

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

TAÍS REGINA CUTCHMA

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE LIGNOCELULOLÍTICA
PARA PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

DOIS VIZINHOS
2019

TAÍS REGINA CUTCHMA

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE
LIGNOCELULOLÍTICA PARA PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA-
DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Fernandes Montanher
Coorientador: Prof. Dr. Cleverson Busso

DOIS VIZINHOS
2019

C988b Cutchma, Taís Regina.
Bioprospecção de actinomicetos com atividade
lignocelulolítica para pré-tratamento da palha de cana-de-
açúcar. / Taís Regina Cutchma - Dois Vizinhos, 2019.
72 f.: il.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Paula Fernandes Montanher.
Coorientador: Prof^o Dr. Cleverson Busso.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Dois Vizinhos, 2019.

Bibliografia p.62-72.

1. Biomassa vegetal. 2. Celulose - Biodegradação. 3.
Actinomicetos. I. Montanher, Paula Fernandes, orient. II.
Busso, Cleverson, coorient. III. Universidade Tecnológica
Federal do Paraná - Dois Vizinhos. IV. Título

CDD:660.6



Ministério da Educação

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS DOIS VIZINHOS
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PPGBIOTEC
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação Nº 8/2019

Bioprospeção de actinomicetos com atividade lignocelulolítica para pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar

Por

Taís Regina Cutchma

Esta dissertação foi apresentada às **09 horas de 30 de agosto de 2019**, na sala da B7S4 da UTFPR-DV, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. A candidata foi arguido pela Banca Examinadora, composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof.^a Dr.^a Paula Fernandes Montanher
(UTFPR-DV)

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da
Cunha (UTFPR-PB)

Prof.^a Dr.^a Fabíola Bogoni Mundstock
Mohr
(UNISEP-DV)



Prof.^a Dr.^a Andreia Anschau (UTFPR)
Coordenadora do PPGBIOTEC
UTFPR – Câmpus Ponta Grossa

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ouvir minhas orações e atender as minhas preces.

Agradeço imensamente aos meus orientadores, Profa. Dra. Paula Fernandes Montanher e Prof. Dr. Cleverson Busso, pelo apoio, pelos ensinamentos, e pela paciência no decorrer de todo esse trabalho.

Agradeço a minha família, de forma especial ao meu pai Luiz Alvaro Cutchma por acreditar na minha capacidade. Minha mãe Maria Peters Cutchma, que olhava pra mim e dizia, senta e faz, minha irmã Tamara também. Minha irmã Talita, nas idas ao laboratório e sua preocupação de não me deixar sozinha trabalhando. O meu irmão Gabriel Luiz Cutchma o qual muitas vezes deixei de cuidar, ajudar na tarefa e brincar com ele pra poder chegar a esse momento. A minha afilhada Manuela Cutchma Paliga, que me deu forças para concluir essa caminhada, com seus sorrisos que encantam e acalmam.

Sou grata pelo apoio incondicional do meu namorado Marcos Medeiros Pasa, pelas caronas, de idas e vindas aos laboratórios nos finais de semana, pelos dias que não pudemos estar juntos, diante das necessidades exigidas do mestrado.

Minha imensa gratidão á minha colega de mestrado Paula Juliane Barbosa, com seus conselhos, e também orientações sobre este trabalho. Uma pessoa incrível, que admiro muito, forte, determinada, batalhadora e uma ótima amiga!

Gustavo Matos, que esteve sempre comigo nos laboratórios, a quem agradeço imensamente pela ajuda nas análises, pelos conselhos e ensinamentos sobre quais os próximos passos a serem tomados diante de tantos resultados não esperados.

Candida Nissola, que esteve comigo desde antes do mestrado, uma amiga que quero sempre por perto, mulher guerreira, determinada, exemplo de ser humano.

Agradeço aos técnicos do laboratório, em especial Izabel Gogoni, que auxiliou no desenvolvimento deste trabalho, seja na busca de um reagente, ou palavras de apoio.

