 °C e 37 °C e enriquecidos por meio de sucessivas passagens em meio de cultura onde lignina Kraft ou lignina extraída por método alcalino foi usada como fonte de carbono. Foi realizado o sequenciamento de *i*Tags da região espaçadora transcrita interna ITS de fungos, e da região ribossomal 16S de bactérias, para cada um dos seis ciclos de adaptação (passagens). A análise da comunidade microbiana mostrou que a diversidade diminuiu gradualmente e a comunidade tende a se estabilizar em termo de composição a partir da quarta passagem. As variáveis substrato e temperatura atuam na modificação da composição de famílias em cada consórcio. Diferentes famílias bacterianas que atuam na degradação da lignina foram identificadas: Planococcaceae, Paenibacillaceae e Bacillaceae do filo Firmicutes; Rhodobacteraceae, Sphingomonadaceae, Methylobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Brucellaceae, Burkholderiaceae, Phyllobacteriaceae e Erythrobacteraceae, do filo Proteobacteria; Flavobacteriaceae do filo Bacteroidetes; e Microbacteriaceae do filo Actinobacteria. Espécies do filo Firmicutes e Proteobacteria foram favorecidas, respectivamente, pelo cultivo em lignina extraída por método alcalino e lignina Kraft. Para a comunidade fúngica, Trichosporonaceae, Trichocomaceae e Cephalothecaceae são as principais famílias encontradas ao final do processo de enriquecimento. Além disso, foram identificados ciliados que possivelmente desempenham um papel importante na dinâmica evolutiva da comunidade microbiana. No segundo capítulo dessa dissertação, foi obtida uma biblioteca metagenômica, BELig MG 6P, com o DNA da sexta passagem do consórcio microbiano cultivado a 37 °C e enriquecido com lignina extraída por método o alcalino. Os clones da biblioteca foram transformados em *Escherichia coli* HB101 e *Pseudomonas putida* KT2440. Duas abordagens foram utilizadas para triar essa biblioteca para clones que codifiquem enzimas ligninolíticas: uma metodologia funcional e outra baseada na sequência. A metodologia funcional é baseada no fenótipo das colônias que revelam atividades de enzimas ligninolíticas, sendo capazes de oxidarem os compostos aromáticos: guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico ao longo de 24 horas. Sete potenciais clones positivos foram obtidos, mas apenas três foram sequenciados: P1 7A, P3 3G e P4 7G. ORFs de interesse foram obtidas por essa metodologia. Na metodologia baseada na sequência *primers*, previamente construídos a partir de domínios conservados de enzimas ligninolíticas já descritas, foram utilizados para amplificar fragmentos por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o DNA da biblioteca metagenômica BELig MG 6P como molde. Essa metodologia permitiu identificar uma lacase e uma metiltransferase, ambas de *Escherichia coli*. Uma metodologia adicional baseada na complementação da atividade em *Pseudomonas putida* KT2440 identificou potenciais clones positivos que convertem guaiacol em catecol permitindo que *Pseudomonas putida* KT2440 utilize o guaiacol como única fonte de carbono.

**Palavras-chave:** lignina, consórcios microbianos, enzimas ligninolíticas, metagenômica.

## ABSTRACT

In the biorefinery model, the best use of biomass requires the degradation of lignin, and its use for making bioproducts. Lignin is the major source of phenolic compounds in nature. Its resistance to enzymatic conversion remains one of the limiting steps for lignin valorization. In nature, fungi and bacteria are able to degrade lignin using ligninolytic enzymes. In the first chapter of this dissertation, the diversity and dynamics of four lignin-adapted microbial consortia that originated from a commercial soil sample, grown at 30 °C and 37 °C, were analyzed. Sequencing of iTags for the ITS region from fungi and 16S rDNA region from bacteria was performed for each of the six adaptation cycles (passages). Microbial community diversity analysis showed that diversity gradually decreases, and the community tends to stabilize in terms of its composition from the fourth passage on forward. Different bacterial families that potentially degrade lignin were identified: Planococcaceae, Paenibacillaceae and Bacillaceae of phylum Firmicutes; Rhodobacteraceae, Sphingomonadaceae, Methylobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Brucellaceae of phylum Proteobacteria, Burkholderiaceae and Flavobacteriaceae of phylum Bacteroidetes; and Microbacteriaceae of phylum Actinobacteria. Species of Firmicutes and Proteobacteria phyla were favored by enrichment with base-extracted lignin and kraft lignin, respectively. Trichosporonaceae, Trichocomaceae, and Cephalothecaceae were the main families found in the fungal community, in addition to the presence of Ciliophoras that possibly played an important role in the evolutionary dynamics of the microbial community. In the second chapter, a metagenomic library, BElig MG 6P, was obtained using microbial consortium DNA of the six passage from a culture maintained at 37 °C, which used base-extracted lignin as a carbon source. The library clones were transformed into *Escherichia coli* HB101 and *Pseudomonas putida* KT2440. To screen this library for lignolytic clones, two strategies were used: one based on function and another sequence-based. The functional methodology is based on the phenotype of the colonies that show activities of ligninolytic enzymes, being able to oxidize the aromatic compounds: guaiacol, catechol, 4-methylcatechol and ferulic acid over 24 hours. Seven potential positive clones were obtained, but only three were sequenced: P1 7A, P3 3G and P4 7G. ORFs of interest were obtained by this methodology. In the sequence-based methodology primers, previously designed from conserved domains present in bacterial lacases, were used to amplify fragments by polymerase chain reaction (PCR), using the DNA from the BElig MG 6P metagenomic library as template. This methodology allowed the identification of a laccase and a methyltransferase both from *Escherichia coli*. An additional complementation strategy for screening in *Pseudomonas putida* KT2440 identified potential positive clones that convert guaiacol to catechol allowing *Pseudomonas putida* KT2440 to use guaiacol as the only source of carbon.

**Keywords:** lignin, microbial consortium, ligninolytic enzymes, metagenomics.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Índices de diversidade do solo original do consórcio microbiano do solo <i>Miracle</i> <i>Growth</i> .....	32
<b>Tabela 2.</b> Índices de diversidade da sexta passagem do consorcio microbiano do solo <i>Miracle</i> <i>Growth</i> .....	32
<b>Tabela 3.</b> Enzimas envolvidas na degradação da lignina .....	81
<b>Tabela 4.</b> Construção da metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas. .	93
<b>Tabela 5.</b> Lista de hospedeiros transformados com os clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p 1ªparte. ....	99
<b>Tabela 6.</b> Avaliação do crescimento da <i>Escherichia coli</i> HB101 em meios com diferentes características nutricionais .....	105
<b>Tabela 7.</b> Análises dos clones 1p3, 6p1, 6p3 e 7p16 no banco de dados nr no GenBank (NCBI) .....	118
<b>Tabela 8.</b> Índices de diversidade da comunidade bacteriana do consórcio MG BE 30 °C.....	152
<b>Tabela 9.</b> Índices de diversidade da comunidade bacteriana do consórcio MG BE 37 °C.....	153
<b>Tabela 10.</b> Índices de diversidade da comunidade bacteriana do consórcio MG Kraft 30 °C..	154
<b>Tabela 11.</b> Índices de diversidade da comunidade bacteriana do consórcio MG Kraft 37 °C..	155
<b>Tabela 12.</b> Índices de diversidade da comunidade fúngica do consórcio MG BE 30 °C .....	156
<b>Tabela 13.</b> Índices de diversidade da comunidade fúngica do consórcio MG BE 37 °C .....	157
<b>Tabela 14.</b> Índices de diversidade da comunidade fúngica do consórcio MG Kraft 30 °C.....	158
<b>Tabela 15.</b> Índices de diversidade da comunidade fúngica do consórcio MG Kraft 37 °C.....	159
<b>Tabela 16.</b> Teste da oxidação de 11 compostos aromáticos.....	160
<b>Tabela 17.</b> Dados coletados a partir de sucessivos cultivos dos clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p em <i>Escherichia coli</i> HB101 .....	161

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura molecular da lignina .....	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Enriquecimento de quatro consórcios microbianos de solo <i>Miracle Growth</i> .....	<b>29</b>
<b>Figura 3.</b> Curvas de rarefação para o número de OTUs de bactérias .....	<b>33</b>
<b>Figura 4.</b> Curvas de rarefação para o número de OTUs de fungos.....	<b>34</b>
<b>Figura 5.</b> Perfil taxonômico de diferentes bactérias a nível de família do consórcio MG BE 30 °C.....	<b>37</b>
<b>Figura 6.</b> Perfil taxonômico de diferentes bactérias a nível de família do consórcio MG BE 37 °C .....	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Perfil taxonômico de diferentes bactérias a nível de família do consórcio MG Kraft 30 °C.....	<b>39</b>
<b>Figura 8.</b> Perfil taxonômico de diferentes bactérias a nível de família do consórcio MG Kraft 37 °C.....	<b>40</b>
<b>Figura 9.</b> Perfil taxonômico de diferentes fungos a nível de família do consórcio MG BE 30 °C .....	<b>43</b>
<b>Figura 10.</b> Perfil taxonômico de diferentes fungos a nível de família do consórcio MG BE 37 °C. ....	<b>44</b>
<b>Figura 11.</b> Perfil taxonômico de diferentes fungos a nível de família do consórcio MG Kraft 30 °C.....	<b>45</b>
<b>Figura 12.</b> Perfil taxonômico de diferentes fungos a nível de família do consórcio MG Kraft 37 °C.....	<b>46</b>
<b>Figura 13.</b> Diagrama de Venn com os gêneros de bactéria .....	<b>47</b>
<b>Figura 14.</b> Diagrama de Venn com os gêneros de fungos. ....	<b>49</b>
<b>Figura 15.</b> Dissimilaridade de Bray-Curtis na matriz de NMDS para avaliar diferenças devido às variáveis substrato e temperatura entre as composições das comunidades bacterianas a nível de gênero. ....	<b>51</b>
<b>Figura 16.</b> Dissimilaridade de Bray-Curtis na matriz de NMDS para avaliar diferenças devido às variáveis substrato e temperatura entre as composições das comunidades fúngicas a nível de gênero. ....	<b>52</b>
<b>Figura 17.</b> Biodegradação da lignina presente na biomassa lignocelulósica .....	<b>71</b>
<b>Figura 18.</b> Vias do catabolismo de compostos aromáticos de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	<b>73</b>
<b>Figura 19.</b> Via do catabolismo de ácido vanílico em <i>S. setonii</i> .....	<b>74</b>
<b>Figura 20.</b> Ciclo catalítico da lacase.....	<b>77</b>
<b>Figura 21.</b> Ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase .....	<b>80</b>
<b>Figura 22.</b> Ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase.....	<b>80</b>
<b>Figura 23.</b> Construção de uma biblioteca metagenômica a partir do DNA microbiano de uma comunidade de solo.....	<b>83</b>
<b>Figura 24.</b> Construção da biblioteca metagenômica Belig MG 6p.....	<b>87</b>
<b>Figura 25.</b> Mapa da placa de elisa 96 poços inoculada com os clones da biblioteca.....	<b>94</b>
<b>Figura 26.</b> Validação da expressão dos clones da biblioteca por ensaio de detecção de β-glicosidases..	<b>100</b>
<b>Figura 27.</b> Eletroforese de gel de agarose 1 % com o resultado da digestão de 20 clones aleatórias da biblioteca Belig MG 6p .....	<b>101</b>
<b>Figura 28.</b> Porcentagem de descoloração dos corantes azure B, azul de metileno e azul brilhante de remanzol pela <i>Escherichia coli</i> HB101 em 24, 48 e 72 horas. ....	<b>103</b>
<b>Figura 29.</b> Porcentagem de descoloração dos corantes azure B, azul de metileno e azul brilhante de remanzol pela <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 em 24, 48 e 72 horas. ....	<b>103</b>
<b>Figura 30.</b> Ensaio para descoloração dos corantes azure B (AB), azul de metileno (AM) e azul brilhante de remanzol (RBBR) no tempo final de 72 horas.....	<b>104</b>
<b>Figura 31.</b> Avaliação da oxidação de 11 compostos aromáticos. ....	<b>106</b>
<b>Figura 32.</b> Avaliação da atividade oxidativa de sete potenciais clones positivos em guaiacol e catecol.	<b>109</b>
<b>Figura 33.</b> Avaliação da atividade oxidativa de sete potenciais clones positivos em 4-metilcatecol e ácido ferúlico.....	<b>110</b>
<b>Figura 34.</b> Digestão das triplicadas dos sete potenciais clones positivos da biblioteca Belig MG 6p. ....	<b>111</b>
<b>Figura 35.</b> Digestão dupla dos sete potenciais clones positivos da biblioteca Belig MG 6p .....	<b>112</b>
<b>Figura 36.</b> Mapa do inserto do clone P1 7A com as três principais ORFs encontradas .....	<b>113</b>
<b>Figura 37.</b> Alinhamento MUSCLE no programa Geneious R7 da ORF 7 do clone P1 7A e da enzima CotA de <i>Bacillus subtilis</i> . ....	<b>113</b>
<b>Figura 38.</b> Mapa do inserto do clone P3 3G com as quatro principais ORFs encontradas.....	<b>114</b>
<b>Figura 39.</b> Mapa do inserto do clone P4 7G com as três principais ORFs encontradas. ....	<b>115</b>
<b>Figura 40.</b> Alinhamento MUSCLE da ORF 3 do clone P4 7G com a enzima superóxido dismutase de <i>Labilithrix luteola</i> .....	<b>115</b>
<b>Figura 41.</b> Eletroforese em gel de agarose um 1 % da amplificação de fragmentos de 1.200 pb que codifiquem uma lacase bacteriana .....	<b>117</b>

<b>Figura 42.</b> Mapa do inserto do clone 1p3 com a ORF 1 para multicobre oxidase.....	<b>118</b>
<b>Figura 43.</b> Mapa do inserto do clone 6p1 com a ORF 7 para metiltransferase.....	<b>119</b>
<b>Figura 44.</b> Alinhamento MUSCLE da ORF 1 do clone 1p3 com uma lacase de Escherichia coli no programa Geneious R6. ....	<b>119</b>
<b>Figura 45.</b> Árvore filogenética de lacase.....	<b>120</b>
<b>Figura 46.</b> Metodologia de complementação da atividade para consumo do guaiacol como única fonte de carbono por Pseudomonas putida KT2440 transformada com os clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p. ....	<b>121</b>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1.</b>	<b>Solo</b> .....	19
<b>2.2.</b>	<b>Lignina</b> .....	19
<b>2.2.1.</b>	<b>Tipos de lignina</b> .....	20
<b>2.3.</b>	Degradação da lignina por fungos e bactérias .....	21
<b>2.4.</b>	Consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina .....	23
<b>2.5.</b>	Abordagem de bioinformática para análise de taxonomia e diversidade de comunidades microbianas .....	24
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>4.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	27
<b>4.1.</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	27
<b>4.1.1.</b>	Identificar os grupos taxonômicos presentes nos consórcios microbianos enriquecidos;.....	27
<b>4.1.2.</b>	Analisar a dinâmica da comunidade;.....	27
<b>4.1.3.</b>	Identificar como as variáveis temperatura e substrato atuam sobre a diferenciação das comunidades dos consórcios.....	27
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
<b>5.1.</b>	Enriquecimento de consórcios microbianos .....	28
<b>5.2.</b>	Sequenciamento da região ribossomal rDNA 16S e ITS.....	29
<b>5.3.</b>	Análise da diversidade dos consórcios microbianos.....	30
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	31
<b>6.1.</b>	Diversidade alfa dos consórcios microbianos.....	31
<b>6.2.</b>	Afiliação taxonômica a nível de família para os consórcios microbianos.....	34
<b>6.3.</b>	Gêneros compartilhados entre os consórcios microbianos .....	47
<b>6.4.</b>	Análise das variáveis temperatura e substrato .....	50

<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	53
7.1.	Análise da diversidade dos consórcios microbianos.....	53
7.2.	Análise da taxonomia dos consórcios microbianos .....	55
7.2.1.	Análise taxonômica dos consórcios bacterianos.....	56
7.2.2.	Análise taxonômica dos consórcios microbianos para o grupo dos fungos ....	60
7.3.	Análise das variáveis temperatura e substrato sob a dinâmica das comunidades 62	
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	65
CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EM BIBLIOTECA METAGENÔMICA .....		66
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	66
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	68
2.1.	Biomassa e o interesse biotecnológico .....	68
2.2.	Biorrefinarias .....	69
2.3.	Valorização da lignina .....	71
2.4.	Degradação enzimática da lignina .....	74
2.4.1.	Enzimas ligninolíticas bacterianas.....	75
2.4.2.	Lacases (EC 1.10.3.2).....	77
2.4.3.	Peroxidasas .....	79
2.4.4.	Outras enzimas envolvidas na degradação da lignina.....	81
2.5.	Abordagem metagenômica .....	82
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	85
<b>4.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	86
4.1.	Objetivos específicos .....	86
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	87
5.1.	Construção da biblioteca metagenômica BE-lig MG 6p 37 °C .....	87
5.2.	Escolha dos hospedeiros .....	87

5.3.	Transformação da ligação (pBTL2 com insertos do DNA do consórcio) em <i>Escherichia coli</i> HB101 .....	88
5.4.	Transformação da ligação (pBTL2 com insertos do DNA do consórcio) em <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 .....	89
5.5.	Validação da biblioteca: Confirmação do padrão de insertos.....	90
5.6.	Validação da atividade ligninolítica dos hospedeiros.....	90
5.7.	Construção de uma metodologia funcional para identificar enzimas ligninolíticas na biblioteca metagenômica Belig MG 6p 37 °C em <i>Escherichia coli</i> HB101	91
5.7.1.	Escolha dos meios de cultura.....	91
5.7.2.	Escolha dos substratos aromáticos para o ensaio de detecção de enzimas ligninolíticas .....	92
5.7.3.	Escolha dos padrões de aeração e crescimento celular.....	93
5.8.	Metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas na biblioteca Belig MG 6p 37 °C em <i>Escherichia coli</i> HB101 .....	93
5.9.	Corroboração dos fenótipos dos transformantes.....	95
5.10.	Metodologia funcional por complementação da atividade em <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	96
5.11.	Metodologia baseada na sequência para identificação de lacases na biblioteca metagenômica Belig MG 6p.....	96
5.12.	Análise de sequências .....	97
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>98</b>
6.1.	Construção da biblioteca metagenômica Belig MG 6p 37 °C .....	98
6.2.	Validação da biblioteca metagenômica por ensaio de $\beta$ -glicosidase e análise dos padrões de insertos.....	99
6.3.	Atividade ligninolítica dos hospedeiros escolhidos.....	102
6.4.	Construção de uma metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas .....	104
6.4.1.	Escolha do meio de cultivo .....	104
6.4.2.	Escolha dos reagentes oxidativos .....	105

6.4.3.	Escolha dos parâmetros de incubação e suplementação nutricional.....	106
6.5.	Identificação de potenciais clones positivos para enzimas ligninolíticas .....	107
6.6.	Sequenciamento dos clones P1 7A, P3 3G e P4 7G .....	112
6.7.	<i>Screening</i> para identificação de lacase bacteriana baseado na sequência.....	116
6.8.	Screening funcional por complementação em <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 120	
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	122
7.1.	Identificação de enzimas ligninolíticas por abordagem metagenômica .....	122
7.2.	Atividade ligninolítica dos hospedeiros.....	124
7.3.	Metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas.....	126
7.3.1.	Identificação de clones positivos a partir da oxidação do guaiacol e ácido ferúlico	126
7.3.2.	Oportunidades encontradas na metodologia baseada na função para identificação de enzimas ligninolíticas bacterianas .....	132
7.4.	Metodologia baseada na sequência para identificação de enzimas ligninolíticas 133	
7.5.	Metodologia de complementação da atividade em <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	135
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	137
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	138
A.	APÊNDICE: Índices de diversidade e riqueza da comunidade bacteriana...	152
B.	APÊNDICE: Índices de diversidade e riqueza da comunidade fúngica .....	156
C.	APÊNDICE: leitura no espectrofotômetro dos compostos aromáticos .....	160
D.	APÊNDICE: parâmetros de cultivo da <i>Escherichia coli</i> HB101 .....	161
A.	ANEXO: Protocolo do meio mínimo de cultura M9 .....	163

## CAPÍTULO 1: ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS ENRIQUECIDOS PARA DEGRADAR LIGNINA

### 1. INTRODUÇÃO

A lignina presente na biomassa lignocelulósica é uma fonte de compostos fenólicos de interesse industrial (BUGG *et al.*, 2011a). Entretanto, a lignina possui uma estrutura física resistente a degradação química e enzimática (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Para a desconstrução da biomassa lignocelulósica os consórcios microbianos são identificados como grupos de microrganismos atuando em sinergia para a transformação biológica da celulose, hemicelulose e lignina (MORAES *et al.*, 2018).

A compreensão do processo de degradação da lignina mediada por atividade enzimática é fundamental para um quadro de aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica. Apesar da recalcitrância da lignina, fungos e bactérias são capazes de expressar enzimas oxirredutases (lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, peroxidase versátil e DyP peroxidase) para degradá-la (ALCALDE, 2015; ZAKZESKI *et al.*, 2010). Já foram classificados fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota que degradam a lignina (MENEZES, 2013). As bactérias também podem utilizar a lignina como fonte de carbono ou energia, ainda assim, se conhece um número menor de espécies bacterianas ligninolíticas que espécies ligninolíticas de fungos (ZHU *et al.*, 2017). Bactérias dos filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes são capazes de expressar enzimas para desconstruírem a lignina (ZHU *et al.*, 2017).

O solo é o habitat de comunidades microbianas que realizam múltiplas atividades de interesse industrial por meio da expressão de enzimas, incluindo a degradação da lignina (CARLOS; FAN; CURRIE, 2018; YU *et al.*, 2015). Todavia, a seleção direta desses microrganismos para a degradação da lignina pode ser dificultada pela complexidade funcional e estrutural das comunidades microbianas, dada as múltiplas interações intraespecíficas e interespecíficas, encontradas nesse ecossistema (BRENNER; YOU; ARNOLD, 2008; REDDY *et al.*, 2011). É nesse contexto que o enriquecimento de consórcios microbianos é utilizado como estratégia para identificar grupos de microrganismos com funções bioquímicas similares (NANNIPIERI *et al.*, 2017). O processo de enriquecimento diminui a complexidade funcional convergindo a comunidade para atividades específicas facilitando a descoberta de microrganismos para a desconstrução da lignina (MORAES *et al.*, 2018).

Para compreender a composição da comunidade microbiana sem a necessidade de cultivo de cada microrganismo, abordagens baseadas na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) da região ribossomal 16S de bactérias e da região espaçadora transcrita interna (ITS) de fungos pode ser utilizada. Os fragmentos amplificados são sequenciados e posteriormente classificados como unidades taxonômicas operacionais (OTUs) (KEMP; ALLER, 2004). Diferentes índices de diversidade e riqueza (Chao1, Shannon, Simpson, *PD whole tree*) são utilizados em análises de bioinformática para compreender a dinâmica da comunidade microbiana (KEMP; ALLER, 2004; PALIY; SHANKAR, 2016).

Neste trabalho, para selecionar microrganismos que atuam na degradação da lignina, o solo comercial *Miracle Growth* foi utilizado como fonte de diversidade para o estabelecimento de quatro consórcios microbianos enriquecidos ao longo do tempo para microrganismos capazes de utilizar lignina Kraft ou lignina extraída por método alcalino como uma única fonte de carbono. Os consórcios microbianos utilizando os dois tipos de lignina foram cultivados em duas temperaturas a 30 °C e 37 °C por seis ciclos de adaptação (passagens) de duas semanas cada. Os quatro consórcios estabelecidos foram: enriquecido com lignina extraída por método alcalino e mantido a 30 °C, enriquecido com lignina extraída por método alcalino e mantido a 37 °C, enriquecido com lignina Kraft e mantido a 37 °C e enriquecido com lignina Kraft e mantido a 30 °C. Para identificar os microrganismos presentes nos consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina foi realizado o sequenciamento Illumina da região ITS de fungos e do gene 16S rDNA de bactérias para cada uma das passagens.

O presente trabalho é dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo focará nos grupos de microrganismos presentes em consórcios microbianos enriquecidos capazes de degradar a lignina. O segundo capítulo discorrerá sobre enzimas ligninolíticas bacterianas que participam do processo de biodegradação da lignina. Neste primeiro capítulo serão analisadas a diversidade taxonômica e a dinâmica evolutiva de consórcios microbianos de solo *Miracle Growth* enriquecidos com dois tipos de lignina (lignina Kraft e lignina extraída por método alcalino) e cultivados a 30 °C e a 37 °C por seis ciclos de adaptação.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Solo

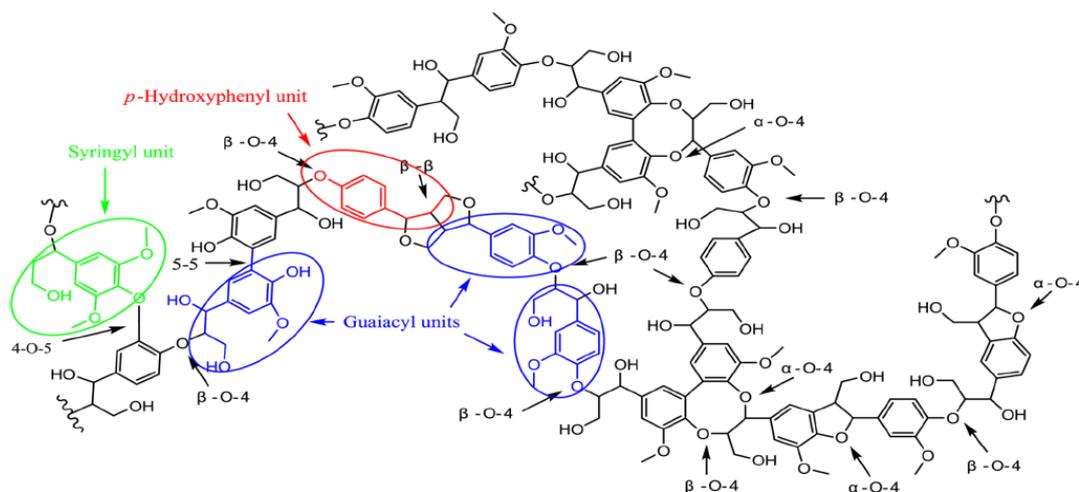
O solo é um ambiente com micro-habitats heterogêneos, com características físicas, químicas e biológicas próprias (BATISTA, 2007). Essa heterogeneidade reflete a diversidade microbiana encontrada com variadas características metabólicas que permitem que microrganismos díspares vivam no mesmo habitat utilizando diferentes fontes de carbono e energia (BATISTA-GARCÍA *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A microbiota presente no solo participa dos ciclos biogeoquímicos, sendo responsável pela decomposição e ciclagem de nutrientes da biomassa vegetal e animal.

No solo os microrganismos são capazes de degradar todas as frações da biomassa vegetal inclusive os compostos fenólicos e não fenólicos presentes na lignina (CARLOS; FAN; CURRIE, 2018; NANNIPIERI *et al.*, 2017). Os microrganismos encontrados no solo são uma fonte de enzimas de interesse biotecnológico (YU *et al.*, 2015). A desconstrução da celulose, hemicelulose e lignina presentes na biomassa lignocelulósica para a produção de materiais químicos de valor agregado desempenhará um importante papel na bioeconomia ao permitir o uso integral da biomassa.

### 2.2. Lignina

A lignina é um heteropolímero fenólico formada pela polimerização de unidades de p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) respectivamente derivadas dos monolignóis, álcool cumarílico, coniferílico e sinapílico (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003) (Figura 1). As enzimas ligninolíticas, peroxidases e lacases, oxidam os monolignóis fenólicos que formam os dímeros (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; GONZALO *et al.*, 2016). Os monolignóis oxidados podem fazer uma série de ligações do tipo éter e carbono-carbono, sendo as ligações  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -O-4 e  $\beta$ -5 as mais comuns, para a formação da estrutura da lignina (GONZALO *et al.*, 2016). No bagaço de cana-de-açúcar a lignina corresponde cerca de 10 - 30 % da parede celular vegetal sendo a maior fonte de compostos fenólicos da natureza (ALCALDE, 2015; OGATA, 2013). A lignina é uma parte essencial da biomassa lignocelulósica e para que o carbono e nutrientes ali presentes sejam incorporados novamente nos ciclos biogeoquímicos é

necessário a desconstrução da biomassa, por conseguinte a degradação da lignina (GONZALO *et al.*, 2016).



**Figura 1** Estrutura molecular da lignina. Extraído de Li et al. (2015).

### 2.2.1. Tipos de lignina

Os monômeros que formam a lignina, guaiacil (G), siringil (S) e p-hidroxifenil (H) diferem entre si apenas no grau de metilação (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). A porcentagem de cada unidade monomérica irá variar de acordo com a espécie vegetal. A lignina das angiospermas possui unidades de guaiacil, siringil e p-hidroxifenil, esse último em menor quantidade. A lignina das gimnospermas é formada por guaiacil e p-hidroxifenil, esse último em menor quantidade. A lignina das monocotiledôneas, como as gramíneas, é formada por unidades de guaiacil, siringil e p-hidroxifenil (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Diferentes ligninas também podem ser resultado dos diferentes tipos de tratamento da biomassa lignocelulósica para a deslignificação. Dentro da indústria de papel e polpa, dois tipos de lignina podem ser obtidas a partir do pré-tratamento da biomassa: a lignina Kraft (sulfática) e a lignina sulfítica (obtida por tratamento com hidróxido de sódio) (SALIBA *et al.*, 2001).

A lignina Kraft é obtida após o tratamento da biomassa na indústria de polpa e de papel. O processo de tratamento Kraft e a precipitação da lignina por acidificação a partir do licor negro atuam diretamente na estrutura da lignina (FOELKEL, 2009). A lignina Kraft, ou sulfática, possui mais grupos carboxílicos e maior solubilidade (FOELKEL, 2009). A lignina Kraft tem um alto teor de grupos fenólicos livres resultado da hidrólise

das ligações éter (FOELKEL, 2009). A lignina Kraft ainda é menos condensada que a lignina soda (FOELKEL, 2009).

O tratamento da biomassa de origem vegetal para obtenção de lignina extraída por método alcalino passa por um pré-tratamento utilizando bases como o hidróxido de sódio (NaOH) (BRODEUR *et al.*, 2011). Esse tipo de tratamento rompe as ligações éter entre os grupos aromáticos modificando a lignina estruturalmente (BRODEUR *et al.*, 2011; QUINELATO, 2016). Na presença de temperaturas elevadas, esse pré-tratamento também pode desmetilar a lignina (QUINELATO, 2016).

### **2.3. Degradação da lignina por fungos e bactérias**

Os microrganismos possuem capacidade de transformar moléculas orgânicas complexas em compostos mais simples e utilizá-los como fonte de carbono e energia (BATISTA, 2007; COSTA *et al.*, 2007). Na natureza, fungos e bactérias conseguiram driblar a recalcitrância da lignina utilizando enzimas oxirredutases para decompô-la (GONZALO *et al.*, 2016). No solo é possível identificar representantes dos três domínios da vida que atuam na decomposição da biomassa vegetal, especificamente da lignina.

Os fungos degradadores da madeira podem ser divididos de acordo com a modo da degradação: fungos de podridão marrom e branca. Os fungos de podridão marrom modificam a lignina através de uma série de desmetilações disponibilizando os compostos fenólicos para serem oxidados (CONCEIÇÃO, 2010; ESLYN, 1975). A maioria dos fungos de podridão marrom que modificam a lignina são do filo Basidiomycota das famílias Polyporaceae e Hymenochaetaceae e algumas espécies do filo Ascomycota principalmente da família Xylariaceae (CONCEIÇÃO, 2010).

Os fungos ligninolíticos, principalmente os de podridão branca, ao longo do processo evolutivo desenvolveram um grande arsenal de enzimas oxidativas extracelulares que podem ser empregadas na degradação da lignina (FANG *et al.*, 2018; SHI; CHINN; SHARMA-SHIVAPPA, 2008; SHI *et al.*, 2013). Durante o processo de biodegradação da lignina os fungos da podridão branca podem empregar uma única enzima ligninolítica ou um coquetel enzimático formado por: lignina peroxidase (LiP), peroxidase de manganês (MnP) e lacase (Lac) (FANG *et al.*, 2018; GONZALO *et al.*, 2016).

Por exemplo, *Phanerochaete chrysosporium*, um fungo de podridão branca, tem capacidade de despolimerizar a lignina utilizando ligninas peroxidases (LiPs), manganês

peroxidases (MnPs) e a enzima auxiliar glioxal oxidase geradora de peróxido de hidrogênio (CONCEIÇÃO, 2010; RAJARATHANAM; SHASHIREKA; BANO, 1992). Os gêneros de fungos *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp. e *Penicillium* sp. foram testados para sua capacidade de degradar compostos fenólicos com estrutura análogas a da lignina (SILVA; MONTEIRO, 2000). Para ativar a expressão de enzimas ligninolíticas, as cepas foram cultivadas em meio com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e suplementado com o corante Azul Brillhante de Remanzol - RBBR. A descoloração do RBBR foi de 16 % para *Penicillium*, 14 % para *Acremonium* e 5 % para *Paecilomyces* (SILVA; MONTEIRO, 2000). As espécies *Colletotrichum* sp. e *Pleurotus ostreatus* são produtores de lacase (MARTINEZ *et al.*, 2009). A degradação da lignina por fungos pode ainda envolver mediadores como cátions de álcool veratrílico, íons de manganês além de outras enzimas auxiliares (GONZALO *et al.*, 2016).

As bactérias, ainda que bem menos estudadas que fungos, também podem utilizar a lignina como fonte de carbono ou energia. Há poucas caracterizações bioquímicas sobre espécies bacterianas ligninolíticas (ZHU *et al.*, 2017). Pesquisas recentes demonstraram que as bactérias expressam diferentes enzimas que podem agir sobre a lignina. As principais classes enzimáticas seriam as heme-peroxidases e as fenoloxidasas (lacases) (FANG *et al.*, 2018; GONZALO *et al.*, 2016). Outros estudos indicam que essa lista seria mais extensa havendo outras enzimas bacterianas que parecem contribuir para as modificações na lignina, como as superóxido dismutases, catalases e  $\beta$ -eterases (GONZALO *et al.*, 2016).

Raj *et al.* (2007) identificou uma espécie bacteriana do gênero *Bacillus* sp. isolada de lodo de usinas de produção de papel capaz de degradar lignina Kraft. A cepa isolada foi cultivada em meio de cultura suplementado com lignina Kraft, glicose e peptona. Análises de espectrometria de massa CG-MS indicaram modificações bioquímicas da lignina que gerou vários compostos monoméricos. Os actinomicetos, especialmente *Streptomyces* sp., também foram identificados por possuir a capacidade de degradar a lignina através da expressão de lacases (SHI *et al.*, 2013). Várias DyPs peroxidases (do inglês *dye type peroxidase*) foram descritas ao longo dos anos sendo expressas por diferentes bactérias: *Bacillus subtilis* (MIN *et al.*, 2015) *Pseudomonas putida* (SANTOS *et al.*, 2014), *Saccharomonospora viridis* (YU *et al.*, 2014), *Thermobifida fusca* (VAN BLOOIS *et al.*, 2010). Diferentes isolados bacterianos foram identificados sendo capazes de metabolizar diferentes formas de lignina, entre eles isolados de *Microbacterium*,

*Micrococcus*, *Rhodococcus erythropolis* do filo Actinobactéria, isolados de *Ochrobactrum* da classe Alphaproteobacteria e isolados *Rhizobiales* e *Sphingobacterium* do filo Bacteroidetes (TAYLOR *et al.*, 2012).

#### **2.4. Consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina**

Os consórcios microbianos são formados por grupos que atuam em conjunto para uma determinada finalidade apresentando uma rede de atividade complexa onde as funções são amplamente interligadas e o produto gerado por um organismo pode ser utilizado como substrato por outro (BRENNER; YOU; ARNOLD, 2008; COSTA *et al.*, 2007). O processo de enriquecimento de um consórcio microbiano permite a seleção de organismos específicos, afunilando a atividade da comunidade para aquela desejada, facilitando a descoberta de enzimas de interesse biotecnológico (MORAES *et al.*, 2018). Essa estratégia é necessária uma vez que é difícil identificar todos os microrganismos envolvidos no processo de biodegradação da biomassa, especialmente da lignina, dado a alta diversidade e complexidade funcional no solo.

A identificação taxonômica dos grupos de microrganismos presentes nos consórcios microbianos enriquecidos pode ser feita por técnicas moleculares. Para tal, realiza-se a amplificação, sequenciamento e análise do gene ribossomal rDNA 16S de bactérias e da região espaçadora transcrita interna (ITS) de fungos (FELSKE *et al.*, 1998; NEUPERT, 2017; SILVEIRA, 2004). O DNA ribossomal bacteriano e fúngico é formado por regiões variáveis e conservadas. Essas regiões conservadas são utilizadas no anelamento de *primers* para amplificar regiões específicas utilizadas na identificação dos microrganismos (BORNEMAN; HARTIN, 2000; BORNEMAN; TRIPLETT, 1997). Dado a sensibilidade do sequenciamento e das análises é possível detectar espécies, gêneros, famílias ou grupos taxonômicos em hierarquias maiores, como por exemplo filo (NANNIPIERI *et al.*, 2017).

Utilizando a abordagem anteriormente descrita, Yu *et al.* (2015) avaliaram a composição e a dinâmica de consórcios microbianos enriquecidos por 12 semanas, usando a gramínea *Panicum virgatum* L. como única fonte de carbono. O sequenciamento do gene ribossomal rDNA 16S de bactérias permitiu identificar os filos mais abundantes após o processo de enriquecimento: Acidobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Actinobacteria, Bacteroidetes e Proteobacteria. A comunidade sofreu modificações principalmente nas três passagens iniciais de 2 semanas, atingindo a estabilidade da

terceira para quarta passagem. Os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes já foram descritos por possuírem espécies que expressam enzimas ligninolíticas (ZHU *et al.*, 2017).

Moraes *et al.* (2018) enriqueceram por 50 semanas o consórcio LigMet obtido a partir do solo de plantação de cana-de-açúcar com lignina como única fonte de carbono. O DNA do consórcio microbiano foi extraído para o sequenciamento das regiões rDNA 16S de bactérias e ITS de fungos. As análises taxonômicas revelaram as famílias bacterianas mais abundantes: Alcaligenaceae (24 %), Micrococcaceae (11 %), Bacteriaceae (9 %) e Paenibacillaceae (5 %). A comunidade fúngica também foi analisada sendo os principais gêneros encontrados: *Candida* sp. (39 %), *Rhodospiridium* sp. (26 %), *Trichosporon* sp. (20 %) e *Cyberlindnera* sp. (9 %) (MORAES *et al.*, 2018).

Recentemente, Jiménez *et al.* (2016) obtiveram três consórcios microbianos capazes de degradar biomassa lignocelulósica. Estes consórcios foram estabelecidos a partir de amostra de solo utilizando palha de trigo (WS1-M), grama (SG-M) ou palha de milho (CS-M) como fontes de carbono. O consórcio SG-M representado por membros das famílias Pseudomonadales, Xanthomonadales, Burkholderiales do filo das Proteobactérias e Flavobacteriales e Sphingobacteriales do filo Bacteroidetes foi dentre os consórcios estabelecidos aquele que apresentou a maior atividade para degradar lignina (JIMÉNEZ *et al.*, 2016).

Amostras de troncos de árvores em decomposição e do solo próximo dos troncos foram utilizadas como fonte de diversidade microbiana inicial para o cultivo de quatro consórcios microbianos ligninolíticos: DT 1, DT 2, DM 1 e DM 2 (FANG *et al.*, 2018). Os consórcios foram enriquecidos ao longo das passagens inicialmente com guaiacol e depois com aparas de árvores como fonte de carbono. A comunidade microbiana atingiu a estabilidade em sua composição a nível de gênero após 6 dias de cultivo. O consórcio DM 1 demonstrou a maior atividade seletiva em degradar a lignina, sendo os principais gêneros bacterianos encontrados: *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Cellulosimicrobium* e *Mesorhizobium* (FANG *et al.*, 2018).

## **2.5. Abordagem de bioinformática para análise de taxonomia e diversidade de comunidades microbianas**

Para ter acesso a diversidade microbiana presente no solo, sem a necessidade de cultivo, surge como alternativa a identificação de grupos taxonômicos através do

sequenciamento e análises de genes ribossomais rDNA 16S e ITS (LAMBAIS *et al.*, 2005). Em bactérias o gene 16S codifica para uma região ribossômica conservada entre as diferentes espécies de procariotos (SILVEIRA, 2004). Os locais conservados são utilizados como molde para o desenho de *primers* específicos para amplificar as sequências de interesse. (SILVEIRA, 2004). Em fungos, a região espaçadora transcrita interna (ITS) está situada entre as subunidades ribossômicas. Essa região é flanqueada por regiões conservadas que permitem o desenho de *primers* para a amplificação de sequências utilizadas em identificações filogenéticas de espécies de fungos (SCHOCH *et al.*, 2012).

O sequenciamento dos fragmentos amplificados de rDNA 16s e ITS pode ser realizado pela plataforma Illumina por síntese de nucleotídeos. As amostras amplificadas do rDNA 16S e ITS pela plataforma Illumina são chamadas de iTags (DEGNAN; OCHMAN, 20012). Essa técnica é dividida em três etapas: preparação da amostra, PCR sólida e sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010). Na primeira etapa os fragmentos de DNA são ligados aos adaptadores. Na segunda etapa ocorre a hidridização dos fragmentos de DNA e adaptadores com um segundo grupo de adaptadores acoplados em uma placa de vidro. Os fragmentos são amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) em fase sólida. Na terceira e última etapa ocorre o sequenciamento dos fragmentos amplificados por síntese de nucleotídeos.

Para caracterizar a taxonomia de uma comunidade microbiana baseada apenas na amplificação e sequenciamento do gene ribossomal rDNA 16S e ITS, os iTags obtidos a partir do sequenciamento Illumina devem ser agrupados em forma de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) a partir do grau de similaridade (LAMBAIS *et al.*, 2005). As OTUs são utilizadas para descrever e comparar populações e comunidades microbianas (LAMBAIS *et al.*, 2005). A maioria dos estudos utilizam valores de similaridade mínima de 97 % entre as sequências amplificadas para agrupar as OTUs (KEMP; ALLER, 2004). As sequências consenso obtidas podem ser comparadas com outras sequências dos bancos de dados para fazer as classificações taxonômicas nos diferentes níveis hierárquicos.

Diferentes índices podem ser utilizados para medir a diversidade e a riqueza das comunidades microbianas sequenciadas. O índice de diversidade de Shannon possui seus pressupostos pautados pela teoria da informação (LUDWIG; REYNOLDS, 1988). Diz

respeito à chance de coletar um indivíduo da amostra e esse pertencer a uma espécie “X” (SCOLFORO *et al.*, 2008). Esse índice é relacionado à riqueza e distribuição das espécies dando maior peso a indivíduos raros. Quanto maior o valor do índice, maior a diversidade. O índice de diversidade Simpson é baseado na probabilidade de dois indivíduos, retirados aleatoriamente da amostra, pertencerem a espécies distintas (GORENSTEIN, 2002; SCOLFORO *et al.*, 2008). Os valores estimados para esse índice variam de 0 a 1, sendo que quando mais próximo de 1 maior a diversidade. O índice *Phylogenetic Diversity Whole Tree* incorpora diferenças filogenéticas entre as OTUS para estimar a biodiversidade total da amostra (PYLRO *et al.*, 2014). O índice Chao 1 estima a riqueza de espécies nas amostras.

Para avaliar as comunidades microbianas em diferentes consórcios enriquecidos para degradar biomassas lignocelulósicas, além dos índices de diversidade e riqueza, Brossi *et al.* (2016) utilizaram o escalonamento multidimensional não métrico (NMDS). O objetivo do NMDS é coletar informações multidimensionais da comunidade microbiana e reduzir isso a informações que possam ser plotadas em eixos para serem visualizadas (RAMETTE, 2007). O NMDS usa ordens de classificação das espécies associadas a uma distância absoluta sendo uma técnica que pode ser empregada em diferentes tipos de dados (RAMETTE, 2007). Quando utilizado com o algoritmo de Bray-Curtis o NMDS revela a dissimilaridade das amostras (NEUPERT, 2017). Para garantir a confiabilidade dos dados gerados o NMDS calcula o valor de *stress* comparando a dissimilaridade dos dados originais com a dos dados gerados (NEUPERT, 2017).

Alguns exemplos de trabalho como o de Li *et al.* (2012) e Hill *et al.* (2013) identificaram respectivamente a comunidade bacteriana de solos de lavoura e de solos contaminados com zinco através do sequenciamento do gene rDNA 16S. Cada fragmento amplificado foi designado a uma unidade taxonômica operacional (OTU). O índice Chao1 foi utilizado para calcular a riqueza de OTUs na amostra. Os índices de Simpson e Shannon foram utilizados para calcular a biodiversidade (LI *et al.*, 2012a). O estimador de cobertura não paramétrica *Good's Coverage* foi usado para estimar a porcentagem total de espécies sequenciadas em cada amostra, dado corroborado pela produção das curvas de rarefação.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O processo de degradação da lignina ainda não é bem elucidado. Entender quais microrganismos estão envolvidos nessa atividade é fundamental para entender como ela ocorre e viabilizar o uso da lignina para geração de bioprodutos dentro do modelo de biorrefinarias. O enriquecimento de consórcios microbianos para degradar lignina é eficaz para o direcionamento da comunidade para a atividade desejada. Avaliar a diversidade e a dinâmica da comunidade ao longo do processo de enriquecimento é necessário para entender como os consórcios se moldam em face das pressões seletivas, quando a comunidade atinge a estabilidade e quais os grupos podem estar envolvidos na expressão de enzimas que degradam a lignina.

### **4. OBJETIVO GERAL**

Identificar a composição e a dinâmica evolutiva de quatro consórcios microbianos, inoculados com solo *Miracle Growth* e enriquecidos com lignina Kraft ou extraída por método alcalino ao longo de seis ciclos de passagens, avaliando como as variáveis temperatura e substrato atuam na diferenciação de composição de famílias nos diferentes consórcios.

#### **4.1. Objetivos específicos**

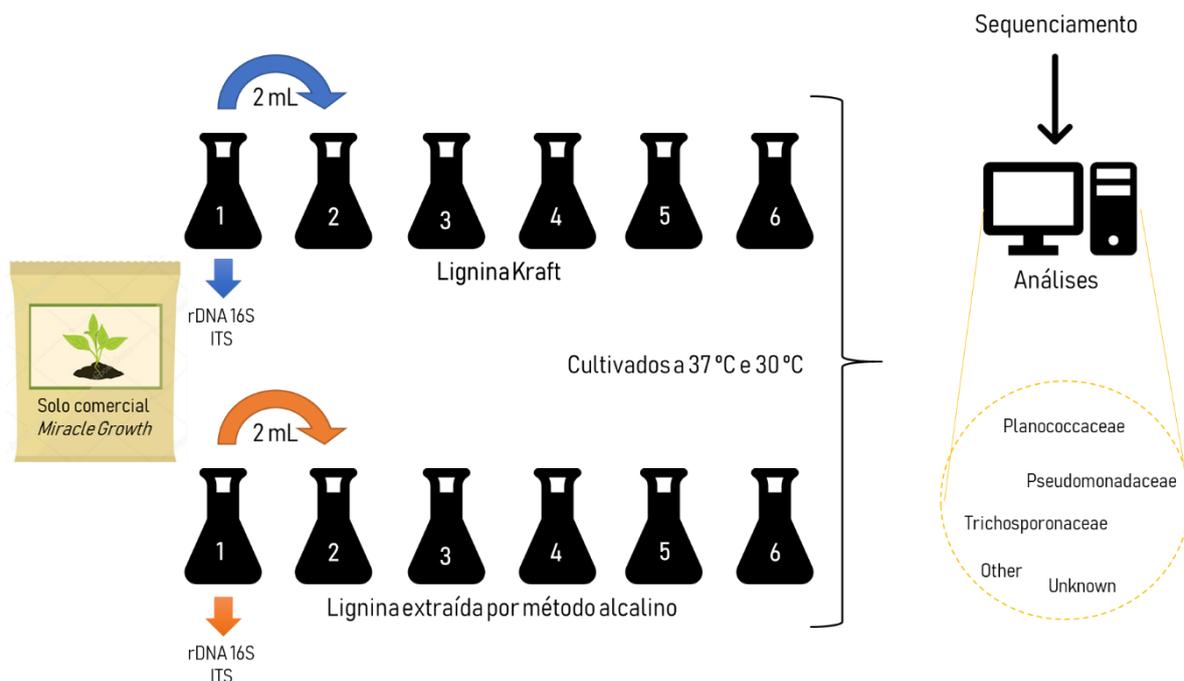
- 4.1.1.** Identificar os grupos taxonômicos presentes nos consórcios microbianos enriquecidos;
- 4.1.2.** Analisar a dinâmica da comunidade;
- 4.1.3.** Identificar como as variáveis temperatura e substrato atuam sobre a diferenciação das comunidades dos consórcios.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram analisadas a diversidade e a dinâmica de quatro consórcios microbianos enriquecidos por meio de cultura usando lignina Kraft ou lignina extraída por método alcalino como fonte de carbono, e cultivados por seis ciclos de duas semanas cada em duas temperaturas, 30 °C e 37 °C, pela Dra. Betania Quirino (2016) no Joint Bioenergy Institute (Emeryville, CA, EUA).