Agradeço a Prof. Talita, que me aconselhou de várias maneiras e permitiu que eu estivesse em sala de aula (algo que realmente gosto de fazer), fazendo o estágio.

Agradeço a Cíntia, e a Anaclara da Central de Análise – UTFPR Câmpus Pato Branco.

RESUMO

CUTCHMA, Taís R. **Bioprospecção de actinomicetos com atividade lignocelulolítica para pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

O presente trabalho objetivou o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica presente nos resíduos lignocelulósicos como a palha da cana-de-açúcar, utilizando, inoculantes bacterianos do filo actinomicetos, que auxiliam na hidrólise desses resíduos transformando-os em compostos mais simples, possibilitando a reciclagem da biomassa vegetal. Fez-se a prospecção dos actinomicetos, a partir de fertilizantes orgânicos e palha de cana-de-açúcar. Verificou-se a atividade enzimática celulolítica dos isolados *in vitro*. Selecionou-se os mais eficientes, para determinação da atividade das enzimas lignina (utilizando a enzima lacase) e celulose (pelo método DNS), em substrato palha de cana-de-açúcar. Fez-se também a identificação morfológica, por meio da coloração de Gram e molecular utilizando a região gênica ACTINO e 16S. Como resultado, encontrou-se boa atividade enzimática nos dois isolados, identificados como bactéria Gram-positiva com 95% de similaridade com actinomiceto e Gram-negativa, com 96% de similaridade com *Alcaligenes sp.*, a qual apresenta a necessidade de uma busca maior sobre o funcionamento de suas enzimas celulolíticas. Para o teste da enzima celulose foi verificado boa degradação para ambas, no entanto, observou-se queda nos dias seguintes aos picos de produção, o que pode ocorrer devido às enzimas serem inibidas quando o meio apresenta alta concentração de glicose ou nos tratamentos não esterilizados, o que pode ter ocorrido é o consumo simultâneo da glicose produzida. Já na verificação da atividade da enzima lignolítica o resultado não foi significativo. Concluindo dessa forma que a utilização de inoculantes bacterianos isolados de biofertilizantes tem potencial para a biodegradação da biomassa lignocelulósica.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade enzimática. Degradação da biomassa vegetal. Prospecção de bactéria.

ABSTRACT

CUTCHMA, Taís R. **Bioprospecting of actinomycetes with lignocellulolytic activity for pre-treatment of sugarcane straw.** Dissertation (Master Degree in Biotechnology) – Federal University of Technology - Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

The present work aimed to reduce the cost of pre-treatment of lignin and cellulose present in lignocellulosic residues such as sugarcane straw, using bacterial inoculants of phylum actinomycetes, which help in the lysis of these residues turning them into simpler compounds. , enabling the recycling of plant biomass. Actinomycetes were prospected through organic fertilizers and sugarcane straw. The cellulolytic enzymatic activity of the isolates was verified in vitro. The most efficient ones were selected to determine the activity of the enzymes lignin (through the laccase enzyme) and cellulose (through the DNS method) in sugarcane straw substrate. Morphological identification was also made by Gram and molecular staining using the ACTINO and 16S gene region. As a result good enzymatic activity was found in both isolates, identified as Gram-positive bacteria with 95% similarity with actinomycete and Gram-negative, with 96% similarity with *Alcaligenes sp.*, which presents the need for a greater search for the functioning of their cellulolytic enzymes. For the cellulose enzyme test good degradation was verified for both, however a decrease was observed in the days after the production peaks, which may occur due to the enzymes being inhibited when the medium presents high glucose concentration or in non-sterile treatments. What may have occurred is the simultaneous consumption of the glucose produced. In the verification of lignolytic enzyme activity, the result was not significant. In conclusion, the use of bacterial inoculants isolated from biofertilizers has potential for biodegradation of lignocellulosic biomass.

KEYWORDS: Bacterial prospecting. Plant biomass degradation. Enzymatic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura da biomassa da cana-de-açúcar.....	13
Figura 2 Ação catalítica do complexo enzimático sobre a celulose na geração de glicose ..	15
Figura 3 Estrutura da lignocelulose, antes e após pré-tratamento.....	16
Figura 4 Estrutura química da celulose.....	17
Figura 5 Estrutura química da hemicelulose	18
Figura 6 Estrutura química da lignina.....	19
Figura 7 Precursores básicos na formação de lignina.....	19
Figura 8 Representação da importância de um pré-tratamento utilizando enzimas degradantes da biomassa vegetal	21
Figura 9 Representação Geral dos procedimentos realizados	30
Figura 10 Isolamento de actinomicetos de amostras de compostagem	31
Figura 11 Seleção e ativação celular dos isolados.....	32
Figura 12 Procedimento inicial para teste <i>in vitro</i> da atividade lignocelulolítica	33
Figura 13 Determinação <i>in vitro</i> da atividade lignocelulolítica dos isolados.....	34
Figura 14 Procedimento para obtenção dos extratos enzimáticos	36
Figura 15 Preparo do extrato enzimático para análises seguintes	38
Figura 16 Análise quantitativa da enzima celulolítica	39
Figura 17 Análise quantitativa da enzima lignolítica.....	41
Figura 18 Preparo de coloração de Gram.....	42
Figura 19 análise do sequenciamento do inóculo obtido do biofertilizante <i>in natura</i>	48
Figura 20 Árvore filogenética da cepa do tratamento com 45 dias de compostagem	49
Figura 21 Árvore filogenética da cepa do tratamento com acréscimo de casca de ovo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Eliminação gradativa da palha da cana-de-açúcar	14
Tabela 2 Concentração dos compostos do meio comercial seletivo para actinomiceto.....	31
Tabela 3 Composição do meio mineral (MM).....	33
Tabela 4 Curva padrão de glicose	40
Tabela 5 Índice enzimático dos isolados em milímetros.....	45
Tabela 7 Determinação diária do pH dos tratamentos	51
Tabela 8 Leitura diária da ação da enzima celulolítica dos isolados em absorbância	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Amostras selecionadas para quantificação lignocelulolítica.....	37
Quadro 2 Isolamento e seleção das cepas	44
Quadro 3 Resultado da ação enzimática dos isolados.....	45
Quadro 4 Resultado do teste de Coloração de Gram nos isolados	47
Quadro 5 Micrografia em Microscópio Eletrônico de Varredura do tratamento Controle	61
Quadro 6 Micrografia em Microscópio Eletrônico de Varredura do tratamento <i>in natura</i>	62
Quadro 7 Micrografia em Microscópio Eletrônico de Varredura do tratamento com 45 dias de compostagem	63
Quadro 8 Micrografia em Microscópio Eletrônico de Varredura do tratamento com acréscimo de casca de ovo.....	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Curva Padrão de Glicose.....	40
Gráfico 2 Ação enzimática dos isolados em substrato estéril.....	53
Gráfico 3 Ação enzimática dos isolados em substrato não estéril	54
Gráfico 4 Ação enzimática dos isolados comparando os substratos esterilizados e não esterilizados.....	55

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO RESÍDUO ENERGÉTICO	13
3.2	COMPONENTES PRINCIPAIS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	16
3.2.1	Celulose.....	16
3.2.2	Hemicelulose	18
3.2.3	Lignina	19
3.3	IMPORTÂNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO PARA A BIOMASSA VEGETAL COMO RESÍDUO	20
3.4	BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS.....	23
3.5	BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS E SUAS ENZIMAS DEGRADANTES DA BIOMASSA VEGETAL.....	23
3.5.1	Actinomiceto	24
3.5.2	<i>Alcaligenes sp.</i>	26
3.6	ENZIMAS DEGRADANTES DA BIOMASSA VEGETAL	27
3.7	APLICAÇÕES DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS POSTERIORES AO PRÉ-TRATAMENTO	28
4.	MÉTODOS E PROCEDIMENTOS	29
4.1	ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE LIGNOCELULOLÍTICA	30
4.1.1	Prospecção de actinomicetos em biomassa vegetal	30
4.1.2	Pré-inóculo em meio sólido contendo palha de cana de açúcar	32
4.1.3	Determinação <i>in vitro</i> da atividade lignocelulolítica dos actinomicetos isolados	32
4.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA E LIGNOLÍTICA DOS ACTINOMICETOS ISOLADOS	34
4.2.1	Obtenção dos extratos enzimáticos dos actinomicetos	34
4.2.2	Determinação da atividade de enzimas celulolíticas	38
4.2.3	Determinação da atividade de enzimas lignolíticas	40
4.3	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE ACTINOMICETOS.....	41
4.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE ACTINOMICETO	42
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	43
5.	RESULTADOS.....	44