### 5.1. Enriquecimento de consórcios microbianos

Para o enriquecimento e cultivo dos consórcios microbianos inoculados com solo comercial *Miracle Growth* foram empregados dois tipos de substrato: lignina Kraft (Sigma-Aldrich 471003) e lignina extraída por método alcalino da biomassa de gramíneas (Figura 2). Para a lignina extraída por método alcalino foi pesado 12,5g da biomassa adicionada em um boeco com 250 mL de NaOH 0,5M. A solução foi esterilizada por autoclavagem por 30 minutos a 121 °C. Posteriormente, foi adicionado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5M até a solução atingir o pH 7. A solução foi armazenada por 24 horas na geladeira e centrifugada a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um segundo tubo e centrifugado novamente a 18.514 g a 4 °C por 1h. O sobrenadante foi retirado e esterelizado com filtro de poros 0,45 µm. Para o enriquecimento dos consórcios o protocolo utilizado foi adaptado ao previamente descrito por DeAngelis *et al.* (2010). Inicialmente, em quatro *ernlenmeyers* de 200 mL foram adicionados 50 mL de meio mínimo M9 com elementos traços (LOPEZ *et al.*, 2007). Em cada frasco foi inoculado 0,5 g de solo *Miracle Growth*. Em dois meios de cultura foram adicionados 0,5 g/L de lignina Kraft (Sigma-Aldrich 471003). E os outros dois foram suplementados com 10 % (v/v) de lignina extraída por tratamento alcalino. As culturas foram mantidas em condições aeróbicas e crescidas em *shaker* a 200 rpm sendo que duas (uma enriquecida com ligninia Kraft e uma enriquecida com lignina extraída por método alcalino) foram mantidas a uma temperatura de 37 °C e as outras duas culturas (uma enriquecida com ligninia Kraft e uma enriquecida com lignina extraída por método alcalino) a 30 °C. Para o processo de enriquecimento uma alíquota de 2 mL foi transferida a cada duas semanas para um novo meio de cultura. As comunidades foram enriquecidas ao longo de seis passagens, de duas semanas cada, nas mesmas condições. Nos diferentes tempos de cultivo foram coletadas de cada cultura enriquecida 20 mL que posteriormente foram centrifugadas a 20.000 xg por 10 min a 4 °C. O sedimento microbiano obtido foi guardado a -80 °C para posterior extração de DNA segundo o protocolo de DeAngelis *et al.* (2010).



**Figura 2.** Enriquecimento de quatro consórcios microbianos de solo *Miracle Growth* cultivados em meio M9 utilizando lignina Kraft ou extraída por método alcalino como fonte de carbono. A cada passagem foi transferida uma alíquota de 2 mL para um novo meio de cultura. Os consórcios foram enriquecidos por seis ciclos com passagens de duas semanas cada. Em cada passagem do enriquecimento uma alíquota de 20 mL foi retirada de todos os consórcios para posterior extração do eDNA. Para cada passagem o gene ribossomal rDNA16S e ITS foram amplificados e enviados para o sequenciamento. As seqüências obtidas foram analisadas e classificadas, com similaridade de 97 %, em unidades taxonômicas operacionais (OTUs).

## 5.2. Sequenciamento da região ribossomal rDNA 16S e ITS

O DNA extraído foi encaminhado para o sequenciamento segundo as orientações do JGI (Joint Genome Institute, CA, comunicação pessoal) (RIVERS, 2016). Para identificar a comunidade bacteriana, foi realizado o sequenciamento da região 16S rDNA. Para isto, o DNA extraído, foi utilizado como molde em reações de cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região 16S rDNA V4-V5. Foram usados os seguintes *primers* FW (515F): 5'GTG CCA GCM GCC GCG GTAA 3' e RV (805R): 5' GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT 3'(RIVERS, 2016). Para o sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS) para fungos foram usados os *primers* FW (ITS9): 5' GAA CGC AGC RAA IIG YGA 3' e RV (ITS4): 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'(RIVERS, 2016). Os fragmentos amplificados pela PCR foram analisados pelo *Bioanalyzer* para controle de qualidade. Os fragmentos amplificados de rDNA 16S e ITS foram sequenciados na plataforma Miseq (Illumina) por sequenciamento *pair end* (2 x 150 pb) pelo Joint Genome Institute (Walnut Creek, CA, EUA) (RIVERS, 2016).

### 5.3. Análise da diversidade dos consórcios microbianos

Os *amplicons* de rDNA 16S e ITS foram classificadas e agrupadas nas respectivas unidades taxonômicas operacionais (OTUS) as quais pertencem no programa iTagger 2.0 com a ferramenta Usearch com similaridade de 97 % pelo Joint Genome institute (JGI) (TREMBLAY *et al.*, 2015). Os seguintes bancos de dados foram utilizados para realizar as anotações taxonômicas: Silva SSU para rRNA16S e Silva LSU para 18S (QUAST *et al.*, 2012); e UNITE para ITS (KÖLJALG *et al.*, 2013). Os dados obtidos pelo sequenciamento do gene rDNA 16S e do ITS das culturas inoculadas com solo *Miracle Growth* foram submetidos a análises de diversidade. As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram analisadas no software QIIME (Quantitative Insights in Microbial Ecology) (CAPORASO *et al.*, 2010). Para calcular a diversidade alfa das comunidades foram empregados os seguintes scripts: “alpha\_rarefaction.py” com uma amostra de 150.000 OTUs para bactérias e 1.000 OTUs para fungos. Para análise de riqueza e diversidade foram calculadas as seguintes métricas: OTUs observadas, Chao1, Shannon, Simpson, *Good’s coverage* e *PD whole tree*. Para calcular a abundância absoluta de cada comunidade foi empregado o script “summarize\_taxa.py”. No Excel, com os dados dos valores absolutos de cada comunidade foi calculada a abundância relativa. A partir da abundância relativa foram gerados gráficos de barras com as principais famílias bacterianas e fúngicas. Apenas as OTUs bacterianas com abundância relativa acima de 0,05 % foram utilizadas para gerar os gráficos de taxonomia. Para identificar quais gêneros de fungos e bactérias estavam presentes ao final do processo de enriquecimento, na sexta passagem, dos consórcios microbianos com abundância relativa acima de 1 % foi utilizado o diagrama de Venn (HEBERLE *et al.*, 2015). Para analisar a dissimilaridade dos dados nas diferentes passagens das culturas foi empregado o cálculo de dissimilaridade de Bray-Curtis na matriz de escalonamento multidimensional não métrico (non metric multidimensional scaling – NMDS) utilizando os dados das comunidades a nível de gênero para fungos e bactérias (THE R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Diversidade alfa dos consórcios microbianos

Foram obtidos quatro consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina: 1. MG BE 30°C: enriquecido para degradar lignina extraída por método alcalino e cultivado a 30 °C; 2. MG BE 37 °C: enriquecido para degradar lignina extraída por método alcalino e cultivado a 37 °C; 3. MG Kraft 30 °C: enriquecido para degradar lignina Kraft e cultivado a 30 °C; 4. MG Kraft 37 °C: enriquecido para degradar lignina Kraft e cultivado a 37 °C.

Para analisar a diversidade alfa das comunidades bacterianas e fúngicas dos consórcios microbianos inoculados com solo *Miracle Growth* ao longo das seis passagens foram calculadas as seguintes métricas: OTUs observadas, *Goods coverage*, o índice de diversidade filogenética *PD whole tree*, Chao 1 e os índices de diversidade Shannon e Simpson. Para estimar o número de sequências presentes em cada passagem dos consórcios foi calculado o índice *Good's coverage* no programa QIIME (Apêndice A). Para o índice *Good's coverage* os valores de 99 % e 100 % para todas as passagens de todos os consórcios indicam que o número de sequências amostradas foi suficiente para representar a diversidade dos consórcios (Apêndice A).

Os índices de diversidade *PD whole tree*, Simpson e Shannon em conjunto com os dados calculados no índice de riqueza Chao 1 demonstram que a diversidade e a riqueza são maiores no solo original quando comparados à sexta passagem (Tabela 1 e 2). Os dados do sequenciamento do rDNA 16S e ITS do solo original foram utilizados para estimar a diversidade presente antes do processo de enriquecimento dos consórcios para degradar a lignina. O solo original possui a mesma composição bacteriana e fúngica para todos os quatro consórcios microbianos enriquecidos (Figura 5 – 12). Para a comunidade bacteriana e fúngica dos consórcios microbianos, a diversidade é maior no solo original e permanece diminuindo gradualmente até a sexta passagem (Apêndice A e B). A única exceção para esse padrão observado são os dados atípicos da comunidade bacteriana do consórcio MG Kraft 37 °C. Para esse consórcio, MG Kraft 37 °C, a diversidade calculada pelos índices de Shannon e Simpson, diminuiu do solo original até a terceira passagem, mas da quarta passagem em diante a diversidade aumenta resultando em uma diversidade na sexta passagem maior que a diversidade do solo original (Apêndice A – Tabela 11).

**Tabela 1.** Índices de diversidade do solo original do consórcio microbiano do solo *Miracle Growth*.

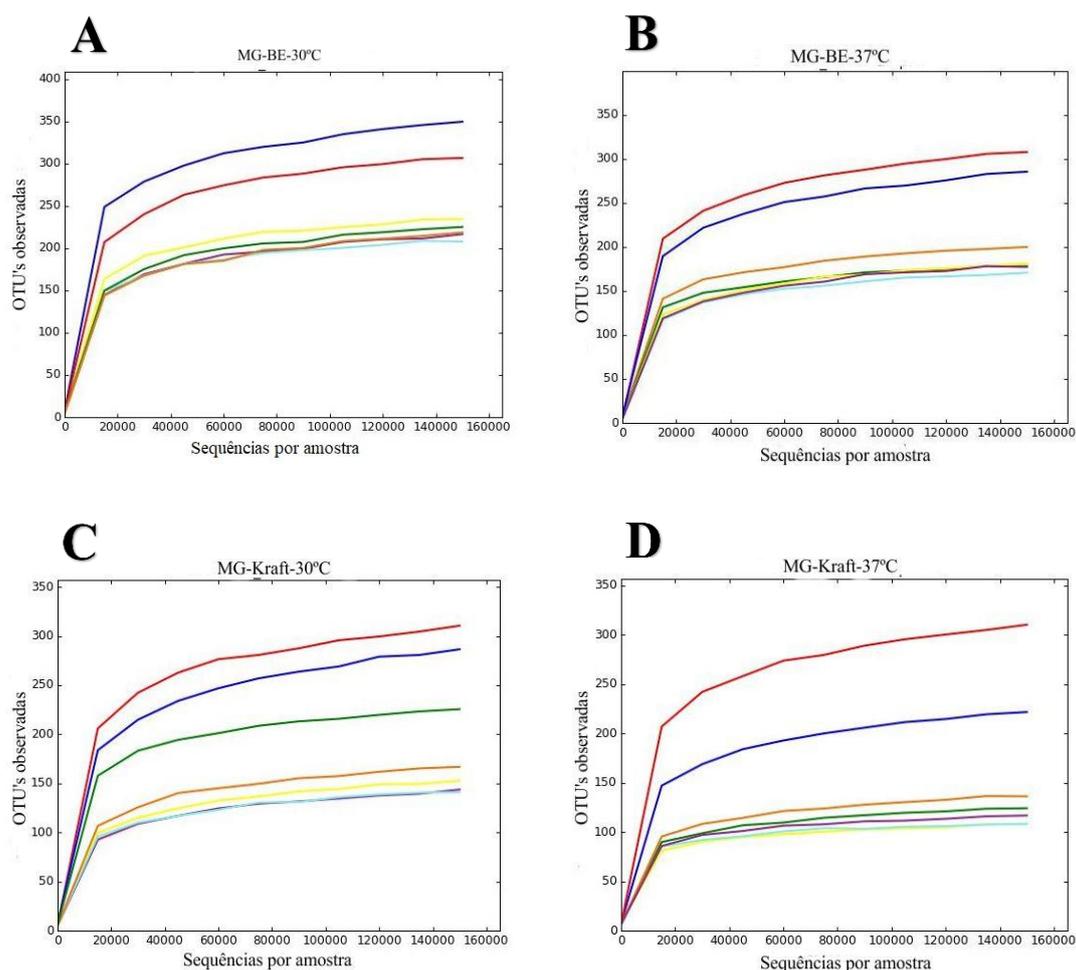
Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
Bactéria	MG BE 30 °C	307	100 %	32,327	346,723	4,091	0,861
	MG BE 37 °C	308	100 %	32,375	340,453	4,093	0,862
	MG Kraft 30 °C	309	100 %	32,568	346,310	4,094	0,862
	MG Kraft 37 °C	309	100 %	32,390	349,022	4,093	0,862
Fungo	MG BE 30 °C	32	99 %	6,425	41,332	3,226	0,801
	MG BE 37 °C	33	99 %	6,354	52,545	3,177	0,796
	MG Kraft 30 °C	34	99 %	6,347	47,603	3,231	0,801
	MG Kraft 37 °C	33	99 %	6,328	43,178	3,232	0,806

**Tabela 2.** Índices de diversidade da sexta passagem do consorcio microbiano do solo *Miracle Growth*.

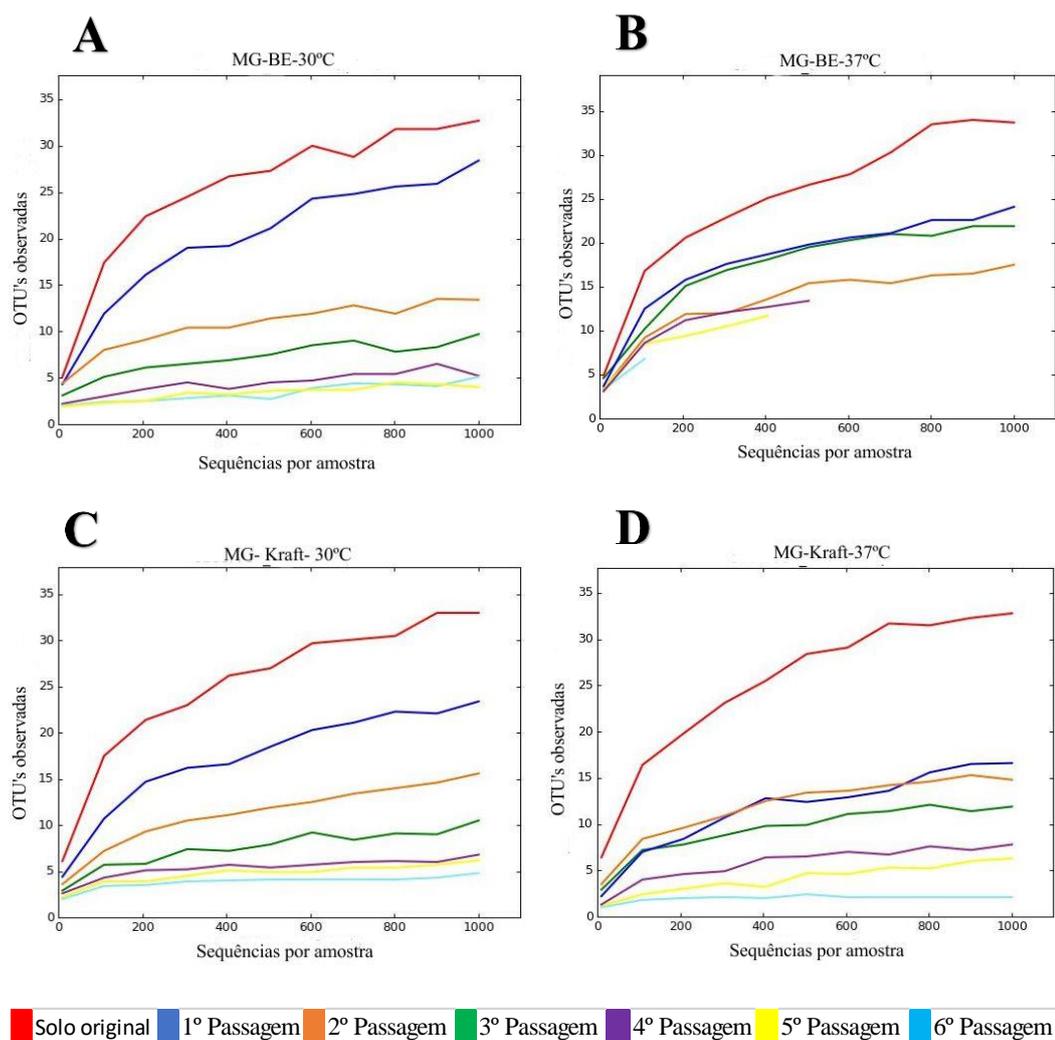
Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
Bactéria	MG BE 30 °C	209	100 %	22,425	227,927	3,467	0,803
	MG BE 37 °C	171	100 %	12,750	158,112	3,428	0,766
	MG Kraft 30 °C	144	100 %	18,653	184,670	2,662	0,682
	MG Kraft 37 °C	107	100 %	10,081	114,618	4,104	0,904
Fungo	MG BE 30 °C	4	100 %	4,113	6,050	0,979	0,466
	MG BE 37 °C	7	100 %	2,529	4,300	0,715	0,249
	MG Kraft 30 °C	4	99 %	2,797	5,000	0,725	0,253
	MG Kraft 37 °C	2	100 %	0,941	2,100	0,131	0,036

Assim como os dados de diversidade, o número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) observadas para fungos e bactérias é maior no solo original (Tabela 1) e são menores ao final do processo de enriquecimento, na sexta passagem (Tabela 2). Para o grupo das bactérias o número de OTUs observadas na sexta passagem é maior nos consórcios cultivados com lignina extraída por método alcalino quando comparado ao número de OTUs bacterianas observadas dos consórcios microbianos cultivados com lignina Kraft, indicando que o processo de enriquecimento com lignina extraída por método alcalino permitiu a existência de um maior número de espécies (Tabela 2).

Os resultados obtidos pelo índice de riqueza calculado são corroborados pelas curvas de rarefação que amostram o número de OTUs encontradas em cada passagem do processo de enriquecimento (Figura 3 e 4). Para analisar o número de OTUs observadas de fungos e bactérias no consórcio do solo *Miracle Growth* foi construída uma curva de rarefação no QIIME, com uma amostragem de 150.000 sequências para bactérias e 1.000 sequências para fungos. No geral o número de OTUs encontradas é maior no solo original e diminui até a sexta passagem (Figura 3 e 4). A exceção para o padrão observado é a amostra da comunidade bacteriana MG BE 30 °C em que a primeira passagem apresenta um número maior de OTUs observadas em relação ao solo original (Figura 3 A) (Apêndice A Tabela 8).



**Figura 3.** Curvas de rarefação para o número de OTUs de bactérias observadas, com uma amostragem de 150.000 sequências, ao longo de seis passagens em experimento de enriquecimento para microrganismos capazes de utilizar lignina. A: Consórcios microbianos nas diferentes passagens (1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>) durante enriquecimento a 30 °C, estabelecidos a partir do solo *Miracle Growth*, usando lignina extraída por método alcalino. B: Consórcios microbianos nas diferentes passagens (1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>) durante enriquecimento a 37 °C, estabelecidos a partir de do solo *Miracle Growth* enriquecidos com lignina extraída por método alcalino. C: Consórcios microbianos nas diferentes passagens (1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>) durante enriquecimento a 30 °C, estabelecidos a partir de do solo *Miracle Growth* enriquecidos com lignina Kraft (Sigma-Aldrich). D: Consórcios microbianos do solo *Miracle Growth* nas diferentes passagens (1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>) durante enriquecimento a 37 °C, estabelecidos a partir de enriquecidos com lignina Kraft (Sigma-Aldrich).



**Figura 4.** Curvas de rarefação para o número de OTUs de fungos observados, com uma amostragem de 1.000 sequências, ao longo de seis passagens em experimento de enriquecimento para microrganismos capazes de utilizar lignina. A: Consórcios microbianos nas diferentes passagens (1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>) durante enriquecimento a 30 °C, estabelecidos a partir do solo *Miracle Growth*, usando lignina extraída por método alcalino. B: Consórcios microbianos nas diferentes passagens (1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>) durante enriquecimento a 37 °C, estabelecidos a partir de do solo *Miracle Growth* enriquecidos com lignina extraída por método alcalino. C: Consórcios microbianos nas diferentes passagens (1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>) durante enriquecimento a 30 °C, estabelecidos a partir de do solo *Miracle Growth* enriquecidos com lignina Kraft (Sigma-Aldrich). D: Consórcios microbianos do solo *Miracle Growth* nas diferentes passagens (1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>) durante enriquecimento a 37 °C, estabelecidos a partir de enriquecidos com lignina Kraft (Sigma-Aldrich).

## 6.2. Afiliação taxonômica a nível de família para os consórcios microbianos

A afiliação taxonômica dos *amplicons* de rDNA 16S e ITS em unidades taxonômicas operacionais (OTUS) foi realizada pelo Joint Genome institute (JGI) utilizando uma similaridade de 97 % entre as sequências (RIVERS, 2016). Com as OTUS obtidas foram realizados gráficos de taxonomia. Os gráficos de taxonomia a nível de família revelam a dinâmica e a composição das comunidades ao longo das seis passagens.

Há diminuição da abundância de OTUS entre o solo original e a primeira passagem, sendo que a riqueza de OTUS permanece diminuindo gradualmente até a sexta passagem (Figura 5 – 12). Apesar da dinâmica evolutiva, as comunidades dos consórcios microbianos tendem a se estabilizar em termos de composição de espécies da quarta passagem até a sexta. Entretanto, os dados de taxonomia a nível de família para o consórcio microbiano enriquecido com lignina extraída por método alcalino e cultivado a 30 °C (MG BE 30 °C) na terceira passagem apresentam uma composição de famílias bacterianas destoante do restante das passagens (Figura 5). Para esse consórcio a família Pseudomonadaceae é a mais abundante na terceira passagem com 41 % de representantes. Todavia, nas demais passagens essa família apresenta uma abundância inferior a 2 %. Em contrapartida, a família Planococcaceae na segunda passagem possui 31 % de abundância, na terceira passagem possui 6 % de abundância e na quarta passagem a abundância volta a aumentar pra cerca de 53 %. O mesmo ocorre com a família Flavobacteriaceae que na segunda passagem possui 34 % de abundância e na terceira passagem a abundância cai para 3 % e volta a subir na quarta passagem para 17 %. A terceira passagem destoante também é encontrada no consórcio enriquecido para degradar lignina Kraft e cultivado a 30 °C (MG Kraft 30 °C) (Figura 7). A família Pseudomonadaceae do filo Proteobacteria na segunda passagem possuía 40 % de abundância relativa e na terceira passagem essa abundância cai par 20 % e volta a atingir 55 % na quarta passagem. Em contrapartida, as famílias Bacillaceae e Planococcaceae na segunda passagem possuem abundância inferior a 0,01 % e na terceira passagem possuem respectivamente abundâncias de 13 % e 20 %. Na quarta passagem essas famílias voltam a ter uma abundância inferior a 0,01 %.

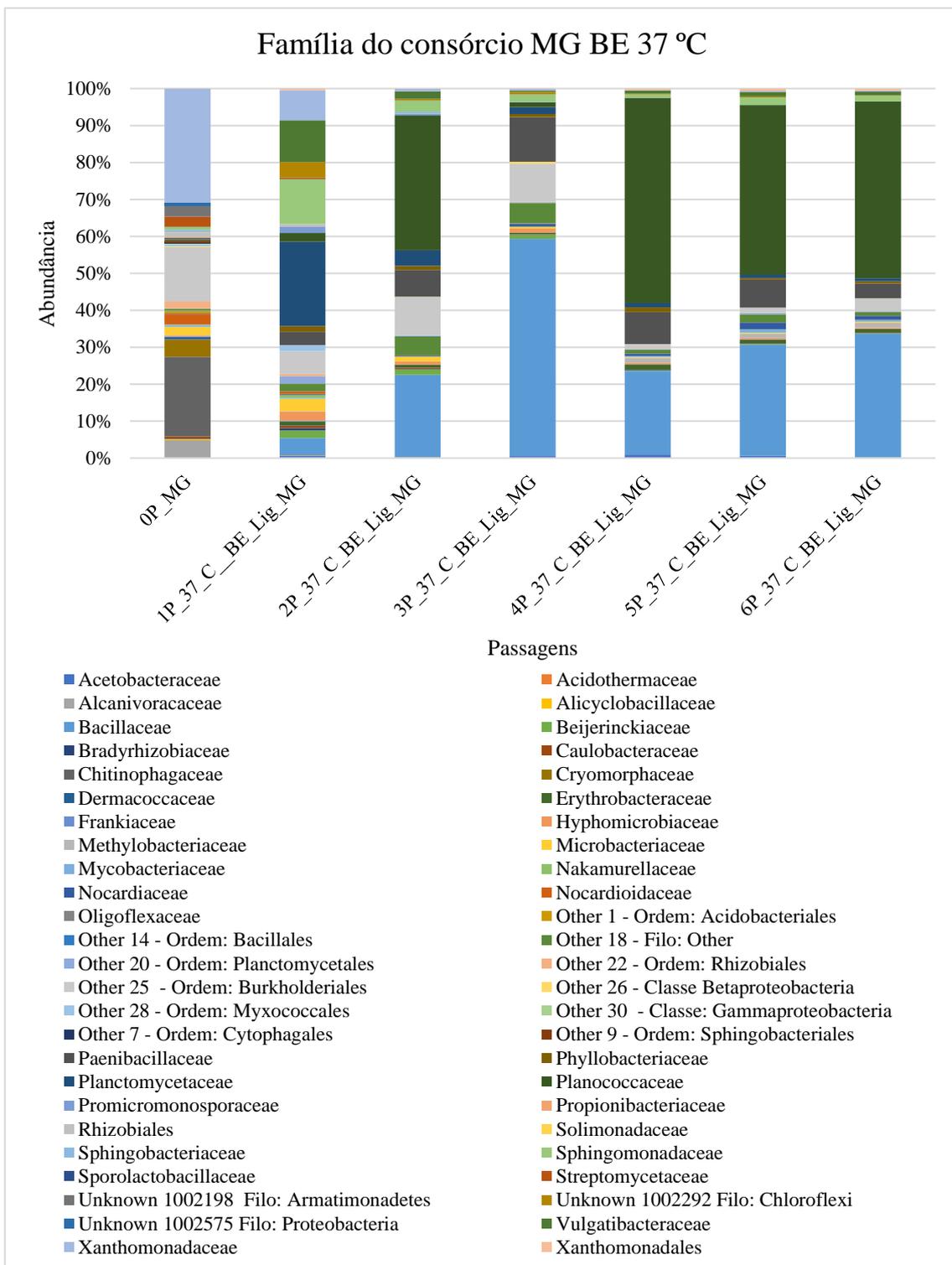
As famílias bacterianas mais abundantes encontradas no solo original do consórcio inoculado com solo *Miracle Growth* foram: Xanthomonadaceae (30 %), Chitinophagaceae (21 %), Cryomorphaceae (5 %), Alcanivoracaceae com (5 %) (Figura 3). Sendo os principais gêneros: *Dyella* (30 %) da família Xanthomonadaceae, *Taibaiella* (17 %), *Crenotalea* (4 %) da família Chitinophagaceae e *Alcanivorax* (5 %) da família Alcanivoracaceae.

As famílias bacterianas mais abundantes na sexta passagem do consórcio MG BE 30 °C (enriquecida com lignina extraída por método alcalino e cultivada a 30 °C) foram: Planococcaceae (37 %), Paenibacillaceae (17 %), Flavobacteriaceae (13 %) e Bacillaceae (8 %) (Figura 5). No consórcio MG BE 37 °C (enriquecido com lignina extraída por

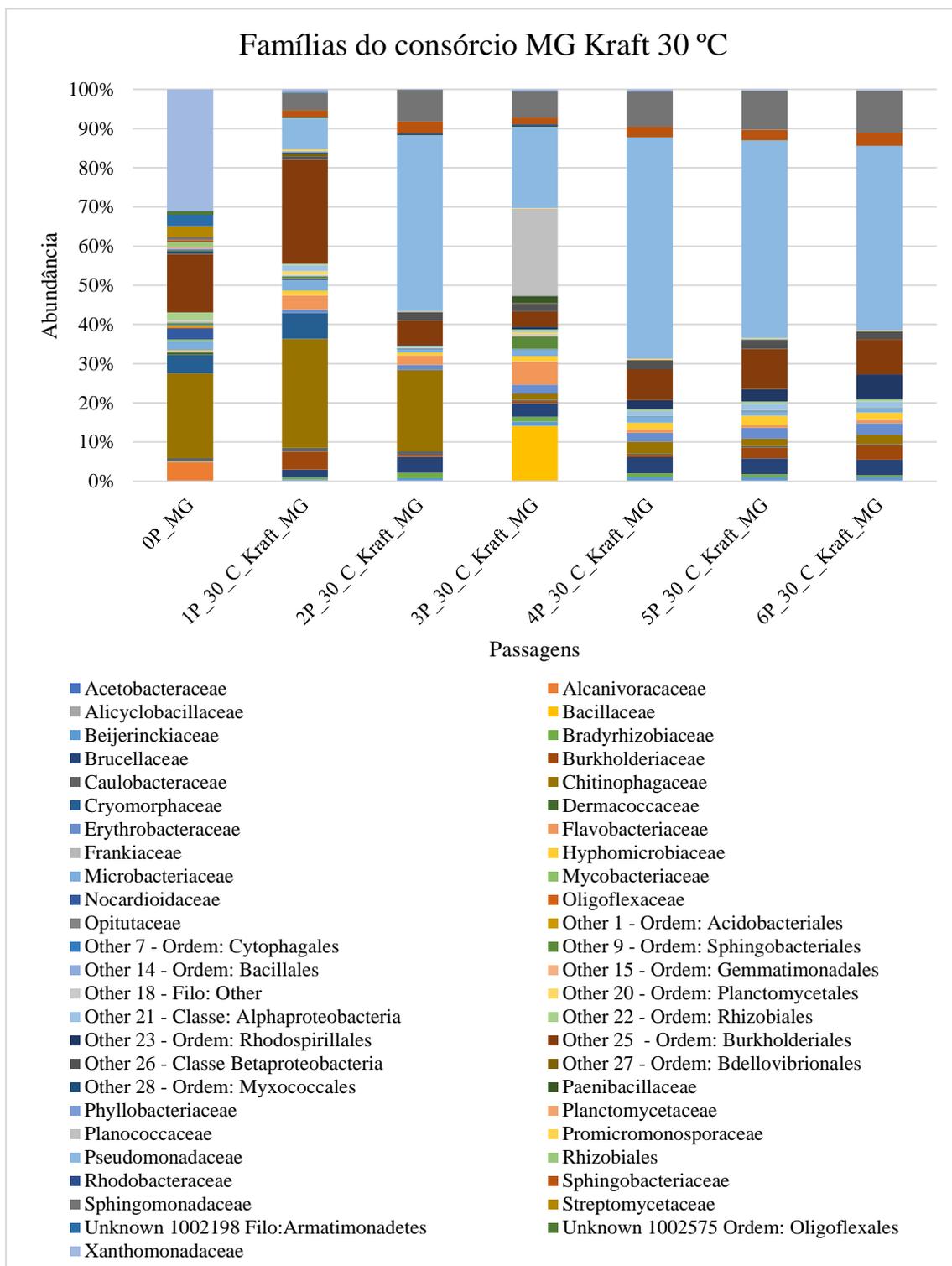
método alcalino e cultivado a 37 °C) as famílias bacterianas mais abundantes na sexta passagem foram: Planococcaceae (46 %), Bacillaceae (32 %) e Paenibacillaceae (4 %) (Figura 6). No consórcio MG Kraft 30 °C (enriquecido com lignina kraft e cultivado a 30 °C) as famílias bacterianas mais abundantes na sexta passagem foram: Pseudomonadaceae (46 %), Sphingomonadaceae (10 %), Brucellaceae (4 %) e Burkholderiaceae (4 %) (Figura 7). No consórcio MG Kraft 37 °C (enriquecido com lignina kraft e cultivado a 37 °C) as famílias mais abundantes na sexta passagem foram: Brucellaceae (17 %), Pseudomonadaceae (11 %), Phyllobacteriaceae (10 %) Microbacteriaceae (6 %), Sphingomonadaceae (5 %), Promicromonosporaceae (5 %) e Erythrobacteraceae (4 %) (Figura 8).

Para o consórcio microbiano MG BE cultivado a 30 °C algumas famílias sem classificação taxômica aparecem com abundância relativa acima de 1 % na sexta passagem: *Other* 9 (3 %) da ordem Sphingobacteriales, *Other* 18 (2 %) que não possui classificação taxonômica nem a nível de filo, *Other* 20 (3 %) da ordem Planctomycetales, *Other* 25 (2 %) da ordem Burkholderiales (Figura 5). Algumas famílias classificadas como *Unknown* 1002198 do filo Armatimonadetes e *Unknown* 1002681 do filo TM6 também estão presentes na sexta passagem desse consórcio, mas em uma abundância relativa abaixo de 1 %. Para o consórcio microbiano MG BE cultivado a 37 °C há uma OTU classificada como *Other* 25 (3 %) da ordem Burkholderiales e uma OTU classificada como *Unknown* 1002292 (0,1 %) da classe Thermomicrobia (Figura 6). Para o consórcio microbiano MG Kraft cultivado a 30 °C algumas famílias sem classificação taxômica aparecem com abundância relativa acima de 1 % na sexta passagem: *Other* 21 (1 %) da classe Alphaproteobacteria, *Other* 23 (6 %) da ordem Rhodospirillales, *Other* 25 (9 %) da ordem Burkholderiales e *Other* 26 (2 %) da classe Betaproteobacteria (Figura 7). Para a sexta passagem do consórcio microbiano MG Kraft cultivado a 37 °C há uma OTU classificada como *Other* 24 (5 %) da ordem Sphingomonadales, *Other* 25 (18 %) da ordem Burkholderiales e uma OTU classificada como *Unknown* 1002159 (0,0015 %) da família Acidimicrobiales (Figura 8).





**Figura 6.** Perfil taxonômico de diferentes bactérias a nível de família presentes nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) realizadas a cada duas semanas, de experimento de enriquecimento de culturas inicialmente inoculadas em meio M9 com substrato *Miracle Growth* (MG) e mantidas a 37 °C, onde lignina obtida por método de extração alcalina (BE Lig) foi usada como fonte de carbono. Para as famílias classificadas em *Other* e *Unknown* não foi possível obter a afiliação taxonômica a nível de família sendo fornecido a classificação taxonômica do nível hierárquico anterior. Caso o nível hierárquico anterior não esteja classificado é fornecida a afiliação taxonômica do nível hierárquico mais próximo.



**Figura 7.** Perfil taxonômico de diferentes bactérias a nível de família presentes nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) realizadas a cada 2 semanas, de experimento de enriquecimento em culturas inicialmente inoculadas em meio M9 com substrato *Miracle Growth* (MG) e mantidas a 30 °C, onde lignina Kraft foi usada como fonte de carbono. Para as famílias classificadas em *Other* e *Unknown* não foi possível obter a afiliação taxonômica a nível de família sendo fornecido a classificação taxonômica do nível hierárquico anterior. Caso o nível hierárquico anterior não esteja classificado é fornecida a afiliação taxonômica do nível hierárquico mais próximo.



Para fungos, o número de famílias encontradas é maior no solo original e vai diminuindo gradualmente até a sexta passagem (Figura 9 - 12). As famílias presentes na comunidade fúngica com abundância relativa acima de 1 % encontradas no solo original do consórcio inoculado com solo *Miracle Growth* foram: Cephalothecaceae (41 %), Trichocomaceae (12 %), Trichomonascaceae (10 %), Hypocreaceae (8 %) e Onygenaceae (6 %) todas do filo Ascomycota (Figura 9 – 12). Os principais gêneros, com abundância relativa acima de 1 %, encontrados no solo antes do processo de enriquecimento foram: *Blastobotrys* (10 %) da família Trichomonascaceae, *Candida* (9 %) da família Cryptococcaceae, *Cephalotheca* (40 %) da família Cephalothecaceae, *Debaryomyces* (2 %) da família Saccharomycetaceae, *Other 12* (3 %) da família Trichocomaceae, *Other 13* (6 %) da família Onygenaceae, *Other 20* (8 %) da classe Leotiomycetes, *Penicillium* (8 %) da família Trichocomaceae e *Trichoderma* (6 %) da família Hypocreaceae. Todos os gêneros acima citados são do filo Ascomycota.

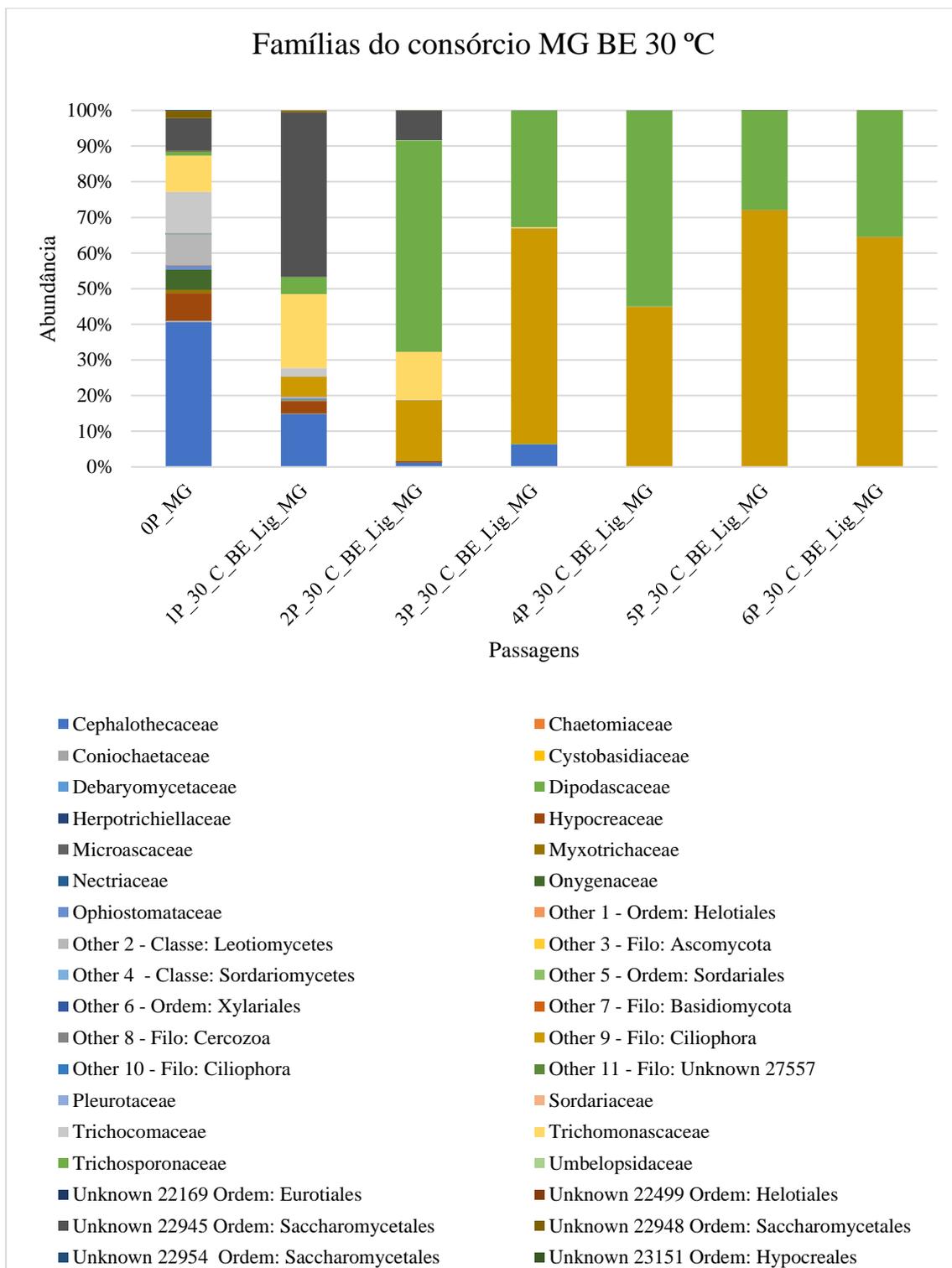
Após o processo de enriquecimento realizado, na sexta passagem, a 30 °C para degradação de lignina extraída por método alcalino, as principais famílias de fungos observadas (consórcio MG BE 30 °C) foram: Trichosporonaceae (34 %) do filo Basidiomycota e um ciliado *Other 9* (64 %) do filo Ciliophora (Figura 9). Para o consórcio MG BE 37 °C (enriquecido com lignina extraída por método alcalino como fonte de carbono e cultivado a 37 °C) as famílias fúngicas mais abundantes na sexta passagem foram: Trichosporonaceae (40 %) do filo Basidiomycota e *Other 10* (45 %) da ordem *Unknown 27795* do filo Ciliophora (Figura 10). No consórcio MG Kraft 30 °C (enriquecido com lignina Kraft como fonte de carbono e cultivado a 30 °C) as principais famílias de fungo na sexta passagem foram: Trichosporonaceae (10 %) do filo Basidiomycota, Cephalothecaceae (86 %) do filo Ascomycota (Figura 11). No consórcio MG Kraft 37 °C (enriquecido com lignina Kraft como fonte de carbono e cultivado a 37 °C) as principais famílias de fungo na sexta passagem foram: Microascaceae (1 %) e Trichocomaceae (98 %) ambos do filo Ascomycota (Figura 12).

Representantes do filo Ciliophora aparecem nos dois consórcios microbianos enriquecidos com lignina extraída por método alcalino (Figura 9 e 10). O consórcio microbiano inoculado com substrato *Miracle Growth* (MG) cultivado a 30 °C e enriquecido com lignina obtida por método de extração alcalina (BE Lig) apresenta uma família *Other 9* do filo Ciliophora em todas as passagens, sendo a família mais abundante na terceira, quinta e sexta passagem desse consórcio (Figura 9). Para o consórcio MG

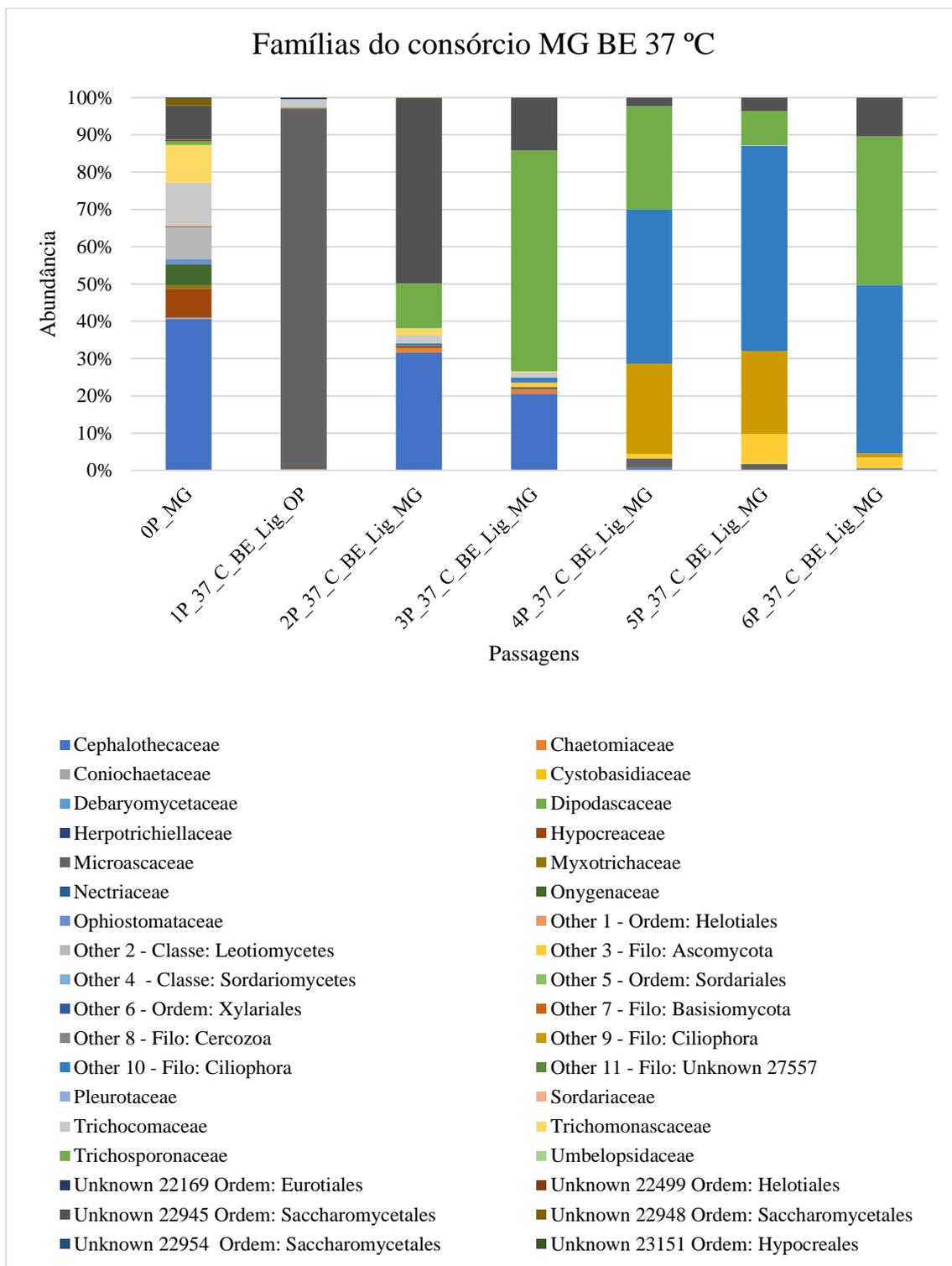
BE 37 °C a família *Other 9* do filo Ciliophora possui uma abundância relativa menor que 1 % até a terceira passagem. Essa família aparece com abundância superior a 20 % na quarta e quinta passagem. Na sexta passagem a abundância relativa dessa família volta a ser de 1 %. A família *Other 10* também está presente no consórcio MG BE 37 °C. A família *Other 10* do filo Ciliophora possui uma abundância relativa menor que 1 % até a terceira passagem. Essa família aparece com abundância superior a 40 % na quarta, quinta e sexta passagem desse consórcio.

Os ciliados também estão presentes nos consórcios enriquecidos com lignina Kraft (Figura 11 e 12). No consórcio MG Kraft 30 °C *Other 9* do filo Ciliophora possui cerca de 60 % de abundância relativa na terceira passagem (Figura 11). Mas nas demais passagens apresenta uma abundância relativa menor que 0,05 %. Para esse consórcio a família *Other 10* do filo Ciliophora é encontrada em todas as passagens, mas com uma abundância relativa menor que 0,05%. Para o consórcio MG Kraft 37 °C representantes do filo Ciliophora aparecem em todas as passagens, mas com uma abundância relativa menor que 0,05 % em todas as passagens (Figura 12).

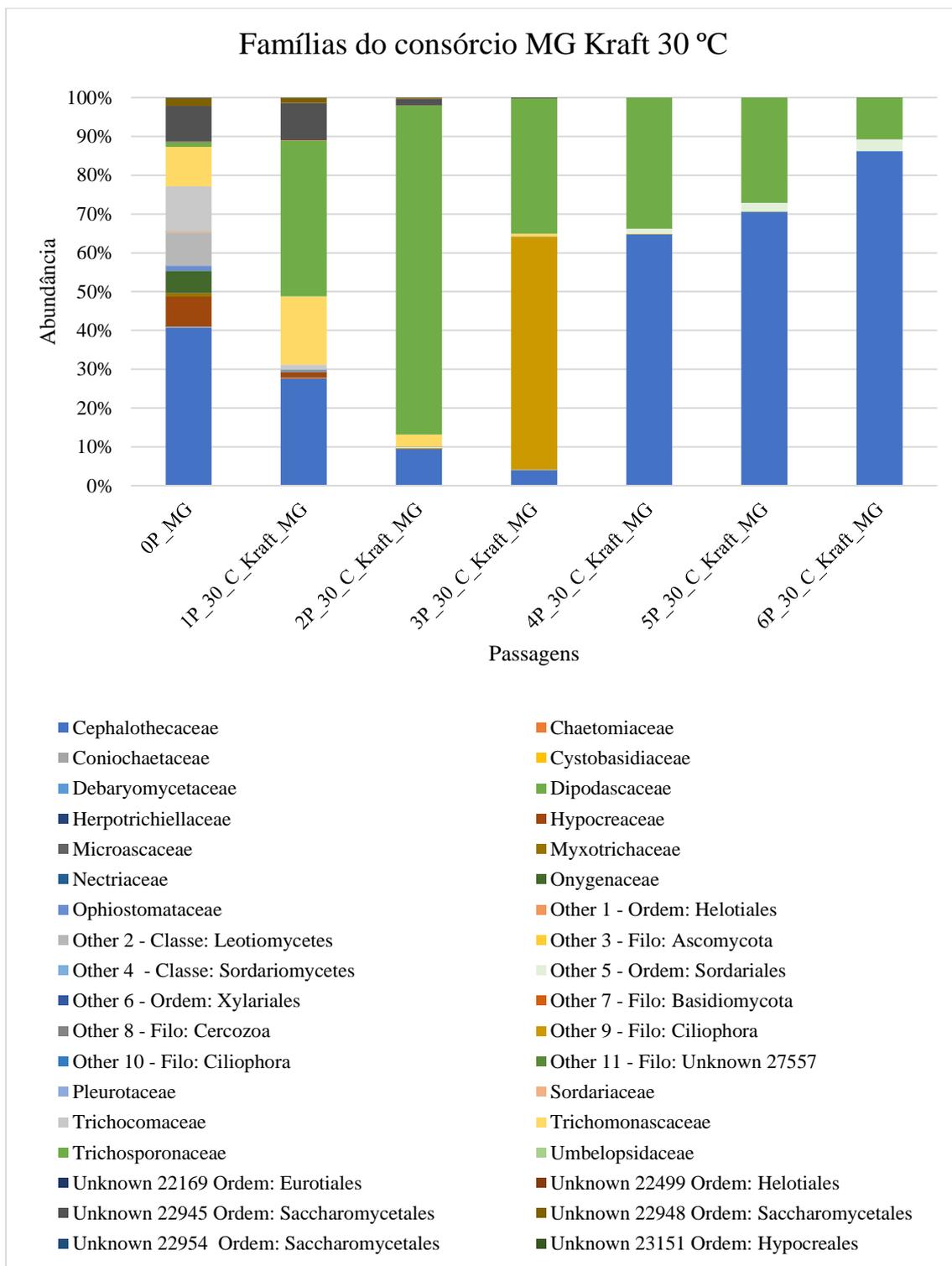
A comunidade de fungos também apresentou OTUS classificadas como *Others* e *Unknowns* (Figura 9 - 12). No consórcio microbiano MG BE 30 °C na sexta passagem há apenas seis famílias sendo que três dessas são classificadas como: *Other 3* (0,013 %) do filo Ascomycota; *Other 9* (64 %) do filo Ciliophora; e *Other 10* (0,012 %) do filo Ciliophora (Figura 9). Na sexta passagem do consórcio microbiano MG BE 37 °C há a presença de uma OTU classificada em *Unknown 22945* da ordem Saccharomycetales (10 %) e outras OTUS classificadas como *Others*: *Other 3* (3 %) do filo Ascomycota; *Other 9* (1 %) do filo Ciliophora; e *Other 10* (45 %) do filo Ciliophora (Figura 10). Na sexta passagem do consórcio microbiano MG Kraft 30 °C há a presença de uma OTU classificada em *Other 5* (3 %) da ordem Sordariales (Figura 11). Na sexta passagem do consórcio microbiano MG Kraft 37 °C há a presença de uma OTU classificada em *Other 3* (0,003 %) do filo Ascomycota e *Other 10* (0,001%) do filo Ciliophora (Figura 12).