5.1	ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE LIGNOCELULOLÍTICA	44
5.2	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE ACTINOMICETOS.....	46
5.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE ACTINOMICETO	47
5.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS.....	51
5.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	52
5.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS.....	59
5.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	60
6.	CONCLUSÃO	65
7.	REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem se destacado no cenário mundial de cana-de-açúcar, cuja produção foi de 633,26 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra de 2017/2018 em uma área aproximada de 8,73 milhões de hectares. É apontada como potencial para o setor de biocombustível, devido a grande capacidade de produção de etanol e açúcar. Além desses fatores, tem-se buscado aumentar a eficiência, através da geração de energia elétrica, permitindo a utilização deste produto com custo reduzido, além de contribuir com a sustentabilidade do setor (CONAB, 2019).

No entanto, têm-se verificado que há uma grande quantidade de resíduo nas plantações de cana (GAMBARATO, 2010). Cujas colheitas podem ser feitas de forma manual, ou mecânica. Como o processo manual é dificultado pela falta de mão de obra e há proibição gradativa do resíduo, em que no estado de São Paulo a queima foi extinta no ano de 2017, tem-se investido muito no trabalho mecânico. Pois além de não ser necessária a queima prévia, as folhas, bainhas, ponteiros, e quantidades variáveis de pedaços de colmo, são cortados, triturados e lançados sobre a superfície do solo, formando uma cobertura de resíduo vegetal denominada palha ou palhada (Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002).

Essa cobertura quando se decompõe, com ação física, química e biológica, reduz a utilização de fertilizantes no replantio, além de ser fonte de nutrientes e matéria orgânica, ou seja, uma forma sustentável de lidar com a eliminação deste resíduo (FORTES, 2010).

De acordo com Costa (2011), ao considerar a crise petrolífera e as mudanças no clima causadas pela emissão de gases do efeito estufa, cria-se um desafio em produzir energia utilizando as fontes renováveis, destacando resíduos agroindustriais ou de madeira, compostos especialmente de biomassa lignocelulósica. A hidrólise da lignocelulose tem sido estudada objetivando a produção de bioetanol através da hidrólise enzimática pelos microrganismos, ou ainda pela produção de biogás por digestão anaeróbica. Esta última mais vantajosa que o bioetanol ambientalmente, pois reduz o número de influências negativas no ambiente, como é o caso das queimadas durante a colheita na lavoura.

Porém há dificuldades na degradação deste, seja em solo ou em biodigestores, pois a biomassa vegetal é composta basicamente de celulose,

hemicelulose e lignina (SAINI et al., 2015). Este material pode ser convertido em glicose por métodos químicos ou hidrólise enzimática (MOSIER et al., 2005) utilizando microrganismos, entre eles, fungos e actinomicetos, por apresentarem um complexo enzimático com atividade lignolítica e celulítica, que permitem a degradação da biomassa lignocelulósica. Diante disso, faz-se necessário um pré-tratamento eficiente que auxilie na quebra destes polissacarídeos, em monômeros de glicose (DAS et al., 2007; YU et al., 2007).