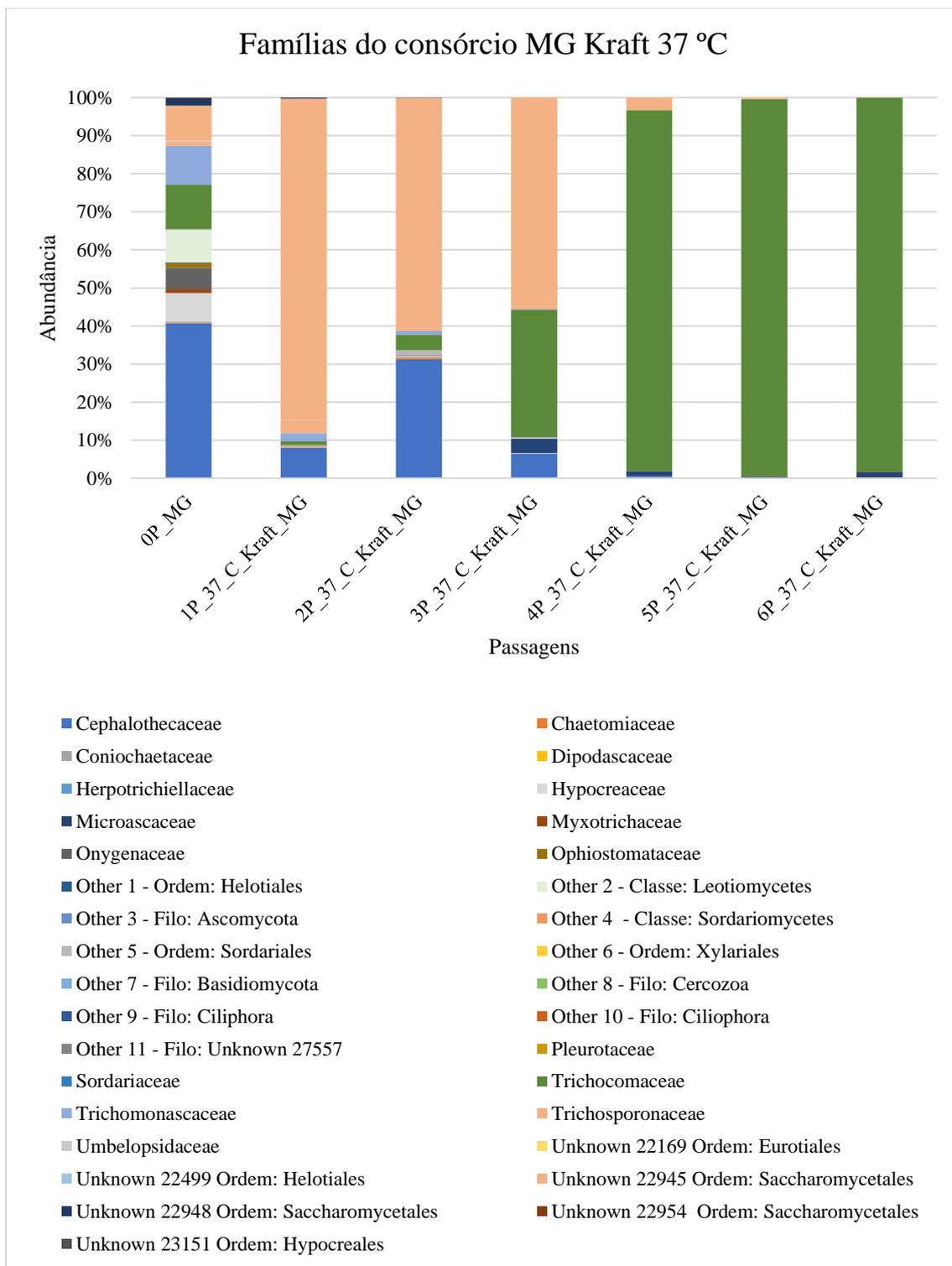
**Figura 9.** Perfil taxonômico de diferentes fungos a nível de família presentes nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) realizadas a cada 2 semanas, de experimento de enriquecimento em culturas inicialmente inoculadas em meio M9 com substrato *Miracle Growth* (MG) e mantidas a 30 °C, onde lignina obtida por método de extração alcalina (BE Lig) foi usada como fonte de carbono. Para as famílias classificadas em *Other* e *Unknown* não foi possível obter a afiliação taxonômica a nível de família sendo fornecido a classificação taxonômica do nível hierárquico anterior. Caso o nível hierárquico anterior não esteja classificado é fornecida a afiliação taxonômica do nível hierárquico mais próximo.



**Figura 10.** Perfil taxonômico de diferentes fungos a nível de família presentes nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) realizadas a cada duas semanas, de experimento de enriquecimento em culturas inicialmente inoculadas em meio M9 com substrato *Miracle Growth* (MG) e mantidas a 37 °C, onde lignina obtida por método de extração alcalina (BE Lig) foi usada como fonte de carbono. Para as famílias classificadas em *Other* e *Unknown* não foi possível obter a afiliação taxonômica a nível de família sendo fornecido a classificação taxonômica do nível hierárquico anterior. Caso o nível hierárquico anterior não esteja classificado é fornecida a afiliação taxonômica do nível hierárquico mais próximo.



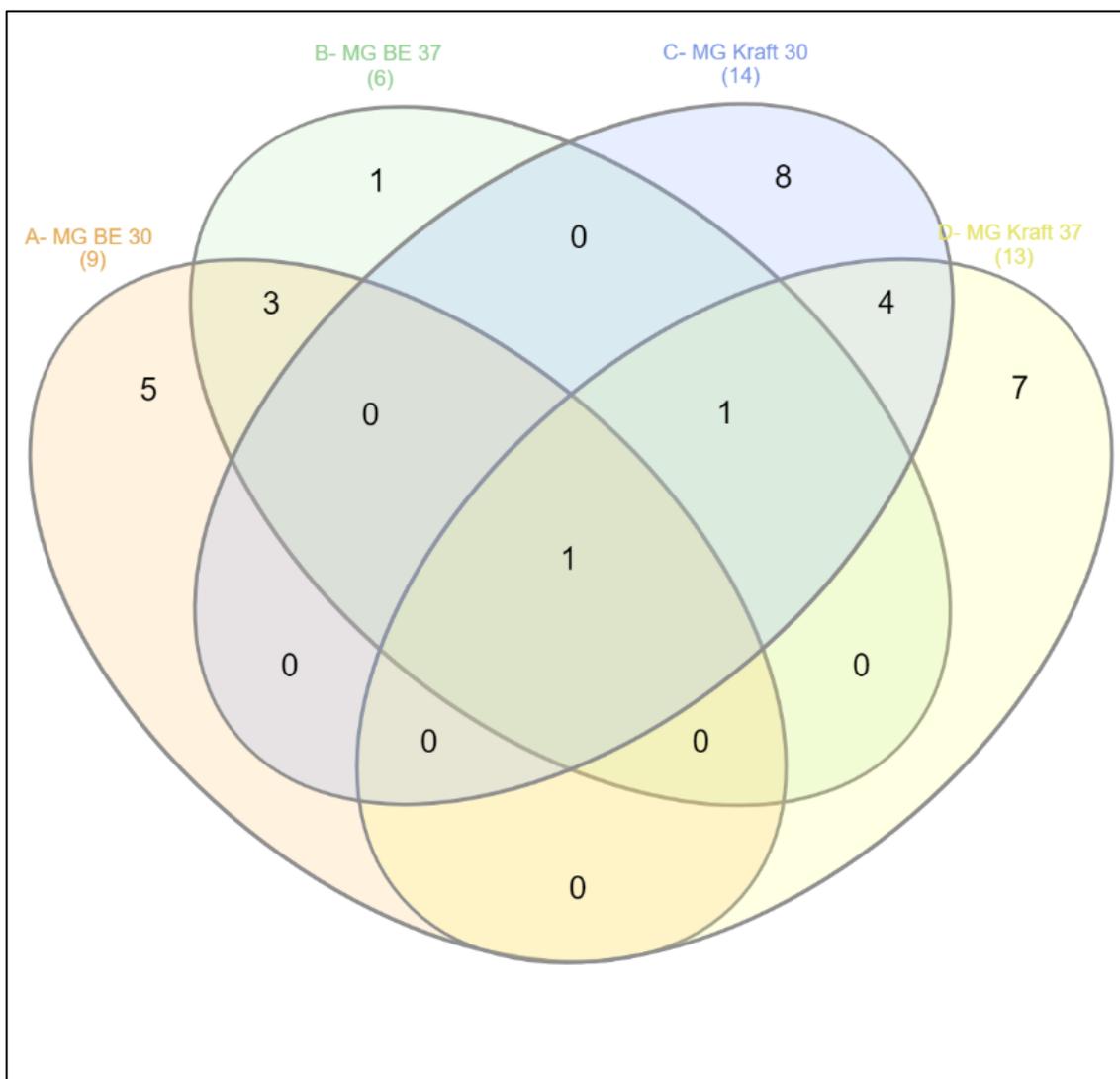
**Figura 11.** Perfil taxonômico de diferentes fungos a nível de família presentes nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) realizadas a cada duas semanas, de experimento de enriquecimento em culturas inicialmente inoculadas em meio M9 com substrato *Miracle Growth* (MG) e mantidas a 30 °C, onde lignina Kraft foi usada como fonte de carbono. Para as famílias classificadas em *Other* e *Unknown* não foi possível obter a afiliação taxonômica a nível de família sendo fornecido a classificação taxonômica do nível hierárquico anterior. Caso o nível hierárquico anterior não esteja classificado é fornecida a afiliação taxonômica do nível hierárquico mais próximo.



**Figura 12.** Perfil taxonômico de diferentes fungos a nível de família presentes nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) realizadas a cada duas semanas, de experimento de enriquecimento em culturas inicialmente inoculadas em meio M9 com substrato *Miracle Growth* (MG) e mantidas a 37 °C, onde lignina Kraft foi usada como fonte de carbono. Para as famílias classificadas em *Other* e *Unknown* não foi possível obter a afiliação taxonômica a nível de família sendo fornecido a classificação taxonômica do nível hierárquico anterior. Caso o nível hierárquico anterior não esteja classificado é fornecida a afiliação taxonômica do nível hierárquico mais próximo.

### 6.3. Gêneros compartilhados entre os consórcios microbianos

Para avaliar quais gêneros de bactérias estariam presentes na sexta passagem nos quatro consórcios microbianos enriquecidos com lignina Kraft e lignina extraída por método alcalino e cultivados a 30 °C ou 37 °C foi realizado o diagrama de Venn com os gêneros que apresentavam abundância relativa acima de 1 % (Figura 13).



**Figura 13** Diagrama de Venn com os gêneros de bactéria que apresentam abundância relativa acima de 1 % na sexta passagem dos consórcios enriquecidos para degradar lignina. Dentro do parêntese aparece o número de gêneros encontrados na sexta passagem em cada consórcio. A – MG BE 30: Consórcio microbiano inoculado com solo *Miracle Growth* enriquecido com lignina extraída por método alcalino e cultivado a 30 °C. B – MG BE 37: Consórcio microbiano inoculado com solo *Miracle Growth* enriquecido com lignina extraída por método alcalino e cultivado a 37 °C. C – MG Kraft 30: Consórcio microbiano inoculado com solo *Miracle Growth* enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 30 °C. D - MG Kraft 37: Consórcio microbiano inoculado com solo *Miracle Growth* enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 37 °C

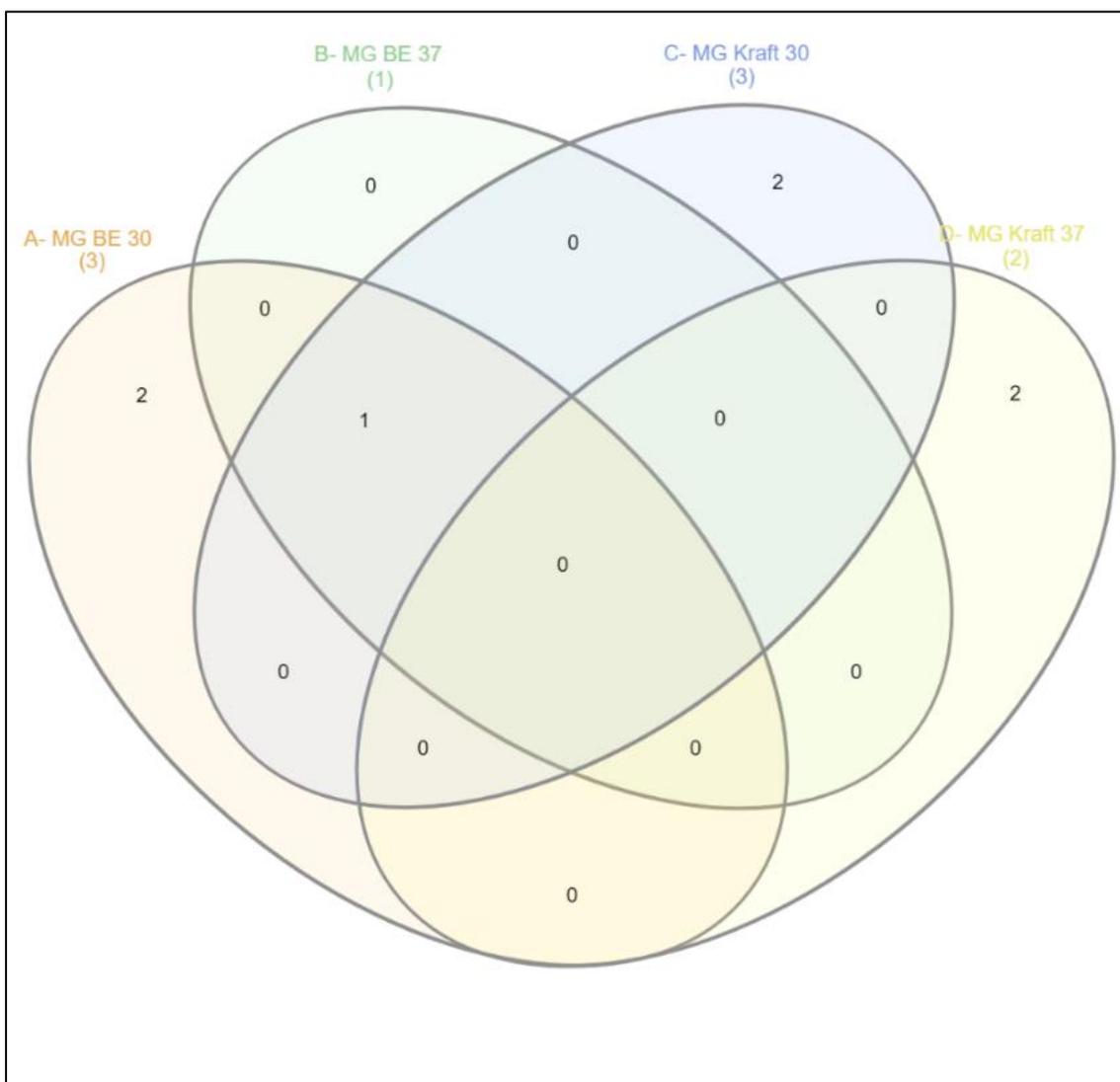
Para o consórcio microbiano MG BE 30 °C os principais gêneros na sexta passagem são: *Bacillus* (9 %), *Lysinibacillus* (37 %), *Other* 38 (13 %) da família Flavobacteriaceae, *Other* 44 (3 %) da ordem Sphingobacteriales, *Other* 86 (2 %) do filo *Other*, *Other* 92 (3 %) da ordem Planctomycetales, *Other* 109 (1 %) da família Rhodobacteraceae, *Other* 120 (2 %) da ordem Burkholderiales e *Paenibacillus* (17 %). Para o consórcio microbiano MG BE 37 °C os principais gêneros na sexta passagem são *Bacillus* (33 %), *Lysinibacillus* (47 %), *Microvirga* (1 %), *Other* 120 (3 %) da ordem Burkholderiales, *Paenibacillus* (2 %) e *Sphingobium* (1 %).

Para o consórcio MG Kraft 30 °C os principais gêneros na sexta passagem são: *Altererythrobacter* (3 %), *Burkholderia* (4 %), *Camelimonas* (1 %), *Devosia* (1 %), *Ochrobactrum* (4 %), *Other* 45 (2 %) de ordem Sphingobacteriales, *Other* 100 (1 %) da classe Alphaproteobacteria, *Other* 111 (6 %) da ordem Rhodospirillales, *Other* 120 (9 %) da ordem Burkholderiales, *Other* 124 (2 %) da classe Betaproteobacteria, *Pseudomonas* (46 %), *Sphingobium* (9%), *Sphingopyxis* (1 %) e *Taibaiella* (2%). Para o consórcio MG Kraft 37 °C os principais gêneros na sexta passagem são: *Altererythrobacter* (5 %), *Aminobacter* (10 %), *Camelimonas* (1 %), *Inquilinus* (1 %), *Isoptericola* (5 %), *Microbacterium* (5 %), *Ochrobactrum* (17 %), *Other* 116 (5 %) da ordem Sphingomonadales, *Other* 117 (3 %) da família Sphingomonadaceae, *Other* 120 (18 %) da ordem Burkholderiales, *Pseudomonas* (11 %), *Roseomonas* (1 %) e *Sphingobium* (2 %).

Os consórcios MG BE 30 °C e MG BE 37 °C compartilham três gêneros entre si: *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus* (Figura 13). Os consórcios MG Kraft 30 °C e MG Kraft 37 °C compartilham quatro gêneros entre si: *Altererythrobacter*, *Camelimonas*, *Ochrobactrum* e *Pseudomonas*. O gênero *Sphingobium* é compartilhado entre os consórcios MG BE 37 °C, MG Kraft 30 °C e MG Kraft 37 °C. Apenas um único gênero é compartilhado pelos quatro consórcios: *Other* 120 da ordem Burkholderiales.

Para avaliar quais gêneros de fungos estariam presentes na sexta passagem nos quatro consórcios microbianos foi realizado o diagrama de Venn com os gêneros que apresentavam abundância relativa acima de 1% (Figura 14). Para o consórcio MG BE 30 °C os gêneros presentes na sexta passagem com abundância relativa acima de 1 % são: *Acremonium* (2 %), *Other* 66 (6 %) do filo Ciliophora e *Trichosporon* (91 %). O gênero *Trichosporon* (99 %) é o único gênero presente na sexta passagem do consórcio MG Kraft

37 °C com abundância relativa acima de 1 %. Para o consórcio MG Kraft 30 °C os gêneros com abundância relativa acima de 1 % na sexta passagem são: *Other* 39 (3 %) da ordem Sordariales, *Phialemonium* (86 %) e *Trichosporon* (10 %). Os gêneros *Aspergillus* (98 %) e *Scedosporium* (2 %) são os únicos fungos presentes na sexta passagem do consórcio microbiano MG Kraft 37 °C. O gênero *Trichosporon* é compartilhado pelos três consórcios: MG BE 30 °C, MG BE 37 °C e MG Kraft 30 °C.

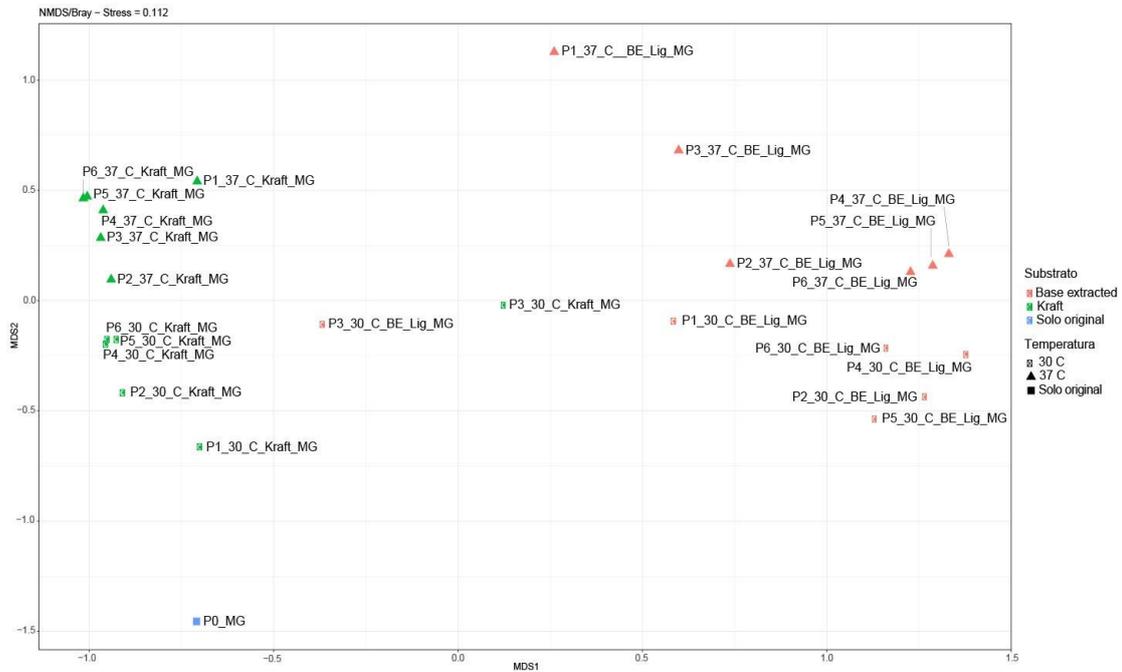


**Figura 14.** Diagrama de Venn com os gêneros de fungos que apresentam abundância relativa acima de 1 % na sexta passagem dos consórcios enriquecidos para degradar lignina. Dentro do parêntese aparece o número de gêneros encontrados na sexta passagem em cada consórcio. A – MG BE 30: Consórcio microbiano inoculado com solo *Miracle Growth* enriquecido com lignina extraída por método alcalino e cultivado a 30 °C. B – MG BE 37: Consórcio microbiano inoculado com solo *Miracle Growth* enriquecido com lignina extraída por método alcalino e cultivado a 37 °C. C – MG Kraft 30: Consórcio microbiano inoculado com solo *Miracle Growth* enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 30 °C. D - MG Kraft 37: Consórcio microbiano inoculado com solo *Miracle Growth* enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 37 °C.

#### 6.4. Análise das variáveis temperatura e substrato

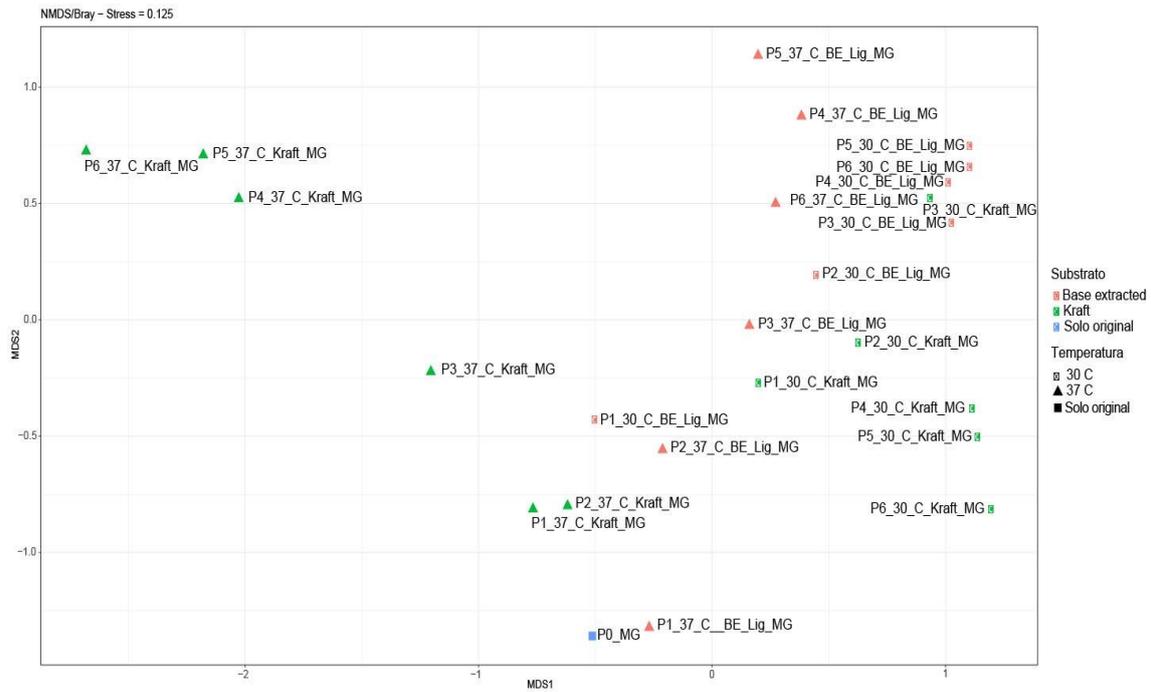
Para avaliar como a temperatura e o substrato (lignina Kraft ou lignina extraída por método alcalino) influenciaram na diferenciação da composição de espécies das comunidades dos consórcios microbianos durante o processo de enriquecimento, foram utilizados dados a nível de gênero para análise de dissimilaridade de Bray-Curtis na matriz de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (Non-Metric Multidimensional Scaling - NMDS).

Para o NMDS da comunidade bacteriana o valor do *stress* 0,112 indica que os dados possuem uma boa representação contribuindo para a confiabilidade dos resultados (Figura 15). Os dados do solo original (P0\_MG) que aparecem na parte inferior do gráfico, são os mais dissimilares de todo o restante. Para a comunidade bacteriana, a fonte de carbono utilizada durante o processo de enriquecimento, lignina Kraft ou lignina extraída por método alcalino separou as passagens dos consórcios, indicando maior dissimilaridade entre amostras enriquecidas com diferentes tipos de lignina (Figura 15). As passagens dos consórcios enriquecidas para degradar lignina alcalina está agrupada no lado direito do gráfico, enquanto as passagens dos consórcios enriquecidos para degradar a lignina Kraft está agrupada do lado esquerdo do gráfico (Figura 15). Apesar do tipo de substrato utilizado no experimento de enriquecimento para degradar lignina, a terceira passagem dos consórcios microbianos enriquecidos com lignina Kraft e lignina extraída por método alcalino, cultivados a 30 °C estão próximas no gráfico indicando certa similaridade entre a composição de espécies. Por sua vez, a variável temperatura implica certas diferenciações entre os grupos de bactérias, sendo que as passagens mantidas a 37 °C se agruparam na parte superior do gráfico, enquanto que as passagens mantidas a 30 °C se agruparam na parte inferior do gráfico. Todavia, essa variável não aparenta uma influência tão forte com a composição dos consórcios quanto a variável substrato.



**Figura 15.** Dissimilaridade de Bray-Curtis na matriz de escalonamento multidimensional não métrica (NMDS) para avaliar diferenças devido às variáveis substrato e temperatura entre as composições das comunidades bacterianas a nível de gênero. Foram analisadas a composição das seis passagens dos quatro consórcios microbianos inoculados em meio M9 com solo *Miracle Growth*. As siglas no gráfico são referentes à: 1. “P1” a “P6” as seis passagens; 2. “PO MG” é o solo original; 3. “30 BE MG” consórcio microbiano enriquecido com lignina alcalina e cultivo a 30 °C; 4. “37 BE MG” consórcio microbiano enriquecido com lignina extraída por método alcalino e cultivado a 37 °C; 5. “30 Kraft MG” consórcio microbiano enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 30 °C; 6. “37 Kraft MG” consórcio microbiano enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 37 °C. \*Stress <0,05 excelente, <0,1 ótimo, <0,2 bom / ok e <0,3 ruim.

Para o NMDS da comunidade fúngica o valor do *stress* 0,125 indica que os dados possuem uma boa representação contribuindo para a confiabilidade dos resultados. O dado do solo original (PO\_MG) é similar apenas a primeira passagem do consórcio enriquecido para degradar lignina extraída por método alcalino, mas dissimilar de todo o restante. Para o grupo dos fungos, tanto a variável temperatura quanto a variável substrato, leva a diferenciações mais amenas entre a composição de gêneros dos diferentes consórcios (Figura 16). O substrato faz com que dois grupos distintos sejam formados. Todavia, dentro desses grupos a temperatura não aparenta ocasionar tanta diferenciação. Os dados da quarta, quinta e sexta passagem do consórcio microbiano enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 37 °C agrupam entre si sendo dissimilares de todo o restante.



**Figura 16.** Dissimilaridade de Bray-Curtis na matriz de escalonamento multidimensional não métrica (NMDS) para avaliar diferenças devido às variáveis substrato e temperatura entre as composições das comunidades fúngicas a nível de gênero. Foram analisadas a composição das seis passagens dos quatro consórcios microbianos inoculados em meio M9 com solo *Miracle Growth*. As siglas no gráfico são referentes à: 1. “P1” a “P6” as seis passagens; 2. “PO MG” é o solo original; 3. “30 BE MG” consórcio microbiano enriquecido com lignina alcalina e cultivo a 30 °C; 4. “37 BE MG” consórcio microbiano enriquecido com lignina extraída por método alcalino e cultivado a 37 °C; 5. “30 Kraft MG” consórcio microbiano enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 30 °C; 6. “37 Kraft MG” consórcio microbiano enriquecido com lignina Kraft e cultivado a 37 °C. \*Stress <0,05 excelente, <0,1 ótimo, <0,2 bom / ok e <0,3 ruim.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Análise da diversidade dos consórcios microbianos

Nesse estudo quatro consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina foram obtidos. De acordo com estudos prévios, a utilização de consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina foi avaliada como uma abordagem promissora para identificar microrganismo que estariam envolvidos da degradação e conversão da lignina (CARLOS; FAN; CURRIE, 2018; MORAES *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2015).

Análises comparativas entre as diferentes passagens dos consórcios pelos dados obtidos pelos índices de riqueza Chao 1 e de diversidade *PD Whole tree*, Shannon e Simpson, bem como o número de OTUS observadas, permitiu analisar as mudanças sofridas pelas comunidades bacterianas e fúngicas ao longo do processo de enriquecimento para degradar lignina. Os dados obtidos nesse trabalho foram comparados com as poucas informações existentes na literatura a respeito de degradação biológica da lignina em consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina (FANG *et al.*, 2018; JIMÉNEZ *et al.*, 2016; MORAES *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2015).

A diminuição da diversidade encontrada nos consórcios ao longo do processo de enriquecimento é similar ao observado por Yu *et al.* (2015) durante o enriquecimento de um consórcio microbiano para degradar lignina. Resultados similares da diminuição da diversidade também foram observados por Moraes *et al.* (2018) ao enriquecer um consórcio microbiano (LigMet) de solo de plantação de cana-de-açúcar com lignina como única fonte de carbono por 50 semanas. Para o estudo de Moraes *et al.* (2018) a diversidade do solo original, calculada pelos índices de Shannon e Simpson, foi respectivamente de 6,3 e 0,99, enquanto para o consórcio enriquecido LigMet foi de 3,4 para o índice de Shannon e 0,63 para o índice de Simpson.

Para o presente trabalho, é possível notar, que durante o processo de enriquecimento dos consórcios microbianos com lignina como única fonte de carbono, alguns fungos e bactérias se tornaram dominantes ao final da sexta passagem em detrimento de outros. Esse fato pode ser explicado como resultado do processo de enriquecimento para degradação de lignina que seleciona microrganismos com um maquinário enzimático para degradar a lignina e utilizá-la como fonte de carbono, além de resistir à toxicidade dos compostos liberados no meio (MORAES *et al.*, 2018). Em outros termos, a diminuição da diversidade observada ocorre pelo fato de o

enriquecimento com lignina como única fonte de carbono levar a comunidade dos consórcios microbianos a convergir em termos de atividade funcional.

O padrão da dinâmica da comunidade bacteriana esperado durante um processo de enriquecimento envolve a diminuição da diversidade do solo original para a primeira passagem. As únicas exceções observadas para o padrão de diminuição da diversidade ao longo das passagens são os dados da comunidade bacteriana dos consórcios de MG Kraft 37 °C e MG BE 30 °C.

Para a comunidade bacteriana do consórcio MG Kraft 37 °C, apesar do número de OTUS observadas diminuir até a sexta passagem, os índices de diversidade Shannon e Simpson calculados para esse consórcio revelaram que a diversidade bacteriana na sexta passagem é maior que a diversidade do solo original. Pequenas oscilações nos valores dos índices de diversidade podem acontecer uma vez que esses são calculados a partir do número de proporção de espécies (ou OTUS) dando pesos diferentes para cada espécie amostrada. Para garantir a confiabilidade dos resultados gerados diversos índices de diversidade e riqueza são calculados para comparar os valores obtidos entre si. Para a comunidade bacteriana da amostra MG Kraft 37 °C apesar do índice de Shannon e Simpson serem maiores na sexta passagem quando comparados ao solo original, os índices de Chao 1 e *PD Whole Tree* indicam que a riqueza e a diversidade para essa amostra são menores na sexta passagem quando comparados ao solo original. O número de OTUS observadas também diminuiu como o esperado.

Analisando as curvas de rarefação da comunidade bacteriana do consórcio MG BE 30 °C, o número de OTUS observadas é maior na primeira passagem quando comparado ao solo original. O índice de riqueza Chao1 e os índices de diversidade de Shannon e Simpson também indicam que a riqueza e a diversidade são maiores na primeira passagem quando comparadas ao solo original. Para ambos os casos descritos nos consórcios MG BE 30 °C e MG Kraft 37 °C é necessário lembrar que os consórcios microbianos são compostos por microrganismo vivos que interagem de modo intraespecífico e interespecífico, dessa maneira, a dinâmica da comunidade tende a ser alterada constantemente, sendo esperada pequenas oscilações nos valores encontrados para os índices de diversidade e riqueza.

Ainda para a comunidade bacteriana, ao final do processo de enriquecimento, os consórcios microbianos enriquecidos com lignina extraída por método alcalino

apresentam maior número de OTUS observadas, maior índice de PD *whole tree* e maior índice de riqueza Chao 1 quando comparada a sexta passagem dos consórcios enriquecidos com lignina Kraft. Assim, como será discutido posteriormente, a lignina extraída por método alcalino a partir de uma biomassa vegetal pode apresentar contaminação com outros carboidratos, que atuam como fonte de carbono alternativa. Fontes de carbono alternativas podem contribuir para a presença de espécies que não utilizam a lignina no meio como fonte de carbono exclusiva. Em contrapartida, a lignina Kraft possui um alto grau de pureza, assegurando que os microrganismos presentes nos consórcios inoculados com lignina Kraft estejam utilizando a lignina Kraft como fonte de carbono

## **7.2. Análise da taxonomia dos consórcios microbianos**

Assim como sugerido por Lambais *et al.* (2005) as sequências obtidas a partir do sequenciamento da região ribossomal 16S de bactérias e ITS de fungos devem ser classificadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Esse procedimento é requerido dado a dificuldade em catalogar e identificar o número de espécies de cada táxon utilizando apenas dados de sequenciamento (LAMBALIS *et al.*, 2005). No presente trabalho, os dados obtidos a partir do sequenciamento foram analisados até o nível de gênero, não sendo possível realizar a afiliação taxonômica a nível de espécie. É necessário recordar que as análises da composição da comunidade dos consórcios microbianos baseadas na amplificação e sequenciamento do rDNA 16S e ITS são completamente dependentes das sequências já depositadas em bancos de dados (IRANNIA; CHEN, 2016).

Os gráficos de taxonomia a nível de família revelam a dinâmica e a composição das comunidades ao longo das seis passagens. Para bactérias e fungos, apesar da dinâmica evolutiva, a comunidade tende a estabilizar em termos de composição de famílias da quarta passagem até a sexta. Resultado semelhante foi obtido por Yu *et al.* (2015) nos estudos de enriquecimento de consórcio microbiano para degradar lignina onde o consórcio atingiu a estabilidade a nível de filo da terceira passagem adiante. Os dados do âmbito desse trabalho quando comparados aos obtidos por Yu *et al.* (2015) mostram a possibilidade de análises taxonômicas em diferentes níveis hierárquicos indicarem que a comunidade microbiana dos consórcios atinge a estabilidade em termos de composição de microrganismos em diferentes tempos de cultivo.

Assim como os índices de diversidade apontam, as análises taxonômicas também corroboram o fato do solo original ser o mais diverso, enquanto a diversidade diminui gradualmente até a sexta passagem. Para a comunidade bacteriana e fúngica as análises taxonômicas ainda revelam as diferentes famílias presentes nos diferentes consórcios. No ambiente natural, como o solo, diferentes variáveis como pH, temperatura, matéria orgânica (fonte de carbono) e umidade desempenham uma pressão seletiva sobre a comunidade microbiana (BATISTA, 2007). O mesmo ocorre no processo de enriquecimento de consórcios microbianos, os diferentes substratos, tempo de cultivo e temperaturas utilizados modulam a comunidade favorecendo a seleção de determinados grupos microbianos (CARLOS; FAN; CURRIE, 2018).

### **7.2.1. Análise taxonômica dos consórcios bacterianos**

Ao observar as comunidades bacterianas dos consórcios é possível notar que cada consórcio tende a adquirir uma composição própria de famílias bacterianas. A divergência na composição das famílias entre os consórcios indica que as variáveis utilizadas durante o processo de enriquecimento, temperatura e substrato, foram fortes o suficiente para alterar a composição de bactérias iniciais dos consórcios. Ao final do processo de enriquecimento esperava-se que as bactérias presentes na sexta passagem dos consórcios microbianos sejam capazes de degradar a lignina e/ou utilizar os compostos fenólicos e não fenólicos liberados como fonte de carbono.

Para todos os consórcios microbianos as famílias presentes no solo original, o solo *Miracle Growth* antes do processo de enriquecimento, são inexistentes ou possuem abundância relativa menor que 1 % na sexta passagem dos consórcios microbianos indicando uma provável dificuldade em consumir a lignina como fonte de carbono. Por sua vez, todas as famílias bacterianas abundantes na sexta passagem dos consórcios bacterianos são virtualmente inexistentes no solo original com uma abundância relativa inferior a 0,5 %. O fato dessas famílias se tornarem abundantes ao longo do processo de enriquecimento contribui para indicar que o enriquecimento para degradar a lignina é capaz de convergir a comunidade dos consórcios microbianos para a presença de famílias com representantes que atuam na degradação da lignina e a utilizam como fonte de carbono.

Os resultados indicam que o tipo de lignina utilizada como fonte de carbono no experimento de enriquecimento, Kraft ou extraída por método alcalino, favoreceram

grupos distintos de bactérias. A lignina Kraft favoreceu representantes do filo das Proteobacterias, enquanto as comunidades enriquecidas com lignina extraída por método alcalino possuem representantes do filo Firmicutes na sexta passagem. A lignina Kraft é uma lignina comercializada pela Sigma-Aldrich e possui alto grau de pureza. Já a lignina extraída por método alcalino pode apresentar contaminantes de outras fontes de carboidrato. Como será discutido adiante representantes do filo Firmicutes podem requerer fontes alternativas de carbono para degradar a lignina.

Os filios Bacteroidetes e Actinobacteria também foram identificados em consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina (CARLOS; FAN; CURRIE, 2018; MORAES *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2015). Mas para o presente trabalho apenas um representante do filo Actinobacteria possui abundância relativa superior a 1 % na sexta passagem dos consórcios inoculados com lignina Kraft: Microbacteriaceae. A família Microbacteriaceae também está presente no consórcio Lig Met enriquecido com lignina Kraft desenvolvido por Moraes *et al.* (2018). A família Flavobacteriaceae (13 %) e Sphingobacteriaceae (3 %) ambas do filo Bacteroidetes possuem abundância relativa superior a 1 % na sexta passagem dos respectivos consórcios MG BE 30 °C e MG Kraft 30 °C.

Estudos apontam que muitos dos gêneros e famílias identificadas no âmbito desse trabalho já foram identificados pela sua atividade ligninolítica. No consórcio Lig Met enriquecido por Moraes *et al.* (2018) com lignina Kraft isolada do licor negro da indústria de polpa foi possível identificar as classes Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e membros dos filios Actinobacteria e Firmicutes. Representantes do filo Proteobacteria foram os mais abundantes no consórcio cultivado com lignina Kraft. Semelhante ao resultado encontrado no âmbito desse trabalho. Entre os principais gêneros encontrados está o gênero *Paenibacillus* do filo Firmicutes. No presente trabalho o gênero *Paenibacillus* é um dos mais abundantes na sexta passagem dos consórcios enriquecidos com lignina extraída por método alcalino, mas possui abundância relativa inferior a 0,5 % na sexta passagem dos consórcios enriquecidos com lignina Kraft.

Bactérias das classes Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacilli, Planococaceae foram encontradas nesse trabalho, sendo que essas classes são frequentemente estudadas por apresentar espécies com capacidade em degradar a lignina e seus compostos aromáticos (MORAES *et al.*, 2018). Alguns

gêneros dessas classes foram reportados como bactérias ligninolíticas, sendo eles: *Ochractrum*, *Rhizobiales*, *Sphingobium*, *Lysinibacillus* e *Bacillus* (CHANTARASIRI; BOONTANOM; NUIPLOT, 2017; MORAES *et al.*, 2018). O gênero *Aminobacter* está presente no consórcio microbiano MG Kraft 37 °C na sexta passagem. Apesar de não terem sido achados estudos utilizando consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina que tenham identificado espécies do gênero *Aminobacter* o sequenciamento do genoma desse gênero indica a presença da enzima ligninolítica, a lacase (NIELSEN *et al.*, 2018). Esse representante pode estar atuando na degradação da lignina indicando a necessidade de maiores caracterizações das atividades realizadas por bactérias desse gênero.

Bactérias de compostagem e solo do filo Proteobacteria identificadas como *Azotobacter*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas putida* e do filo Firmicutes *Bacillus megatarium* são capazes de degradar lignina Kraft (RAJ *et al.*, 2007). Duas cepas, C6 de *Bacillus pumilus* e a B7 de *Bacillus atrophaeus* também possuem atividade de lacase (HUANG *et al.*, 2013). Através de um ensaio utilizando luz UV para detectar a degradação da lignina, amostras de palha de trigo foram analisadas identificando duas espécies não caracterizadas com atividade de degradar lignina kraft: uma da ordem Rhizobiales e outra do gênero *Sphingobacterium* (TAYLOR *et al.*, 2012).

Para as OTUS classificadas como *Other* ou *Unknown* não foi possível atribuir a sequência a um táxon (IRANNIA; CHEN, 2016). Esse resultado pode ser decorrente da falta de sequências nos bancos de dados para comparar os resultados obtidos ou pode indicar que para essas OTUS o sequenciamento apresenta erros não sendo possível encontrar sequências homólogas nos bancos de dados. De qualquer maneira as OTUS classificadas em *Other* e *Unknown* não devem ser desconsideradas quanto a potencial atividade ligninolítica, uma vez descartada a possibilidade de erro no sequenciamento, através das análises dos eletroferogramas das sequências, elas podem representar grupos ainda não classificados.

A OTU a nível de gênero *Other* 120 da ordem Burkholderiales apareceu em todos os consórcios microbianos tendo a maior abundância no consórcio enriquecido para degradar lignina Kraft e cultivado a 37 °C. Apesar da falta de classificação taxonômica a nível de gênero essa OTU não deve ter a sua atividade ligninolítica desconsiderada uma vez que espécies dessa ordem já foram descritas na literatura atuando na degradação da

lignina. Um exemplo disso é a espécie *Burkholderia* sp. cepa CCA53 da ordem Burkholderiales foi identificada com base no sequenciamento do gene rDNA 16S e análises em meio de cultivo com monômeros da lignina ou lignina alcalina como única fonte de carbono comprovaram que essa espécie expressa enzimas ligninolíticas que permitem a degradação da lignina (AKITA *et al.*, 2016). Essa cepa além de degradar a lignina utiliza os compostos aromáticos liberados como fonte de carbono.

Analisando os dados de taxonomia das famílias bacterianas dos consórcios microbianos MG BE 30 °C e MG Kraft 37 °C e terceira passagem se mostrou destoante em termos de composição de famílias do restante das passagens. Nota-se que na terceira passagem do consórcio MG BE 30 °C as famílias Pseudomonadaceae e Sphingomonadaceae do filo Proteobacteria se tornam dominantes enquanto as famílias Bacillaceae e Planococcaceae diminuem em termos de abundância. O contrário ocorre na terceira passagem do consórcio MG Kraft 30 °C onde as famílias Bacillaceae e Planococcaceae se tornam dominantes ao passo de que as famílias Pseudomonadaceae e Sphingomonadaceae diminuem em termos de abundância. Essa dinâmica pode ser natural, dada as múltiplas interações realizadas pela comunidade microbiana incluindo a competição entre espécies.

Outra potencial explicação para essa modificação na abundância das famílias de forma repentina pode ser resultado da má homogeneização do meio na hora de coletar uma alíquota para o sequenciamento o que levaria a uma má representatividade das famílias presentes. Essas modificações também podem ser explicadas pela presença de ciliados detectados pelo sequenciamento da região ITS ou esporos de bactérias no meio de cultura. Os ciliados, como será explicado no tópico seguinte, podem fagocitar bactérias e utilizá-las como fonte de alimento. A atividade de ciliados em consórcios microbianos já foram caracterizadas por afetar a dinâmica da comunidade bacteriana (MORAES *et al.*, 2018).

A última explicação fornecida para as passagens destoantes é a presença de esporos de microrganismos que foram germinando ao longo do enriquecimento, conforme a lignina fosse degradada os seus constituintes disponibilizados no meio poderiam ser utilizados como fonte de carbono. Alguns gêneros do filo Firmicutes foram estudados extensivamente pela capacidade de formar endósporos. Sendo esses gêneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*,

*Thermoactinomyces* (WHITMAN *et al.*, 2012). Um fato intrigante é que a espécie *Bacillus subtilis* forma endósporos em resposta a estresses ambientais e uma das enzimas presentes no córtex do endósporo é uma CotA que possui atividade similar a de lacases bacterianas (MARTINS *et al.*, 2002). Os endósporos são formados devido a estresses físico-químicos ambientais (MARTINS *et al.*, 2002; WHITMAN *et al.*, 2012).

### **7.2.2. Análise taxonômica dos consórcios microbianos para o grupo dos fungos**

O gênero *Acremonium* sp. presente nos consórcios foi estudado pela capacidade de degradar compostos fenólicos com estrutura análogas a da lignina (SILVA; MONTEIRO, 2000). O gênero *Trichosporon* do filo Basidiomycota está presente na sexta passagem dos consórcios MG BE 30 °C, MG BE 37 °C e MG Kraft 30 °C com abundância reativa acima de 1 %. As enzimas lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) foram identificadas na espécie *Trichosporon pullulans* permitindo que esse fungo degrade a lignina (SLÁVIKOVÁ; KOŠÍKOVÁ; MIKULÁŠOVÁ, 2002). Ensaio enzimáticos dessas enzimas permitiram concluir que a suas atividades são aumentadas em condições de baixa disponibilidade de carbono. Nos consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina obtidos por Moraes *et al.* (2018), *Trichosporon* sp. foi um dos gêneros de fungos mais abundantes presentes nos consórcios microbianos, assim como os resultados encontrados nesse presente trabalho.

O gênero *Phialemonium* do filo Ascomycota é um dos mais abundantes na sexta passagem do consórcio microbiano MG Kraft 30 °C. Esse gênero possui espécies que já foram isoladas do ar, solo e águas contaminadas com resíduos industriais (PERDOMO *et al.*, 2013). Não foi encontrada na literatura referências a esse gênero atuando na degradação da lignina. Mas dada a abundância desse gênero após o processo de enriquecimento com lignina Kraft por seis ciclos de duas semanas cada, a sua potencial atividade em degradar a lignina não deve ser descartada.

Os gêneros *Aspergillus* e *Scedosporium*, ambos do filo Ascomycota, são os mais abundantes na sexta passagem do consórcio microbiano MG Kraft 37 °C. O gênero *Aspergillus* já foi identificado por possuir atividade ligninolítica. Nos estudos de Silva (2012) amostras de fungos filamentosos foram coletadas de sedimento de rio contaminado com corantes pela indústria têxtil, sendo que uma das espécies de fungo coletadas era *Aspergillus terreus* I *Aspergillus terreus* II que apresentaram atividade de

manganês peroxidase (SILVA, 2012). Outros estudos corroboram o fato do fungo *Aspergillus terreus* ser capaz de expressar as enzimas do complexo ligninolítico (BAPTISTA *et al.*, 2012). A análise do genoma do gênero *Scedosporium* identificou a presença de lacase indicando a possibilidade desse gênero atuar na degradação da lignina (VANDEPUTTE *et al.*, 2014).

Os quatro consórcios enriquecidos para degradar lignina são marcados pela presença de ciliados com diferentes abundâncias relativas. Apenas o filo Ciliophora foi identificado pela taxonomia. A única exceção é a terceira passagem do consórcio MG Kraft 30 °C em que os ciliados aparecem com abundância de 60 %. Essa abundância diminui para menos de 1 % na sexta passagem. Moraes *et al.* (2018) também identificaram protozoários da classe Litostomatea no consórcio microbiano LigMet enriquecido usando fragmentos de lignina como fonte de carbono. De acordo com Moraes *et al.* (2018), Jürgens *et al.* (1999) e Simek *et al.* (1997), os protozoários podem modular a dinâmica de um consórcio microbiano ao fagocitar bactérias de um táxon.

O filo Ciliophora é representado por protozoários ciliados. É possível que os *primers* utilizados para amplificar a região ITS tenham co-amplificado sequências de protozoários. De qualquer maneira, a presença dos ciliados nos consórcios microbianos pode explicar os dados atípicos encontrados nas análises de taxonomia bacteriana. Os protozoários ciliados são capazes de utilizar bactérias como fontes de aminoácidos e ácidos nucleicos (WLODARSKI, 2017). Alguns gêneros comuns de protozoários ciliados no solo são *Colpoda* sp. e *Vorticella* sp. (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Todavia no âmbito desse trabalho só foi possível identificar a classificação taxonômica dos ciliados a nível de filo.

Assim como mencionado anteriormente, as OTUS classificadas em *Other* ou *Unknown* não devem ser desconsideradas. Há uma possibilidade que essas OTUS pertençam a espécies ainda não classificadas. A OTU a nível de gênero *Other* 39 pertencente à família *Other* 3 da ordem Sordariales filo Ascomycota é um exemplo de uma potencial OTU ainda não classificada. Em estudos utilizando metodologias funcionais para identificação de fungos ligninolíticos 14 isolados foram obtidos, sendo um deles da ordem Sordariales (SAITO *et al.*, 2018).

Apenas o gênero de fungo *Trichosporon* está presente nos consórcios inoculados com lignina extraída por método alcalino e no consórcio inoculado com lignina Kraft e

cultivado a 30 °C. De modo geral, os consórcios tendem a apresentar uma ou duas OTUs exclusivas na sexta passagem indicando para as estritas condições de cultivos, com temperatura e tipo de lignina, requeridas por cada uma dessas famílias.

Ao comparar as análises taxonômicas da comunidade de fungos com as de bactérias, as comunidades fúngicas apresentam um número menor de OTUS observadas. Conseqüentemente, os fungos apresentam uma menor diversidade de gêneros na sexta passagem quando comparados com a diversidade de gêneros de bactérias. A identificação da diversidade microbiana por técnicas moleculares independentes de cultivo apresenta certas limitações. A utilização do rDNA para classificação taxonômica de comunidades microbianas é limitado ao fato de espécies mais abundantes serem favorecidas no processo de amplificação por PCR em detrimento de espécies mais raras (VETRIANI *et al.*, 1999). Técnicas baseadas na amplificação de marcadores moleculares do gene ribossomal não são tão eficazes para a caracterização de comunidades fúngicas quanto para a caracterização de diversidade bacteriana porque a concentração de DNA fúngico no meio ambiente é menor que a do DNA bacteriano (BORNEMAN; HARTIN, 2000).

Mesmo durante o processo de enriquecimento, o número de OTUS observadas para fungos permaneceu sendo menor que o número de OTUS observadas para bactéria. Uma questão a ser pensada é que durante o processo de enriquecimento dos consórcios microbianos para degradar lignina, as diferentes condições de cultivo (substrato, temperatura e os ciclos de passagens) podem favorecer diferentes grupos microbianos. O tempo de geração, tempo necessário que uma célula leva para se dividir, de bactérias é variável entre espécies, mas pode ser considerado, de maneira geral, relativamente menor que o tempo de geração de fungos (BOSSHARD, 2011; CARVALHO, 2010). Os ciclos de passagens realizados no enriquecimento dos quatro consórcios microbianos foram de duas em duas semanas. Sendo assim, as passagens de uma alíquota dos consórcios microbianos para um novo meio de cultivo a cada duas semanas podem ter favorecido a detecção da maior diversidade bacteriana, enquanto os fungos se beneficiariam de passagens de um meio para o outro com intervalos mais longos.

### **7.3. Análise das variáveis temperatura e substrato sob a dinâmica das comunidades**

Sabe-se que o processo de biodegradação da lignina por fungos e bactérias é completamente dependente do tipo da estrutura da lignina (BAPTISTA *et al.*, 2012;

BUGG *et al.*, 2011a; GONZALO *et al.*, 2016; KNEŽEVIĆ *et al.*, 2013; WONG, 2009). Diferentes tipos de pré-tratamento podem originar diferentes estruturas tridimensionais da lignina. Durante o processo de enriquecimento de um consórcio microbiano para degradar lignina diferentes tipos de lignina podem ser utilizados como substrato. Nesse caso, a lignina Kraft e a lignina extraída por método alcalino possuem características distintas ocasionando consequentemente na seleção de grupos de microrganismos hábeis a degradá-las.

Entretanto, essa diferença ocasionada pelo tipo de substrato é mais acentuada na comunidade bacteriana. As amostras bacterianas cultivadas com lignina extraída por método alcalino como única fonte de carbono mostraram a maior dissimilaridade quando comparadas com o solo original. Por sua vez, os fungos são grandes decompositores da lignina e podem empregar um coquetel enzimático com lacases e peroxidases para degradá-la. Dado todo o arsenal enzimático fúngico, esses não são tão afetados pelo tipo de lignina utilizada. As enzimas ligninolíticas bacterianas possuem um potencial redox menor, logo diferenças estruturais na lignina levariam a necessidades da atuação de diversas enzimas para degradar diferentes partes da lignina (BUGG *et al.*, 2011a). Acredita-se que para os consórcios microbianos analisados nesse trabalho as bactérias estariam atuando em comperação para degradar diferentes frações da lignina.

Outra possível explicação para a diferença na composição de espécies bacterianas encontradas entre os consórcios microbianos é a presença de outra fonte de carbono durante o processo de enriquecimento. No processo manual de extração da lignina por método alcalino podem restar resquícios carboidratos. Fontes de carbono alternativas à lignina que podem atuar como um “start up” para a degradação (PASTORE, 2016). Nessa mesma perspectiva, a lignina Kraft (Sigma- Aldrich) possui um alto grau de pureza confirmando que não há contaminação por outras fontes de carbono nos consórcios enriquecidos obtidos usando lignina Kraft como fonte de carbono. A partir desse resultado e de dados da literatura pressupõe-se que: representantes do filo Firmicutes precisam de uma fonte alternativa de carbono para iniciar o processo de degradação da lignina ou representantes do filo Proteobacteria são competidores fortes favorecidos pelo enriquecimento com a lignina Kraft não permitindo a colonização do meio por espécies do filo Firmicutes. A literatura aponta alguns estudos em que os gêneros *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* e *Bacillus* atuam na degradação da lignina Kraft na presença de 1 % de glicose e 0,5 % de peptona como fonte alternativa de carbono e nitrogênio (CHANDRA

*et al.*, 2008; HAQ; RAJ, 2013; RAJ *et al.*, 2007). Determinados grupos de microrganismos requerem um cossubstrato facilmente metabolizável para favorecer a degradação de compostos aromáticos, como no caso da biodegradação da lignina (PADMAVATHY *et al.*, 2003; SOLÍS *et al.*, 2012). Fontes alternativas de carbono podem ser necessárias devido ao alto peso molecular da lignina Kraft (RAJ *et al.*, 2007). Vale apenas ressaltar, que apesar da hipótese aqui formulada, e de alguns dados encontrados na literatura, não se deve descartar a possibilidade desses gêneros do filo Firmicutes atuarem na degradação da lignina Kraft na ausência de fontes de carbonos alternativas.

Para os gêneros presentes na comunidade fúngica, as variáveis temperatura e substrato apresentam uma relação fraca com as amostras, implicando em dados com padrões inconsistentes. Estudos realizados por Taha *et al.* (2015) demonstraram que o pré-tratamento da palha de arroz e cana-de-açúcar com fungos para a degradação da lignina é mais eficaz que o pré-tratamento com bactérias, indicando que os fungos são eficientes degradadores da lignina. Outros estudos demonstram que os fungos de podridão branca são capazes de remover até 85 % da lignina da biomassa (WANG *et al.*, 2013). Para fungos muitos fatores ambientais como a temperatura influenciam no crescimento celular (MADADI; ABBAS, 2017). A eficiência em degradar a lignina por parte dos fungos pode indicar o motivo pelos quais diferentes tipos de lignina utilizados no processo de enriquecimento dos consórcios não resultaram em diferenciações tão claras em termos de composição de fungos das comunidades.

Dentro de cada grupo bacteriano e fúngico formado pelas diferenças na composição devido ao tipo de lignina utilizada como substrato, a temperatura também atuou como fator de diferenciação. Um dos fatores físicos necessários para o crescimento microbiano é a temperatura (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Para o presente trabalho a variação de 7 °C entre as temperaturas escolhidas apresentou uma menor capacidade de diferenciação em termos de composição da comunidade bacteriana e fúngica quando comparada ao tipo de lignina. No geral, os microrganismos possuem uma temperatura ótima de crescimento, mas também podem crescer em uma faixa de temperatura mínima e máxima (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

## 8. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram obtidos quatro consórcios microbianos enriquecidos para degradar lignina: dois enriquecidos para degradar lignina Kraft e dois enriquecidos para degradar lignina extraída por método alcalino. Para todos os consórcios a diversidade é maior no solo original, antes do processo de enriquecimento, e diminui até a sexta passagem, ao final do processo de enriquecimento. Apesar da dinâmica das comunidades microbianas observadas para os consórcios, as comunidades tendem a se estabilizar em termos de composição de famílias da quarta passagem até a sexta. É possível que para o grupo bacteriano as espécies presentes na sexta passagem estejam atuando em cooperação para degradar a lignina. A presença de ciliados nos consórcios pode ter ditado a dinâmica da comunidade bacteriana. Diferentes tipos de ligninas e temperaturas podem ser utilizados no processo de enriquecimento, sendo que para esse trabalho o grupo bacteriano apresentou maior sensibilidade, quando comparado aos fungos, no tipo de variável utilizada. Em suma, ao final do processo de enriquecimento de consórcios microbianos para degradar lignina foi possível identificar fungos e bactérias já descritos com atividade ligninolítica. Com ressalvas para dois gêneros identificados: 1. *Aminobacter* ao qual não foi encontrado dados na literatura desse gênero presente em consórcios microbianos capazes de degradar lignina; 2. *Phialemonium* ao qual não foi encontrado dados na literatura desse gênero atuando na degradação a lignina. Ainda há famílias classificadas como *Others* e *Unknown* que podem indicar também a possibilidade da presença de fungos e bactérias ainda não classificados atuando no processo de degradação da lignina.

## CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EM BIBLIOTECA METAGENÔMICA

### 1. INTRODUÇÃO

Devido ao caráter renovável e não competitivo com a indústria alimentícia, a biomassa lignocelulósica é utilizada como matéria-prima na geração de produtos de valor agregado, sendo a biotecnologia a peça chave para a produção de energia e produtos de maneira sustentável (JÚNIOR, 2013). A biomassa lignocelulósica é composta de celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes (JÚNIOR, 2013). Para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica de forma economicamente viável é necessário desconstruir a parede celular de modo a possibilitar o acesso enzimático à celulose e hemicelulose, além de utilizar a própria lignina como matéria-prima na geração de bioprodutos (SANTOS; NASCIMENTO; ALVES, 2017).

As mudanças climáticas permanecem sendo uma das principais preocupações globais quando se trata de questões ambientais (NORDHAUS, 2018). Modelos econômicos de desenvolvimento que priorizam questões ambientais frente ao avanço tecnológico, como aquele proposto pelo Nordhaus *et al.* (2016) estão ganhando força em um mundo globalizado onde prosperar com sustentabilidade é uma escolha importante. Nesse contexto, as biorrefinarias são instalações análogas à indústria petroquímica que utilizam a biomassa lignocelulósica para a geração de bioprodutos de modo a diminuir o impacto gerado ao meio ambiente (CHERUBINI, 2010).

No Brasil, nos últimos anos, diferentes tipos de matérias-primas vêm sendo exploradas para a produção de biocombustíveis e materiais químicos, sendo elas: cana-de-açúcar, milho, mandioca, óleo vegetal, óleo de mamona, entre outros (JÚNIOR, 2013). No geral, a utilização de alguns desses produtos, tanto no modelo de biorrefinarias, quanto em outras indústrias geram os chamados resíduos lignocelulósicos, sendo eles: serragem, palha, sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar (ZABANIOTOU *et al.*, 2010).

No bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, a lignina é o terceiro componente da parede celular vegetal, correspondendo a cerca de 20 % a 30 % da composição desta (OGATA, 2013). A lignina, além de presente na biomassa lignocelulósica, também pode ser obtida como resíduo industrial a partir dos processos de fabricação de papel e na agroindústria sucroenergética, sendo o bagaço da cana-de-açúcar o principal subproduto gerado no Brasil com atrativo potencial de exploração econômica (BUGG; RAHMANPOUR, 2015; SANTOS; NASCIMENTO; ALVES, 2017).

Devido a sua complexidade estrutural, a lignina é resistente à degradação enzimática, o que dificulta a sua utilização como matéria-prima em modelos de desenvolvimento voltados para a bioeconomia. Fungos e bactérias possuem enzimas oxirredutases que podem ser utilizadas em modelos de biodegradação da lignina (ALCALDE, 2015). Do ponto de vista biotecnológico, a diversidade bacteriana pode ser explorada em busca de novas enzimas ligninolíticas (BUGG *et al.*, 2011a). A despolimerização da lignina por bactérias ainda não foi bem caracterizada.

O solo é uma fonte de microrganismos que possuem enzimas de interesse biotecnológico devido à diversidade genética e metabólica ali encontrada (BATISTA-GARCÍA *et al.*, 2016). Todavia, o acesso a essa diversidade pode encontrar barreiras, uma vez que não se pode cultivar ou não se conhece todas as necessidades nutricionais dos microrganismos. A metagenômica surge como uma abordagem que dá acesso ao código genético da biodiversidade microbiana presente no solo sem a necessidade de cultivo (MORAES *et al.*, 2018).

Este segundo capítulo discorrerá sobre enzimas ligninolíticas bacterianas que participam do processo de biodegradação da lignina. No presente trabalho, o DNA da sexta passagem do consórcio microbiano cultivado a 37 °C e enriquecido para microrganismos capazes de utilizar lignina extraída por método alcalino como fonte de carbono (MG BE 37 °C) foi utilizado na construção de uma biblioteca metagenômica, Belig MG 6P, que foi transformada em dois hospedeiros: *Escherichia coli* HB101 e *Pseudomonas putida* KT2440. Para identificação de clones que expressam enzimas ligninolíticas na biblioteca Belig MG 6P foram utilizadas duas abordagens. Uma baseada na função, onde um protocolo de oxidação de compostos monoaromáticos foi otimizado para triar a biblioteca metagenômica para busca de potenciais clones positivos para enzimas ligninolíticas. E outra baseada na sequência, utilizando *primers* com sítios conservados de lacases bacterianas para amplificar fragmentos de interesse. A biblioteca em Belig MG 6P em *Pseudomonas putida* KT2440 foi utilizada em *screening* de complementação da atividade para identificação de enzimas que permitam o consumo do guaiacol como fonte de carbono.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Biomassa e o interesse biotecnológico

O interesse global no uso de matérias-primas renováveis para geração de energias e insumos químicos é pautado em um modelo global de desenvolvimento econômico correlacionado com a preservação ambiental (RODRIGUES; ABDELNUR, 2013; SOUZA; RIBEIRO, 2013). A dependência de fontes não renováveis para produção de energia ou produtos faz com que o quadro energético mundial e as indústrias sofram forte pressão econômica, ambiental e social em busca de rotas alternativas para o desenvolvimento de maneira sustentável (ALVAREZ, 2013).

Nesse contexto, a biomassa vegetal desperta grande interesse biotecnológico por possuir um caráter renovável. A biomassa vegetal é formada a partir do processo de fotossíntese realizada pelas plantas que converte o gás carbônico atmosférico em açúcares que serão utilizados nas sínteses dos polímeros amido, celulose, hemicelulose e lignina (JÚNIOR, 2013). O Brasil dispõe de uma série de biomassas de origem vegetal que podem ser classificadas como oleaginosas (soja, algodão, mamona, dendê, girassol e amendoim), amiláceas (arroz, mandioca e milho), sacarídeas (cana-de-açúcar e sorgo sacarino) e lignocelulósicas (resíduos florestais como galhos e troncos, resíduos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar e de sorgo sacarino, e resíduos agrícolas de cereais como a palha de arroz, trigo e sabugo de milho) (RODRIGUES; ABDELNUR, 2013).

A biomassa lignocelulósica desperta um interesse especial por ser uma matéria-prima residual não competitiva com a indústria alimentícia (JÚNIOR, 2013). O material lignocelulósico corresponde cerca de 60 % de toda a biomassa vegetal encontrada na biosfera (RODRIGUES *et al.*, 2017). No Brasil, a agroindústria sucroenergética gera muitos resíduos sendo o bagaço da cana-de-açúcar o principal subproduto gerado com atrativo potencial de exploração econômica (SANTOS; NASCIMENTO; ALVES, 2017). Estima-se que a cada 1 tonelada de cana-de-açúcar processada 250 kg de bagaço é produzido (RABELO, 2007). Dados sugerem 30 % a 50 % do bagaço de cana-de-açúcar poderia estar disponível para um destino mais nobre ao invés da queima para geração de vapor e energia elétrica nas usinas (SOARES; ROSSELL, 2004). Parte desse material lignocelulósico poderia ser disponibilizado nas biorrefinarias, possibilitando um quadro

de aproveitamento integral da biomassa com maior impacto econômico a partir da geração de bioprodutos (MACEDO, 2007).

## **2.2. Biorrefinarias**

As biorrefinarias são instalações análogas à indústria petroquímica que visam à utilização integral da biomassa lignocelulósica para a geração de produtos com valor agregado de modo a diminuir o impacto gerado ao meio ambiente (CHERUBINI, 2010). Dentro desse modelo, a biomassa pode ser fracionada em seus constituintes e utilizada como matéria-prima na geração de bioprodutos. A biomassa vegetal é amplamente utilizada por ser um material rico em carbono, menos poluente e de fácil acesso (JÚNIOR, 2013).

Segundo Pérez *et al.* (2017) o modelo de biorrefinaria pode ser dividido em três fases classificadas de acordo com a utilização de diferentes biomassas e a sua complexidade. A fase I seriam biorrefinarias que desconstroem apenas um único tipo de biomassa em um processo de transformação fixo. Na biorrefinaria de fase II é utilizado apenas um único tipo de biomassa, que é fracionada para a geração de diversos bioprodutos. A biorrefinaria de fase III utiliza diversos tipos de biomassas que serão desconstruídas e utilizadas na geração de diversos produtos.

Para o desenvolvimento sustentável, a utilização da biomassa lignocelulósica como matéria-prima possibilita que as biorrefinarias, seja para geração de energia ou bioprodutos, agreguem valor aos resíduos agrícolas e industriais (FUNNICELLI, 2018). Dentro do modelo de biorrefinarias, a biomassa vegetal e seus respectivos resíduos podem ser utilizados como matéria-prima na geração de: energia termal, elétrica e mecânica; biodiesel, biogás e biocombustíveis sintéticos; produtos e materiais químicos; bioprodutos a base de carboidratos, lipídios, proteínas, lignina; e metabólitos secundários (PÉREZ *et al.*, 2017).

A biomassa lignocelulósica é formada por uma matriz complexa de polissacarídeos representada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (RODRIGUES; ABDELNUR, 2013). Na parede celular vegetal esses componentes estão interligados conferindo a sustentação e proteção contra a degradação biológica e química (FUNNICELLI, 2018). As cadeias de celulose são rodeadas pela hemicelulose que interagem entre si por pontes de hidrogênio (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005). A hemicelulose é interligada a lignina por pontes de hidrogênio, ligações iônicas, ligações

do tipo éster e éter e interações de *van der Waals* (KUMAR *et al.*, 2018a). Dado as características intrínsecas do complexo celulose, hemicelulose e lignina e a variedade de ligações que os unem, a biomassa lignocelulósica adquire um caráter estruturalmente recalcitrante (RODRIGUES; MENDES; PACHECO, 2013).

Uma das possibilidades para o aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica é necessário converter a celulose e hemicelulose em seus açúcares constituintes, bem como desconstruir a lignina em seus integrantes fenólicos e não fenólicos e converter os compostos e açúcares liberados em bioprodutos de forma economicamente viável (SANTOS *et al.*, 2012). A lignina é uma estrutura difícil de ser degradada e sua presença na biomassa diminui a ação enzimática sobre a celulose e a hemicelulose. A lignina pode bloquear a ação de enzimas hidrolíticas sobre a celulose e, por ser hidrofóbica, pode impedir que a fibra de celulose se entumeça, diminuindo a superfície disponível para a atividade enzimática (OGATA, 2013).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa fundamental para quebrar as ligações que unem a celulose, a hemicelulose e a lignina. Os processos utilizados podem ser físicos, químicos, biológicos ou combinados (DIAS, 2014). Na rota biológica, um dos principais recursos utilizados são microrganismos que tenham capacidade de secretar enzimas que atuem na desconstrução da biomassa vegetal. Essa mesma abordagem enzimática pode ser utilizada em modelos de conversão enzimática da celulose, hemicelulose e lignina em produtos de valor agregado. A biodegradação usando modelos biológicos, seja microrganismos ou enzimas, desperta interesse por ocorrer em condições amenas de temperatura, pressão e pH (RODRIGUES; MENDES; PACHECO, 2013).

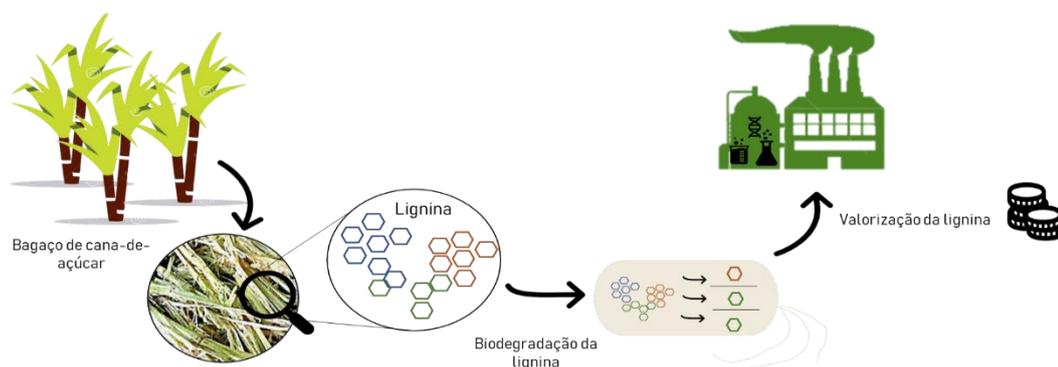
Abdelnur e Rodrigues (2013) relataram que o teor de lignina presente no material lignocelulósico é correlacionado com o rendimento na produção de etanol de segunda geração. A razão S/G (razão guaiacil-siringil) presente no eucalipto é proporcionalmente relacionada a produção de xilose em tratamentos da biomassa com ácido sulfúrico. A lignina liberada durante a produção de etanol celulósico é queimada para geração de energia elétrica ou vapor. Na produção de polpa celulósica, a madeira de eucalipto é tratada pelo processo Kraft para promover a deslignificação da biomassa. A presença da lignina diminui a efetividade do processo de branqueamento da polpa (RODRIGUES; ABDELNUR, 2013). A indústria de papel e polpa foi a primeira a se interessar por

tratamentos biológicos auxiliares no processo de deslignificação da biomassa vegetal durante o branqueamento da polpa celulósica (ELIAS *et al.*, 2017).

O processo de cozimento Kraft para o tratamento da polpa celulósica gera um licor negro como subproduto residual (DIAS, 2014). A composição do licor negro é 39 - 54 % de lignina, 25 - 35 % carboidratos degradados, 3 - 5 % extrativos e 18 - 25 % de componentes inorgânicos (MARINS, 2012). A maioria do licor negro é utilizado para queima, gerando energia para a própria indústria. O licor negro é tóxico, dado aos componentes químicos liberados, como o enxofre, e pode causar grande impacto ambiental (DIAS, 2014). Dados sugerem que apenas cerca de 2 % da lignina presente no licor negro é comercializada (MARINS, 2012). Toda essa lignina poderia ser disponibilizada para fins mais nobres, como a geração de produtos de valor agregado, além da queima.

### 2.3. Valorização da lignina

A remoção da lignina da biomassa, além de permitir uma maximização da utilização da celulose e hemicelulose na geração de biocombustíveis ou biomateriais, também contribui para um quadro de aproveitamento integral da biomassa ao permitir o uso da própria lignina para geração de bioprodutos (Figura 17). Estudos indicam que a lignina é uma fonte rica em compostos fenólicos que podem ser utilizados na síntese de produtos de valor agregado (DIAS, 2014).



**Figura 17.** Biodegradação da lignina presente na biomassa lignocelulósica (bagaço de cana-de-açúcar) para geração de produtos de valor agregado em modelos de biorrefinarias.

Bugg e Rahmanpour (2015) descrevem algumas dificuldades na conversão enzimática da lignina para promover um quadro de valorização. Uma dessas dificuldades

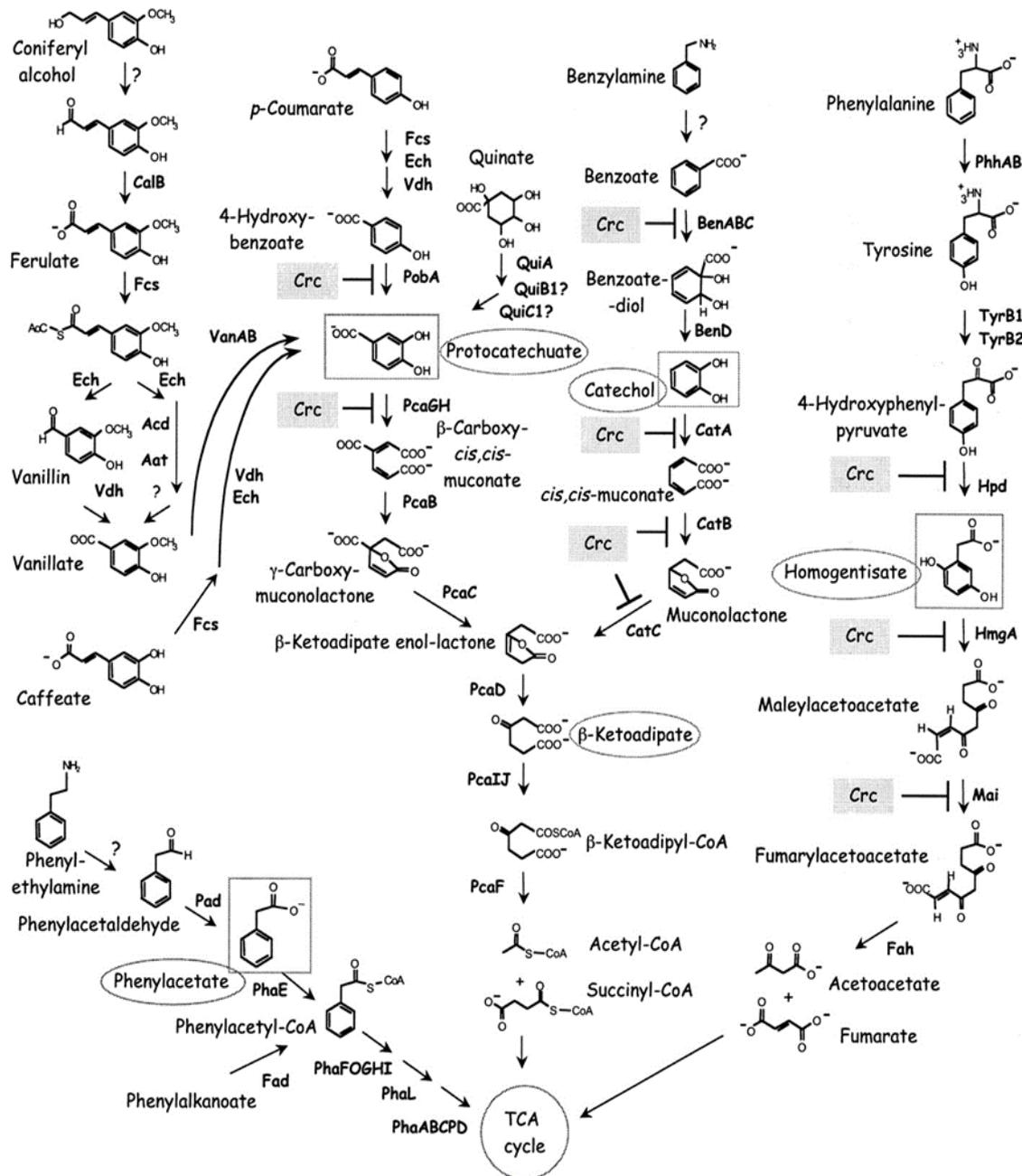
são os tipos de ligações encontradas na lignina, como as ligações C-C, C-O e éter que são resistentes à hidrólise enzimática. Diferentes tipos de ligninas podem apresentar diferentes tipos de estruturas e solubilidades (BUGG; RAHMANPOUR, 2015). As enzimas que atuam no processo de despolimerização da lignina também atuam na polimerização, gerando uma concorrência entre polimerização e despolimerização dos compostos da lignina (BUGG; RAHMANPOUR, 2015). Por fim, a heterogeneidade de compostos liberados na biodegradação da lignina também gera uma dificuldade no seu processo de valorização. É necessário otimizar processos para simplificar o número de componentes liberados.

A degradação da lignina pode liberar compostos como o guaiacol, a vanilina e ácido ferúlico que possuem valor agregado (BUGG; RAHMANPOUR, 2015; SAINSBURY *et al.*, 2013). O guaiacol é utilizado na indústria farmacêutica como antisséptico, expectorante e possui um grande potencial para ser utilizado como antioxidante (AZADFAR; GAO; CHEN, 2015). A vanilina é utilizada como flavorizante e o ácido ferúlico como antioxidante na indústria alimentícia (BUGG *et al.*, 2011b). Diversos biomateriais (resinas fenólicas, fibras de carbono, nanomateriais) podem ser produzidos a partir dos blocos construtores liberados na despolimerização da lignina (BUGG; RAHMANPOUR, 2015; LABAT, 2008; SOUZA, 2006).

Sainsbury *et al.* (2013) através de engenharia metabólica de *Rhodococcus jostii*, deletou o gene da vanilina desidrogenase resultando em um mutante que produzia vanilina a partir da lignina degradada na presença de uma peroxidase. Também há possíveis vias de produção de vanilina sintética a partir do guaiacol e do ácido ferúlico. Moraes *et al.* (2018) com os dados obtidos a partir da montagem dos genomas de um consórcio microbiano obtido do solo de plantação de cana-de-açúcar identificou uma via de produção sintética de vanilina a partir do ácido ferúlico utilizando duas enzimas: feruloil-CoA sintetase e uma enoil-CoA hidratase / aldolase.

O interesse em estudos biotecnológicos utilizando *Pseudomonas putida* para a valorização da lignina deriva das características intrínsecas do seu metabolismo de compostos aromáticos. No seu metabolismo, *Pseudomonas putida* KT2440 possui rotas para a degradação de compostos aromáticos: o protocatecoato e catecol ramos da via de  $\beta$ -ceto adipato, a via do homogentisato e a via fenilacetato (Figura 18) (JIMÉNEZ *et al.*, 2002). Os dois ramos da via da  $\beta$ -ceto adipato iram convergir no intermediário  $\beta$ -

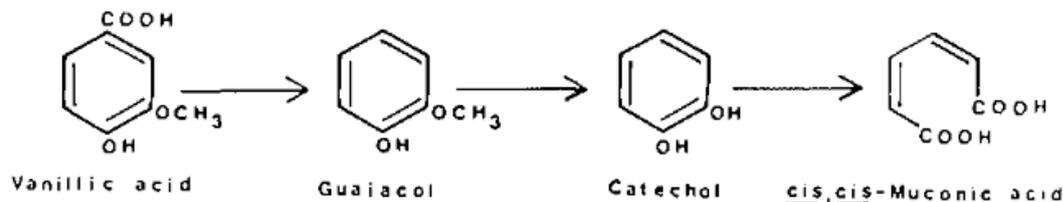
cetoadipato enol-lactona. Posteriormente esse composto será convertido a intermediários do ciclo de Krebs, succinil-CoA e acetil-CoA (JIMÉNEZ, *et al.*, 2002). A via do homogentisato é responsável pelo catabolismo da tirosina e fenilalanina (JIMÉNEZ, *et al.*, 2002). Por fim, há a via de degradação do fenilacetato (JIMÉNEZ, *et al.*, 2002).



**Figura 18** Vias do catabolismo de compostos aromáticos de *Pseudomonas putida* KT2440. Fonte: Retirado de Jiménez *et al.* (2002)

A *Pseudomonas putida* é capaz de metabolizar catecol, mas não é capaz de metabolizar guaiacol. A degradação da lignina pode gerar entre vários compostos o guaiacol, a vanilina e ácido ferúlico (BUGG; RAHMANPOUR, 2015; SAINSBURY *et al.*, 2013). O guaiacol por sua vez pode ser desmetilado formando catecol (POMETTO; SUTHERLAND; CRAWFORD, 1981). Essa afirmação é corroborada por estudo com citocromo P450 que converte guaiacol em catecol em uma única etapa (MALLINSON *et al.*, 2018). A partir do consumo do compostos aromáticos da lignina, *Pseudomonas putida* KT2440 pode ser engenheirada para a produtos de produtos químicos de valor agregado como a vanilina, polidroxialcanoato (PHA), ácido cítrico e ácido succínico (SILVA *et al.*, 2007). A *Pseudomonas putida* também foi engenheirada para acumular ácido cis, cis-mucônico produzido a partir da via do catecol (KOHLSTEDT *et al.*, 2018).

As vias do catabolismo ácido vanílico foi elucidada em *Streptomyces setonii* demonstrando que o guaiacol pode ser desmetilado formando catecol (POMETTO; SUTHERLAND; CRAWFORD, 1981) (Figura 19). Estudo mais recentes confirmar essa afirmação demonstrando que o citocromo P450 converte guaiacol em catecol em uma única etapa (MALLINSON *et al.*, 2018).



**Figura 19.** Via do catabolismo de ácido vanílico em *S. setonii*.  
Fonte: Retirado de Pometto, Sutherland e Crawford (1981).

## 2.4. Degradação enzimática da lignina

Na natureza fungos e bactérias são capazes de expressar enzimas oxirredutases que degradam a lignina (ALCALDE, 2015). As enzimas ligninolíticas possuem plasticidade funcional podendo atuar na oxidação de diferentes substratos (RODRIGUES; MENDES; PACHECO, 2013). As principais enzimas identificadas que atuam nesse processo de desconstrução da lignina podem ser classificadas em fenoloxidasas, que reduzem a molécula de O<sub>2</sub> e heme-peroxidases que reduzem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CARVALHO, 2011). A lignina e os seus constituintes também podem ser modificados direta ou indiretamente por outras enzimas: β-etherases, superóxido dismutase, feruloil

esterases, glicose oxidase, glioxal oxidase e aril álcool oxidase (ALVAREZ, 2013; BUGG; RAHMANPOUR, 2015; GONZALO *et al.*, 2016).

O princípio da despolimerização da lignina envolve enzimas que oxidam as cadeias propílicas, desmetilam grupos metoxilas e rompem os anéis aromáticos, ao passo que reduzem o oxigênio ou peróxido de oxigênio, gerando uma série de compostos tóxicos e recalcitrantes aos microrganismos (FABBRINI; GALLI; GENTILI, 2002). Devido ao tamanho dos poros da lignina e o peso molecular das enzimas oxirredutases, essas só teriam acesso a lignina em um segundo momento. Acredita-se que o processo de degradação da lignina ocorre inicialmente com o auxílio de mediadores naturais (3-hidroxi-antranílico, derivados de p-hidroxibenzóico e p-hidroxi benzaldeídos) que quando oxidados geram radicais livres que penetram na estrutura celular e oxidam a lignina (RODRIGUES; MENDES; PACHECO, 2013). Os mediadores são moléculas de baixo peso molecular que atuam como carreador de elétrons permitindo a oxidação de uma série de substratos (ARANTES; MILAGRES, 2009). O sinergismo enzimático é necessário para a completa despolimerização da lignina.

Os consórcios de enzimas ligninolíticas, além de atuarem no processo de desconstrução da lignina, despertam interesse biotecnológico por possuírem plasticidade funcional podendo ser empregados em diferentes processos industriais para obtenção de energia e bioprodutos, sendo eles: viabilização do processo de produção de combustíveis (bioetanol e biobutanol); síntese de polímeros e antibióticos; nanobiotecnologia para produção de biosensores para aplicação na área médica; na biorremediação para a indústria têxtil atuando na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), dioxinas, halogenados e outros compostos xenobióticos; na indústria alimentícia; e no branqueamento na indústria têxtil e de papel (ALCALDE, 2015; BUGG; RAHMANPOUR, 2015).

#### **2.4.1. Enzimas ligninolíticas bacterianas**

As enzimas ligninolíticas são produtos do metabolismo de fungos e bactérias que são utilizadas em processo de degradação da lignina e conversão dos compostos liberados em insumos químicos de interesse industrial (ELIAS *et al.*, 2017). Essas foram inicialmente estudadas em fungos de podridão-branca e podridão-marrom. Os fungos são eficientes decompositores da lignina e produzem uma série de ligninases extracelulares: lacase, lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase versátil (BUGG *et al.*,

2011a, 2011b; GALL *et al.*, 2017). São capazes de decompor a lignina em vários compostos monoaromáticos (GALL *et al.*, 2017).

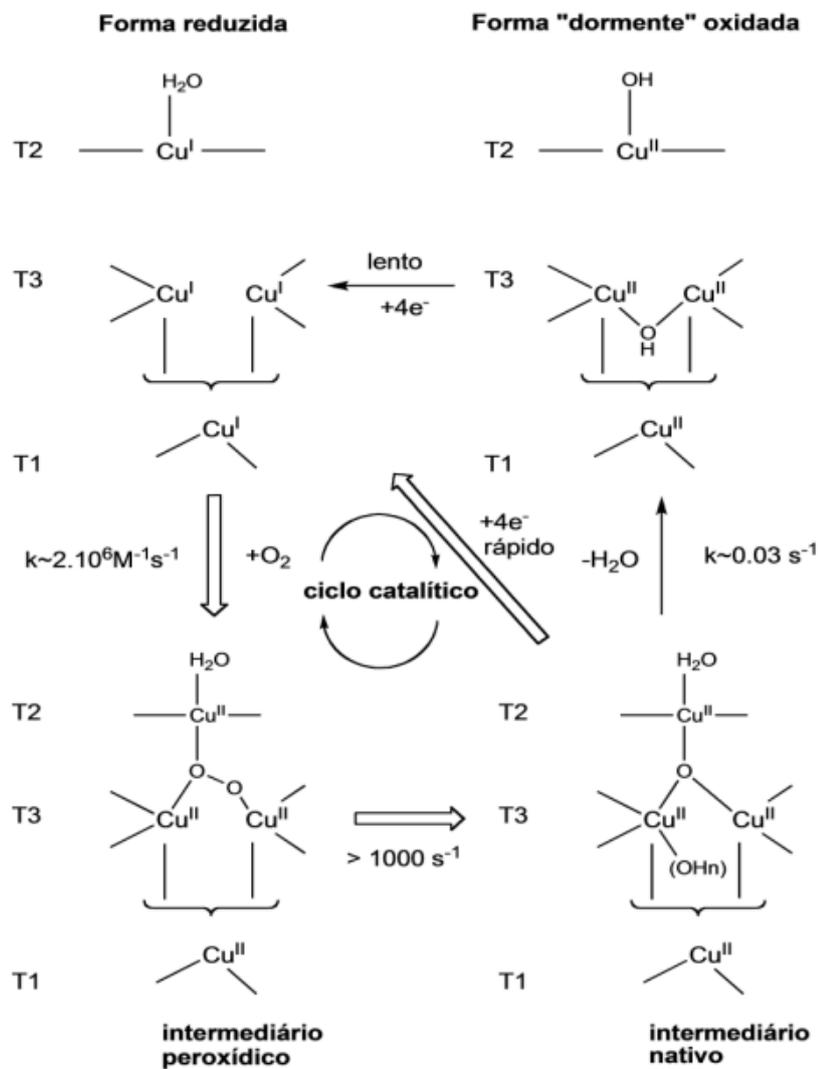
A diversidade bacteriana encontrada no solo pode ser explorada para a busca de novas enzimas ligninolíticas bacterianas (BUGG *et al.*, 2011). Quando comparada aos fungos, as bactérias como *Sphingobacterium* sp., despolimerizam a lignina em um número mais restrito de compostos aromáticos, o que facilitaria a sua utilização em aplicações biotecnológicas (RASHID *et al.*, 2015). A despolimerização da lignina por bactérias e a conversão dos compostos aromáticos liberados em produtos químicos renováveis ainda não é bem caracterizada (BUGG; RAHMANPOUR, 2015).

Na literatura há diversos relatos de bactérias que expressam enzimas ligninolíticas. A espécie *Enterobacter lignolyticus* SCF1 da classe Gammaproteobactéria desempenha um papel importante na degradação da lignina através das enzimas catalase/peroxidase em ambiente anaeróbico (DEANGELIS *et al.*, 2013). Peroxidases extracelulares foram identificadas na espécie *Streptomyces viridosporus* T7A do filo Actinobactéria clivando regiões  $\beta$ -aril éter da lignina (DEANGELIS *et al.*, 2013). A atividade da lignina peroxidase nessa espécie é corroborada pela necessidade de peróxido de hidrogênio para degradar a lignina. A análise do genoma de *Rhodococcus jostii* RHA1 identificou a presença de duas DyP peroxidases (WARREN *et al.*, 2006). Kumar e Chandra (2018) utilizaram um consórcio microbiano formado por *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* na expressão de lacases e manganês peroxidases utilizadas para degradar corantes poluentes liberados pelas destilarias.

Foram identificadas lacases bacterianas. *Pseudomonas putida* mt-2 degrada regiões fenólicas da lignina na presença de oxigênio indicando a possível presença de lacase (AHMAD *et al.*, 2010). Uma lacase termotolerante, com atividade em 80 °C foi isolada de *Thermus thermophilus* (MIYAZAKI, 2005). Uma lacase halotolerante foi isolada de *Streptomyces psammoticus* (NILADEVI; JACOB; PREMA, 2008). Quando comparadas às lacases de fungos, as lacases bacterianas podem apresentar um potencial redox menor. Estudo com a lacase CotA isolada de *Bacillus subtilis* teve a sua especificidade com o substrato aumentada por evolução dirigida (GUPTA; FARINAS, 2010).

### 2.4.2. Lacases (EC 1.10.3.2)

A lacase possui quatro tipos de íons de cobre distribuídos pelos sítios catalíticos T1 e T2/T3. O substrato é oxidado no sítio mononuclear “blue” T1 e os elétrons são transferidos para o sítio trinuclear T2/T3 (um íon de cobre no T2 e dois íons de cobre no T3) onde o oxigênio molecular é reduzido a água (Figura 20) (SHLEEV *et al.*, 2005). O sítio mononuclear *blue* é assim chamado pela faixa de absorção no espectro de luz em 600 nm (MOROZOVA *et al.*, 2007). A *yellow* lacase é uma enzima que não possui a capacidade de absorção no sítio T1 em 600 nm (IKE *et al.*, 2015; LEONTIEVSKY *et al.*, 1997).



**Figura 20.** Ciclo catalítico da lacase.  
Fonte: Adaptado de Shleev (2006).

As lacases oxidam uma variedade de compostos orgânicos, orgânicos aromáticos e inorgânicos (REISS *et al.*, 2013). Devido ao seu baixo potencial redox, a lacase só despolimeriza regiões não fenólicas da lignina na presença de mediadores (AUSEC; VAN ELSAS; MANDIC-MULEC, 2011). Possuem diversas aplicações biotecnológicas na indústria alimentícia, no branqueamento da celulose, na biorremediação do solo de áreas contaminadas e na produção de polímeros (WELLINGTON, 2014).

As lacases já foram reportadas em plantas, alguns insetos, fungos e bactérias (ARUMUGAM; KALAVATHI; MAHALINGAM, 2014; DITTMER; GORMAN; KANOST, 2009; MENEZES, 2013). Nas plantas, as lacases estão envolvidas na polimerização desidrogenativa das unidades estruturais da lignina (MOROZOVA *et al.*, 2007). Nos fungos e bactérias, as lacases estão envolvidas na degradação da lignina, na patogênese e na desintoxicação do meio (MOROZOVA *et al.*, 2007). Em bactérias como *Bacillus subtilis* a lacase também atua na formação de esporos e pigmentação (AUSEC; VAN ELSAS; MANDIC-MULEC, 2011). Em fungos e bactérias há relatos de lacases intracelulares e extracelulares (WELLINGTON, 2014). Segundo Morozova *et al.* (2007), as lacases intracelulares podem estar envolvidas na transformação de compostos fenólicos presentes no interior da célula.

Um outro tipo de lacase identificada é a *small* lacase. Essa possui apenas dois domínios de cupredoxina, sendo uma classe encontrada apenas em procariontes (AUSEC; VAN ELSAS; MANDIC-MULEC, 2011). Acredita-se que é um representante evolutivo para a lacase de três domínios. Essa lacase é classificada de A - C de acordo com a posição do sítio T1 (LAWTON *et al.*, 2009). A *small* lacase inicialmente foi encontrada em *Streptomyces* e *Nitrosomonas europea*, mas análises de metagenoma também identificaram no filo Bacteroidetes (AUSEC; VAN ELSAS; MANDIC-MULEC, 2011; GUNNE *et al.*, 2014; LAWTON *et al.*, 2009).

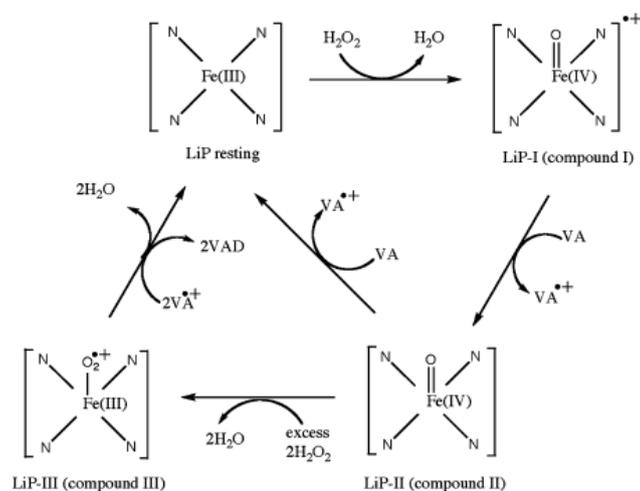
Dada a variedade de reações catalisadas e a sua ampla distribuição entre plantas, fungos e bactérias, Reiss *et al.* (2013) sugeriram uma nova classificação para lacases: multicobre oxidase com atividade de lacase (*laccase-like multicopper oxidase* - LMCO). As multicobre oxidases (MCOs) pertencem a uma superfamília enzimática de proteínas que possuem quatro íons de cobre em seus sítios T1 e T2/T3 e que oxidam o substrato na presença de oxigênio molecular gerando água como o único produto. Reiss *et al.* (2013) avaliaram a atividade de 11 multicobres oxidases com atividade de lacase em 91

substratos. As enzimas escolhidas foram das seguintes espécies: duas de plantas: *Rhus vernicifera* e *Cucurbita* sp.; três de fungos: *Trametes versicolor*, *Agaricus bisporus* e *Myceliophthora thermophil*; e cinco de bactéria: *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Gramella forsetii*, *Marivirga tractuosa* e *Streptomyces pristinaespiralis*. Os substratos testados foram de diferentes classes químicas: ácidos carboxílicos aromáticos, álcool aromático, cetonas aromáticas, aldeídos aromáticos, aminas aromáticas, ésteres aromáticos, amidas aromáticas, compostos azo aromáticos, naftalenos, N-heterocíclicos, polifenol, compostos trifenil, cromano, fenotiazínicos e benzonitrilos. Por fim, conclui que as lacases são capazes de oxidar diferentes substratos.

### 2.4.3. Peroxidases

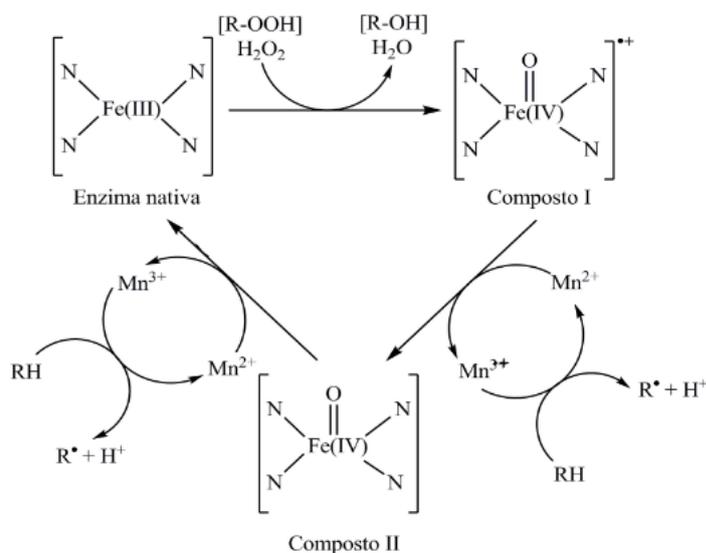
As peroxidases ligninolíticas fazem parte de uma superfamília, as heme peroxidases, que possuem ferro como grupo prostético (WONG, 2009). São classificadas em lignina peroxidases (LiP EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (MnP EC 1.11.1.13), peroxidases versáteis (VP EC 1.11.1.16 ) (WONG, 2009). Recentemente, uma outra classe de peroxidases foi descrita, a DyP-type peroxidase (DyP EC 1.11.1.19) (GONZALO *et al.*, 2016). No geral, essas enzimas oxidam o substrato através de uma série de transferências de elétrons com a formação de intermediários reativos utilizando o peróxido de hidrogênio como acceptor de elétrons.