Já foram desenvolvidos vários trabalhos que utilizam métodos diversificados nesta área, Os principais pré-tratamentos realizados para o processo de hidrólise da hemicelulose, são: físico, mecânico, físico-químico (explosão de vapor), radiação de microondas, químicos, alcalino, ácido, biológico, microbiológico e microaeróbico (AMIN et al. 2017). Porém os métodos e os custos empregados ainda continuam inviáveis. Verificando assim, a necessidade de desenvolver novas tecnologias que reduzam o custo e aumentam a eficiência deste processo, agregando novas oportunidades para o produtor rural e para a agroindústria.

Custos estes, que podem ser reduzidos utilizando para a degradação de resíduos lignocelulósicos, comunidades microbianas, pois é uma abordagem promissora, por fornecer uma decomposição eficiente da biomassa, e posteriormente convertida em valor agregado ao produto (SILVA 2009).

Embora alguns estudos indiquem que esses microrganismos produzem quantidades relativamente baixas de celulasas, alguns grupos como o *Streptomyces* (actinomicetos) são capazes de produzir enzimas termoestáveis. Alani, Anderson e Moo-Young (2008) conseguiram isolar uma linhagem de *Streptomyces* produtora de celulasas termoalcalofílicas. Outra linhagem de *Streptomyces*, a M23, isolada no Japão, produz um tipo de exoglucanase que apresenta termoestabilidade a 100°C. Considerando que em um biodigestor a temperatura pode ser superior a 60°C, a descoberta de novos microrganismos que produzam enzimas com atividade lignocelulolíticas e termoestáveis é extremamente importante para a decomposição da cama de aviário e de outras biomassas que apresentam características similares.

Os actinomicetos, em especial o gênero *Streptomyces*, degradam moléculas complexas, como a lignocelulose, celulose, xilana e lignina, que se encontra em abundância na biomassa vegetal (HEUER et al., 1997; DING et al., 2004). Esse processo de degradação ocorre devido à capacidade de o microrganismo produzir

fenol-oxidase, uma enzima que está envolvida na degradação da lignina (CASTRO, 2009).

Desta forma o presente trabalho objetiva um pré-tratamento da lignina e celulose do resíduo da palha da cana-de-açúcar, utilizando para este fim, inoculantes bacterianos do filo actinomicetos, que auxiliam na lise da lignina e celulose transformando em compostos mais simples, possibilitando com essa quebra, a reciclagem da biomassa vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetiva um pré-tratamento que auxilie na lise da lignina e celulose, como resíduo da palha de cana-de-açúcar transformando em compostos mais simples, por meio de inoculantes bacterianos do filo actinomiceto, permitindo a reciclagem da biomassa vegetal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

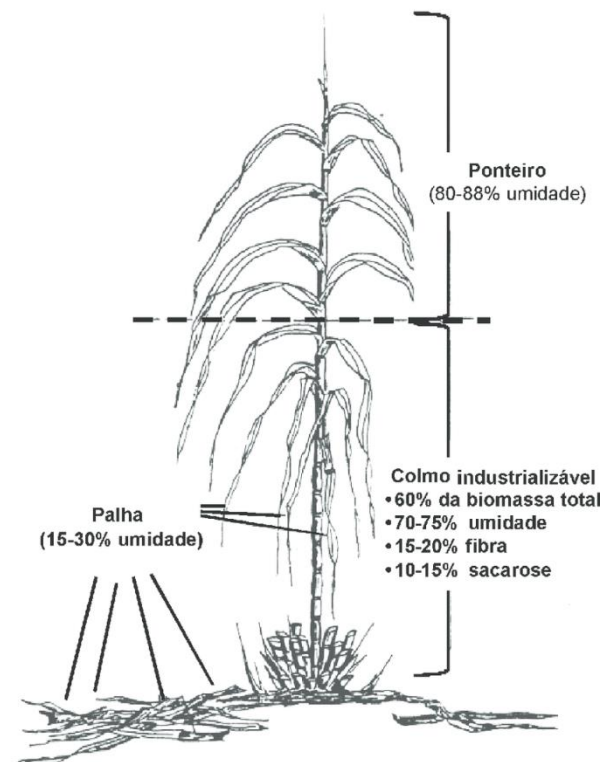
- Realizar a bioprospecção de actinomicetos a partir de material lignocelulósico em decomposição, tais como pilhas de compostagem e biodigestores anaeróbios.
- Purificar e caracterizar as colônias de actinomicetos em meios de cultura seletivos.
- Avaliar *in vitro* a ação lignocelulolítica dos isolados a partir de meios de cultura sintéticos e compostos derivados da palha da cana de açúcar.
- Identificar bioquimicamente e molecularmente as espécies que apresentarem maior eficiência verificada nos ensaios *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO RESÍDUO ENERGÉTICO