A lignina peroxidase possui um alto potencial redox e oxida compostos na presença de peróxido de hidrogênio (WONG, 2009). Essa enzima oxida regiões fenólicas e promove a quebra das ligações C-C e C-O-C das regiões não fenólicas da lignina sem a necessidade de um mediador (RODRIGUES; MENDES; PACHECO, 2013). O ciclo catalítico é iniciado com a oxidação do ferro III a ferro IV pelo peróxido de hidrogênio tornando a LiP nativa em LiP I que reage com um substrato redutor formando a LiP II (Figura 21) (WONG, 2009). Os substratos fenólicos (guaiacol, álcool vanílico, catecol, etc.) são oxidados na redução de LiP I a LiP II formando radicais fenoxil. A oxidação de regiões não fenólicas da lignina é feita via ação de radicais catiônicos, oxidados pela enzima (NETO, 2012). O álcool veratrílico também atua como um mediador redox na degradação da lignina. Essa classe de enzimas pode ser utilizada em modelo de biorrefinaria, indústria têxtil, indústria farmacêutica e biorremediação de áreas contaminadas (FALADE *et al.*, 2017).



**Figura 21.** Ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase.  
 Fonte: Retirado de Wong (2009)

A manganês peroxidase (MnP) é dependente de peróxido de hidrogênio e de manganês. A MnP oxida os íons Mn (II) para Mn (III), onde o complexo Mn (III) irá atuar como mediador redox das estruturas fenólicas da lignina (Figura 22) (WONG, 2009). Para oxidar estruturas não fenólicas, a MnP necessita de um segundo mediador, como por exemplo os ácidos orgânicos, para a formação de radicais reativos que irão atuar na desconstrução da lignina (NETO, 2012). A MnP é utilizada em aplicações biotecnológicas como o branqueamento de polpa Kraft e celulose e a remoção de resíduos poluentes (COELHO, 2007).



**Figura 22.** Ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase.  
 Fonte: Retirado de Ventura (2015)

As peroxidases versáteis são enzimas que apresentam atividade híbridas de lignina peroxidase e manganês peroxidase (RODRIGUES; MENDES; PACHECO, 2013). Esta enzima oxida o Mn (II) a Mn (III), assim como observado no ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase. Na ausência de Mn, essa enzima também é capaz de oxidar compostos fenólicos e não fenólicos utilizando o álcool veratrílico como mediador, assim como a lignina peroxidase (WONG, 2009).

A DyP peroxidase (*dye-type peroxidase*) é membro de uma nova família de heme peroxidases (SUGANO, 2009). Essa enzima possui capacidade de degradar corantes. A DyP peroxidase não é similar às outras peroxidases descritas (GONZALO *et al.*, 2016). Essas enzimas são classificadas de A-D, baseadas em similaridades de regiões na sequência gênica. As classes A-C são encontradas em bactérias e D em fungos (GONZALO *et al.*, 2016). Oxidam uma série de compostos fenólicos, incluindo dímeros de guaiacil- $\beta$ -glicerol éter da lignina (VAN BLOOIS *et al.*, 2010). Algumas DyPs bacterianas como as de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas putida* oxidaram compostos como o álcool veratrílico (GONZALO *et al.*, 2016; VAN BLOOIS *et al.*, 2010).

#### 2.4.4. Outras enzimas envolvidas na degradação da lignina

Além das enzimas ligninolíticas anteriormente descritas outras classes de enzimas bacterianas parecem estar envolvidas na modificação da estrutura da lignina. Alcalde (2015), Gonzalo *et al.* (2016) e Mallison *et al.* (2018) citam outras classes de enzimas que poderiam estar envolvidas em diferentes estágios dos processo de desconstrução da lignina (Tabela 3).

**Tabela 3.** Enzimas envolvidas na degradação da lignina de forma direta através da geração de radicais reativos ou de forma indireta através da reposição de peróxido de hidrogênio ou redução do ferro no meio para atuação das peroxidases

Enzima	Atividade
Peroxigenases inespecíficas	Atua como monoxigenase inserindo oxigênio em uma ampla faixa de substratos, incluindo anéis aromáticos. Catalisa a oxidação de um elétron de substratos. Link evolutivo entre peroxidases e citocromo P450 (ALCALDE, 2015).
Aril- álcool oxidases Glioal oxidases	Enzimas auxiliares que fornecem peróxido de hidrogênio às peroxidases e peroxigenases durante a degradação da lignina (ALCALDE, 2015).

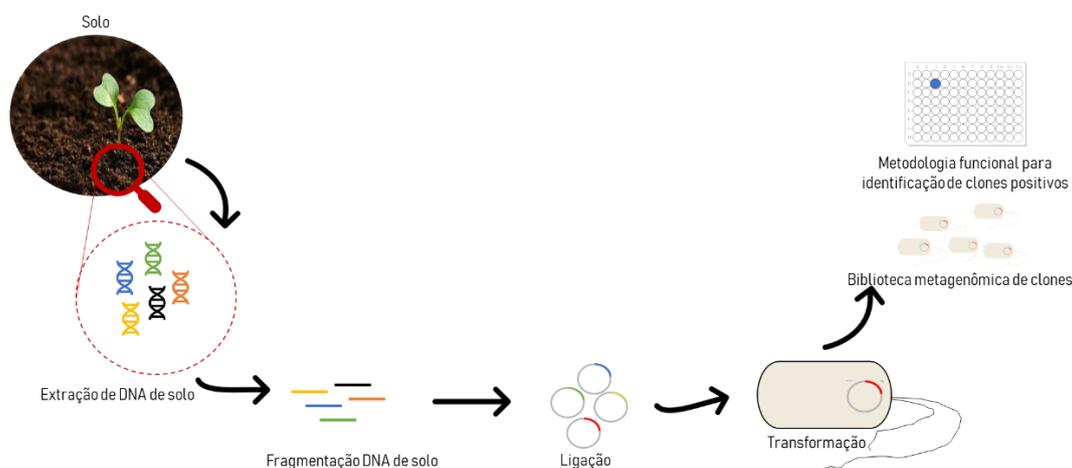
Metano oxidases	
Superóxido dismutase	Atua na proteção do estresse oxidativo na célula. Produz radicais hidroxilas que oxidam a lignina (GONZALO <i>et al.</i> , 2016; RASHID <i>et al.</i> , 2015).
Celobiose desidrogenase	Enzimas auxiliares redutoras de ferro que auxiliam a atividade das heme peroxidases (ALCALDE, 2015).
Quinona redutase	
Glutathiona dependente de $\beta$ -eterases	Cliva as ligações $\beta$ -éter da lignina (GONZALO <i>et al.</i> , 2016; PICART; MARÍA; SCHALLMEY, 2015)
Citocromo P450	O-desmetilação de éteres aril de compostos derivados do álcool coniferílico e sinapílico da lignina (MALLINSON <i>et al.</i> , 2018).

## 2.5. Abordagem metagenômica

A diversidade microbiológica é vista como fonte para a prospecção de novos genes para aplicação em processos biológicos na indústria têxtil, energética, farmacêutica, alimentícia e indústria de polpa e papel (FUNNICELLI, 2018; LI *et al.*, 2012b). O acesso à diversidade genética e metabólica dos microrganismos por métodos clássicos de cultivo pode encontrar barreiras, uma vez que não se pode cultivar ou não se conhece todos os requerimentos nutricionais dos microrganismos para permitir o seu crescimento em um ambiente laboratorial. A abordagem metagenômica permite acessar o conjunto de genomas da comunidade microbiana para prospecção e genes de interesse biotecnológicos sem a necessidade de cultivo (OULAS *et al.*, 2015). Uma vez que o DNA ambiental é extraído, diferentes abordagens podem ser utilizadas para estudar o genoma coletado: I. Através do sequenciamento total do metagenoma da amostra ambiental para posterior comparação com amostras de banco de dados; II. Por construções de bibliotecas metagenômicas para *screenings* para identificação dos fenótipos de interesse (QUIRINO *et al.*, 2013; SOUTO *et al.*, 2013).

Nessa última abordagem o DNA ambiental é extraído, fragmentando e clonado em vetores de expressão (Figura 23) (SOUTO *et al.*, 2013). Para bibliotecas de grandes insertos os fragmentos são clonados em fagos, fosmídeos ou cosmídeos. Para bibliotecas de pequenos ou médios insertos os fragmentos são ligados em vetores de expressão plasmidiais. Os clones, obtidos a partir da ligação do vetor com os insertos, podem ser transformados em *Escherichia coli* para triagem de atividades enzimáticas de interesse

(SOUTO *et al.*, 2013). Outras bactérias também podem ser utilizadas como hospedeiras. Para degradação de compostos aromáticos, *Pseudomonas putida* é um organismo modelo (JIMÉNEZ *et al.*, 2002).



**Figura 23.** Construção de uma biblioteca metagenômica a partir do DNA microbiano de uma comunidade de solo. O DNA é extraído, fragmentado por enzimas de restrição e ligado em vetor de expressão. Os clones são transformados em um hospedeiro formando uma biblioteca metagenômica. A biblioteca pode ser triada por metodologia funcional para identificação do fenótipo de interesse.

Diferentes metodologias funcionais e baseadas em sequência podem ser utilizadas para triar a biblioteca (OULAS *et al.*, 2015; QUIRINO *et al.*, 2013). As metodologias funcionais podem ser realizadas diretamente no meio com o substrato de interesse ou por metodologia de complementação. Pela metodologia de complementação o hospedeiro escolhido deve carecer da atividade que se busca, assim o clone da biblioteca atuará complementando a atividade de interesse. As metodologias baseadas na sequência usam *primers* específicos para identificação dos genes de interesse através da reação em cadeia da polimerase – PCR.

Por meio da abordagem metagenômica foram identificadas enzimas de diferentes espécies bacterianas que degradam a lignina presente na biomassa lignocelulósica. Por uma abordagem baseada na sequência, Fang *et al.* (2011) identificaram uma lacase bacteriana (Lac15) de 432 aminoácidos a partir do metagenoma de uma comunidade do mar do China Meridional. A enzima Lac15 possui três domínios de cobre conservados em seu sítio ativo com 84 % de identidade com uma lacase da espécie *Roseobacter sp.*

Para identificar enzimas ligninolíticas na microbiota intestinal de panda, uma biblioteca metagenômica foi construída com o metagenoma da comunidade microbiana e

triada por duas metodologias: uma funcional e outra baseada na sequência (FANG *et al.*, 2012). Na metodologia funcional, os clones da biblioteca foram inoculados em meios de culturas com guaiacol e siringaldazina como única fonte de carbono. Essa metodologia não identificou nenhum clone positivo. Na metodologia baseada na sequência, *primers*, desenhados a partir de sítios conservados de lacase bacterianas já descritas, foram utilizados para amplificar fragmentos de interesse. Duas multicobres oxidases do tipo lacase foram identificadas, Lac51 e Lac9, ambas provenientes da bactéria do gênero *Pseudomonas* sp. (FANG *et al.*, 2012). Ausec *et al.* (2017) também identificaram uma multicobre oxidase com atividade de lacase a partir de uma biblioteca metagenômica de solo ácido de pântano por uma metodologia baseada na sequência. A enzima possui similaridade com sequências de *Candidatus solibacter* do filo Acidobacteria.

Uma multicobre oxidase com atividade lacase foi isolada por uma metodologia funcional em *screenings* de uma biblioteca metagenômica de solo de mangue (YE *et al.*, 2010). O DNA da comunidade foi extraído, fragmentado e clonado em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Os clones foram crescidos em meio de cultura e posteriormente lisados. A atividade do extrato bruto foi analisada na presença de 1 mM de guaiacol. Uma enzima de 500 aminoácidos foi isolada com identidade de 52 % para uma sequência de aminoácidos que codifica a enzima lacase da espécie *Bacillus halodurans* (YE *et al.*, 2010).

Em outro trabalho, utilizando uma biblioteca metagenômica de rúmen de bovinos o gene RL5 foi identificado. Esse gene codifica para uma fenoloxidase (BELOQUI *et al.*, 2006). A enzima expressa no hospedeiro *Escherichia coli* foi capaz de oxidar uma série de reagentes aromáticos: siringaldazina, guaiacol, álcool veratrílico, entre outros. Análises de bioinformática sugerem que o gene encontrado é similar a uma polifenol oxidase do gênero *Bacteroides* (BELOQUI *et al.*, 2006).

### **3. JUSTIFICATIVA**

A biomassa lignocelulósica utilizada em modelos de biorrefinarias é uma matéria-prima renovável não competitiva com a indústria alimentícia que contribui para o desenvolvimento sustentável. A lignina é uma fonte de compostos fenólicos de interesse industrial e a sua transformação biológica permite o uso integral da biomassa, agregando valor a um resíduo agroindustrial. A resistência à degradação química e enzimática dificulta a utilização da lignina como matéria-prima para a geração de bioprodutos.

Entretanto, fungos e bactérias são capazes de driblar a sua recalcitrância e degradá-la por meio de enzimas oxirredutases. Do ponto de vista biotecnológico, a diversidade bacteriana pode ser explorada para identificação de novas enzimas ligninolíticas. Mas, o processo de biodegradação da lignina ainda não foi bem caracterizado. A abordagem metagenômica é uma técnica promissora para prospecção de genes de interesse biotecnológico. A metagenômica possibilita a identificação de novas enzimas que irão promover a valorização da lignina através da sua degradação e conversão em produtos de valor agregado.

#### 4. OBJETIVO GERAL

Utilizar o DNA da sexta passagem de um consórcio microbiano inoculado com o solo *Miracle Growth*, enriquecido por seis semanas com lignina extraída por método alcalino e cultivado a 37 °C para construir uma biblioteca metagenômica para identificar novas enzimas que modifiquem a lignina.

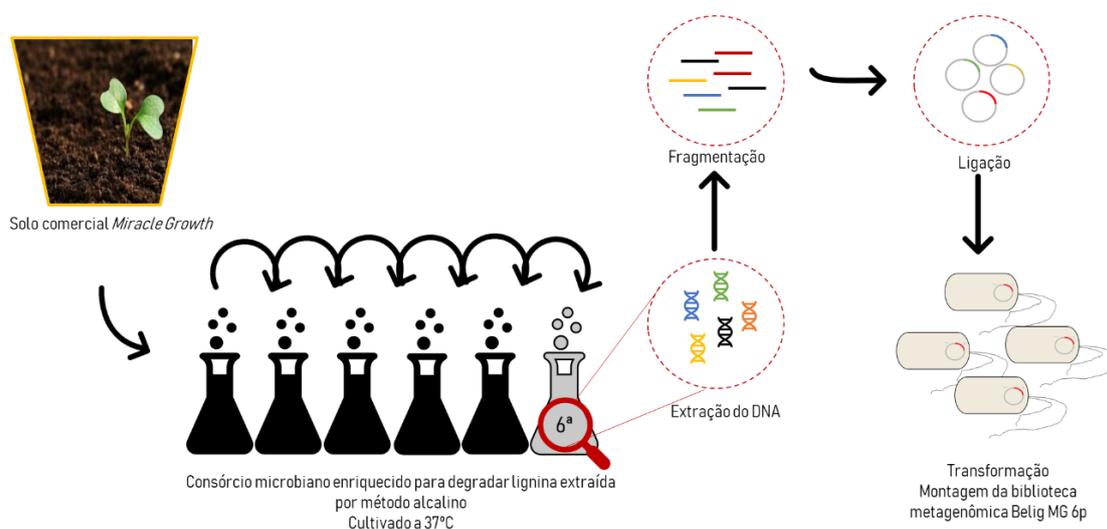
##### 4.1. Objetivos específicos

- ◆ Transformar os clones biblioteca BELig MG 6p em *Escherichia coli* HB101 e em *Pseudomonas putida* KT2440;
- ◆ Validar a expressão dos clones e confirmar a presença de diferentes padrões de insertos;
- ◆ Definir um protocolo e realizar *screenings* funcionais para identificar enzimas ligninolíticas bacterianas;
- ◆ Realizar metodologia baseada na sequência para identificar enzimas ligninolíticas bacterianas;
- ◆ Realizar uma metodologia funcional por complementação para consumo de guaiacol em *Pseudomonas putida* KT2440;
- ◆ Analisar as sequências consensos comparando-as ao banco de dados nr no GenBank (NCBI) utilizando blastx e blastn;
- ◆ Montar uma árvore filogenética para as enzimas ligninolíticas encontradas no programa MEGA.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Construção da biblioteca metagenômica BE-lig MG 6p 37 °C

A biblioteca metagenômica, Belig MG 6P, foi construída pela Dra. Betania Quirino (2016) no Joint Bioenergy Institute (Emeryville, CA, EUA) (Figura 24). O DNA da sexta passagem do consórcio microbiano *Miracle Growth* enriquecido para degradar lignina foi extraído pelo protocolo descrito por DeAngelis *et al.* (2010) e purificado com o Kit QIagen DNA RNA All prep. A construção da biblioteca metagenômica foi realizada conforme descrito anteriormente por Nagayama *et al.* (2015). Fragmentos de 2-8 kb do DNA ambiental (eDNA) foram clonados no plasmídeo de amplo espectro pBTL-2 (Addgene). Foi possível importar a ligação (pBTL-2 com insertos do DNA do consórcio), mas não foi possível importar a biblioteca metagenômica para o Brasil. Sendo assim, a ligação foi re-transformada em hospedeiros adequados. A biblioteca utilizada no âmbito desse trabalho foi intitulada Belig MG 6P. Belig de lignina extraída por método alcalino, MG de solo *Miracle Growth* e 6P referência ao DNA utilizado da sexta passagem do consórcio microbiano MG BE 37 °C.



**Figura 24.** Construção da biblioteca metagenômica Belig MG 6p a partir do DNA da sexta passagem de um consórcio microbiano inoculado com solo comercial *Miracle Growth* enriquecido para degradar lignina extraída por método alcalina e cultivado a 37 °C.

### 5.2. Escolha dos hospedeiros

Os clones biblioteca Belig MG 6p (pBTL2 com insertos do DNA do consórcio), foram transformados por eletroporação em *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e *Escherichia coli* Top 10, segundo o protocolo de Lynch e Gill (2006) e em

*Pseudomonas putida* KT2440, segundo o protocolo do Wargo Laboratory (CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006). Para a transformação das cepas de *Escherichia coli* foram utilizadas cubetas de eletroporação de 1 mm. Para transformação da cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 foram utilizadas cubetas de eletroporação de 2 mm. O vetor de amplo espectro pBTL-2 (Addgene) também foi inserido em cada uma das cepas e utilizado como controle negativo. Após a eletroporação, os transformantes foram inoculados em meio SOC (2 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> e 20 mM glicose) e incubados em um termomixer com 200 rpm de agitação a 37 °C para *Escherichia coli* e a 30 °C para *Pseudomonas putida* KT2440 por uma hora para a recuperação das células (HANAHAN, 1983). Em seguida, foi inoculado 100 µl das transformações em diluições de 1:1000 em placas de petri de 150 mm x 15 mm contendo meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar) suplementado com 100 µg/mL de canamicina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C para *Escherichia coli* e a 30 °C para *Pseudomonas putida* KT2440 por cerca de 18 horas.

Para validar a expressão dos clones da biblioteca por ensaio de β-glicosidase, os transformantes também foram inoculadas em placas de petri de 90 mm x 15 mm contendo meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar) suplementado com 100 µg/mL de canamicina, 0,6 g/L de esculina e 0,5 g/L citrato férrico e 0,8 mM de IPTG (EBERHART; CROSS; CHASE, 1964). As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica a 37 °C para *Escherichia coli* e 30 °C para *Pseudomonas putida* KT2440 por cerca de 18 horas. Neste ensaio, os clones da biblioteca transformada que expressem a proteína β-glicosidase, convertem a esculina em esculetina na presença de íons Fe<sup>3+</sup> originando um precipitado escuro (TREPETA; EDBERG, 1987).

### **5.3. Transformação da ligação (pBTL2 com insertos do DNA do consórcio) em *Escherichia coli* HB101**

Os clones da biblioteca Belig MG 6p foram transformados em células de *Escherichia coli* HB101 por eletroporação em cubetas de 1 mm. Inicialmente para o teste de diluição foi realizada uma única transformação. O transformante foi inoculado em meio SOC (2 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> e 20 mM glicose) e então incubado em um termomixer com 200 rpm de agitação a 37 °C para a recuperação das células (HANAHAN, 1983). Em seguida o transformante foi inoculado em diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 em placas de petri de

150 mm x 15 mm contendo meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar) suplementado com 100 µg/mL de Canamicina para calibrar a quantidade necessária de transformante plaqueado para obter colônias individualizadas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 horas.

Após a escolha da diluição adequada, foram realizadas sete transformações com os clones da biblioteca Belig MG 6P em células de *Escherichia coli* HB101. Os transformantes foram inoculados em meio SOC (2 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> e 20 mM glicose) e então incubados em um termomixer com 200 rpm de agitação a 37 °C por uma hora para a recuperação das células (HANAHAN, 1983). Em seguida foi inoculado 100 µl em diluições de 1:1000 em 70 placas de petri de 150 mm x 15 mm contendo meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar) suplementado com 100 µg/mL de Canamicina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 horas para promover o crescimento celular.

Colônias aleatórias foram individualizadas em placas de Elisa 96 poços contendo meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl) e crescidas a 37 °C por 18 horas em estufa bacteriológica. Posteriormente, foi adicionado glicerol para uma concentração final de 20 % em cada poço das placas e essas foram armazenadas a -80 °C. Foram montadas 66 placas de Elisa totalizando 6.336 clones individualizados. O restante das colônias foi raspado das placas com uma alça de Drigalski e meio Luria Bertani e o inóculo resultante foi armazenado em tubos criogênicos com concentração final de glicerol a 20 % e estocado a -80 °C.

#### **5.4. Transformação da ligação (pBTL2 com insertos do DNA do consórcio) em *Pseudomonas putida* KT2440**

No fluxo laminar foram riscadas dez placas de petri com meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar) com a cepa de *Pseudomonas putida* KT2440. As placas foram armazenadas por 48 horas em uma estufa bacteriológica a 30 °C para o crescimento celular. As colônias foram coletadas das placas e foi feita três transformação por eletroporação em cubetas de 2 mm com o DNA da biblioteca metagenômica Belig MG 6p, segundo o protocolo do Wargo Laboratory (CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006). Uma transformação adicional foi realizada com

o vetor de amplo espectro pBTL2 (Addgene) utilizado como controle negativo. Os transformantes foram inoculados em meio SOC (2 % triptona, 0.5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> e 20 mM glicose) e então incubados em um termomixer com 200 rpm de agitação a 30°C por uma hora para a recuperação das células (HANAHAN, 1983). Em seguida foi inoculado 100 µl em diluições de 1:1000 em 20 placas de petri de 150 mm x 15 mm contendo meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15g/L de ágar) suplementado com 100 µg/mL de canamicina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 18 horas. As colônias foram raspadas das placas com uma alça de Drigalski e meio Luria Bertani e o inóculo resultante foi armazenado em tubos criogênicos com a uma concentração final de glicerol a 20 % e estocados a -80 °C.

### **5.5. Validação da biblioteca: Confirmação do padrão de insertos**

Para a identificação do padrão de diferentes insertos 10 colônias aleatórias para cada transformação foram escolhidas e crescidas em meio líquido Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) com 100 µg/mL de Canamicina, por 12 horas a 37 °C ou 30 °C sobre agitação de 180 rpm para extração do seu DNA plasmidial e estoque em glicerol 20 %. O DNA plasmidial foi extraído segundo o protocolo do Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Para confirmar a presença dos insertos, os clones positivos foram digeridos com a enzima de restrição EcoRV fast digest (Thermo Scientific) a 37 °C por 30 minutos. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1 % utilizando o marcador GeneRuler 1kb plus SM1331(Thermo-Scientific) como referência.

### **5.6. Validação da atividade ligninolítica dos hospedeiros**

Para a avaliação da atividade ligninolítica das cepas *Escherichia coli* HB101 e *Pseudomonas putida* KT2440, foi realizado um teste de degradação dos corantes azul brilhante de remanzol (RBBR), azul de metileno e azure B (POINTING, 1999). Dois pré-inóculos foram preparados em falcons de 50 mL contendo 5 mL de meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl). A *Pseudomonas putida* KT2440 foi armazenada no *shaker* a 30 °C e a *Escherichia coli* HB101 foi armazenada no *shaker* a 37 °C por cerca de 18 horas com 180 rpm de agitação para promover o crescimento celular.

As cepas previamente crescidas foram inoculadas a  $OD_{600nm} = 0,1$  inicial em *erlenmeyers* contendo meio GLYB tamponado modificado (solução de sais de Bushnell Hass, 0,3 % extrato de levedura e 1 % de glicose) suplementado com 0,5 mM de  $CuSO_4$  (PASTORE, 2016). Em três meios de cultura foram adicionados 25 mg/L de azure B, em outros três 25 mg/L de azul de metileno e nos três restantes 25 mg/L azul brilhante de remanzol. Cada cepa foi inoculada em um frasco contendo meio de cultura GLYB suplementado com um corante. Os três meios restantes, um para cada corante, foram utilizados como controle negativo. Os inóculos foram armazenados no *shaker* a 30 °C e a 37 °C de acordo com a temperatura de crescimento de cada cepa por 72 horas. Uma alíquota para cada inóculo foi centrifugada a 2.950 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e a densidade óptica (OD) foi lida em um intervalo de 24, 48 e 72 horas para cada um dos nove *erlenmeyers*. Para o corante Azure B foi lida a  $OD_{638nm}$ . Para o corante Azul de metileno foi lida a  $OD_{665nm}$ . Para o corante azul brilhante de remanzol foi lida a densidade óptica  $OD_{562nm}$ . Os dados obtidos foram plotados em gráficos do excel. A descoloração do corante ao longo do tempo é dada pela seguinte fórmula: Descoloração (%) =  $[(OD \text{ inicial} - OD \text{ final}) / OD \text{ inicial}] \times 100$ .

## **5.7. Construção de uma metodologia funcional para identificar enzimas ligninolíticas na biblioteca metagenômica Belig MG 6p 37 °C em *Escherichia coli* HB101**

### **5.7.1. Escolha dos meios de cultura**

Inicialmente a *Escherichia coli* HB101 foi transformada por eletroporação com o vetor de amplo espectro pBTL-2 (Addgene) em cubetas de 1 mm. O transformante foi recuperado em meio SOC (2 % tripton, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $MgSO_4$  e 20 mM glicose) e incubados em um termomixer com 200 rpm de agitação a 37 °C por uma hora (HANAHAN, 1983). As células eletroporadas foram inoculadas em placas de petri de 90 mm x 15 mm contendo diferentes meios de cultura suplementados com o antibiótico de seleção, 100 µg/mL de canamicina, para avaliar a taxa de crescimento. Os meios utilizados foram:

- I. Meio mínimo MSM com 10 g/L de lignina Kraft (Sigma-Aldrich 471003) como única fonte de carbono (POINTING, 1999);

- II. Meio LYB - 1L de solução de sais de Bushnell Hass, 0,3 % de lignina Kraft (Sigma-Aldrich 471003) e 0,3 % de extrato de levedura (PASTORE, 2016);
- III. Meio GLYB - 1L de solução de sais de Bushnell Hass, 0,3 % de lignina Kraft (Sigma-Aldrich 471003) 0,3 %, extrato de levedura e 1 % de glicose (PASTORE, 2016);
- IV. Meio Lan - 10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 0,3 % de lignina Kraft (Sigma-Aldrich 471003) (PASTORE, 2016);
- V. Meio M9 (Sigma-Aldrich) suplementado com solução A9, 1 mM 10 g/L de glicose (ABRIL *et al.*, 1989);
- VI. Meio mínimo SM3 suplementado com 10 g/L de glicose (ROTHEN *et al.*, 1998);
- VII. Meio de cultura Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl).

### **5.7.2. Escolha dos substratos aromáticos para o ensaio de detecção de enzimas ligninolíticas**

O protocolo realizado foi adaptado do trabalho de Reiss *et al.* (2013). Para a escolha dos reagentes, um teste inicial de atividade oxidativa foi realizado com 11 reagentes: três ácidos carboxílicos aromáticos, ácido ferúlico, ácido gálico e ácido sinapílico; cinco álcoois aromáticos, catecol, 4-metilcatecol, guaiacol, hidroquinona e ácido veratrílico; dois aldeídos aromáticos, vanilina e siringaldeído; e um polifenol o ácido tânico.

No fluxo laminar, foi adicionado 100 µl de tampão fosfato-potássio 100mM pH 6 (17,4 g/L fosfato dipotássico e 13,6 g/L de fosfato monopotássico) suplementado com 1 mM CuSO<sub>4</sub> e 5 mM de cada reagente em cada poço da placa Elisa de 96 poços de fundo chato. Para avaliar a oxidação dos reagentes, foram utilizados como controles positivos a lacase de *Pleurotus ostreatus* (Sigma-Aldrich BCBD6229V) e a manganês peroxidase de *Nematoloma frowardii* (Sigma- Aldrich BCBC3643V). Para o teste com a peroxidase, o meio foi suplementado com 2 mM de peróxido de hidrogênio e 2 mM de manganês. Também foi adicionado 100 µL do inóculo de *Escherichia coli* HB101 transformada com o vetor pBTL-2 (Addgene) crescida em meio líquido Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) com 100 µg/mL de canamicina por 12 horas a 37 °C sobre agitação de 180 rpm.

No espectrofotômetro foi realizada a leitura inicial e final da densidade óptica OD para os reagentes: OD<sub>312nm</sub> para ácido ferúlico, OD<sub>270nm</sub> para ácido gálico, OD<sub>307nm</sub> para ácido sinapílico, OD<sub>450nm</sub> para catecol, OD<sub>400nm</sub> para 4-metilcatecol, OD<sub>465nm</sub> para guaiacol, OD<sub>390nm</sub> para hidroquinona, OD<sub>310nm</sub> para ácido veratrílico, OD<sub>353nm</sub> para vanilina, OD<sub>320nm</sub> para siringaldeído e OD<sub>458nm</sub> para ácido tânico (REISS *et al.*, 2013).

### 5.7.3. Escolha dos padrões de aeração e crescimento celular

Os clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p individualizados em placas de Elisa 96 poços foram carimbados em uma placa *deep well* de 96 poços contendo 300 µl de meio Luria Bertani (10 g/L tripton, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl) suplementado com 100 µg/mL de canamicina e incubado em diferentes meios e condições de rotação. As três concentrações de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) foram testadas sendo adicionadas no primeiro tempo de incubação, ao preparo do inóculo, e no segundo tempo de incubação junto com a atividade oxidativa. A presença ou ausência da glicose também foi avaliada. Diferentes tempos e modos de incubação também foram testados para otimizar o protocolo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Construção da metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas através de diferentes concentrações de glicose e CuSO<sub>4</sub> adicionados em diferentes tempos e modos de incubação dos clones da biblioteca.

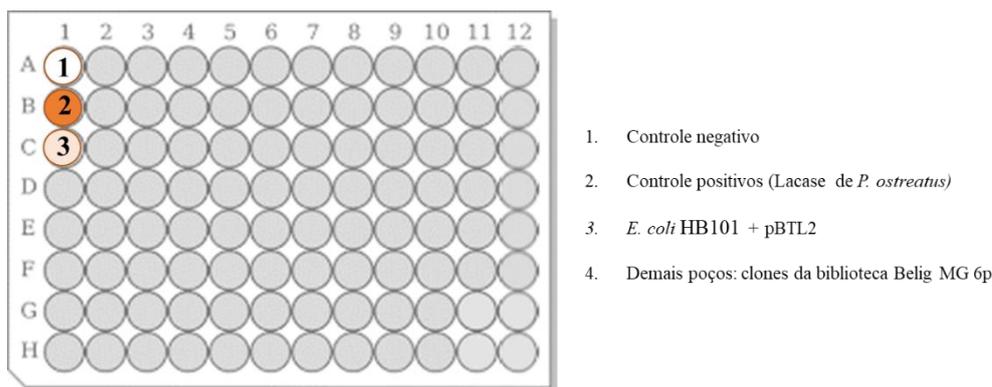
Reagentes e Rotação	Condições	Modo de incubação
Glicose	ausência ou presença (1 %)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 48h na estufa</li> <li>▪ 24 h no shaker e 24 h na estufa</li> <li>▪ 24 h no shaker e 24 h no shaker</li> <li>▪ 24 h no shaker, 24 h na estufa e 24 h no shaker</li> </ul>
Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> )	0,25 mM, 0,5 mM e 1 mM	
Rotação	180 rpm e 250 rpm	

### 5.8. Metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas na biblioteca Belig MG 6p 37 °C em *Escherichia coli* HB101

Essa metodologia é baseada na utilização dos compostos aromáticos guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico avaliando a capacidade oxidativa ao longo do tempo por parte dos clones da biblioteca. As placas de Elisa da biblioteca Belig MG 6P da 1 a 34, contendo os clones individualizados, foram carimbadas em uma placa *deep*

*well* de 96 poços contendo 300 µl meio Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) suplementado com 100 µg/mL de canamicina. A placa foi vedada e armazenada no *shaker* a 37 °C, 250 rpm por 16 horas para promover o crescimento celular.

Após o período de incubação, 100 µl do inóculo de cada placa *deep well*, foi transferido para uma nova placa de Elisa 96 poços de fundo chato (Figura 25). Em todos os poços da nova placa de Elisa também foi adicionado 100µL do tampão de fosfato-potássio 100 mM pH 6 (17,4 g/L fosfato dipotássico e 13,6 g/L de fosfato monopotássico) suplementado com 0,2 mM de IPTG, 100 µg/ml de canamicina, 0,25 mM sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) e 5 mM do reagente aromático. O poço 1A era o controle negativo e nenhum inóculo foi adicionado. No poço 2A foi adicionado a mais 0,5 µl da lacase de *Pleurotus ostreatus* (Sigma-Aldrich BCBD6229V) utilizada como controle positivo. O poço 3A foi inoculado com a *Escherichia coli* HB101 transformada com o vetor pBTL-2 (Addgene).



**Figura 25.** Mapa da placa de elisa 96 poços inoculada com os clones da biblioteca e os respectivos controles para a execução do *screening* funcional baseado na oxidação de compostos aromáticos.

As placas foram vedadas com adesivos e foi realizado a leitura da densidade óptica OD inicial para o crescimento celular OD<sub>600nm</sub>, e para os reagentes OD<sub>465nm</sub> para o guaiacol, OD<sub>450nm</sub> para catecol, OD<sub>400nm</sub> para 4-metilcatecol e OD<sub>312nm</sub> para o ácido ferúlico (REISS *et al.*, 2013). Em seguida, as placas foram incubadas no *shaker* a 37 °C, 250 rpm por 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram vortexadas e a leitura da taxa de crescimento e da oxidação dos reagentes foi realizada no espectrofotômetro. O resultado da oxidação dos reagentes ao longo de 24 horas é dado por: variação da atividade = atividade final - atividade inicial. A variação no crescimento é dada por: variação do crescimento = crescimento final – crescimento inicial.

### 5.9. Corroboração dos fenótipos dos transformantes

Os clones que apresentaram atividade positiva para a oxidação do guaiacol e ácido ferúlico foram reconfirmados. Os potenciais clones positivos foram estriados em placa de petri de 90 mm x 15 mm contendo meio Luria Bertani suplementado com 100 µg/mL de canamicina. As placas foram armazenadas na estufa bacteriológica a 37 °C por cerca de 18 horas. Após o crescimento celular, foram preparados três inóculos (triplicata biológica) em 5 mL de meio Luria Bertani suplementado com 100 µg/mL de canamicina para cada clone positivo. Os falcons foram incubados no *shaker* a 37 °C, 250 rpm por 18 horas para promover o crescimento celular.

Os inóculos foram transferidos para placas de Elisa 96 poços de fundo chato com a  $OD_{600nm} = 0,5$  inicial. A metodologia funcional anteriormente descrita foi repetida com quatro reagentes para serem oxidados: guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico. As placas foram vedadas com adesivos e foi realizada a leitura inicial da densidade óptica OD inicial para o crescimento celular  $OD_{600nm}$ , e para os reagentes  $OD_{465nm}$  para o guaiacol,  $OD_{450nm}$  para catecol,  $OD_{400nm}$  para 4-metilcatecol e  $OD_{312nm}$  para o ácido ferúlico (REISS et al., 2013). Em seguida, as placas foram incubadas no *shaker* a 37 °C, 250 rpm por 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram vortexadas e a leitura da taxa de crescimento e da oxidação dos reagentes foi realizada no espectrofotômetro. O resultado da oxidação dos reagentes ao longo de 24 horas é dado por: variação da atividade = atividade final - atividade inicial. A variação no crescimento é dada por: variação do crescimento = crescimento final – crescimento inicial.

Os clones que apresentaram novamente a atividade oxidativa dos reagentes foram cultivados em meio líquido Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) suplementado com 100 µg/mL de canamicina, por 12 horas a 37 °C sobre agitação de 180 rpm para extração do seu DNA plasmidial. O DNA plasmidial foi isolado das colônias segundo o protocolo do Wizard® Plus SV Minipreps (Promega). Para confirmar a presença do inserto, os clones positivos foram digeridos com a enzima de restrição EcoRV (Thermo-Scientific) a 37 °C por 30 minutos. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o marcador GeneRuler 1kb plus SM1331(Thermo-Scientific) como referência. Os clones com insertos de padrões distintos foram enviados para sequenciamento por terceiros.

### **5.10. Metodologia funcional por complementação da atividade em**

#### ***Pseudomonas putida* KT2440**

A metodologia da biblioteca para a prospecção de genes que permitem o consumo de guaiacol foi realizado por uma técnica baseada na complementação da função em *Pseudomonas putida* KT2440. A partir do estoque da biblioteca Belig MG 6p transformada em *Pseudomonas putida* KT2440, foi realizado um inóculo em falcon de 50 mL com 5 mL de meio Luria Bertani suplementando com 100 µl/mL de canamicina. O vetor de amplo espectro pBTL-2 (Addgene) foi transformado em células de *Pseudomonas putida* KT2440 por eletroporação e utilizado como controle negativo (CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006). Os inóculos foram incubados no *shaker* a 30 °C por cerca de 18 horas para o crescimento celular. Em seguida, as células foram lavadas para a retirada de qualquer fonte de carbono com STE (20 mL/L NaCl 5 M, 10 mL/L Tris HCl 1 M pH 8,0 e 1 mL/L EDTA 0,5 M pH 8,0) (GREEN; SAMBROOK, 2012). As células lavadas foram inoculadas em meio líquido M9 (Sigma-Aldrich) suplementado com 100 µg/mL de canamicina, 2,5 mL de solução de elementos traços A9, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mg/ml de timina e enriquecido com 10 mM de guaiacol como única fonte de carbono por dois ciclos de passagens de 2 semanas cada, afim de selecionar os transformantes antes de serem plaqueados (Anexo A) (ABRIL *et al.*, 1989). A cada passagem uma alíquota foi retirada e plaqueada em meio mínimo M9 (Sigma-Aldrich) suplementado com 2,5 mL de solução de elementos traços A9, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mg/mL de timina, 15 g/L de ágar bacteriológico, 100 µg/µL de canamicina e 10 mM de guaiacol como única fonte de carbono (ABRIL *et al.*, 1989). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 15 dias – 30 dias.

### **5.11. Metodologia baseada na sequência para identificação de lacases na biblioteca metagenômica Belig MG 6p**

Na metodologia baseada na sequência, foram utilizados dois pares de *primers* construídos a partir de domínios conservados de lacases bacterianas já descritas que anelam nos domínios de sítios de ligação de cobre I e IV de lacases. O primeiro par de *primers* utilizado foi o descrito por AUSEC *et al.* (2011): Cu1AF (5' ACM WCB GTY CAY TGG CAY GG 3') e Cu4R (5' TGC TCV AGB AKR TGG CAG TG 3'). O segundo par de *primers* utilizado foi o descrito por FANG *et al.* (2011): Cu1AF (5' ACM WCK GTT CAY TGG CAC GG 3') e Cu4R (5' TGN TCN AGN AWG TGR CAR TG 3'). Para cada par de *primers* foi realizado o procedimento de reação em cadeia da polimerase

(PCR) utilizando 100 ng de DNA da biblioteca metagenômica Belig MG 6p como *template*, 0, 5 µM dos *primers*, 1x da Taq Phusion Flash High-Fidelity Master Mix (Thermo Scientific) e água livre de nucleases para completar o volume final da reação de 20 µl. Os parâmetros para a realização da amplificação para ambos os *primers* foram: desnaturação inicial 94 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 segundos, anelamento 48 °C por 30 segundos, extensão 72 °C por 1 minuto, após o término dos ciclos, extensão final 72 °C por 5 minutos.

As sequências originadas da PCR foram clonadas no vetor pJET (Thermo Scientific) segundo o protocolo CloneJET PCR Cloning Kit e transformadas em células *Escherichia coli* HB101 por eletroporação, conforme descrito anteriormente. A transformação foi plaqueada em meio sólido Luria Bertani com ampicilina 150 mg/mL. As colônias selecionadas foram crescidas em meio líquido Luria Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) com ampicilina 150 mg/mL, por 12 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. O DNA plasmidial foi extraído das colônias, segundo o protocolo Wizard® Plus SV Minipreps (Promega). Os clones foram digeridos com enzima de restrição BglII (Thermo Fisher Scientific). Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1 % utilizando o marcador GeneRuler 1kb plus SM1331(Thermo-Scientific) como referência. Por fim, os insertos dos escolhidos foram enviados para sequenciamento.

### **5.12. Análise de sequências**

Com as sequências dos potenciais clones positivos foram montados *contigs* no programa Geneious R7 (OLSEN, 2014). As sequências consensos geradas para cada clone foram comparados com as sequências presentes no banco de dados nr no GenBank (NCBI) utilizando a ferramenta *blastx* e *blastn* (MADDEN, 2002). A busca por domínios conservados foi feita no banco de dados InterPro (MITCHELL *et al.*, 2019). A busca por ORFs nos clones foram feitos no programa ORFfinder utilizando a ferramenta *Smart Blast* (WHEELER *et al.*, 2003). Para análise filogenética das enzimas de interesse foi construída uma árvore filogenética no programa MEGA 6 utilizando o método de maximum likelihood com bootstrap 1.000 (KUMAR *et al.*, 2018b).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Construção da biblioteca metagenômica Belig MG 6p 37 °C

Foi construída uma biblioteca metagenômica Belig MG 6p obtendo cerca de 41.620 clones em *E. coli*. A biblioteca metagenômica Belig MG 6p foi dividida em 1ª parte com 22.356 clones e 2ª parte com 19.264 clones. Todavia, essa biblioteca foi construída no laboratório do JGI (Joint Genome Institute, California) não sendo possível importar para o Brasil. Como citado anteriormente, a transformação da ligação (vetor pBTL-2 ligado com os fragmentos de DNA da sexta passagem do consórcio microbiano MG BE 37 °C) em hospedeiros bacterianos adequados foi refeita no Brasil. No âmbito desse trabalho apenas a 1ª parte da biblioteca metagenômica foi re-transformada e trabalhada.

Quatro potenciais hospedeiros bacterianos foram escolhidos para testar a transformação com os clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p, sendo que o resultado de cada teste não será mostrado nesse trabalho (Tabela 5). A cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi transformada com sucesso, mas não foi possível validar a expressão dos clones da biblioteca por ensaio de detecção de  $\beta$ -glicosidases. Não houve crescimento bacteriano com a transformação dos clones da biblioteca na cepa de *Escherichia coli* TOP 10. Por fim, a transformação e validação da biblioteca foi efetuada com sucesso apenas em duas cepas: *Escherichia coli* HB101 e *Pseudomonas putida* KT2440. Sendo esses os dois hospedeiros escolhidos para transformar os clones da biblioteca metagenômica.

No total 70 placas foram inoculadas com a transformação da ligação (pBTL2 com insertos do DNA da sexta passagem do consórcio MG BE 37 °C) em *E. coli* HB101, com uma média de 10.000 colônias por placa. No total, aproximadamente 700.000 colônias foram criopreservadas em glicerol, o que representa 33 vezes mais o número original de clones contabilizados. Para a transformação dos clones da biblioteca metagenômica em *P. putida* KT2440 foram plaqueadas 20 placas de petri com uma média de 8.000 clones por placa. Contabilizando cerca de 160.000 colônias transformadas criopreservadas, o que representa 7 vezes mais que número original de clones.

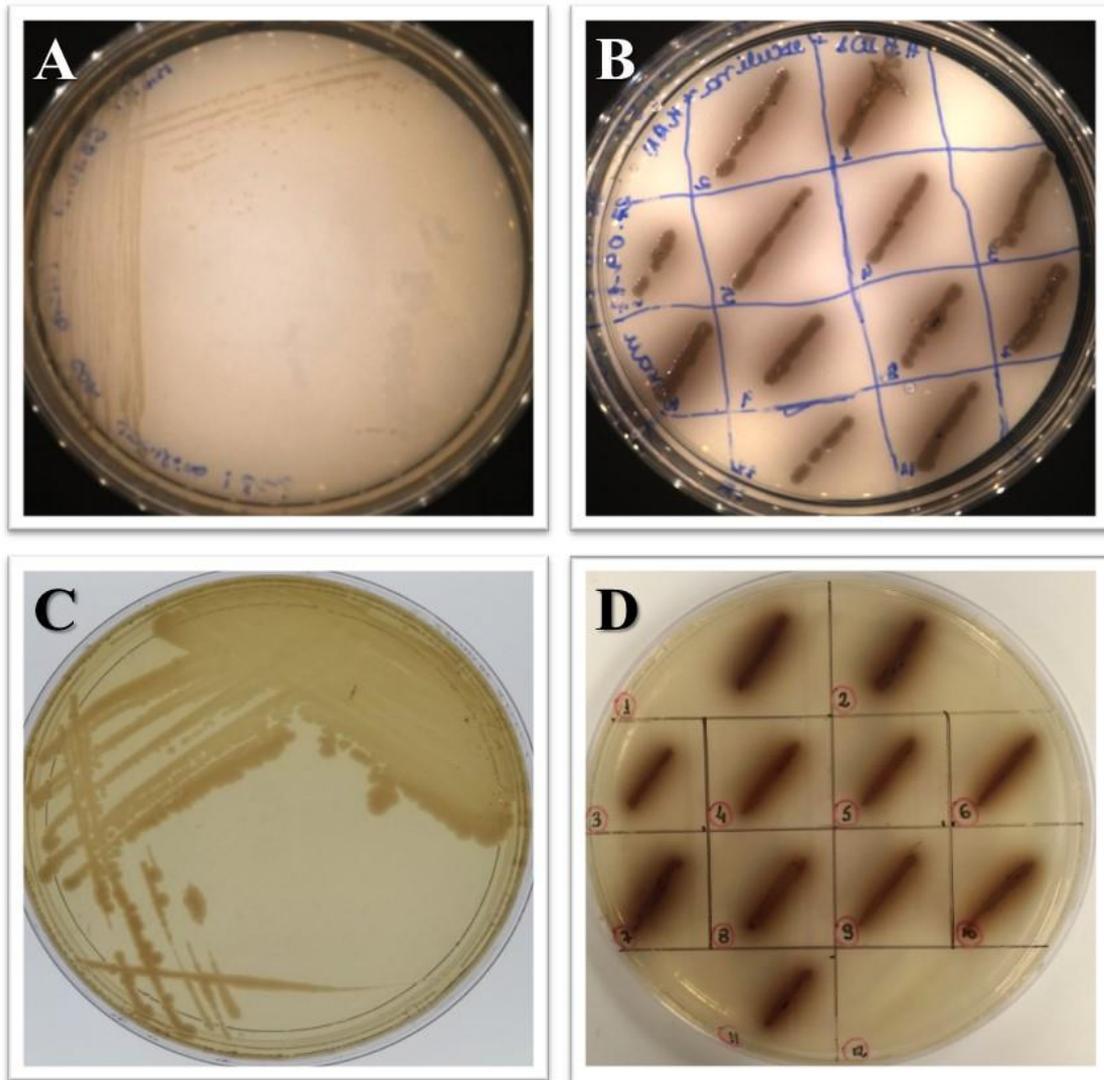
**Tabela 5.** Lista de hospedeiros e cepas transformados com os clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p 1ª parte. O "X" indica que a transformação e/ou validação da expressão por ensaio com  $\beta$ -glicosidase não funcionou. O " ✓ " indica que o hospedeiro foi escolhido e que a transformação e validação da expressão funcionaram.

Hospedeiro	DNA	Observações	Escolhido (s)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	pBTL-2 + insetos de Belig MG 6p	Foi possível transformar a biblioteca, mas não foi possível expressá-la	X
<i>Escherichia coli</i> Top10	pBTL-2 + insetos de Belig MG 6p	Não foi possível transformar a biblioteca	X
<i>Escherichia coli</i> HB101	pBTL-2 + insetos de Belig MG 6p	Foi possível transformar a biblioteca e expressá-la	✓
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	pBTL-2 + insetos de Belig MG 6p	Foi possível transformar a biblioteca e expressá-la	✓

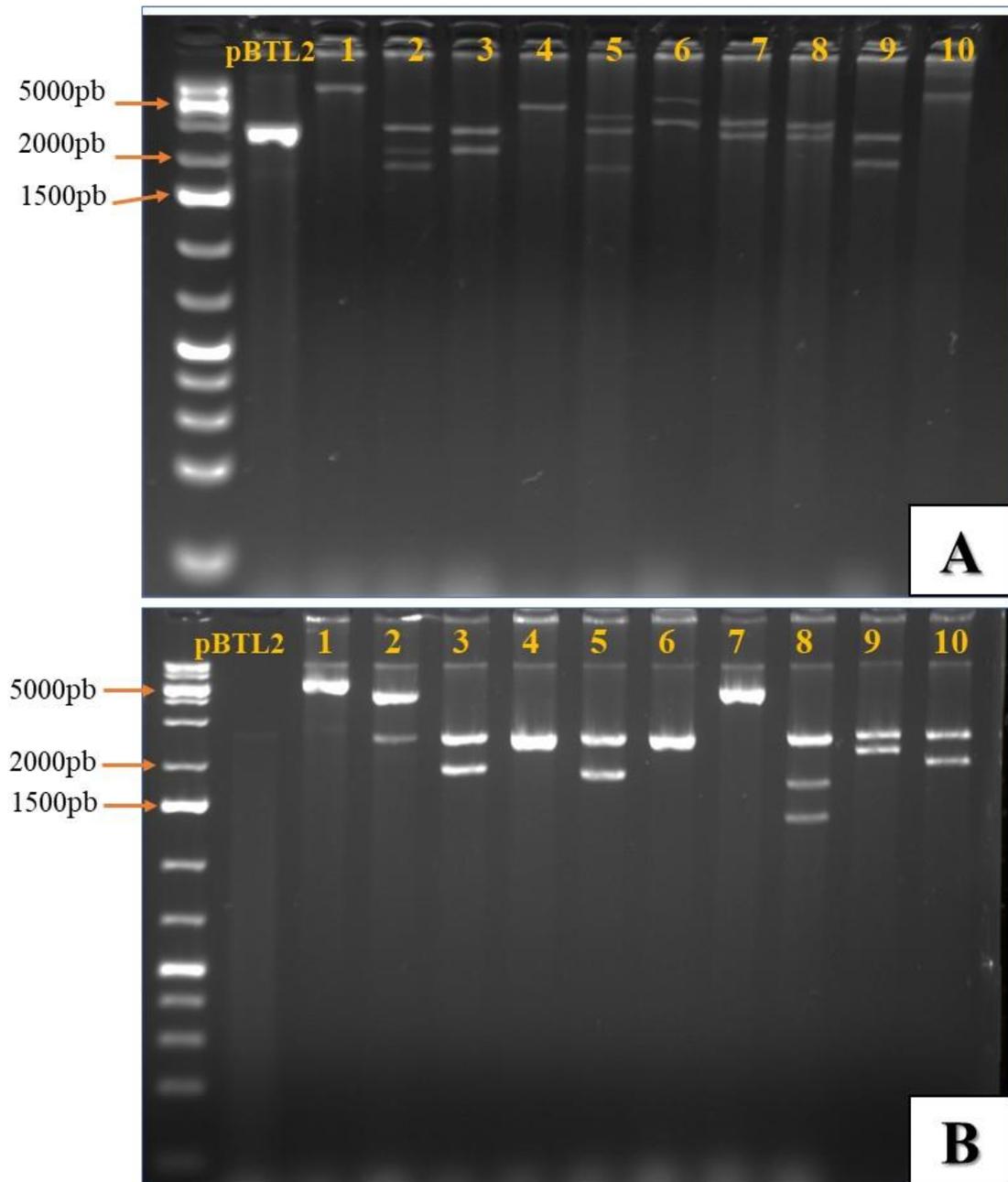
## 6.2. Validação da biblioteca metagenômica por ensaio de $\beta$ -glicosidase e análise dos padrões de insetos.

Nos clones da biblioteca metagenômica transformada em *E. coli* HB101 e *P. putida* KT240 foi possível detectar a atividade de  $\beta$ -glicosidases que na presença de íons de  $\text{Fe}^{3+}$  converteram a esculina em esculetina formando um precipitado escuro no meio (Figura 26). A presença de colônias escuras demonstra que o pBTL-2 está permitindo a expressão dos clones da biblioteca em ambos os hospedeiros. Os hospedeiros *E. coli* HB 101 e *P. putida* KT2440 transformadas com o pBTL-2 vazio não apresentaram atividade de  $\beta$ -glicosidases para o período de tempo analisado (Figura 26A e C).

Para verificar se o perfil de restrição é diferente entre clones distintos da biblioteca, 10 clones da biblioteca metagenômica em *Escherichia coli* HB101 e 10 clones em *Pseudomonas putida* KT240 foram digeridos com a enzima de restrição EcoRV (Figura 27). Os diferentes padrões de insetos podem ser um indicativo da diversidade de genes presentes na biblioteca. Os clones transformados em *Escherichia coli* HB101 apresentam insetos de 2.000 pb a 8.000 pb (Figura 27A). Os clones transformados em *Pseudomonas putida* KT2440 apresentam insetos de 2.000 pb a 5.000 pb (Figura 27B).



**Figura 26.** Validação da expressão dos clones da biblioteca por ensaio de detecção de  $\beta$ -glicosidases. Na presença de íons de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\beta$ -glicosidase converte esculina em esculetina formando um precipitado escuro. A: *Escherichia coli* HB101 transformada com o vetor pBTL-2. B: *Escherichia coli* transformada com DNA plasmidial da biblioteca BE-lig MG 6P com atividade para  $\beta$ -glicosidase. C *Pseudomonas putida* KT240 transformada com o vetor pBTL-2. D *Pseudomonas putida* KT2440 transformada com DNA plasmidial da biblioteca BE-lig MG 6P com atividade para  $\beta$ -glicosidase



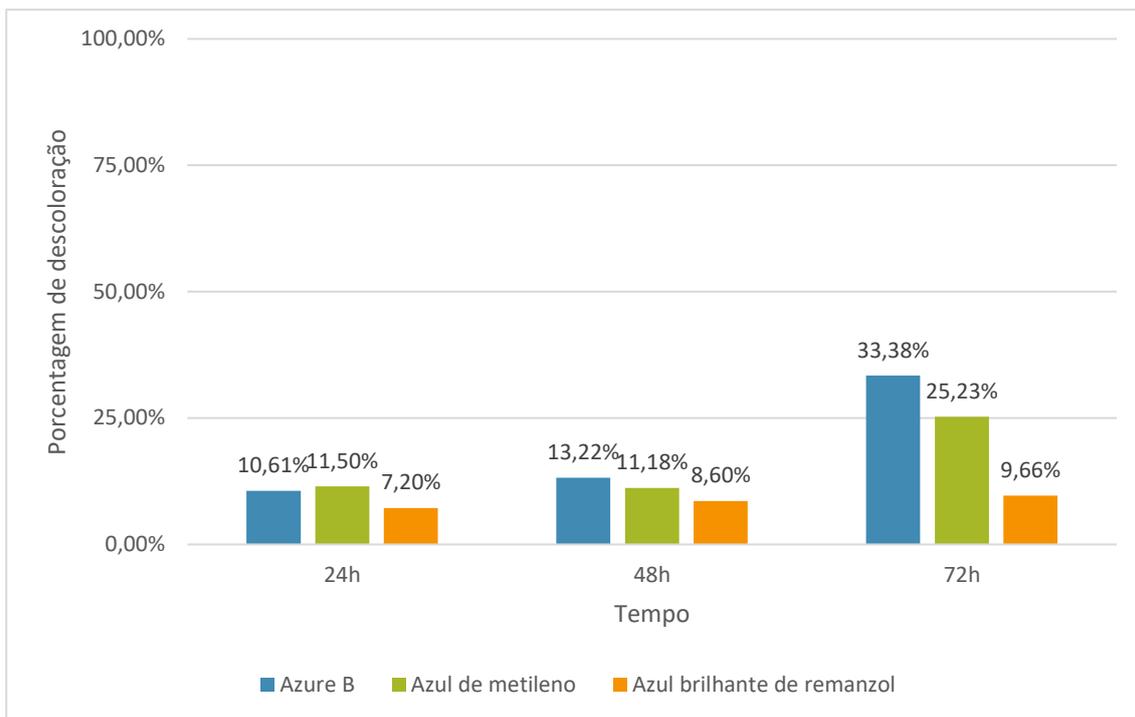
**Figura 27.** Eletroforese de gel de agarose 1 % com o resultado da digestão de 20 clones aleatórias da biblioteca Belig MG 6p com a enzima de restrição EcoRV para avaliar os diferentes padrões de insertos. A. Digestão de 10 clones aleatórios da biblioteca metagenômica Belig MG 6p transformada em *Escherichia coli* HB101. Poço 1: Marcador 1kbplus SM1331. Poço 2: vetor pBTL-2 digerido. Poço 3 - 12: clones digeridos. B. Digestão de 10 clones aleatórios da biblioteca metagenômica Belig MG 6p transformada em *Pseudomonas putida* KT2440. Poço 1: Marcador 1kbplus SM1331. Poço 2: vetor pBTL-2 digerido. Poço 3 - 12: clones digeridos.

### 6.3. Atividade ligninolítica dos hospedeiros escolhidos

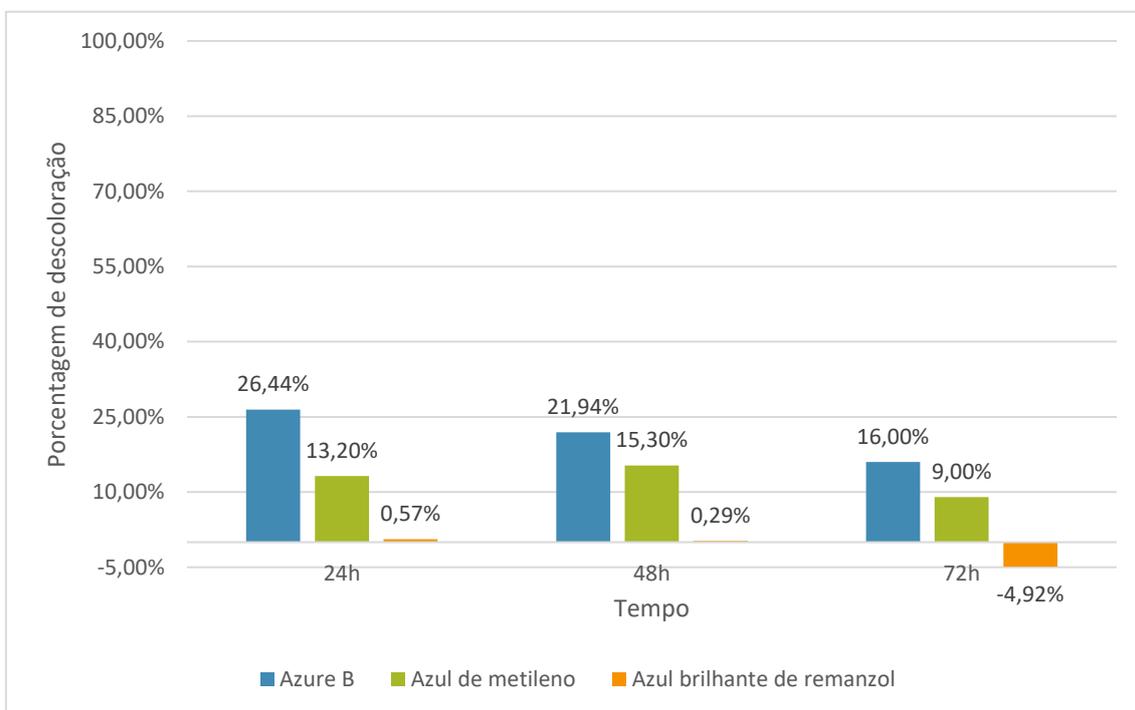
A análise dos genomas dos hospedeiros no banco de dados GeneBank NCBI revelou que a cepa *Escherichia coli* K12 precursora da HB101 possui uma enzima multicobre oxidase com atividade de lacase e uma peroxidase contendo um grupamento heme. A análise do genoma da *Pseudomonas putida* KT2440 no GeneBank NCBI e no banco de dados Pseudomonas genomas DB (WINSOR *et al.*, 2016) revelaram que essa bactéria possui um gene de 1.407 pb que codifica para uma multicobre oxidase com atividade de lacase. Essa bactéria ainda possui uma DyP-peroxidase em seu genoma.

A descoloração dos corantes azul de metileno, azul brilhante de remanzol e azure B é utilizada em metodologias funcionais para a identificação de peroxidases e lacases (CONCEIÇÃO, 2010; POINTING, 1999). Para confirmar a possível atividade ligninolítica desses hospedeiros, foi realizado um breve teste de descoloração na presença desses corantes. O meio suplementado com 25 mg/L dos corantes foi utilizado como controle negativo. A porcentagem de descoloração foi calculada e os dados plotados em gráficos de barras. A descoloração de todo o corante seria efetuada ao atingir os 100 %. Assim, como os dados mostram, a *Escherichia coli* HB101 descolore os três corantes (Figura 28). A atividade de descoloração é maior em 72 horas para os três corantes. Quando comparada a descoloração da *P. putida* KT2440, a *E. coli* HB101 mostrou a maior descoloração em RBBR.

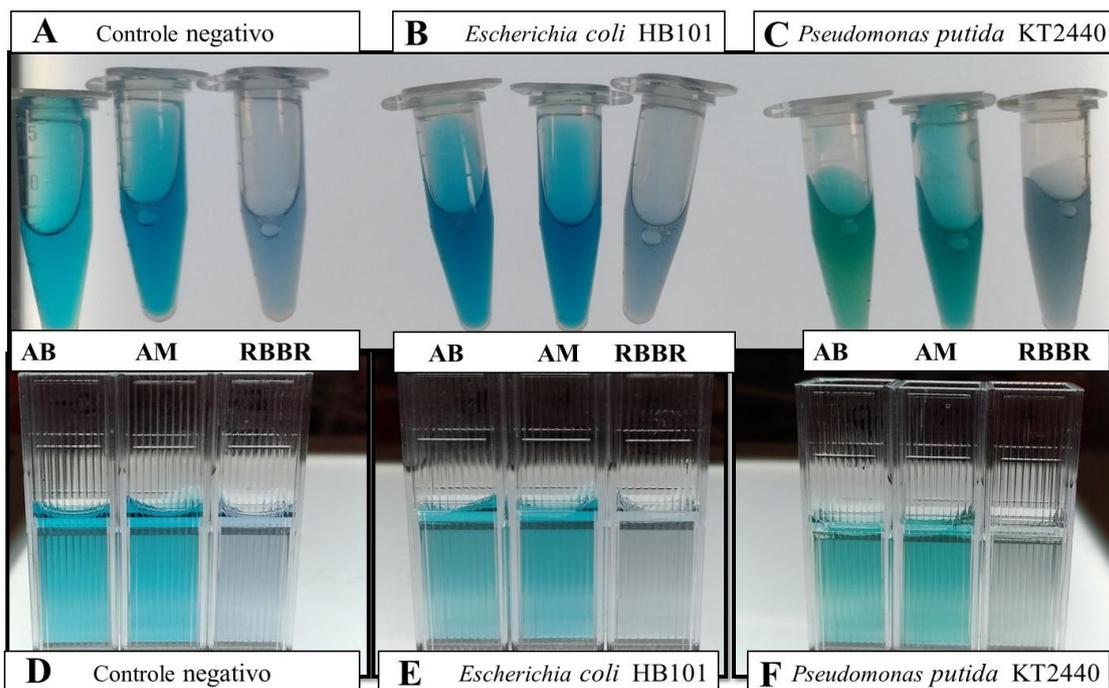
A *P. putida* KT2440 possui as maiores porcentagens de descoloração para os corantes azure B e azul de metileno nas primeiras 24 horas (Figura 29). Todavia, essa atividade de descoloração “diminui” até as 72 horas. Para o corante azul brilhante de remanzol em 72 horas a atividade de descoloração é negativa, indicando que o meio tinha mais corante que o controle. Esse erro amostral, da descoloração ir diminuindo ao longo do tempo, acontece para os três corantes uma vez que a *P. putida* KT2440 muda características colorimétricas do meio impossibilitando a absorção no espectro de luz original de cada corante (Figura 30). Os controles negativos também vão se tornando mais claros ao longo do tempo, uma vez em que os corantes são fotossensíveis.



**Figura 28.** Porcentagem de descoloração dos corantes azure B, azul de metileno e azul brilhante de remanzol pela *Escherichia coli* HB101 em 24, 48 e 72 horas.



**Figura 29.** Porcentagem de descoloração dos corantes azure B, azul de metileno e azul brilhante de remanzol pela *Pseudomonas putida* KT2440 em 24, 48 e 72 horas.



**Figura 30.** Ensaio para descoloração dos corantes azure B (AB), azul de metileno (AM) e azul brilhante de remanzol (RBBR) no tempo final de 72 horas. A e D: Controle negativo. B: *Escherichia coli* HB101. C: *Pseudomonas putida* KT2440. E: Sobrenadante da descoloração dos três corantes por *Escherichia coli* HB101. F Sobrenadante da descoloração dos três corantes por *Pseudomonas putida* KT2440.

## 6.4. Construção de uma metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas

### 6.4.1. Escolha do meio de cultivo

Para a realização do *screening* funcional para a identificação de enzimas ligninolíticas na biblioteca Belig MG 6p em *Escherichia coli* HB101 foi necessário escolher o meio adequado. A primeira etapa foi a escolha do meio de cultivo. Diferentes meios de cultura foram testados (Tabela 6). O meio mínimo MSM foi suplementado apenas com lignina como única fonte de carbono não sendo possível notar o crescimento celular. Também não houve a presença de transformantes no meio mínimo LYB suplementando com lignina como única fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. A formação de colônias foi observada nos meios: GLYB, LAN, M9 e LB. Por fim, o meio escolhido para prosseguir com a metodologia foi o meio Luria Bertani (LB) por permitir um bom crescimento dos transformantes

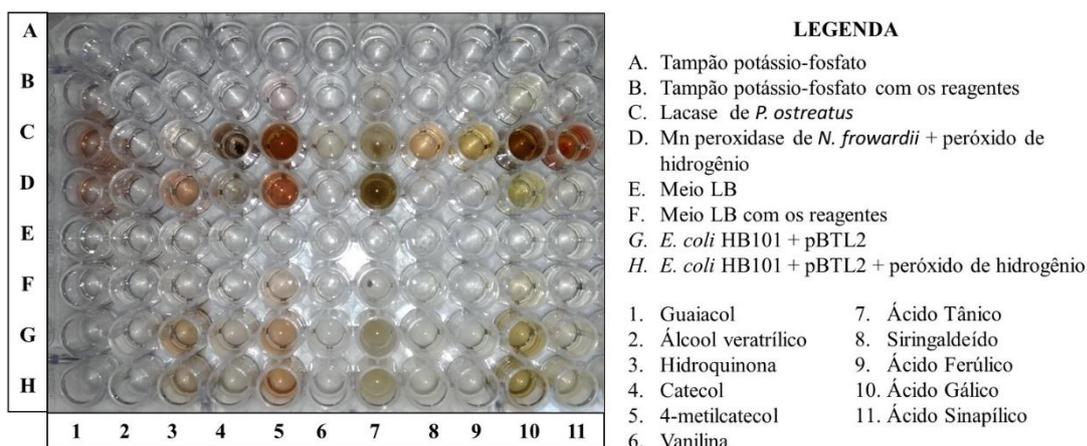
**Tabela 6.** Avaliação do crescimento da *Escherichia coli* HB101 em meios com diferentes características nutricionais. O X indica que o meio não foi escolhido. A ✓ indica o meio mais adequado para promover o crescimento celular da cepa testada

Hospedeiro	Meio	Características do meio	Crescimento	Observações	Escolhido (s)
<i>Escherichia coli</i> HB101	MSM	Meio mínimo com lignina como única fonte de carbono	-	O hospedeiro não cresceu em meio com lignina como única fonte de carbono	X
	LYB	0,3 % de lignina como fonte de carbono e 0,3 % de extrato de levedura	-		
	GLYB	0,3 % de lignina como fonte de carbono e 0,3 % de extrato de levedura + 1 % de glicose	+++	A presença de glicose possibilita crescimento	X
	LAN	0,3 % de lignina + caldo nutriente	+++	A presença do caldo nutriente possibilita crescimento	X
	M9	Meio M9 + glicose	+	O tempo de crescimento é longo	X
	SM3	Meio mínimo com glicose	++	O tempo de crescimento é muito longo.	X
	LB	Meio Luria Bertani - LB	+++	O hospedeiro apresenta um bom crescimento em menos de 24 horas.	✓

#### 6.4.2. Escolha dos reagentes oxidativos

A escolha dos reagentes e o protocolo foram adaptados de Reiss *et al.* (2013). No total 11 reagentes foram analisados em um período de incubação de 24 horas a 37 °C sobre agitação de 180 rpm (Apêndice C). Os reagentes utilizados no teste, ao serem oxidados, geram compostos colorimétricos que podem ser detectados no espectrofotômetro pelo comprimento de onda em que cada composto formado absorve (Figura 31), com exceção da vanilina e do álcool veratrílico. A detecção da oxidação da vanilina é medida pelo desaparecimento dessa no meio por meio da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de OD<sub>353nm</sub> em que ela absorve. A detecção da oxidação

do álcool veratrílico é medida pela formação do veratraldeído no comprimento de luz de OD<sub>310nm</sub> em que este absorve.



**Figura 31.** Avaliação da oxidação de 11 compostos aromáticos após 24 horas de incubação a 37 °C.

O guaiacol, álcool veratrílico, catecol, 4-metilcatecol, ácido ferúlico e o ácido tânico foram oxidados pela lacase de *Pleurotus ostreatus*, pela enzima manganês peroxidase de *Nematoloma frowardii* e pela *Escherichia coli* HB101. A lacase de *Pleurotus ostreatus* tem a maior atividade oxidativa no catecol e no 4-metilcatecol. O siringaldeído e a vanilina foram oxidados apenas pela lacase de *Pleurotus ostreatus*. A hidroquinona foi oxidada pela enzima manganês peroxidase de *Nematoloma frowardii* e pela *Escherichia coli* HB101. Não foi possível medir a taxa oxidativa do ácido gálico e do ácido sinapílico para a lacase e *E. coli* HB101. Os controles do ácido tânico, ácido gálico e 4-metilcatecol apresentaram a formação de compostos colorimétricos mesmo sem a adição das enzimas ou da *Escherichia coli* transformada. Conclui-se que os compostos aromáticos escolhidos foram oxidados pelos controles positivos. A *Escherichia coli* HB101 por possuir atividade ligninolítica também foi capaz de oxidar os compostos aromáticos. Dessa forma a identificação de potenciais clones positivos pela metodologia funcional foi realizada pela atividade de oxidação excedente desses compostos pelos clones da biblioteca metagenômica.

#### 6.4.3. Escolha dos parâmetros de incubação e suplementação nutricional

De acordo com o comportamento dos clones da biblioteca ao longo dos *screenings*, os parâmetros de cultivo como agitação, tempo de incubação e suplementação nutricional também foram otimizados (Apêndice D). No geral, a presença ou ausência da glicose no meio Luria Bertani não alterou o crescimento celular. A adição do sulfato de

cobre no primeiro período de incubação alterou negativamente o crescimento celular. Altas concentrações de sulfato de cobre diminuem o crescimento celular. A agitação na primeira etapa de incubação é necessária para o crescimento celular (Apêndice D). O preparo do inóculo na estufa resultou em baixo número de células. Rotações maiores favorecem o crescimento celular. Os parâmetros finais escolhidos foram: Crescimento inicial no *shaker* a 250 rpm a 37 °C com o meio de cultivo Luria Bertani suplementado com 100 µl de canamicina. No segundo período de incubação o meio foi suplementado com tampão fosfato, 0,2 mM de IPTG, 0,25 mM de sulfato de cobre e 10 mM de guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico, incubado a 250 rpm a 37 °C.

### **6.5. Identificação de potenciais clones positivos para enzimas ligninolíticas**

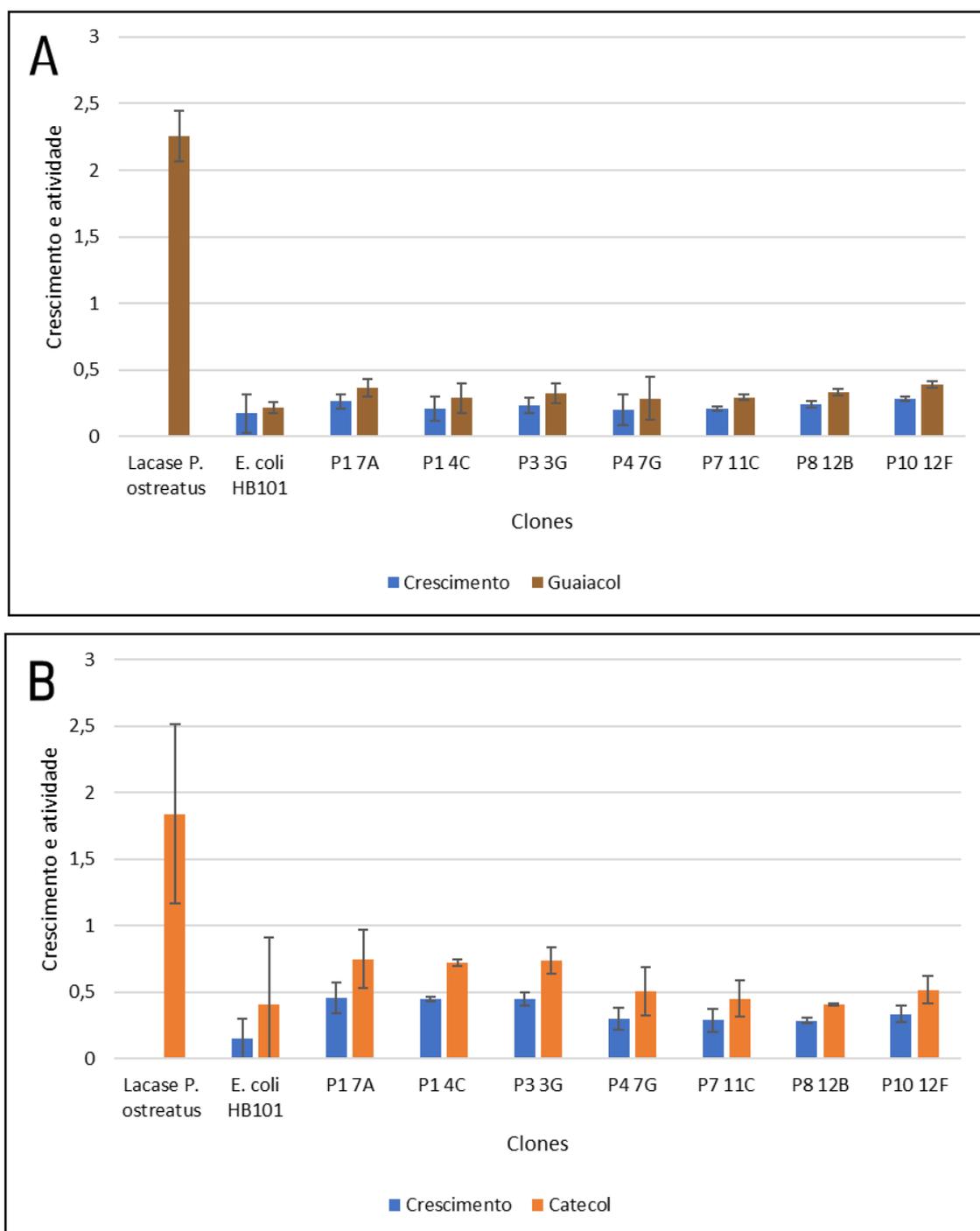
No total, 3.174 clones foram triados pela metodologia funcional de identificação de enzimas ligninolíticas baseada na oxidação de compostos aromáticos guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico. Após sucessivos ensaios foram escolhidos sete potenciais clones positivos segundo a sua atividade (Figura 32 e 33). Foi calculada a variação da atividade oxidativa e o crescimento dos clones da biblioteca Belig MG 6p nos respectivos reagentes, guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico. A *Escherichia coli* HB101 apresentou atividade oxidativa para o guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico. Apenas os clones que apresentaram uma atividade oxidativa superior à da *E. coli* HB101 em pelo menos um dos reagentes utilizados tiveram o seu fenótipo corroborado. A lacase de *Pleurotus ostreatus* utilizada como controle apresentou a maior taxa oxidativa para todos os reagentes.

Analisando a média da variação do crescimento ao longo de 24 horas, na presença dos compostos aromáticos catecol os potenciais clones positivos incluindo a *E. coli* HB101 transformada com o vetor pBTL-2 tiveram a maior média de crescimento  $OD_{600nm} = 0,340$ . Na presença do guaiacol a média da variação do crescimento foi de  $OD_{600nm} = 0,270$  e na presença de 4-metilcatecol  $OD_{600nm} = 0,220$ . A menor média na variação do crescimento dos clones foi na presença do ácido ferúlico  $OD_{600nm} = 0,170$ .

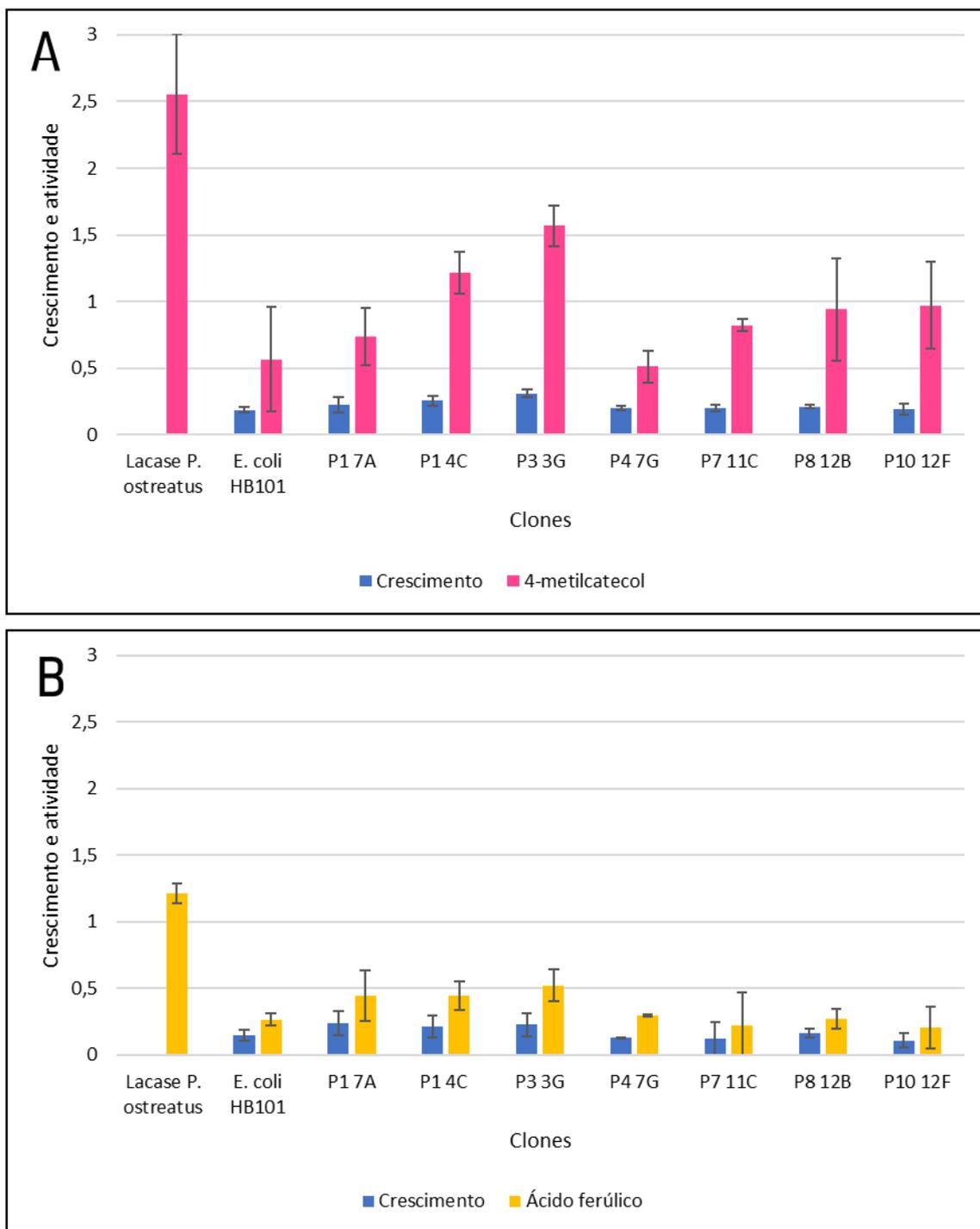
Analisando o crescimento de cada potencial clone positivo individualmente na presença de guaiacol a maior variação de crescimento é do clone P10 12F seguido por P1 7A, P8 12B e P3 3G (Figura 32A). A *E. coli* HB101 atingiu a  $OD_{600nm} = 0,172$ . Na presença de catecol, a maior variação no crescimento foi apresentada pelo clone P1 7A, seguida do clone P3 3G e P1 4C (Figura 32B). Na presença do composto catecol a *E.*

*coli* HB101 atingiu a  $OD_{600nm} = 0,150$ . Na presença de 4-metilcatecol a maior variação do crescimento ao longo de 24 horas foi do clone P3 3G, seguido dos clones P1 4C e P1 7A (Figura 33A). Na presença do 4-metilcatecol a *E. coli* HB101 atingiu a  $OD_{600nm} = 0,190$ . Por último, na presença do ácido ferúlico a maior variação do crescimento em 24 horas foi do clone P1 7A, seguido clone P3 3G e P1 4C (Figura 33B). Na presença do ácido ferúlico a *E. coli* HB101 atingiu a  $OD_{600nm} = 0,150$ .

O clone P10 12F possui a maior atividade em guaiacol, seguido por P1 7A, P8 12B e P3 3G (Figura 32A). A *E. coli* HB101 atingiu a  $OD_{465nm} = 0,220$ . Em catecol, a maior atividade oxidativa foi apresentada pelo clone P1 7A, seguida atividade do clone P3 3G e P1 4C (Figura 32B). Na presença do composto catecol a *E. coli* HB101 atingiu a  $OD_{450nm} = 0,410$  apresentando o maior desvio padrão para todos os reagentes analisados. No reagente 4-metilcatecol, a maior atividade oxidativa pertence ao clone P3 3G, seguido dos clones P1 4C e P10 12F (Figura 33A). Na presença do 4-metilcatecol a *E. coli* HB101 atingiu a  $OD_{400nm} = 0,650$ . O clone P3 3G apresentou a maior atividade oxidativa para o reagente ácido ferúlico seguido do clone P1 7A e P4 7G (Figura 33B). Na presença do ácido ferúlico a *E. coli* HB101 atingiu a  $OD_{372nm} = 0,265$ .

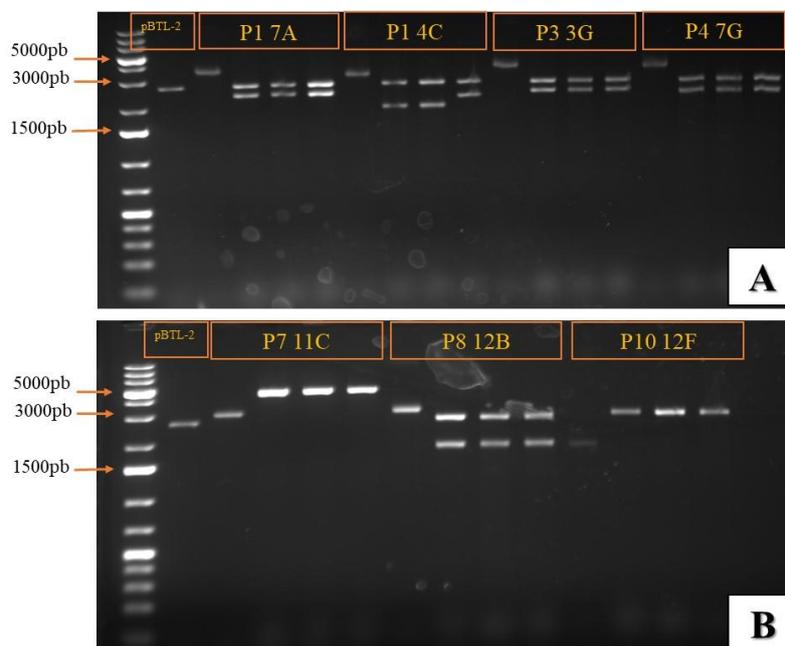


**Figura 32.** Avaliação da atividade oxidativa de sete potenciais clones positivos P1 7A, P1 4C, P3 3G, P4 7G, P7 11C, P8 12B e P10 12F da biblioteca Belig MG 6p em *Escherichia coli* HB101 em guaiacol e catecol. A: Avaliação da oxidação do guaiacol OD<sub>465nm</sub> e do crescimento dos clones. B: Avaliação da oxidação do catecol OD<sub>450nm</sub> e do crescimento dos clones. A leitura da densidade óptica (OD) para detectar a oxidação do substrato e o crescimento dos clones OD<sub>600nm</sub> foi feita no início do experimento e após 24 horas de incubação a 37 °C, 250 rpm de agitação para as triplicatas de cada clone, para a lacase de *P. ostreatus* e para a *E. coli* HB101. A lacase de *P. ostreatus* foi utilizada como controle positivo. A *E. coli* HB101 transformada com o vetor pBTL2 foi utilizada como controle negativo. O resultado final do crescimento e oxidação dos reagentes aromáticos é dado por um cálculo de variação do crescimento (Variação do crescimento = crescimento final – crescimento inicial) e variação da atividade (Variação da atividade = atividade final – atividade inicial) ao longo de 24 horas. O desvio padrão, calculado a partir das triplicas, é dado pela barra de erro acima de cada barra principal.

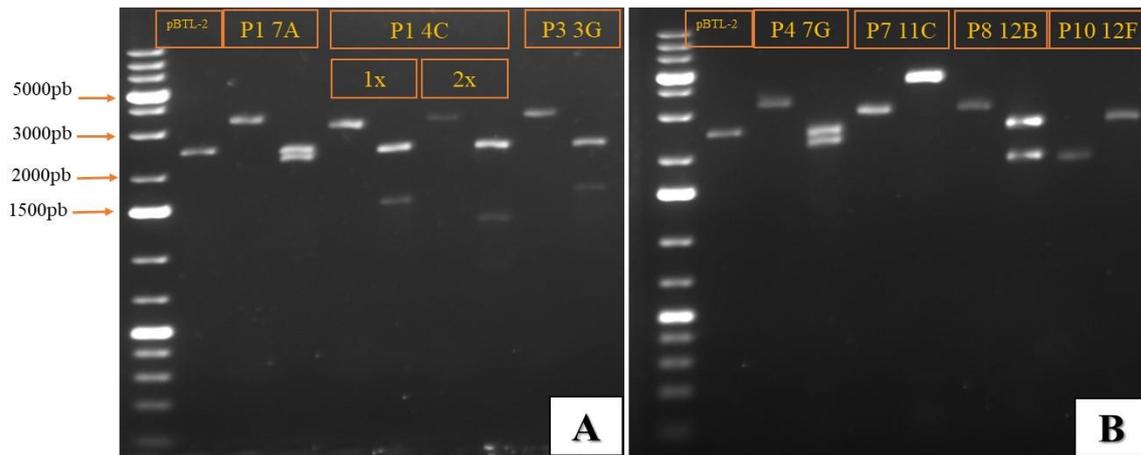


**Figura 33.** Avaliação da atividade oxidativa de sete potenciais clones positivos P1 7A, P1 4C, P3 3G, P4 7G, P7 11C, P8 12B e P10 12F da biblioteca Belig MG 6p em *Escherichia coli* HB101 em 4-metilcatecol e ácido ferúlico. A: Avaliação da oxidação do 4-metilcatecol  $OD_{400nm}$  e crescimento dos clones. B: Avaliação da oxidação do ácido ferúlico  $OD_{372nm}$  e crescimento dos clones. A leitura da densidade óptica (OD) para detectar a oxidação do substrato e o crescimento dos clones  $OD_{600nm}$  foi feita no início do experimento e após 24 horas de incubação a 37 °C, 250 rpm de agitação para as triplicatas de cada clone, para a lacase de *P. ostreatus* e para a *E. coli* HB101. A lacase de *P. ostreatus* foi utilizada como controle positivo. A *E. coli* HB101 transformada com o vetor pBTL2 foi utilizada como controle negativo. O resultado final do crescimento e oxidação dos reagentes aromáticos é dado por um cálculo de variação do crescimento (Variação do crescimento = crescimento final – crescimento inicial) e variação da atividade (Variação da atividade = atividade final – atividade inicial) ao longo de 24 horas. O desvio padrão, calculado a partir das triplicas é dado pela barra de erro acima de cada barra principal.

Para confirmar que as colônias trabalhadas estavam puras o DNA plasmidial foi extraído de triplicatas biológicas de cada potencial clone positivo. Esses foram inicialmente digeridos com a enzima de restrição EcoRV (Thermo-Scientific) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% com marcador GeneRuler 1kb plus SM1331(Thermo-Scientific) para analisar o padrão de insertos dos clones (Figura 34). Os clones P1 7A, P3 3G, P4 7G apresentam um inserto de cerca de 2.400pb. Os clones P7 11C e P10 12F apresentaram respectivamente apenas um fragmento linear de 5.000 pb e 3.000 pb. O clone P8 12B possui um fragmento de 2.100 pb. O clone P1 4C apresentou dois padrões de insertos, um com 2.000 pb e outro com 2.400 pb indicando uma potencial contaminação. Os clones foram digeridos novamente em uma digestão dupla com EcoRV e XbaI para diferenciar os insertos que apresentaram tamanho similar (Figura 35). Na segunda digestão, o clone P3 3G apresentou um padrão de digestão distinto dos clones P1 7A e P4 7G apresentaram padrão de digestão distintos. Os clones P7 11C e P10 12F novamente linearizaram. O clone P1 4C continua apresentando dois padrões de insertos. Por fim, apenas três clones foram escolhidos e completamente sequenciados: P1 7A, P3 3G e P4 7G.



**Figura 34.** Eletroforese em gel de agarose um 1 % com marcador 1kbplus SM1331 como referência. Digestão das triplicatas dos sete potenciais clones positivos da biblioteca Belig MG 6p com a enzima de restrição EcoRV. A: Poço 1: marcador. Poço 2: vetor pBTL2 digerido. Poço 3: Clone P1 7A intacto. Poço 4-6: P1 7A digerido. Poço 7: Clone P1 4C intacto. Poço 8-10: P1 4C digerido. Poço 11: Clone P3 3G intacto. Poço 12-14: P3 3G digerido. Poço 15: Clone P4 4G intacto. Poço 15-17: P4 4G digerido. B: Poço 1: marcador. Poço 2: vetor pBTL2 digerido. Poço 3: Clone P7 11C intacto. Poço 4-6: P7 11C digerido. Poço 7: Clone P8 12B intacto. Poço 8-10: P8 12B digerido. Poço 11: Clone P10 12F intacto. Poço 12-14: P10 12F digerido.



**Figura 35.** Eletroforese em gel de agarose um 1 % com marcador 1kbplus SM1331 como referência. Digestão dupla dos sete potenciais clones positivos da biblioteca Belig MG 6p com as enzimas de restrição EcoRV e XbaI. A: Poço 1: marcador. Poço 2: vetor pBTL2 digerido. Poço 3: Clone P1 7A intacto. Poço 4: P1 7A digerido. Poço 5: Clone P1 4C 1x intacto. Poço 6: P1 4C 1x digerido. Poço 7: Clone P1 4C 2x intacto. Poço 8: P1 4C 2x digerido Poço 9: Clone P3 3G intacto. Poço 10: P3 3G digerido. B: Poço 1: marcador. Poço 2: vetor pBTL2 digerido. Poço 3: Clone P4 4G intacto. Poço 4: P4 4G digerido. Poço 5: Clone P7 11C intacto. Poço 6: P7 11C digerido. Poço 7: Clone P8 12B intacto. Poço 8: P8 12B digerido. Poço 9: Clone P10 12F intacto. Poço 10: P10 12F digerido

### 6.6. Sequenciamento dos clones P1 7A, P3 3G e P4 7G

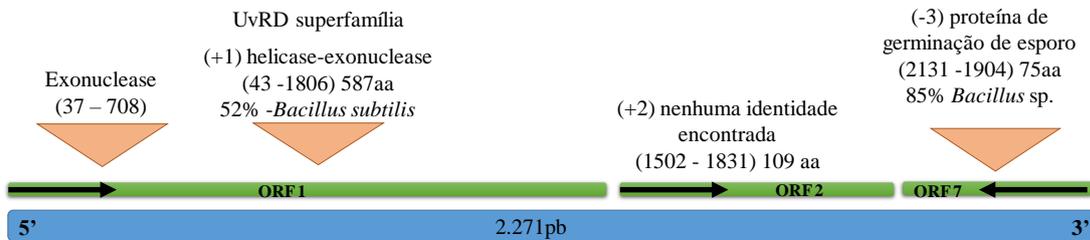
Os clones P1 7A, P3 3G e P4 7G foram sequenciados por terceiros e a partir das sequências obtidas dos clones positivos foram montados os *contigs* no programa Geneious R7 (OLSEN, 2014). Após gerar as sequências consensos, essas foram comparadas com as sequências presentes no banco de dados nr no GenBank (NCBI) utilizando a ferramenta *blastx* e *blastn*. As seis fases de leituras das sequências de cada clone foram analisadas em busca de ORFs (*open reading frame*) acima de 150 nucleotídeos no programa ORFfinder (WHEELER *et al.*, 2003). A presença de domínios conservados foi analisada pelo programa InterPro (MITCHELL *et al.*, 2019). A seguir descreve-se o resultado obtido para cada clone.

O clone P1 7A possui uma sequência de nucleotídeos de 2.271 pb. A sequência possui identidade de 75 % com uma sequência do genoma de *Bacillus subtilis*. No total, 7 ORFs acima de 150 nucleotídeos foram identificadas. Dessas, três ORFs não possuíam identidade. Duas ORFs foram identificadas como proteínas hipotéticas. Outras duas ORFs possuíam domínios conservados: ORF 1 com um domínio de helicase exonuclease da superfamília UvRD; ORF 7 com outro domínio pertencente a uma proteína de germinação de esporos de *Bacillus sp.* (Figura 36). A proteína de germinação de esporos (ORF 7) foi alinhada com uma proteína chamada CotA presente nos endósporos de *Bacillus subtilis* e que possui atividade de lacase para a identificação dos aminoácidos

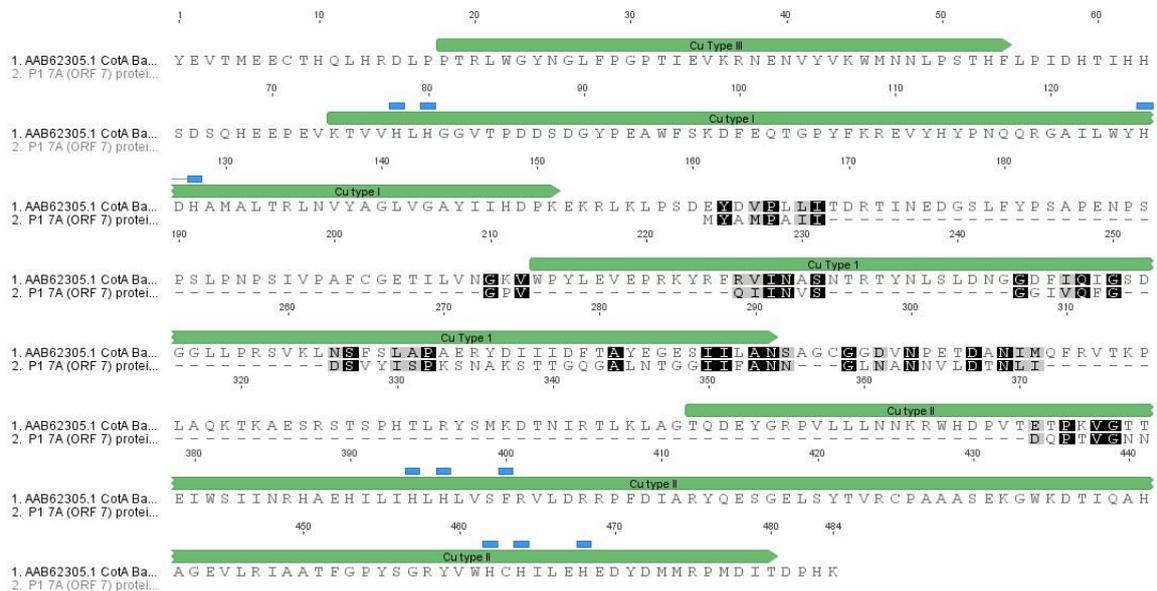
conservados (Figura 37). A ORF 7 e a CotA possuem 17,4% de similaridade, sendo que parte dos aminoácidos alinhados estão dentro do sítio I de ligação de cobre.

### Clone P1 7A

- 75% - *Bacillus subtilis* (CP014840.1)
- 75% - *Bacillus atrophaeus* (CP007640.1)

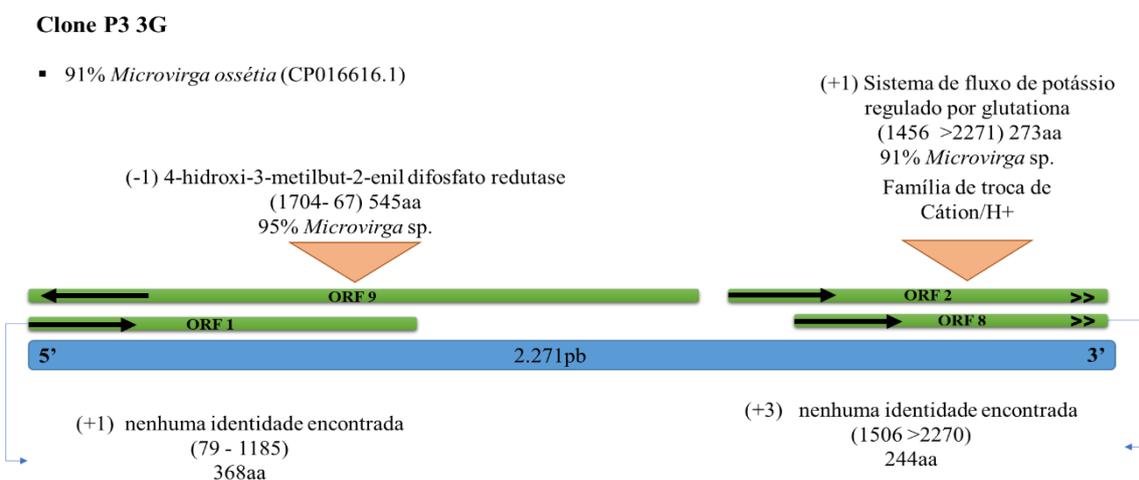


**Figura 36.** Mapa do inserto do clone P1 7A com as três principais ORFs encontradas. A sequência possui 2.271pb. A possíveis identidades da sequência é indicada na parte superior da figura. A barra verde indica as ORFs encontradas e as setas indicam a direção da ORF. A fase de leitura está entre parênteses, assim como as bases iniciais e finais de cada ORF. O triângulo invertido laranja indica os domínios conservados encontrados na sequência.