De acordo com dados do Balanço Energético Nacional (BNE, 2018), o Brasil apresentou uma utilização de 42,9% de energia proveniente de fontes renováveis no ano de 2017, destas, 17% são do bagaço da cana. Além disso, a palha da cana como resíduo posterior à colheita da cana-de-açúcar torna-se importante por ter grande potencial na geração de produtos com alto valor agregado, em que cerca de 30% da energia total da planta está neste material, o qual é composto pelas ponteiros e folhas da planta, conforme apresenta Figura 1 (ALMEIDA, 2008).

Figura 1 Estrutura da biomassa da cana-de-açúcar



Fonte: Matsuoka et al., 2010.

A recuperação dos resíduos de cana-de-açúcar ocorre devido à ação do setor canavieiro, da versatilidade produtiva das usinas em transformar a matéria-prima bruta, subprodutos e também os resíduos em produtos comercializáveis. Além disso, o tratamento como insumo agrícola e bioenergético foi motivado principalmente devido à queima da palha como resíduo ser prejudicial e causar doenças

respiratórias (PARAISO e GOUVEIA, 2015) além de prejuízos no efeito estufa (FIGUEIREDO et al., 2010).

Como subproduto, ou resíduo, têm-se verificado que atualmente há uma grande quantidade de resíduo no canavial. Com isso, os produtores de cana acabam queimando os resíduos deixados após a colheita, como é o caso da palha, ou o bagaço, que é deixado após sua utilização por empresa sucroalcooleira. No entanto, a queima desta, está sob eliminação gradativa, de acordo com a Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002. O art. 2º desta Lei nos traz que os plantadores que dispõem como método de pré-colheita a queima da palha, têm o dever de reduzir essa queima. Desta forma é preciso que sejam tomadas providências para a redução desta prática, como traz a Tabela 1.

Tabela 1 Eliminação gradativa da palha da cana-de-açúcar

Ano	Área mecanizável onde não se pode efetuar a queima	Porcentagem de eliminação da queima
1º ano (2002)	20% da área cortada	20% da queima eliminada
5º ano (2006)	30% da área cortada	30% da queima eliminada
10º ano (2011)	50% da área cortada	50% da queima eliminada
15º ano (2016)	80% da área cortada	80% da queima eliminada
20º ano (2021)	100% da área cortada	Eliminação total da queima
Ano	Área não mecanizável, com declividade superior a 12% ou menos de 150há, proibido queima	Porcentagem de eliminação da queima
10º ano (2011)	10% da área cortada	10% da queima eliminada
15º ano (2016)	20% da área cortada	20% da queima eliminada
20º ano (2021)	30% da área cortada	30% da queima eliminada
25º ano (2026)	50% da área cortada	50% da queima eliminada
30º ano (2031)	100% da área cortada	100% da queima eliminada

Fonte: BRASIL (2002).

Ao ser proibido a queima da palha de cana-de-açúcar, a cultura desta, está sob cultivo de sistema de colheita de cana crua e mecanizada, funcionando através da palhada, onde as folhas secas e ponteiros são lançadas na superfície do solo. Desta forma, se decompõem com ação física, química e biológica, o que reduz a utilização de fertilizantes. Além disso, é fonte de nutrientes e matéria orgânica, ou seja, uma forma sustentável de lidar com a eliminação deste resíduo (FORTES, 2010).

O material biológico mais abundante e renovável disponível na Terra é matéria-prima lignocelulósica. Composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, fortemente associadas entre