**Figura 37.** Alinhamento MUSCLE no programa Geneious R7 da ORF 7 do clone P1 7A e da enzima CotA de *Bacillus subtilis*. As sequências possuem 17,4% de similaridade. Em destaque os aminoácidos compartilhados entre as duas sequências. As barras verdes indicam os domínios de ligação de cobre e os traços azuis indicam os aminoácidos que compõem o sítio catalítico da sequência da enzima CotA.

O clone P3 3G possui uma sequência de nucleotídeos de 2.271pb (Figura 38). A identidade encontrada para essa sequência é de 91 % com uma sequência do genoma da espécie *Microvirga ossetica*. As principais ORFs estão representadas na figura abaixo. No total, 14 ORFs acima de 150 nucleotídeos nas seis fases de leitura foram identificadas. Quatro ORFs codificam para proteínas hipotéticas. A ORF 14 codifica para um domínio de proteína transmembrana fora do interesse desse trabalho. Para sete ORFs não foi encontrada nenhuma identidade, sendo que dessas a ORF 1 possui 368 aminoácidos e a ORF 8 parcial possui 254 aminoácidos. Dois domínios conservados foram identificados: Um na ORF 9 para a enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase; e outro na ORF 2 parcial pertencente a uma família de troca de Cátion/H+.



**Figura 38.** Mapa do inserto do clone P3 3G com as quatro principais *ORFs* encontradas. A sequência possui 2.271pb. A identidade da sequência é indicada na parte superior da figura. A barra verde indica as *ORFs* encontradas e as setas indicam a direção da *ORF*. A fase de leitura está entre parênteses assim como as bases iniciais e finais de cada *ORF*. O triângulo invertido laranja indica os domínios conservados encontrados na sequência.

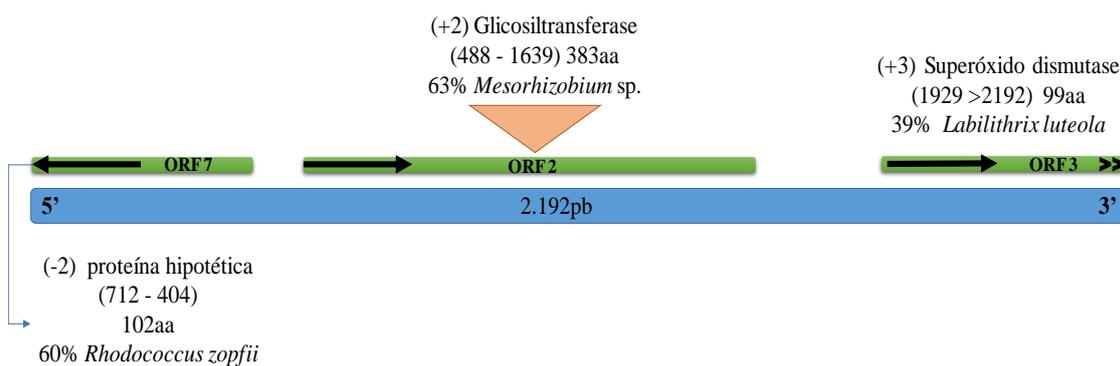
O clone P4 7G possui uma sequência de nucleotídeos de 1.192pb (Figura 39). Essa sequência possui 71 % de identidade com uma sequência do genoma da espécie *Mesorhizobium* sp. Para esse clone, nove ORFs acima de 150 nucleotídeos nas seis fases de leitura foram identificadas. A ORF 1 e 8 não possuem identidade. A ORF 9 codifica para uma proteína hipotética. A ORF 4 possui 59 % de identidade com uma repetição proteica de  $\beta$ -hélice de *Rhizobiales bacterium*. A ORF 5 possui 128 aminoácidos e contém uma região com 15 aminoácidos conservados com 60 % de identidade a um fator 7 de diferenciação de crescimento de *Vicugna pacos*. A ORF 6 possui 81 aminoácidos e

apresenta uma região conservada de 16 aminoácidos com 38 % de similaridade a uma proteína da família de fixação de nitrogênio (NifU) de *Azospirillum brasilense*. A ORF 3 é uma sequência parcial com uma região conservada com 39 % similaridade a uma superóxido dismutase de *Labilithrix luteola*. O alinhamento entre a ORF3 e a superóxido dismutase de *Labilithrix luteola* apresenta 21,8 % de similaridade (Figura 40). Parte do alinhamento ocorre dentro do sitio I de ligação de cobre, compartilhando inclusive o aminoácido alanina que faz parte do centro ativo da enzima.

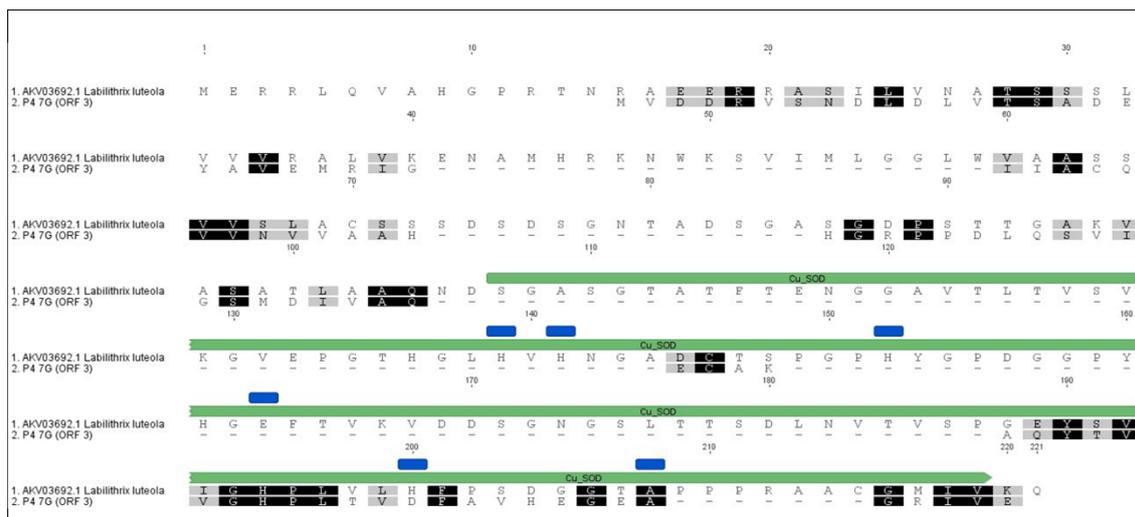
A ORF 7 é identificada como uma proteína hipotética. Mas análises adicionais revelaram uma região de 10 aminoácidos com identidade de 59 % a enzima formil-tetrahydrofolato deformilase de *Geitlerinema* sp. Apenas um único domínio conservado foi identificado na ORF 2 pertencente a uma glicosiltransferase.

#### Clone P4 7G

- 71% *Mesorhizobium* sp. (CP031834.1)



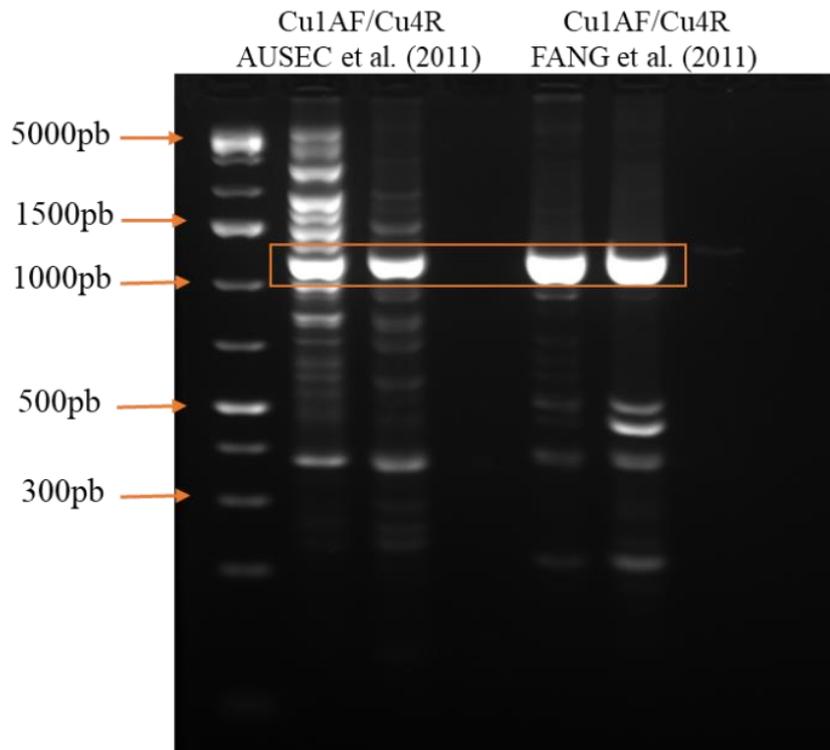
**Figura 39.** Mapa do inserto do clone P4 7G com as três principais *ORFs* encontradas. A sequência possui 2.192pb. A identidade da sequência é indicada na parte superior da figura. A barra verde indica as *ORFs* encontradas e as setas indicam a direção da *ORF*. A fase de leitura está entre parênteses assim como as bases iniciais e finais de cada *ORF*. O triângulo invertido laranja indica o domínio conservado encontrado na sequência



**Figura 40.** Alinhamento MUSCLE da ORF 3 do clone P4 7G com a enzima superóxido dismutase de *Labilithrix luteola* no programa Geneious R7. As sequências compartilham 21,8% de similaridade. Em destaque os aminoácidos compartilhados pelas sequências. A barra verde indica o sítio de ligação de cobre. Em azul os aminoácidos que compõe o sítio catalítico da enzima.

### 6.7. Screening para identificação de lacase bacteriana baseado na sequência

Essa metodologia é baseada na reação em cadeia da polimerase. Dois pares de *primers* previamente construídos baseados em sítios conservados de lacases bacterianas já descritas foram utilizados: Cu1AF e Cu4R (AUSEC; VAN ELSAS; MANDIC-MULEC, 2011); Cu1AF e Cu4R (FANG *et al.*, 2011). Esses *primers* amplificam regiões entre o sítio de ligação de cobre I e IV das lacases bacterianas (AUSEC; VAN ELSAS; MANDIC-MULEC, 2011). Foram amplificados fragmentos de interesse de 1.200 pb para cada *primer* utilizado (Figura 41). Esses fragmentos foram clonados no vetor pJet e transformados por eletroporação em *Escherichia coli* HB101. Foram escolhidas 30 colônias aleatórias com fragmentos amplificados para cada par de *primer*, totalizando 60 colônias. As sequências tiveram o seu DNA plasmidial extraído e digerido pela enzima de restrição BglII (Thermo-Scientific). A presença de insertos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1 % com marcador GeneRuler 1kb plus SM1331(Thermo-Scientific). Os clones foram enviados para serem sequenciados por terceiros.



**Figura 41.** Eletroforese em gel de agarose um 1 % com marcador 1kb plus SM1331 como referência para amplificação de fragmentos de 1.200 pb que codifiquem uma lacase bacteriana. A: Poço 1: marcador. Poço 2 e 3: Reação em cadeia da polimerase realizada com os *primers* Cu1AF/Cu4R. Poço 5 e 6: Reação em cadeia da polimerase com os *primers* Cu1AF e Cu4R. O retângulo laranja indica os fragmentos que foram excisados do gel de agarose

Dada a qualidade do sequenciamento, das 60 seqüências enviadas, apenas 54 seqüências foram analisadas. Os *contigs* das seqüências foram montados no programa Geneious R7 (OLSEN, 2014). A similaridade entre as seqüências foi avaliada pelo alinhamento MUSCLE. As seqüências foram agrupadas por homologia em quatro grupos distintos. O primeiro grupo é formado por 15 seqüências iguais. O segundo grupo é formado por 34 seqüências iguais. O terceiro grupo é formado duas seqüências iguais. E o quarto, e último grupo, é formado por três seqüências. Um representante de cada grupo foi escolhido para prosseguir com as análises: 1p3, 6p1, 6p3 e 7p16 (Tabela 7).

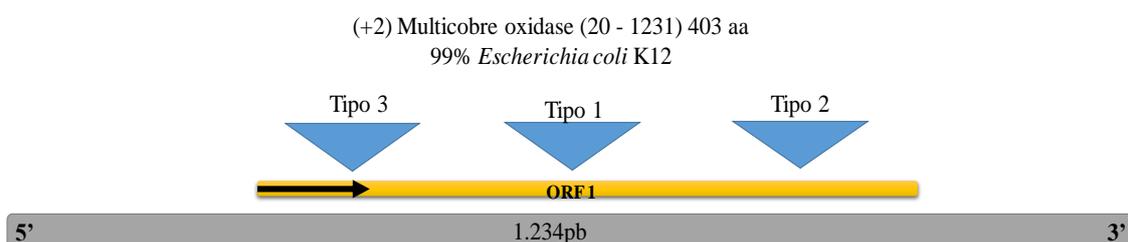
**Tabela 7.** Análises dos clones 1p3, 6p1, 6p3 e 7p16, representantes dos quatro grupos formados, no banco de dados nr no GenBank (NCBI) utilizando a ferramenta *blastn* e *blastx* para analisar a identidade. A busca de ORFs (*open reading frames*) foi feita no ORFfinder com a ferramenta *Smartblast*. Na primeira coluna, entre parênteses consta o número de sequências presentes em cada grupo.

Grupos	Clones	Nucleotídeos	Identidade	ORFs
1 (34x)	1p3	1.243	99% <i>Escherichia coli</i> (CP034595.1)	Multicobre oxidase - 402aa
2 (3x)	6p1	1.135		Metiltransferase CheR - 201aa
3 (2x)	6p3	1.176		Metiltransferase CheR - 222aa
4 (15x)	7p16	1.204		Multicobre oxidase - 354 aa

Apesar das sequências dos grupos serem distintas entre si, todas as sequências apresentam 99 % de identidade com uma sequência de aminoácidos da enzima multicobreoxidase (lacase) da bactéria *Escherichia coli*. A busca por ORFs foi feita no programa ORFfinder (WHEELER *et al.*, 2003). As ORFs encontradas foram comparadas com as sequências presentes no banco de dados nr no GenBank (NCBI) utilizando a ferramenta Smart Blast. Os clones 1p3 e 7p16 possuem, respectivamente, uma ORF de 402 e 354 aminoácidos que codificam para multicobre oxidase (lacase) (Figura 42). Os clones 6p1 e 6p3 possuem, respectivamente, uma ORF de 201 e 202 aminoácidos que codificam para uma metiltransferase (Figura 43).

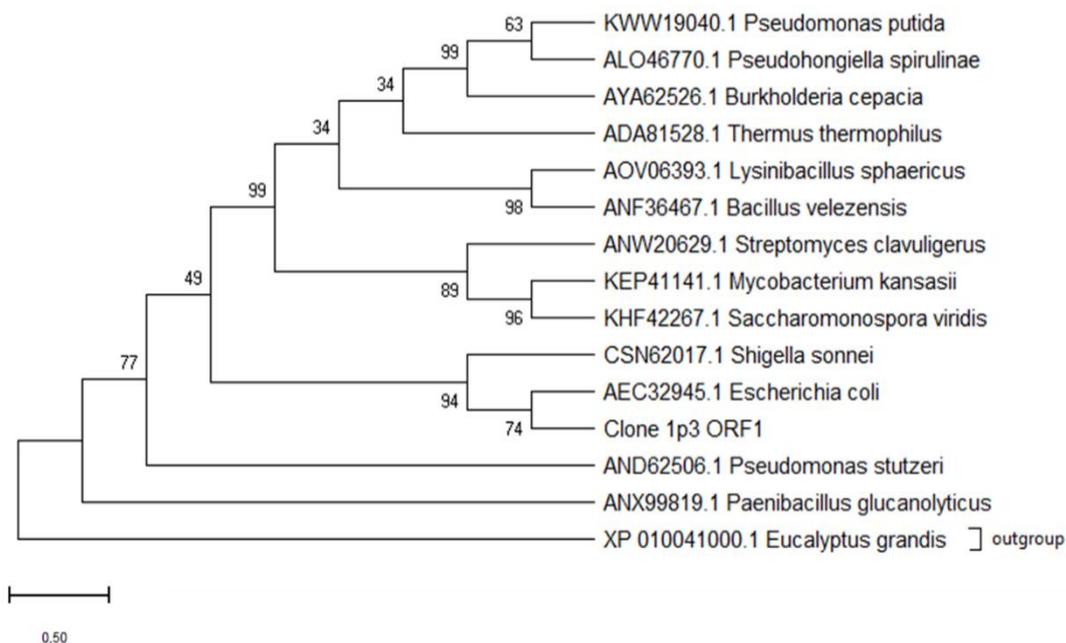
### Clone 1p3

- 99% *Escherichia coli* (CP034595.1)



**Figura 42.** Mapa do inserto do clone 1p3 com a ORF 1 para multicobre oxidase. A sequência possui 1.234 pb. A identidade da sequência é indicada na parte superior da figura. A barra amarela indica a ORF encontrada e a seta indica a direção da ORF. A fase de leitura está entre parênteses, assim com as bases iniciais e finais da ORF. O triângulo invertido azul indica os três domínios conservados para multicobre oxidase encontrados na sequência.

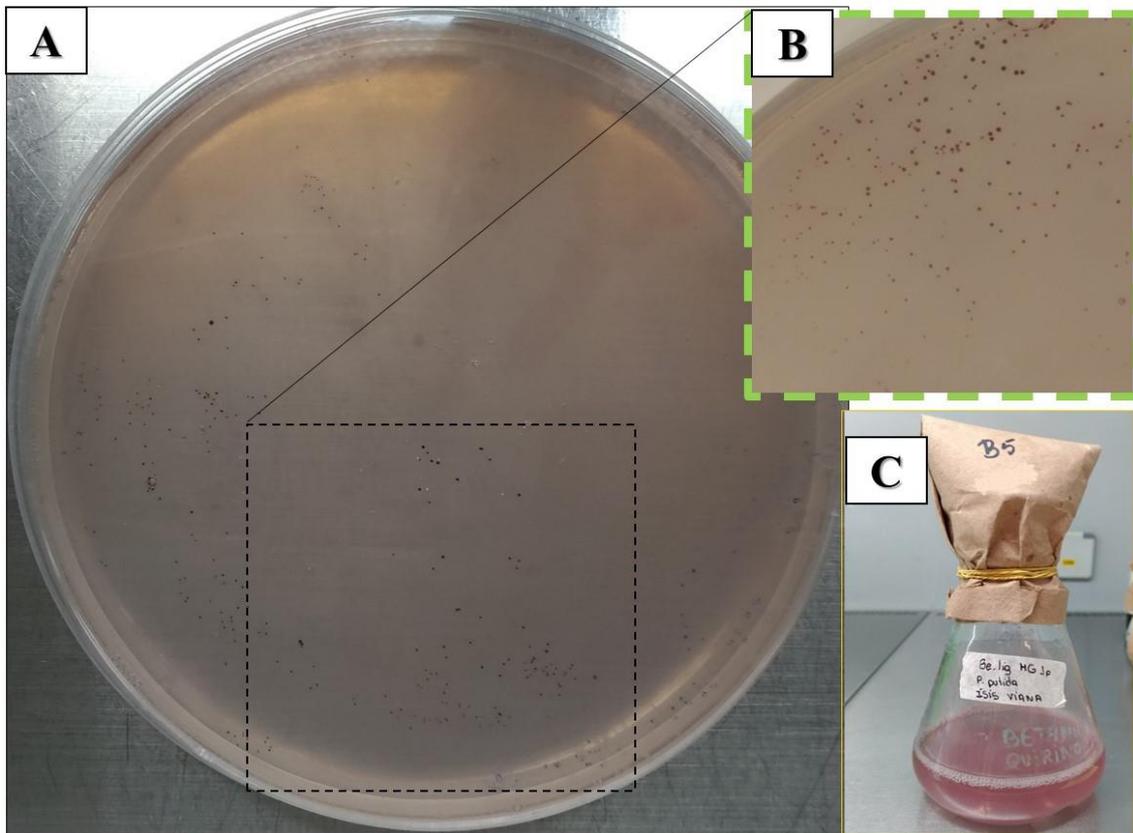




**Figura 45.** Árvore filogenética construída no programa MEGA usando o método Maximun Likelihood com algoritmos Neighbor-Join e BioNJ de 15 sequências de aminoácidos para lacases bacterianas (KUMAR *et al.*, 2018b; NEI; KUMAR, 2000). A árvore consenso obtida foi inferida a partir de um bootstrap com 1.000 réplicas. A porcentagem em que cada grupo taxonômico foi agrupado no teste de bootstrap são mostradas próximas as ramificações. A barra de escala de 0.5 representa o número de substituições de aminoácidos por sítio (0,5 cm = 0,5 substituições de aminoácidos no respectivo ramo). O grupo externo é representado por uma lacase de *Eucalyptus grandis*.

### 6.8. Screening funcional por complementação em *Pseudomonas putida* KT2440

O processo de enriquecimento dos clones biblioteca Belig MG 6p em *Pseudomonas putida* KT2440 para fenótipos capazes de consumir o guaiacol como única fonte de carbono se mostrou eficaz, uma vez que foi possível identificar transformantes de interesse. Essa metodologia é baseada na complementação da atividade em *Pseudomonas putida* KT2440 e o enriquecimento foi feito por duas passagens com duas semanas de intervalo entre uma e outra. A presença de colônias marrons no meio indica o consumo do guaiacol como fonte de carbono por parte da *P. putida* KT2440 (Figura 46). Alguns potenciais clones positivos foram isolados e estão em fase de análise



**Figura 46.** Metodologia de complementação da atividade para consumo do guaiacol como única fonte de carbono por *Pseudomonas putida* KT2440 transformada com os clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p. A: A presença de colônias no meio indica que o guaiacol foi utilizado como fonte de carbono pela *Pseudomonas putida* transformada promovendo o crescimento celular. B: Ampliação da região com diversas colônias. C. Etapa final do processo de enriquecimento com meio M9 suplementado com 10 mM guaiacol com única fonte de carbono

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Identificação de enzimas ligninolíticas por abordagem metagenômica

No segundo capítulo do presente trabalho foi construída uma biblioteca metagenômica a partir do DNA da sexta passagem de um consórcio microbiano enriquecido para degradar lignina (descrito no capítulo 1). Assumindo que a utilização da lignina como única fonte de carbono resultaria em um estresse abiótico selecionando organismos, o último ciclo de cultivo, no caso a sexta passagem, apresentaria organismos com maior potencial para degradar a lignina. A biblioteca foi utilizada na prospecção de genes de interesse biotecnológico que fossem capazes de promover um quadro da valorização da lignina contribuindo para a etapa inicial, que é a degradação desse heteropolímero.

Dado o número limitado de estudos que decidiram promover a identificação de enzimas ligninolíticas por abordagem metagenômica, diversas oportunidades foram encontradas para se trabalhar nessa área (AUSEC *et al.*, 2017). A metagenômica surge com uma proposta de possibilitar o acesso ao genoma de uma comunidade microbiana sem a necessidade de cultivo (SOUTO *et al.*, 2013). Essa abordagem pode ser utilizada para a prospecção de enzimas ligninolíticas ainda não identificadas contribuindo para esclarecer a dinâmica metabólica envolvida durante a biodegradação da lignina.

As análises taxonômicas da sexta passagem do consórcio microbiano enriquecido para degradar lignina extraída por método alcalino revelaram que os gêneros bacterianos *Lysinibacillus* (46 %), *Bacillus* (32 %), *Microvirga* (1 %), *Paenibacillus* (1 %) e *Rhodococcus* (1 %) representariam cerca de 81 % da composição da comunidade. Todos os gêneros acima citados já foram identificados por possuírem enzimas ligninolíticas como as fenoxidases e heme-peroxidases (ANASTASI *et al.*, 2016; CHANTARASIRI; BOONTANOM; NUIPLOT, 2017; GUAN *et al.*, 2015; HOU *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016; LI, 2012; RAJ *et al.*, 2007; SAFRONOVA *et al.*, 2017). Como o DNA desse consórcio foi utilizado na construção da biblioteca, acredita-se que esses mesmos gêneros estariam presentes na biblioteca metagenômica Belig MG 6p.

Os hospedeiros *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Escherichia coli* TOP 10 e *Pseudomonas putida* KT2440 foram utilizados para transformar e validar a expressão da biblioteca Belig MG 6p. Desses, apenas a *Escherichia coli* HB101 e a

*Pseudomonas putida* KT2440 tiveram a transformação e validação da expressão dos clones bem-sucedidas. Sucessivos ensaios foram produzidos na tentativa de obter uma célula competente para *Escherichia coli* TOP 10 para realizar a eletroporação. Todas as tentativas falharam. Sendo esse o possível motivo pelo qual não foi obtido colônias transformadas com a biblioteca em *Escherichia coli* TOP 10.

A *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  é recomendada para a replicação do vetor pBTL-2 (instruções do manual Addgene). Essa cepa possui as mutações endA e recA1 que respectivamente diminui os níveis de endonucleases intracelulares e a aumenta a estabilidade do plasmídeo, possibilitando um alto rendimento da replicação (BRYANT, 1988; GRIFFITH, 2001). Em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  a transformação foi bem-sucedida, mas não foi possível validar a expressão dos genes clonados no vetor pBTL-2. O vetor de amplo espectro pBTL-2 foi construído por Lynch e Gill (2006) que utiliza o promotor Lac induzido por IPTG para promover a expressão gênica. O motivo pelo qual não foi possível validar a expressão dos clones da biblioteca pelo ensaio de  $\beta$ -glicosidases em células de *E.coli* DH5 $\alpha$  é desconhecido.

Para analisar se o vetor pBTL-2 iria expressar os clones da biblioteca Belig MG 6p foi realizado um ensaio para detecção de  $\beta$ -glicosidases. A presença de  $\beta$ -glicosidases já foi relatada em várias bibliotecas metagenômicas sendo de fácil detecção (BERGMANN, 2013; PALUAN, 2011). As  $\beta$ -glicosidases quando expressas em meio que contém citrato de ferro e esculina, convertem a esculina em esculetina gerando um precipitado escuro. Ambas as bibliotecas construídas em *Escherichia coli* HB101 e em *Pseudomonas putida* KT2440 possibilitaram a identificação da expressão de  $\beta$ -glicosidases. A expressão dessas enzimas é utilizada para comprovar que os insertos da biblioteca clonados no vetor pBTL-2 estão sendo expressos nos dois hospedeiros.

Bibliotecas metagenômicas construídas para serem exploradas para identificação de enzimas ligninolíticas bacterianas, como aquelas construídas por Ausec *et al.* (2017), Fang *et al.* (2011), Fang *et al.* (2010), Ye *et al.* (2010) e Beloqui *et al.* (2006) utilizaram a *Escherichia coli* como hospedeiro. Dos trabalhos acima citados, apenas em Beloqui *et al.* (2006) e Ye *et al.* (2010) utilizaram uma abordagem funcional que permitiu identificação de enzimas ligninolíticas bacterianas. Os demais também identificaram enzimas ligninolíticas, mas por uma abordagem baseada na sequência.

A utilização de diferentes hospedeiros é uma estratégia importante na abordagem metagenômica para metodologias funcionais pois possibilita a expressão de um maior número de genes. As abordagens funcionais são dependentes da expressão dos clones pelos hospedeiros. Os hospedeiros podem expressar os genes ou a expressão pode não ocorrer devido a falhas em reconhecer a região promotora do vetor ou dos insertos. O principal hospedeiro utilizado para a transformação de clones de biblioteca metagenômica é a bactéria *Escherichia coli*. Porém, alguns genes podem requerer condições específicas para serem expressos que poderão ou não ser atendidas pela *E. coli*, nesse caso outros hospedeiros como a *Pseudomonas putida* podem ser utilizados (DANIEL, 2005).

## 7.2. Atividade ligninolítica dos hospedeiros

A análise completa dos genomas dos hospedeiros *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida* KT2440 identificou a presença de lacase e DyP peroxidases. De fato, a atividade da lacase e da DyP peroxidase nesses hospedeiros já foram bem estudadas, corroborando as suas atividades ligninolíticas (DJOKO *et al.*, 2015; KUDDUS; JOSEPH; WASUDEV, 2013; LI *et al.*, 2007; MCMAHON *et al.*, 2007; WASAK *et al.*, 2018). Uma maneira de identificar a atividade de enzimas ligninolíticas é através da utilização de compostos com estruturas e ligações similares a aquelas presentes na lignina (ROTH; SPIESS, 2015).

A *E. coli* HB101 descoloriu os três corantes utilizados no ensaio, sendo a maior porcentagem de descoloração para o corante azure B, seguido do azul de metileno e azul brilhante de remanzol. A *Pseudomonas putida* KT2440 também descoloriu os três corantes utilizados e aparenta possuir uma atividade maior de descoloração dos corantes sintéticos, pelo menos nas primeiras 24 horas, do que a *Escherichia coli* HB101. Essa atividade superior pode ser atribuída à presença da enzima DyP peroxidase ou ao fato da *Pseudomonas putida* ser uma bactéria com diversas vias metabólicas para a degradação e consumo de compostos aromáticos como fonte de carbono (BUGG *et al.*, 2011a). A DyP peroxidase está presente em plantas, fungos e bactérias. As DyP peroxidases oxidam os substratos típicos descritos para as demais peroxidases, todavia é a única classe de peroxidase capaz de degradar antraquinonas livres de hidroxila (SUGANO, 2009; SUGANO *et al.*, 2007). Muitos corantes sintéticos são derivados da antraquinona. Apesar do genoma de *Escherichia coli* K12 apresentar apenas a indicação de uma peroxidase não havendo maiores detalhes, estudos relataram que a heme proteína YcdB de *Escherichia coli* apresenta uma região da sua sequência e atividade catalítica similar à da DyP peroxidase (STURM *et al.*, 2006; SUGANO *et al.*, 2007).

A *Pseudomonas putida* ao longo do processo de descoloração modifica as características colorimétricas do meio tornando os corantes azuis mais esverdeados. Essa característica dificulta a detecção da descoloração do corante no meio de cultura e por isso os gráficos apresentam resultados, em que ao contrário do que se espera, a *P. putida* vai diminuindo a descoloração do meio ao longo do tempo. Os resultados indicam que o meio vai se tornando mais “escuro”. Uma hipótese levantada para explicar esses resultados é a modificação das características colorimétricas do meio impossibilitando a absorção de luz no comprimento original de cada corante e conseqüentemente levando a um resultado errôneo.

Há diversas hipóteses para explicar a atividade da *P. putida* em mudar a coloração do meio com corantes. Essa modificação pode ser indício da produção de pigmentos por parte da cepa. As bactérias podem produzir pigmentos quando expostas a diferentes condições de cultivo. Em fungos, a presença da lacase contribui para a formação de pigmentos (MCMAHON *et al.*, 2007). Em um estudo de identificação de isolados bacterianos ligninolíticos da caatinga por metodologia baseada na descoloração de corantes, a modificação das características colorimétricas do meio também foi notada (PASTORE, 2016). Inúmeras respostas podem ser dadas para essa situação. Para o caso específico, a *P. putida* pode ter produzido pigmentos em resultado a um estresse celular ocasionado pela presença dos corantes tóxicos, e esses podem ter gerado um acúmulo de metabólitos (PASTORE, 2016). Ou então, a toxicidade dos corantes pode ter desencadeado mecanismos de defesa. Por fim, a modificação da característica colorimétrica do meio pode ser resultado de reações enzimáticas (PASTORE, 2016).

No presente trabalho, apenas as atividades ligninolíticas dos hospedeiros foram testadas por ensaio de descoloração de corantes sintéticos. Os demais clones da biblioteca foram testados por metodologias baseadas na oxidação de compostos monoaromáticos. Para identificação da atividade ligninolítica por ensaio com corantes é necessário mensurar a descoloração ao longo do tempo. Essa abordagem foi considerada de extrema dificuldade para a proposta desse trabalho, dada a quantidade de clones da biblioteca Belig MG 6p a serem trabalhados e a dificuldade da técnica. Especificamente, para realizar essa metodologia com os clones da biblioteca, a quantidade de corante inicial oferecida para cada clone teria que ser igual, além do mais, os corantes são fotossensíveis e tendem a precipitar no meio, o que poderia levar à identificação de elevado número de falsos positivos.

### 7.3. Metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas

#### 7.3.1. Identificação de clones positivos a partir da oxidação do guaiacol e ácido ferúlico

A abordagem funcional para identificação de clones positivos em biblioteca metagenômica é baseada na identificação dos fenótipos dos fragmentos de DNA clonados no vetor e que expressam atividades enzimáticas provenientes dos genes de interesse. Por meio dessa abordagem é possível analisar simultaneamente diversos clones com a possibilidade de identificar genes inteiros que codifiquem para enzimas ainda não estudadas (DANIEL, 2005). Para que essa metodologia seja de fato funcional, é necessário o reconhecimento da região promotora do vetor por parte do hospedeiro e a expressão dos clones independente da sua estrutura e tamanho (ROPAÍN, 2014).

A metodologia utilizada para a identificação de potenciais clones positivos de enzimas ligninolíticas foi uma proposta adaptada do trabalho de Reiiis *et al.* (2013). É importante ressaltar que, como os hospedeiros possuem atividade ligninolítica intrínseca, a identificação de clones positivos foi realizada por uma metodologia baseada na atividade excedente dos clones. Ou seja, apenas clones que apresentaram uma atividade superior à dos hospedeiros serão considerados positivos. Como o hospedeiro *Pseudomonas putida* KT2440 possui duas enzimas ligninolíticas em seu genoma e tende a modificar as características do meio de cultura, apenas os clones da biblioteca transformados em *Escherichia coli* HB101 foram triados por essa metodologia. Metodologias funcionais futuras que utilizem hospedeiros com atividade ligninolítica basal silenciada oferecem uma grande oportunidade em estudos para prospecção de enzimas ligninolíticas bacterianas por abordagem metagenômica.

Apesar dos clones terem sido inoculados a  $OD_{600nm} = 0,5$  inicial para a realização da metodologia oxidativa, a média da variação do crescimento de todos os clones foram distintas para os meios de cultura com a presença do guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico, sugerindo que esses reagentes podem variar quanto ao grau de toxicidade. No geral as maiores variações do crescimento dos clones estão relacionadas com as maiores variações da atividade, mostrando que para esse *screening* crescimento e atividade aparentam estar correlacionados de maneira direta.

A seleção dos meios de culturas foi necessária para estabelecer o meio que ofereceria as melhores condições de crescimento para a *Escherichia coli* HB101

transformadas. Meios mínimo, como o MSM e LYB, suplementados com a lignina Kraft (Sigma-Aldrich) como única fonte de carbono não possibilitam o crescimento da *E. coli*. Apesar da presença de enzimas ligninolíticas intrínsecas do hospedeiro, a lignina é uma molécula estruturalmente complexa sendo necessário diversas enzimas para degradá-la. Além do mais, a *Escherichia coli* HB101 aparenta não possuir as vias enzimáticas necessárias para consumir os compostos gerados na quebra da lignina como única fonte de carbono. Nesse caso, seria possível identificar a quebra da lignina em um meio de cultura que fornece uma fonte alternativa de carbono que promovesse o crescimento bacteriano. O meio LB é comumente utilizado em laboratório e permite o crescimento bacteriano em um curto período de tempo. Nesse caso, como foi utilizado o meio LB rico em nutrientes, a presença ou ausência de glicose no meio não afetou o crescimento celular. As condições de cultivos como agitação e adição de sulfato de cobre também foram otimizadas. Para o crescimento aeróbico da cepa, a presença de oxigênio molecular é necessária. Nesse caso uma agitação maior do meio permitiu o maior crescimento celular. O sulfato de cobre, apesar de necessário para a atividade da lacase, também atua como bactericida. Logo, concentrações muito altas tendem a inviabilizar o crescimento celular. O sulfato de cobre quando adicionado na fase lag é prejudicial para o crescimento bacteriano. Foi decidido adicionar o sulfato de cobre apenas no segundo momento de incubação após o crescimento celular.

No total, 3.174 clones foram triados pela metodologia funcional, sendo que sete potenciais clones positivos foram selecionados para terem o seu fenótipo corroborado. O comportamento da atividade dos clones ao longo dos ensaios definiu quais clones apresentaram o maior potencial em expressar enzimas de interesse, sendo eles: P1 7A, P3 3G e P4 7G. Os clones P7 11C e P10 12F serão digeridos uma terceira vez para confirmar a presença do inserto. Esses clones linearizaram nas duas digestões realizadas, sugerindo que o sítio da enzima de restrição EcoRV, poderia não ter se reconstituído durante a ligação eDNA no vetor pBTL-2. Enzimas de restrição como a EcoRV que geram terminações abruptas permitem que qualquer fragmento abrupto se ligue, quando na presença de ligase. Por isso, frequentemente não há a reconstituição dos sítios de restrição enzimática. O padrão de digestão do clone P1 4C demonstrou a presença de um segundo clone da biblioteca, sendo necessário estriá-lo novamente em placa para isolar uma única colônia e repetir os testes funcionais. O clone P8 12B apesar da sua digestão mostrar a presença de um inserto esse clone possui um histórico de dar atividade oxidativa

com grande variação biológica para os compostos guaiacol e ácido ferúlico nos sucessivos ensaios. Um teste mais específico será futuramente elaborado para testar a atividade ligninolítica desse clone.

- **Clone P1 7A**

O clone P1 7A oxidou os quatro compostos analisados, tendo uma potencial atividade oxidativa na presença de catecol, guaiacol e ácido ferúlico. Esse clone possui 7 ORFs e 75 % de identidade com uma sequência do genoma da espécie *Bacillus subtilis* e *Bacillus atrophaeus*. O gênero *Bacillus* é um dos mais abundante na sexta passagem do consórcio enriquecido para degradar lignina. Apenas três domínios conservados foram identificados na sequência. Dois domínios presentes na ORF 1: Exonuclease e Helicase-exonuclease. O domínio da helicase exonuclease possui a função relacionada ao processo biológico de reparo da fita de DNA (YEELES; DILLINGHAM, 2007). A princípio, nenhum desses domínios conservados explicariam a atividade desse clone em oxidar os reagentes guaiacol, ácido ferúlico, catecol e 4-metilcatecol. Ainda há uma ORF de 109 aminoácidos para qual nenhuma identidade foi encontrada.

O terceiro domínio conservado está na ORF 7, sendo para uma proteína de germinação de esporos de *Bacillus* sp. Os esporos são estruturas bacterianas que resistem a uma série de estresses abióticos, inclusive a exposição à luz UV e a presença de agentes oxidantes. O córtex do esporo é protegido contra a ação desses estresses por uma camada proteica que inclusive influencia na germinação dos esporos (MARTINS *et al.*, 2002). A caracterização molecular dos endósporos de *Bacillus subtilis* identificou uma proteína CotA de 404 aminoácidos com atividade de lacase (MARTINS *et al.*, 2002). A CotA possui íons de cobre nos seus centros catalíticos T1 e T2/T3, assim como a lacase. A atividade dessa enzima foi avaliada pela oxidação do substrato siringaldazina e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio (ABTS). Ela mostrou atividade oxidativa em ambos os substratos. A presença da CotA é responsável pela pigmentação nos esporos associada à resistência à exposição a luz ultravioleta (MARTINS *et al.*, 2002). A ORF 7 do clone P1 7A foi alinhada com a enzima CotA de *Bacillus subtilis* havendo uma similaridade de 17,4% com 25 aminoácidos conservados entre as sequências. Parte dos aminoácidos conservados estão no domínio tipo I de ligação de cobre. As lacases possuem três núcleos de ligação de cobre, sendo que o sitio de ligação I é responsável pela oxidação do substrato (GONZALO *et al.*, 2016). Quando comparada

à CotA, a ORF 7 do clone P1 7A aparenta estar incompleta, indicando a necessidade de maiores caracterizações para essa ORF. É possível que apesar de ser uma ORF parcial, caso o sítio catalítico da enzima encontre-se presente na sequência, esta esteja atuando na oxidação dos substratos. Metodologias futuras baseadas na caracterização e obtenção da ORF completa serão realizadas.

- **Clone P3 3G**

O clone P3 3G oxidou os quatro compostos aromáticos selecionados. Esse clone possui 14 ORFs e 91 % de identidade com uma sequência do genoma da espécie *Microvirga ossetia*. O gênero *Microvirga* representa 1 % da abundância da comunidade microbiana na sexta passagem do consórcio enriquecido para degradar lignina. Essa espécie *Microvirga ossetia* foi isolada de nódulos da planta *Vicia alpestris* e o sequenciamento completo do seu genoma permitiu identificar a presença de uma lacase (SAFRONOVA *et al.*, 2017). Das 14 ORFs presentes nesse clone 11 são classificadas como proteínas hipotéticas, pois não possuem funções descritas, ou não possuem identidade encontrada. Dois domínios conservados, uma para 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase e outro para sistema de efluxo de potássio regulado por glutatona foram encontrados na sequência do clone P3 3G.

A enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase é uma enzima da família IspH que catalisa a última reação da via do mevalonato (SUBRAMANIYAM *et al.*, 2011). A via do mevalonato está presente no metabolismo de bactérias e é responsável pela síntese de pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) e pirofosfato de isopentenilo (IPP), que são precursores na biossíntese de moléculas como os isoprenóides (REKITTKE *et al.*, 2008). Essa enzima ainda é uma oxirredutases com regiões ligantes de íons de ferro e enxofre (REKITTKE *et al.*, 2008). Dentre os clones analisados, esse clone apresentou o 2º maior crescimento na presença do ácido ferulico e a maior atividade na presença desse mesmo reagente. É possível que dada as características da enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase, ela tenha oxidado os substratos, mas na literatura não há qualquer referência dessa enzima envolvida na oxidação de reagentes aromáticos utilizados no âmbito desse trabalho.

No geral, o sistema de efluxo de potássio regulado por glutatona é responsável por conferir resistência e promover a sobrevivência celular durante a exposição a metabólitos tóxicos (FERGUSON *et al.*, 1993; MUNRO *et al.*, 1991). As enzimas

glutationas são caracterizadas por proteger as células contra o ataque de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e metais pesados. As  $\beta$ -eterases dependentes de glutatona possuem uma participação ativa na degradação da lignina ao clivar as ligações de  $\beta$ -aril éter (GONZALO *et al.*, 2016). No presente caso, é possível que a presença de um canal de efluxo de potássio regulado por glutatona no clone P3 3G possa ter favorecido a resistência a toxicidade dos reagentes aromáticos utilizados na metodologia funcional. Essa hipótese pode ser sustentada pelo fato do clone P3 3G apresentar um dos maiores crescimentos e a maior atividade na presença do ácido ferúlico, que aparenta ser o composto mais tóxico dentre os utilizados no ensaio, quando comparado aos demais clones. Se for esse o caso a atividade resultante desse clone pode ser a atividade de ligninases intrínsecas do hospedeiro favorecida pela presença do sistema de efluxo de potássio regulado por glutatona. É necessário ressaltar que esse mesmo clone apresenta duas ORFs com o tamanho de 368 e 244 aminoácidos sem qualquer identificação. Ainda assim, extensivas análises não indicaram nenhuma identidade e nenhuma presença de domínios conservados

- **Clone P4 4G**

O clone P4 7G possui nove ORFs e 71 % de identidade com uma sequência do genoma do gênero *Mesorhizobium*. As análises taxonômicas do consórcio Belig Mg cultivado a 37 °C e enriquecido para degradar lignina extraída por método alcalino indicam que o gênero *Mesorhizobium* está presente somente até a quarta passagem do consórcio microbiano, em abundância muito baixa. É possível que esse gênero esteja presente na sexta passagem, todavia dada a baixa abundância em que apareceria na comunidade o sequenciamento não detectou seus representantes.

Esse gênero é encontrado no solo e possui a função de fixar de nitrogênio sendo também capaz de formar nódulos nas raízes de plantas. Esse gênero também possui uma lacase em seu genoma (MEYER *et al.*, 2019). Estudos anteriores identificaram a *Mezorhizobium* sp. como uma das bactérias de solo capazes de degradar lignina Kraft (TIAN; POURCHER; PEU, 2016). A atividade ligninolítica dessa bactéria foi confirmada pela capacidade de descolorir os corantes azul brilhante de remanzol e azul de metileno (TIAN; POURCHER; PEU, 2016). A *Mezorhizobium* sp. ainda foi capaz de mineralizar compostos como o guaiacol e álcool veratrílico (TIAN; POURCHER; PEU, 2016).

Das ORFs encontradas, a ORF 7 codifica para uma proteína hipotética com 60% de identidade com *Rhodococcus zopfii*. Esse gênero representa 1 % da comunidade bacteriana na sexta passagem do consórcio. A ORF 2 codifica para um glicosiltransferase com 63 % de identidade com *Mesorhizobium* sp. Esse clone ainda apresenta uma sequência parcial para a ORF3 de 88 aminoácidos com 39 % de similaridade a uma superóxido dismutase da espécie *Labilithrix luteola*.

A glicosiltransferase atua na transferência de uma molécula de açúcar de um doador para um receptor formando ligações glicosídicas (KUMARI *et al.*, 2014). Em plantas, está envolvida na biossíntese da parede celular. Alguns estudos indicam que as UDP-glicosiltransferases (UGTs) também poderiam ter uma participação na síntese de lignina (KUMARI *et al.*, 2014; WANG; HOU, 2009). Para que a biossíntese da lignina ocorra, os monômeros de álcool cumárilico, álcool coniferílico e álcool sinapílico devem ser transportados do citosol até a parede celular. Há indícios de que esses seriam transportados na forma de glicosídeos (WANG; HOU, 2009). As glicosiltransferases recombinantes (UGT) seriam responsáveis por atuarem como 4-O-glicosiltransferases dos álcoois coniferílicos e sinapílicos sugerindo assim a sua participação na biossíntese da lignina (WANG; HOU, 2009). Todavia, essa atividade ainda não é bem elucidada.

A ORF 3 do clone P4 7G foi alinhada com a superóxido dismutase da espécie *Labilithrix luteola* resultando em 21,8 % de similaridade. Infelizmente, a ORF 3 é parcial, sendo necessário obter a sequência completa para maiores caracterizações. A superóxido dismutase atua na dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido sendo importante para a defesa celular contra o estresse oxidativo. Estudos recentes demonstraram a participação de duas superóxidos dismutases na modificação da estrutura da lignina (RASHID *et al.*, 2015). Essas enzimas seriam capazes de clivar regiões de ligações de aril-C e C-C modificando a lignina Kraft e Organosol e substratos com estruturas análogas às da lignina. As quebras das ligações seriam realizadas a partir da geração de um radical livre com alto potencial oxidante.

Aparentemente, a atividade desse clone pode estar associada apenas à ORF de 102 aminoácidos com nenhuma identidade encontrada. Se desconhece a capacidade da enzima glicosiltransferase de oxidar os reagentes monoaromáticos guaiacol, catecol, 4-metilcatecol e ácido ferúlico. A atividade desse clone em oxidar os quatro compostos aromáticos poderia estar associada à presença da superóxido dismutase, sendo que há

duas hipóteses: É possível que essa ORF não esteja funcional, uma vez que as superóxidos dismutases possuem de 180 – 250 aminoácidos e a ORF 3 possui apenas 88 aminoácidos; É possível que esteja funcional, uma vez que parte do alinhamento ocorre no domínio conservado de ligação de cobre, inclusive compartilhando o aminoácido alanina que faz parte do sítio catalítico da sequência de aminoácidos de referência. São necessárias maiores caracterizações.

### **7.3.2. Oportunidades encontradas na metodologia baseada na função para identificação de enzimas ligninolíticas bacterianas**

A metodologia funcional para identificação de enzimas ligninolíticas por abordagem metagenômica oferece uma série de oportunidades. A primeira delas é relacionada aos bancos de dados para analisar as sequências obtidas. A maioria das ORFs classificadas como proteínas hipotéticas ou para as quais não há nenhuma identificação disponível revela a carência de informação nos bancos de dados para enzimas bacterianas envolvidas na degradação da lignina. Estudos extensivos para maiores caracterizações de enzimas ligninolíticas bacterianas são necessárias, e o presente trabalho ao obter potenciais clones positivos por metodologia funcional indica a possibilidade de contribuir para novos depósitos de sequências nos bancos de dados.

A segunda oportunidade é no desenvolvimento de protocolos específicos para as enzimas ligninolíticas. Assim como citado anteriormente, poucos trabalhos obtiveram sucesso na identificação de ligninases bacterianas por abordagem funcional em bibliotecas metagenômicas. No presente trabalho foi desenvolvido um protocolo para metodologia funcional. Mas, os resultados obtidos demonstraram uma sobreposição de atividades de outras enzimas em oxidar os substratos escolhidos, demonstrando que o protocolo deve ser aprimorado. Quanto maiores informações disponíveis nos bancos de dados, maiores as possibilidades de se otimizar um protocolo para a finalidade aqui desejada.

Ao trabalhar com expressão de enzimas bacterianas por abordagem metagenômica uma dificuldade encontrada são níveis de expressão dos clones. A abordagem metagenômica para identificação de lacases e peroxidases bacterianas em *Escherichia coli* pode resultar em um sistema de expressão a baixos níveis. A falta de dados sobre metodologias funcionais em bibliotecas metagenômica, bem como a falta de conhecimento na capacidade de oxidação dos reagentes escolhidos pode dificultar a

identificação das enzimas. A formulação de meios de culturas mais específicos suplementados com outros indutores além do cobre para as lacases podem facilitar a detecção das enzimas ligninolíticas em abordagens futuras.

Apesar da maioria dos clones não mostrarem atividades superiores ao do hospedeiro para a oxidação dos compostos análogos da lignina e os que mostraram não possuírem enzimas ligninolíticas identificadas em um primeiro momento, a presença de enzimas ligninolíticas na biblioteca metagenômica Belig MG 6p não deve ser descartada. A *Escherichia coli* K12 possui em seu genoma o gene cueO que codifica para uma lacase da superfamília multicobre oxidase (RILEY, *et al.*, 2006). Possui ainda o gene sodA, sodB e sodC que codificam para superóxido dismutase e o gene btuE que codifica para glutatona peroxidase (RILEY, *et al.*, 2006). A partir do protocolo funcional utilizado descobriu-se a possibilidade de qualquer inserto dos clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p, que favoreça a atividade dessas enzimas presentes no genoma da *E. coli*, poderem aumentar a atividade intrínseca do hospedeiro na oxidação dos compostos aromáticos, abrindo um leque de oportunidades para a identificação de novas enzimas que auxiliem as enzimas ligninolíticas. Outra oportunidade é trabalhar o silenciamento da atividade ligninolítica dos hospedeiros escolhidos, disponibilizando um hospedeiro que careça da atividade desejada. Estratégia essa similar à utilizada por Parachin e Gorwa-Grauslund (2011) e Mendes (2016) para identificação de xiloses isomerases em bibliotecas metagenômica.

#### **7.4. Metodologia baseada na sequência para identificação de enzimas ligninolíticas**

Essa metodologia é completamente dependente do uso de *primers* desenhados a partir de regiões conservadas das sequências gênicas de interesse. Os *primers* Cu1AF e Cu4R utilizados foram construídos a partir das regiões conservadas dos sítios de ligação de cobre de lacases bacterianas dos gêneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Streptomyces*, *Thermus*, *Marinomonas* (AUSEC; VAN ELSAS; MANDIC-MULEC, 2011). Em Ausec, Elsas e Mandic-Mulec (2011) amplificaram lacases de 12 gêneros diferentes. O segundo par de *primers* utilizados, Cu1F e Cu4R, foi do trabalho de Fang *et al.* (2011) que em seu trabalho permitiu a amplificação de uma lacase de *Roseobacter* sp.

As análises confirmam que para o presente trabalho foram amplificadas apenas lacases parciais de *Escherichia coli*. A presença da lacase corrobora a possibilidade da

presença de enzimas ligninolíticas na biblioteca metagenômica Belig MG 6p. Essa metodologia baseada na sequência, em um primeiro momento, é independente de métodos de cultivos e de sistemas de expressão dos hospedeiros (ALVAREZ, 2013). Essa abordagem apresenta como a maior desvantagem o fato de levar à identificação de genes muitas vezes já descritos por possuírem regiões homologas àquelas utilizadas nos *primers*. Assim, a descoberta de genes completamente novos pode não ser tão fácil.

A multicobre oxidase (lacase) do clone 1p3 foi alinhada com a multicobre oxidase (lacase) de *Escherichia coli* demonstrando que as sequências compartilham 395 aminoácidos e 96,6 % de similaridade. O alinhamento foi utilizado na construção de uma árvore filogenética corroborando a identidade da multicobre oxidase (lacase) encontrada pertencer à espécie *Escherichia coli*. Uma estratégia para obter a sequência completa é desenhar *primers* internos a sequência obtida e realizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) juntamente com *primers* que anelam no vetor pJet, amplificando assim a região que falta.

Genes de diferentes bactérias estão presentes em diferentes concentrações da biblioteca Belig MG 6p, sendo assim, a técnica baseada na sequência pode favorecer os genes mais abundantes. Esperava-se que algumas sequências amplificadas fossem similares, por isso 60 sequências foram enviadas ao sequenciamento. Todavia, é possível que o esforço amostral, 60 clones sequenciados, não tenha sido o suficiente para detectar lacases de diferentes espécies. Talvez o sequenciamento de maior número de clones possibilitasse a identificação de lacases de outras espécies bacterianas. Uma etapa adicional, anterior ao envio dos clones para o sequenciamento, utilizando diferentes enzimas de restrição no processo de digestão dos fragmentos possibilitaria a identificação de diferentes padrões de insertos e possivelmente diferentes clones. Minimizando o risco da maioria dos clones enviados ao sequenciamento codificarem para a mesma enzima.

Outra possibilidade para identificar lacases de diferentes espécies é optar por uma abordagem similar a utilizada por Ausec *et al.* (2017). Em um primeiro momento, os *primers* descritos por Ausec *et al.* (2011) foram utilizados para amplificar fragmentos de interesse pertencentes a lacases na primeira reação em cadeia da polimerase. Uma segunda reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando o DNA da primeira como molde e um segundo par de *primers* foi desenhando especificamente para os grupos de microrganismos presentes na biblioteca. Uma vez que se conhece os grupos taxonômicos

presentes na biblioteca Belig MG 6p, essa abordagem parece promissora para identificar lacases de outras espécies bacterianas além daquelas já descritas de *Escherichia coli*.

A enzima metiltransferase de *Escherichia coli* também foi amplificada. As metiltransferases da família CheR são reponsaveis pela metilação de certos compostos, proteínas e DNA atuando no mecanismo de sinalização da quimiotaxia em bactérias (SCHLUCKEBIER *et al.*, 1995). Em plantas, uma classe de metiltransferases, as O-metiltransferases, participam da biossíntese da lignina (BHUIYA; LIU, 2010). Os precursores da lignina, guaiacil, siringil e p-hidroxifenil, diferem entre si apenas no grau de metilação.

Os *primers* por serem degenerados podem não mostrar a especificidade apenas para amplificar lacases bacterianas. Para estudos de identificação de enzimas ligninolíticas bacterianas por metodologia baseada na sequência uma outra dificuldade ainda é encontrada. Uma vez que a sequência de interesse foi amplificada, esse método é dependente de comparações da sequência de nucleotídeos obtidos com sequências homologas ou com regiões conservadas nos bancos de dados. As enzimas ligninolíticas bacterianas ainda estão em menor número nos bancos de dados quando comparadas as enzimas ligninolíticas de fungos.

## **7.5. Metodologia de complementação da atividade em *Pseudomonas putida***

### **KT2440**

O *screening* funcional por complementação da atividade em *Pseudomonas putida* KT2440 visa selecionar transformantes com os clones da biblioteca Belig MG 6p que permita o crescimento em meio com guaiacol como única fonte de carbono. O curto enriquecimento com *P. putida* KT240 com os clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p para consumo de guaiacol como única fonte de carbono resultou no crescimento de algumas colônias. O processo de enriquecimento permitiu que transformantes com a atividade desejada sejam selecionados e aumentem a sua abundância no meio. As colônias identificadas possivelmente possuem clones que permitem a conversão de guaiacol em catecol complementando a atividade em falta dessa cepa. Esses clones serão futuramente trabalhados.

Um estudo similar utilizando a mesma abordagem de complementação da atividade em *Pseudomonas putida* KT2440 foi realizado por Mallison *et al* (2018) que identificou um aril-O-desmetilase promíscua chamada de citocromo p450. Esse

citocromo foi descrito inicialmente desmetilando unidades de guaiacol em catecol, mas estudos mais específicos demonstraram que ele catalisa desmetilações da unidade de O-aril em uma série de substratos (MALLINSON *et al.*, 2018). Essa reação é fundamental para o catabolismo de derivados da lignina. Descobertas como essas descritas por Mallison *et al.* (2018) possibilitam trabalhos futuros voltados para a engenharia genética da *Pseudomonas putida* para a produção de químicos desejados a partir da lignina.

## 8. CONCLUSÃO

Neste segundo capítulo foi construída uma biblioteca metagenômica Belig MG 6p com o DNA da sexta passagem de um consórcio microbiano enriquecido para degradar lignina. Para triar a biblioteca para enzimas ligninolíticas bacterianas foram utilizadas duas metodologias: uma baseada na função e outra baseada na sequência. Para triar a biblioteca para enzimas que permitissem o consumo do guaiacol foi utilizada uma abordagem funcional baseada na complementação da atividade. Para a abordagem baseada na função foi necessário criar um protocolo de oxidação de compostos aromáticos. Por essa metodologia foram sequenciados três potenciais clones positivos: P1 7A, P3 3G e P4 7G. Analisando as ORFs desses clones em um primeiro momento nenhuma enzima ligninolítica foi identificada. Todavia, ORFs de interesse foram obtidas.

O clone P1 7A possui uma ORF que codifica para uma proteína de esporos com similaridade a uma proteína de *Bacillus subtilis*. Essa ORF foi alinhada com uma proteína CotA da mesma espécie e que apresenta atividade de lacase. Apesar da baixa similaridade entre as sequências, parte do alinhamento aconteceu dentro do sítio conservado de ligação de cobre I. Esse sítio é responsável pela oxidação do substrato. O clone P3 3G possui duas ORFs de interesse. A primeira que codifica para a enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase. Essa enzima é classificada com uma oxirredutase e pode estar atuando na oxidação dos compostos aromáticos. Não há relatos na literatura dessa enzima com atividade ligninolítica. A segunda ORF de interesse do clone P3 3G codifica para um canal de fluxo de potássio regulado por glutatona relacionado a resistência a compostos tóxicos no meio. O último clone sequenciado, P4 4G, possui uma ORF parcial com similaridade a uma superóxido dismutase. Essa enzima atua diretamente na degradação da lignina. Também foram obtidas ORFs sem identidades encontradas.

Por sua vez, a abordagem baseada na sequência permitiu a identificação de uma multicobre oxidase, lacase, de *Escherichia coli*. É necessário construir *primers* mais específicos e optar por um esforço amostral maior para identificação de lacases de outras bactérias. A última metodologia utilizada nesse trabalho foi baseada na complementação da atividade em *Pseudomonas putida* KT2440 que permitiu a obtenção de transformantes que metabolizam guaiacol. Estudos como podem permitir a compreensão da dinâmica metabólica dos compostos aromáticos, bem como aplicações futuras para engenharia metabólica utilizando a *Pseudomonas putida* KT2440 como organismo modelo. Ainda há a necessidade de mais estudos da valorização da lignina por abordagem metagenômica.

## REFERÊNCIAS

- ABRIL, M. A. et al. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 12, p. 6782–6790, 1989.
- AHMAD, M. et al. Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 5, p. 815–821, 2010.
- AKITA, H. et al. Isolation and characterization of Burkholderia sp. strain CCA53 exhibiting ligninolytic potential. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.
- ALCALDE, M. Engineering the ligninolytic enzyme consortium. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 155–162, 2015.
- ALVAREZ, T. M. **Desenvolvimento de uma biblioteca de enzimas a partir de metagenoma de solo**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- ANASTASI, E. et al. Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 10, p. 3140–3148, 2016.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009.
- ARUMUGAM, N.; KALAVATHI, P.; MAHALINGAM, P. U. Lignin Database for Diversity of Lignin Degrading Microbial Enzymes (LD 2 L). **Research in Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 13–18, 2014.
- AUSEC, L. et al. The first acidobacterial laccase-like multicopper oxidase revealed by metagenomics shows high salt and thermo-tolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 6261–6276, 2017.
- AUSEC, L.; VAN ELSAS, J. D.; MANDIC-MULEC, I. Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 975–983, 2011.
- AZADFAR, M.; GAO, A. H.; CHEN, S. Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 58–66, 2015.
- BAPTISTA, N. M. Q. et al. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, p. 019904, 7 pp., 2012.
- BATISTA-GARCÍA, R. A. et al. From lignocellulosic metagenomes to lignocellulolytic genes: trends, challenges and future prospects. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2016.
- BATISTA, S. B. **Diversidade e Atividades Microbianas do Solo da Floresta Amazônica-Brasil, Submetida a Estresse Hídrico Utilizando Técnicas de Biologia Molecular**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- BELOQUI, A. et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression

library of bovine rumen: Biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22933–22942, 2006.

BERGMANN, J. C. **Utilização de estratégias metagenômicas para aplicações biotecnológicas no setor de biocombustíveis**. [s.l.] Universidade Católica de Brasília, 2013.

BHUIYA, M. W.; LIU, C. J. Engineering monolignol 4-O-methyltransferases to modulate lignin biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 1, p. 277–285, 2010.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003.

BORNEMAN, J.; HARTIN, R. J. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4356–4360, 2000.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 1–7, 1997.

BOSSHARD, P. P. Incubation of fungal cultures: How long is long enough? **Mycoses**, v. 54, n. 5, 2011.

BRENNER, K.; YOU, L.; ARNOLD, F. H. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 483–489, 2008.

BRODEUR, G. et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

BROSSI, M. J. DE L. et al. Soil-Derived Microbial Consortia Enriched with Different Plant Biomass Reveal Distinct Players Acting in Lignocellulose Degradation. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 3, p. 616–627, 2016.

BRYANT, F. R. Construction of a recombinase-deficient mutant recA protein that retains single-stranded DNA-dependent ATPase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 18, p. 8716–8723, 1988.

BUGG, T. D. H. et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 394–400, 2011a.

BUGG, T. D. H. et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1883, 2011b.

BUGG, T. D. H.; RAHMANPOUR, R. Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 29, p. 10–17, 2015.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CARLOS, C.; FAN, H.; CURRIE, C. R. Substrate shift reveals roles for members of bacterial consortia in degradation of plant cell wall polymers. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–10, 2018.

CARVALHO, M. C. DA C. G. DE; SILVA, D. C. G. DA. Sequenciamento de DNA de

nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735–744, 2010.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia Básica**. Recife: UFRPE / CODAI, 2010.

CARVALHO, M. A. **Atividade de ligninases e celulases de linhagens de *Lentinula edodes* (berk.) Pegler em diferentes meios de cultivo**. [s.l.] Universidade de Lavras, 2011.

CHANDRA, R. et al. Isolation and characterization of bacterial strains *Paenibacillus* sp. and *Bacillus* sp. for kraft lignin decolorization from pulp paper mill waste. **The Journal of general**, v. 54, p. 399–407, 2008.

CHANTARASIRI, A.; BOONTANOM, P.; NUIPLOT, N. O. Isolation and characterization of *Lysinibacillus sphaericus* BR2308 from coastal wetland in Thailand for the biodegradation of lignin. **AAEL Bioflux**, v. 10, n. 2, p. 200–209, 2017.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

CHOI, K.-H.; KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 3, p. 391–397, mar. 2006.

COELHO, G. D. **Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo**. [s.l.] Instituto de Botânica de São Paulo, 2007.

CONCEIÇÃO, T. D. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por fungos agaricomycetes cultivados em resíduos agro-industriais do estado da Bahia**. [s.l.] Universidade Estadual de Feira De Santana, 2010.

COSTA, A. F. DE S. et al. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciência & Tecnologia**, v. 1, p. 1–7, 2007.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 470–478, 2005.

DEANGELIS, K. M. et al. Strategies for enhancing the effectiveness of metagenomic-based enzyme discovery in lignocellulolytic microbial communities. **Bioenergy Research**, v. 3, n. 2, p. 146–158, 2010.

DEANGELIS, K. M. et al. Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in *Enterobacter lignolyticus* SCF1. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. SEP, p. 1–14, 2013.

DEGNAN, P. H.; OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **International Society for Microbial Ecology**, v. 6, p. 183–194, 20012.

DIAS, L. M. S. Síntese e caracterização de adesivos de lignina kraft de eucalipto. p. 71, 2014.

DITTMER, N. T.; GORMAN, M. J.; KANOST, M. R. Characterization of endogenous and recombinant forms of laccase-2, a multicopper oxidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 9, p. 596–606,

2009.

DJOKO, K. Y. et al. Reaction Mechanisms of the Multicopper Oxidase CueO from. **American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2005–2015, 2015.

EBERHART, B.; CROSS, D. F.; CHASE, L. B-glucosidase system of *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology**, v. 87, n. 5, p. 761–770, 1964.

ELIAS, A. M. et al. Produção de enzimas oxidativas em substratos lignocelulósicos e aplicação na deslignificação de polpas celulósicas. In: RESENDE, R. R. (Ed.). . **Biociencia Aplicada à Agro&Indústria**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2017. p. 569–600.

ESLYN, W. E. Changes in the Chemical Composition of Wood Caused by Six Soft-Rot Fungi. **Phytopathology**, v. 65, n. 4, p. 473, 1975.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic**, v. 16, p. 231–240, 2002.

FALADE, A. O. et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 1, 2017.

FANG, W. et al. Evidence for Lignin Oxidation by the Giant Panda Fecal Microbiome. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–10, 2012.

FANG, X. et al. Screening of a microbial consortium for selective degradation of lignin from tree trimmings. **Bioresource Technology**, v. 254, p. 247–255, 2018.

FANG, Z. et al. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1103–1110, 2011.

FELSKE, A. et al. Phylogeny of the Main Bacterial 16S rRNA Sequences in Drentse A Grassland Soils (The Netherlands). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 871–879, 1998.

FERGUSON, G. P. et al. Activation of potassium channels during metabolite detoxification in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1297–1303, 1993.

FOELKEL, C. **Individualização das fibras de madeira do eucalipto para a produção de celulose kraft**. [s.l.: s.n.].

FUNNICELLI, M. I. G. **Explorando uma comunidade bacteriana isolada de uma pilha de bagaço de cana-de- açúcar e seu potencial funcional na degradação de biomassa lignocelulósica**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2018.

GALL, D. L. et al. Biochemical transformation of lignin for deriving valued commodities from lignocellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 120–126, 2017.

GONZALO, G. DE et al. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 110–119, 2016.

GORENSTEIN, M. R. **Métodos de amostragem no levantamento da comunidade arbórea em floresta estacional semidecidual m**. [s.l.] Universidade de São Paulo,

2002.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**. 4. ed. New York: [s.n.]. v. Vol 1

GRIFFITH, M. **Genetic Modification of the Escherichia coli Strain DH5 $\alpha$  to Allow the Selection of Plasmids Carrying Complementary Yeast Genes**. [s.l: s.n.].

GUAN, Z. B. et al. Complete genome sequence of *Bacillus pumilus* W3: A strain exhibiting high laccase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 207, p. 8–9, 2015.

GUNNE, M. et al. Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus*. **FEBS Journal**, v. 281, n. 18, p. 4307–4318, 2014.

GUPTA, N.; FARINAS, E. T. Directed evolution of CotA laccase for increased substrate specificity using *Bacillus subtilis* spores. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 23, n. 8, p. 679–682, 2010.

HANAHAN, D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. **Journal Of Molecular Biology**, v. 166, n. 557–580, 1983.

HAQ, I.; RAJ, A. Isolation and characterization of laccase-producing *Paenibacillus* sp. For bioremediation of pulp and paper mill. n. November, 2013.

HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2015.

HOU, L. et al. Complete Genome Sequence of *Pseudoxanthomonas suwonensis* Strain. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. 4–5, 2015.

HUANG, X. F. et al. Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 1616–1626, 2013.

IKE, P. T. L. et al. Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, 2015.

IRANNIA, Z. B.; CHEN, T. TACO: Taxonomic prediction of unknown OTUs through OTU co-abundance networks. **Quantitative Biology**, v. 4, n. 3, p. 149–158, 2016.

JIMÉNEZ, D. J. et al. Characterization of three plant biomass-degrading microbial consortia by metagenomics- and metasecretomics-based approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 10463–10477, 2016.

JIMÉNEZ, J. I. et al. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 824–841, 2002.

JÚNIOR, S. V. **Biomassa para química verde**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2013.

JÜRGENS, K. et al. Morphological and Compositional Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan Grazing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1241–1250, 1999.

KEMP, P. F.; ALLER, J. Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: What 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 2, p. 161–177, 2004.

KNEŽEVIĆ, A. et al. Lignin degradation by selected fungal species. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 117–123, 2013.

- KOHLSTEDT, M. et al. From Lignin to Nylon : Cascaded Chemical and Biochemical Conversion Institute of Systems Biotechnology. n. July, 2018.
- KÖLJALG, U. et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 21, p. 5271–5277, nov. 2013.
- KUDDUS, M.; JOSEPH, B.; WASUDEV, R. P. Production of laccase from newly isolated *Pseudomonas putida* and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial effluents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 333–338, 2013.
- KUMAR, A. et al. A Review of Factors affecting Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Lignocellulosic Biomass. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 22, n. 7, p. 62–67, 2018a.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018b.
- KUMAR, V.; CHANDRA, R. Characterisation of manganese peroxidase and laccase producing bacteria capable for degradation of sucrose glutamic acid-Maillard reaction products at different nutritional and environmental conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 1–18, 2018.
- KUMARI, A. et al. Transcriptome sequencing of rhizome tissue of *Sinopodophyllum hexandrum* at two temperatures. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2014.
- LABAT, G. A. A. **Estudo cinético da oxidação de ligninas obtidas da palha e do bagaço de cana e aplicações de lignina de bagaço em resinas à base de materiais naturais.** [s.l: s.n.].
- LAMBAIS, M. R. et al. Diversidade Microbiana Nos Solos: Definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciências do Solo**, v. 4, p. 43–84, 2005.
- LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 1081–1099, 2005.
- LAWTON, T. J. et al. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase: Implications for the evolution of multicopper blue proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p. 10174–10180, 2009.
- LEE, S.-H. et al. Complete Genome Sequence of Nitrilotriacetate-Degrading. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. 1–2, 2016.
- LEONTIEVSKY, A. et al. “Yellow” laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. **FEBS Letters**, v. 413, n. 3, p. 446–448, 1997.
- LI, R. et al. Pyrosequencing Reveals the Influence of Organic and Conventional Farming Systems on Bacterial Communities. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012a.
- LI, S. et al. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, 2012b.
- LI, X. et al. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, n. 1, p. 21–26, 2007.

- LI, Y. Cloning of multicopper oxidase gene from *Ochrobactrum sp.* 531 and characterization of its alkaline laccase activity towards phenolic substrates. **Advances in Biological Chemistry**, v. 02, n. August, p. 248–255, 2012.
- LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. Statistical Ecology: A Primer on Methods and Computing. In: **Statistical Ecology: A Primer on Methods and Computing**. New York: Wiley, 1988. p. 337.
- LYNCH, M. D.; GILL, R. T. Broad host range vectors for stable genomic library construction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 1, p. 151–158, 5 maio 2006.
- MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 157–165, 2007.
- MADADI, M.; ABBAS, A. Lignin Degradation by Fungal Pretreatment: A Review. **Journal Of Plant Pathology & Microbiology**, [s.l.], v. 08, n. 02, p.1-7, 2017.
- MADDEN, T. The BLAST Sequence Analysis Tool. In: MCENTYRE, J.; OSTELL, J. (Eds.). **The NCBI Handbook**. Estados Unidos: National Center for Biotechnology Information, 2002.
- MALLINSON, S. J. B. et al. A promiscuous cytochrome P450 aromatic O-demethylase for lignin bioconversion. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018.
- MARINS, G. DE. **Caracterização do licor negro de eucalipto para avaliação do potencial de incrustação em evaporadores**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2012.
- MARTINEZ, G. C. et al. Screening of Colletotrichum isolates from the Amazon biodiversity as producers of laccases using a simple methodology. **Semina-Ciencias Agrarias**, v. 30, n. 2, p. 397–405, 2009.
- MARTINS, L. O. et al. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the Bacillus subtilis endospore coat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 21, p. 18849–18859, 2002.
- MCMAHON, A. M. et al. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium Pseudomonas putida F6. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1435–1441, 2007.
- MENDES, I. V. **Identificação de novos genes de xilose isomerase em biblioteca metagenômica de rúmen de caprino**. Brasília: Universidade Católica de Brasília, 2016.
- MENEZES, F. P. **Degradação de biossólido por fungos lignocelulolíticos**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2013.
- MEYER, S. E. DE et al. Mesorhizobium carmichaelinearum sp. nov., isolated from Carmichaelinae spp. root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, p. 146–152, 2019.
- MIN, K. et al. A dye-decolorizing peroxidase from Bacillus subtilis exhibiting substrate-dependent optimum temperature for dyes and  $\beta$ -ether lignin dimer. **Scientific Reports**, v. 5, n. March, 2015.
- MITCHELL, A. L. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D351–

D360, 8 jan. 2019.

MIYAZAKI, K. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. **Extremophiles**, v. 9, n. 6, p. 415–425, 2005.

MORAES, E. C. et al. Lignolytic-consortium omics analyses reveal novel genomes and pathways involved in lignin modification and valorization. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2018.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. LAVRAS: UFLA, 2006.

MOROZOVA, O. V et al. “Blue” Laccases. **Biochemistry**, v. 72, n. 10, p. 1136–1150, 2007.

MUNRO, A. W. et al. The cloning and DNA sequence of the gene for the glutathione-regulated potassium-efflux system KefC of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 607–616, 1991.

NAGAYAMA, H. et al. Isolation of oxygenase genes for indigo-forming activity from an artificially polluted soil metagenome by functional screening using *Pseudomonas putida* strains as hosts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4453–4470, 2015.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 68, n. 1, p. 12–26, 2017.

NEI, M.; KUMAR, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. **Oxford University Press**, 2000.

NETO, S. L. M. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

NEUPERT, M. **Analysis e Exploitation of Ecological Data Sets**. Brno: [s.n.].

NIELSEN, T. K. et al. The Genome of BAM-degrading *Aminobacter* sp. MSH1 with Several Low Copy Plasmids. **Division of Soil and Water Management**, 27 jun. 2018.

NILADEVI, K. N.; JACOB, N.; PREMA, P. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 654–660, 2008.

NORDHAUS, W. D. et al. **Modeling Uncertainty in Climate Change: A Multi-Model Comparison** 21637: 21637. New Haven: [s.n.].

NORDHAUS, W. D. Projections and uncertainties about climate change in an era of minimal climate policies. **American Economic Journal: Economic Policy**, v. 10, n. 3, p. 333–360, 2018.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

OLSEN, C. Geneious R7: A Bioinformatics Platform for Biologists. **Plant and Animal Genome XXII Conference**, n. April 2016, p. 20–21, 2014.

OULAS, A. et al. *Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation*

Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. **Libertas Academica**, v. 9, p. 75–88, 2015.

PADMAVATHY, S. et al. Aerobic Decolorization of Reactive Azo Dyes in Presence of Various Cosubstrates. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, v. 17, n. 2, p. 147–151, 2003.

PALIY, O.; SHANKAR, V. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1032–1057, 2016.

PALUAN, S. DE F. **Construção de biblioteca metagenômica de dna microbiano do solo amazônico e prospecção de enzimas de interesse biotecnológico**. [s.l.] Universidade Católica de Brasília, 2011.

PARACHIN, N. S.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Isolation of xylose isomerases by sequence- and function-based screening from a soil metagenomic library. **Biotechnology for Biofuels**, Estocolmo, v. 4, n. 9, 5 mai. 2011.

PASTORE, R. A. A. **Diversidade Taxonômica e Biodegradação de Lignina em Comunidade Bacteriana do Solo da Caatinga**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2016.

PERDOMO, H. et al. *Phialemoniopsis*, a new genus of Sordariomycetes, and new species of *Phialemonium* and *Lecythophora*. **Mycologia**, v. 105, n. 2, p. 398–421, 2013.

PÉREZ, A. T. E. et al. Key challenges and requirements for sustainable and industrialized biorefinery supply chain design and management: A bibliographic analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, n. September 2016, p. 350–359, 2017.

PICART, P.; MARÍA, P. D. DE; SCHALLMEY, A. From gene to biorefinery: Microbial  $\beta$ -etherases as promising biocatalysts for lignin valorization. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, 2015.

POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, n. 2, p. 11–17, 1999.

POMETTO, A. L.; SUTHERLAND, J. B.; CRAWFORD, D. L. Streptomyces setonii: catabolism of vanillic acid via guaiacol and catechol. **Canadian journal of microbiology**, v. 27, n. 6, p. 636–638, 1981.

PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, 2014.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012.

QUINELATO, C. **Métodos de extração da lignina do bagaço da cana-de-açúcar da região noroeste do estado de São Paulo**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2016.

QUIRINO, B. F. et al. The Prokaryotes. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes**. 4. ed. [s.l.] Springer, 2013.

RABELO, S. C. **Avaliação de Desempenho de Pré-Tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2007.

- RAJ, A. et al. Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus* sp. isolated from sludge of pulp and paper mill. **Biodegradation**, v. 18, n. 6, p. 783–792, 2007.
- RAJARATHANAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 37, p. 233–261, 1992.
- RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, n. 2, p. 142–160, 2007.
- RASHID, G. M. M. et al. Identification of Manganese Superoxide Dismutase from *Sphingobacterium* sp. T2 as a Novel Bacterial Enzyme for Lignin Oxidation. **ACS Chemical Biology**, v. 3, 2015.
- REDDY, A. P. et al. Bioenergy feedstock-specific enrichment of microbial populations during high-solids thermophilic deconstruction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 9, p. 2088–2098, 2011.
- REISS, R. et al. Laccase versus Laccase-Like Multi-Copper Oxidase: A Comparative Study of Similar Enzymes with Diverse Substrate Spectra. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- REKITTKE, I. et al. Structure of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate reductase, the terminal enzyme of the non-mevalonate pathway. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 51, p. 17206–17207, 2008.
- RILEY, M. et al. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2006.
- RIVERS, A. R. **iTag amplicon sequencing for taxonomic identification at JGI**. [s.l.: s.n.].
- RODRIGUES, C. et al. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. In: RESENDE, R. R. (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2017. p. 1069.
- RODRIGUES, C. M.; ABDELNUR, P. VE. Análise Química da Biomassa. In: JÚNIOR, S. V. (Ed.). **Biomassa para Química Verde**. 1. ed. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 49–76.
- RODRIGUES, D. DE S.; MENDES, T. D.; PACHECO, T. F. Catálise Enzimática para desconstrução de biomassa lignocelulósica. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na Produção de Biocombustíveis Líquidos**. 1. ed. Brasília: Editora Técnica, 2013. p. 145–188.
- ROPAÍN, R. D. P. C. **Prospecção de novas enzimas de interesse biotecnológico em uma biblioteca metagenômica de amostras de solo Paranaense**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2014.
- ROTH, S.; SPIESS, A. C. Perspectives, Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 12, p. 2285–2313, 2015.
- ROTHEN, S. A. et al. Growth characteristics of *Escherichia coli* HB101[pGEc47] on defined medium. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 58, n. 1, p. 92–100, 1998.
- SAFRONOVA, V. I. et al. *Microvirga ossetica* sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Vicia alpestris* Steven. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 94–100, 2017.

- SAINSBURY, P. D. et al. Breaking down lignin to high-value chemicals: The conversion of lignocellulose to vanillin in a gene deletion mutant of *rhodococcus jostii* RHA1. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 10, p. 2151–2156, 2013.
- SAITO, Y. et al. Screening of fungi for decomposition of lignin-derived products from Japanese cedar. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 126, n. 5, p. 573–579, 2018.
- SALIBA, E. DE O. S. et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917–928, 2001.
- SANTOS, A. et al. New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: Towards biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 2053–2065, 2014.
- SANTOS, F. A et al. Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SANTOS, G. H. F.; NASCIMENTO, R. S. DO; ALVES, G. M. Biomassa Como Energia Renovável No Brasil. **Revista UNINGÁ**, v. 29, n. 2, p. 6–13, 2017.
- SCHLUCKEBIER, G. et al. Universal Catalytic Domain Structure of AdoMet-dependent Methyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 16–20, 1995.
- SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.
- SCOLFORO, J. R. et al. Diversidade, Equabilidade e similaridade no domínio Caatinga. In: CARVALHO, L. M. T. (Ed.). **Mapeamento e Inventário da Flora Nativa e dos Reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: [s.n.]. p. 118–133.
- SHI, J.; CHINN, M. S.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6556–6564, 2008.
- SHI, Y. et al. Biochemical investigation of kraft lignin degradation by *pandoraea* sp. B-6 isolated from bamboo slips. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 12, p. 1957–1965, 2013.
- SHLEEV, S. et al. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 67, n. 1, p. 115–124, 2005.
- SILVA, D. C. V. DA. **Seleção de fungos de sedimento do rio capibaribe contaminado com efluentes têxteis quanto à capacidade de produzir enzimas do complexo fenoxidase e de descolorir corantes**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- SILVA, L. F. DA et al. Produção Biotecnológica de Poli-Hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732–1743, 2007.
- SILVA, J. H.; MONTEIRO, R. T. R. Degradação de xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 1, p. 669–674, 2000.
- SILVEIRA, É. L. DA. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por**

- seqüenciamento do gene 16S rRNA.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2004.
- ŠIMEK, K. et al. Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 587–595, 1997.
- SLÁVIKOVÁ, E.; KOŠÍKOVÁ, B.; MIKULÁŠOVÁ, M. Biotransformation of waste lignin products by the soil-inhabiting yeast *Trichosporon pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 200–203, 2002.
- SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. **Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv.** São Paulo: [s.n.]. v. 3
- SOLÍS, M. et al. Microbial decolouration of azo dyes: A review. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1723–1748, 2012.
- SOUTO, B. DE M. et al. Metagenômica para prospeção de enzimas visando a produção de combustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na Produção de Biocombustíveis Líquidos.** 1. ed. Brasília: Embrapa, 2013. p. 81–82.
- SOUZA, C. S. DE. **Derivatização química e caracterização de uma lignina do bagaço da cana de açúcar.** [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2006.
- SOUZA, M. T. S. DE; RIBEIRO, H. C. M. Sustentabilidade Ambiental: uma Meta-análise da Produção Brasileira em Periódicos de Administração. **Revista de Administração Contemporânea**, v. 17, n. 6, p. 368–396, 2013.
- STURM, A. et al. YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 13972–13978, 2006.
- SUBRAMANIAM, S. et al. Transcriptome profiling and insilico analysis of *Gynostemma pentaphyllum* using a next generation sequencer. **Plant Cell Repair**, v. 30, p. 2075–2083, 2011.
- SUGANO, Y. et al. DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 50, p. 36652–36658, 2007.
- SUGANO, Y. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 1387–1403, 2009.
- TAYLOR, C. R. et al. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 521–530, 2012.
- THE R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** [s.l.: s.n.]. v. 1
- TIAN, J. H.; POURCHER, A. M.; PEU, P. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin and lignin-related compounds. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 30–37, 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

- TREMBLAY, J. et al. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. AUG, p. 1–15, 2015.
- TREPETA, R. W.; EDBERG, S. C. Esculinase ( $\beta$ -glucosidase) for the rapid estimation of activity in bacteria utilizing a hydrolyzable substrate, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 4, p. 273–277, 1987.
- VAN BLOOIS, E. et al. A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1419–1430, 2010.
- VANDEPUTTE, P. et al. Draft Genome Sequence of the Pathogenic Fungus *Scedosporium apiospermum*. **Genom**, v. 2, n. 5, p. 1–7, 2014.
- VETRIANI, C. et al. Population Structure and Phylogenetic Characterization of Marine Benthic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4375–4384, 1999.
- WANG, J.; HOU, B. Glycosyltransferases: Key players involved in the modification of plant secondary metabolites. **Frontiers of Biology in China**, v. 4, n. 1, p. 39–46, 2009.
- WANG W, *et al.* Investigating lignin and hemicellulose in white rot fungus-pretreated wood that affect enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v 134, p 381-385, 2013.
- WANG, Y. et al. A novel lignin degradation bacterial consortium for efficient pulping. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 113–119, 2013.
- WARREN, L. et al. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 42, p. 15582–15587, 2006.
- WASAK, A. et al. Entrapment of DyP-type peroxidase from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 into Ca-alginate magnetic beads. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 238–245, 2018.
- WELLINGTON, K. W. Application of laccases in organic synthesis: a review. In: LUQUE, R. (Ed.). **Green Chemistry**. [s.l.] Nova Science Publishers Inc, 2014. p. 167–212.
- WHEELER, D. L. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 1, p. 28–33, 2003.
- WHITMAN, W. B. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 3: The Firmicutes**. 2. ed. Goergia: Springer US, 2012.
- WINSOR, G. L. et al. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 646–653, 4 jan. 2016.
- WLODARSKI, L. **Determinação e quantificação de protozoários ciliados e bactérias do rúmen de bovinos em pastagens temperadas e tropicais**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.
- WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174–209, 26 maio 2009.
- YE, M. et al. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived

- multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1023–1031, 2010.
- YEELES, J. T. P.; DILLINGHAM, M. S. A Dual-nuclease Mechanism for DNA Break Processing by AddAB-type Helicase-nucleases. **Journal of Molecular Biology**, v. 371, n. 1, p. 66–78, 2007.
- YU, C. et al. Preservation of microbial communities enriched on lignocellulose under thermophilic and high-solid conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015.
- YU, W. et al. Application of a novel alkali-tolerant thermostable DyP-type peroxidase from *saccharomonospora viridis* DSM 43017 in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–11, 2014.
- ZABANIOTOU, A. et al. Bioenergy production for CO<sub>2</sub>-mitigation and rural development via valorisation of low value crop residues and their upgrade into energy carriers: A challenge for sunflower and soya residues. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 619–623, 2010.
- ZAKZESKI, J. et al. The Catalytic Valorization of Ligning for the Production of Renewable Chemicals. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552–3599, 2010.
- ZHU, D. et al. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2017.

**A. APÊNDICE: Índices de diversidade e riqueza da comunidade bacteriana**

**Tabela 8.** Índices de diversidade da comunidade bacteriana nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) em culturas inicialmente inoculadas com substrato *Miracle Growth* (MG) cultivadas 30 °C, onde lignina obtida por método de extração alcalina (BE Lig) foi usada como fonte de carbono.

Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
<b>Bactéria</b>	0P_MG	307	100 %	32,327	346,723	4,091	0,861
	1P_30_C_BE_Lig_MG	349	100 %	30,405	389,427	4,936	0,905
	2P_30_C_BE_Lig_MG	218	100 %	19,690	249,218	2,883	0,757
	3P_30_C_BE_Lig_MG	226	100 %	19,917	246,670	3,866	0,811
	4P_30_C_BE_Lig_MG	215	100 %	19,773	235,051	2,785	0,675
	5P_30_C_BE_Lig_MG	235	100 %	21,678	267,531	3,559	0,810
	6P_30_C_BE_Lig_MG	209	100 %	22,425	227,927	3,467	0,803

**Tabela 9.** Índices de diversidade da comunidade bacteriana nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) em culturas inicialmente inoculadas com substrato *Miracle Growth* (MG) cultivadas 37 °C, onde lignina obtida por método de extração alcalina (BE Lig) foi usada como fonte de carbono.

Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
<b>Bactéria</b>	0P_MG	307	100 %	32,375	340,453	4,093	0,862
	1P_37_C_BE_Lig_MG	283	100 %	20,875	308,973	4,680	0,904
	2P_37_C_BE_Lig_MG	199	100 %	20,494	212,241	3,882	0,850
	3P_37_C_BE_Lig_MG	179	100 %	17,178	202,986	3,268	0,695
	4P_37_C_BE_Lig_MG	179	100 %	19,635	195,789	2,770	0,667
	5P_37_C_BE_Lig_MG	180	100 %	19,369	203,204	3,031	0,725
	6P_37_C_BE_Lig_MG	171	100 %	18,653	184,670	2,662	0,682

**Tabela 10.** Índices de diversidade da comunidade bacteriana nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) em culturas inicialmente inoculadas com substrato *Miracle Growth* (MG) cultivadas 30 °C, onde lignina Kraft (Sigma-Aldrich) foi usada como fonte de carbono.

Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
<b>Bactéria</b>	0P_MG	309	100 %	32,568	346,310	4,094	0,862
	1P_30_C_Kraft_MG	286	100 %	27,450	320,768	4,476	0,908
	2P_30_C_Kraft_MG	165	100 %	15,826	175,741	3,129	0,754
	3P_30_C_Kraft_MG	223	100 %	22,928	244,119	4,182	0,885
	4P_30_C_Kraft_MG	139	100 %	12,918	153,953	3,011	0,676
	5P_30_C_Kraft_MG	153	100 %	13,208	164,780	3,327	0,739
	6P_30_C_Kraft_MG	144	100 %	12,750	158,112	3,428	0,766

**Tabela 11.** Índices de diversidade da comunidade bacteriana nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) em culturas inicialmente inoculadas com substrato *Miracle Growth* (MG) cultivadas 37 °C, onde lignina Kraft (Sigma-Aldrich) foi usada como fonte de carbono.

Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
<b>Bactéria</b>	0P_MG	309	100 %	32,390	349,022	4,093	0,862
	1P_37_C_Kraft_MG	223	100 %	23,329	278,724	3,977	0,885
	2P_37_C_Kraft_MG	135	100 %	13,494	156,036	3,660	0,836
	3P_37_C_Kraft_MG	125	100 %	13,702	138,712	3,669	0,856
	4P_37_C_Kraft_MG	117	100 %	9,890	133,507	4,081	0,905
	5P_37_C_Kraft_MG	109	100 %	10,934	125,017	3,975	0,897
	6P_37_C_Kraft_MG	108	100 %	10,081	114,618	4,104	0,904

## B. APÊNDICE: Índices de diversidade e riqueza da comunidade fúngica

**Tabela 12.** Índices de diversidade de fungos nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) em culturas inicialmente inoculadas com substrato *Miracle Growth* (MG) a 30 °C, onde lignina obtida por método de extração alcalina (BE Lig) foi usada como fonte de carbono.

Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
<b>Fungo</b>	0P_MG	33	99 %	6,425	41,332	3,226	0,801
	1P_30_C_BE_Lig_MG	29	99 %	8,155	37,888	2,522	0,722
	2P_30_C_BE_Lig_MG	15	99 %	5,106	17,595	2,309	0,734
	3P_30_C_BE_Lig_MG	7	99 %	5,156	11,617	1,613	0,577
	4P_30_C_BE_Lig_MG	6	99 %	4,010	6,700	1,124	0,513
	5P_30_C_BE_Lig_MG	4	99 %	2,888	4,900	0,885	0,403
	6P_30_C_BE_Lig_MG	4	99 %	4,113	6,050	0,979	0,466

**Tabela 13.** Índices de diversidade dos fungos nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) em culturas inicialmente inoculadas com substrato *Miracle Growth* (MG) a 37 °C, onde lignina obtida por método de extração alcalina (BE Lig) foi usada como fonte de carbono.

Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
<b>Fungo</b>	0P_MG	32	99 %	6,354	52,545	3,177	0,796
	1P_37_C_BE_Lig_MG	25	99 %	6,033	34,228	2,328	0,635
	2P_37_C_BE_Lig_MG	17	99 %	6,065	23,033	2,066	0,657
	3P_37_C_BE_Lig_MG	21	99 %	8,605	22,083	2,567	0,759
	4P_37_C_BE_Lig_MG	13	99 %	5,871	14,642	2,106	0,706
	5P_37_C_BE_Lig_MG	12	99 %	5,724	13,533	2,020	0,642
	6P_37_C_BE_Lig_MG	7	99 %	4,069	7,100	1,774	0,641

**Tabela 14.** Índices de diversidade dos fungos nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) em culturas inicialmente inoculadas com substrato *Miracle Growth* (MG) a 30 °C, Kraft foi usada como fonte de carbono.

Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
<b>Fungo</b>	0P_MG	34	99 %	63,47	47,603	3,231	0,801
	1P_30_C_Kraft_MG	23	99 %	5,952	29,037	2,360	0,737
	2P_30_C_Kraft_MG	15	99 %	4,717	19,450	1,652	0,543
	3P_30_C_Kraft_MG	10	99 %	5,322	12,308	1,525	0,555
	4P_30_C_Kraft_MG	6	99 %	4,705	7,200	1,327	0,509
	5P_30_C_Kraft_MG	6	99 %	3,244	7,500	1,040	0,433
	6P_30_C_Kraft_MG	4	100 %	2,529	4,300	0,715	0,249

**Tabela 15.** Índices de diversidade dos fungos nas sucessivas passagens (0P, 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P) em culturas inicialmente inoculadas com substrato Miracle Growth (MG) a 37°C, Kraft foi usada como fonte de carbono.

Organismo	Amostra	OTUs	Good's coverage	PD Whole tree	Chao1	Shannon	Simpson
<b>Fungo</b>	0P_MG	33	99 %	6,328	43,178	3,232	0,806
	1P_37_C_Kraft_MG	17	99 %	5,064	21,253	1,072	0,288
	2P_37_C_Kraft_MG	15	99 %	4,649	17,533	1,641	0,552
	3P_37_C_Kraft_MG	12	99 %	5,754	13,133	1,628	0,586
	4P_37_C_Kraft_MG	7	99 %	4,511	8,483	0,413	0,110
	5P_37_C_Kraft_MG	6	99 %	5,648	8,133	0,140	0,029
	6P_37_C_Kraft_MG	2	100 %	0,941	2,100	0,131	0,036

### C. APÊNDICE: leitura no espectrofotômetro dos compostos aromáticos

**Tabela 16.** Teste da oxidação de 11 reagentes escolhidos. No espectrofotômetro foi realizado a leitura final da densidade óptica OD para detectar a oxidação dos reagentes após 24 horas de incubação: OD312nm ácido ferúlico, OD270nm ácido gálico, OD307nm ácido sinapílico, OD 450nm catecol, OD 400nm 4-metilcatecol, OD465nm guaiacol, OD390nm hidroquinona, OD 310nm ácido veratrílico, OD353nm vanilina, OD320nm siringaldeído e 458nm ácido tânico. Tp significa tampão fosfato. A lacase utilizada foi de *P. ostreatus*. A manganês peroxidase utilizada é de *N. frowardii*. A *E. coli* HB101 foi transformada com o vetor pBTL2 e a sua capacidade em oxidar os reagentes foi testada na presença e ausência de peróxido. O símbolo (-) indica que não foi possível efetuar a leitura para o respectivo reagente.

Cepas	Álcool		Hidroquinona	Catecol	4-	Vanilina	Ácido	Siringaldeido	Ácido	Ácido	Ácido
	Guaiacol	veratrílico			metilcatecol		tanico		ferulico	Gálico	sináptico
Tp	0,045	0,165	0,042	0,042	0,042	0,074	0,041	0,137	0,056	3,294	3,281
Tp com os reagentes	0,043	0,174	0,048	0,045	0,076	0,855	1,054	3,589	0,082	3,551	3,689
Lacase	0,429	0,446	0,114	1,022	2,87	0,56	2,007	2,796	0,958	-	-
Mn peroxidase	0,274	0,458	0,474	0,369	0,881	1,159	2,427	3,664	0,346	3,98	3,942
Meio LB	0,051	0,311	0,11	0,06	0,079	0,199	0,058	0,323	0,132	3,439	3,44
Meio LB com reagente	0,06	0,28	0,125	0,058	0,176	1,148	0,321	3,636	0,166	3,612	3,68
<i>E. coli</i> HB101 + pBTL-2	0,275	0,663	0,849	0,573	0,802	2,376	2,157	3,855	1,264	-	-
<i>E. coli</i> HB101 + pBTL-2 com H2O2	0,249	0,777	0,642	0,498	0,861	1,79	2,218	3,926	1,291	-	-
Comprimento de onda (nm)	465	310	390	450	400	353	458	320	325	270	307

#### D. APÊNDICE: parâmetros de cultivo da *Escherichia coli* HB101

**Tabela 17.** Dados coletados a partir de sucessivos cultivos dos clones da biblioteca metagenômica Belig MG 6p em *Escherichia coli* HB101 em diferentes condições. Os dados coletados foram utilizados para otimizar um protocolo para a metodologia funcional.

Hospedeiro	Meio	Glicose	CuSO4	Canamicina	Rotação do shaker	Incubação	Observações	Escolhido (s)
<i>Escherichia coli</i> HB101	LB	1%	1mM	100µg/µl	-	Estufa – estufa	Falta de aeração prejudica o crescimento	X
		1%	1mM	100µg/µl	180rpm	Shaker – estufa	A rotação permitiu um maior crescimento celular	X
		-	1mM	100µg/µl	180rpm	Shaker – estufa	Sulfato de cobre adicionando na fase log impede o crescimento. Altas concentrações também podem diminuir a atividade da enzima. Ausência ou presença de glicose não alterou o crescimento celular	X
		-	0,5mM	100µg/µl	180rpm	Shaker – estufa	Concentrações menores de sulfato de cobre favorecem o crescimento celular.	X

-	0,25mM	100µg/µl	180rpm	Shaker – estufa	Adição posterior do sulfato de cobre a fase log e a diminuição da concentração mostrou as melhores taxas de crescimento.	<b>X</b>
-	0,25mM	100µg/µl	250rpm	Shaker – estufa	Rotações maiores favorecem a aeração e aumentam o crescimento	<b>X</b>
-	0,25mM	100µg/µl	250rpm	shaker – estufa - shaker	Ao adicionar o sulfato de cobre e o iptg deixando os inóculos na estufa diminui o crescimento mas poderia favorecer a expressão das enzimas desejadas. Todavia a taxa de contaminação aumentou.	<b>X</b>
-	<b>0,25mM</b>	<b>100µg/µl</b>	<b>250rpm</b>	<b>Shaker (16 horas) + Shaker (24 horas)</b>	<b>Aparentemente apresenta os melhores resultados de oxidação dos reagentes.</b>	<b>✓</b>

## A. ANEXO: Protocolo do meio mínimo de cultura M9

Meio M9 (Sigma-Aldrich) modificado.

1. Em 1 L de água adicionar 11,30 g de Meio M9 (Sigma-Aldrich M6030) para produção da solução 1X.
  - a. A composição do meio M9 é: 33.9g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 15g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 2.5g/L  $\text{NaCl}$ .
2. Autoclavar o meio por 20 minutos a 120 °C para esterilizar.
3. Depois de autoclavado suplementar o meio com:
  - a. 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  1M
  - b. 100  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina
  - c. 1 mL de Timina a 1 mg/mL
  - d. 10 mM de guaiacol
  - e. 10 mL de solução A9 100x (ABRIL et al., 1989)
    - i. A composição da solução de elementos traços A9 é:  $\text{HBO}_3$  300mg/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,83 g/L,  $\text{ZnCl}_2$  50 mg/L,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  200 mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  10 mg/L,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mg/L,  $\text{NaMoO}_4$  30 mg/L e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  30 mg/L.
    - ii. A solução A9 deve ser esterilizada por filtração com filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .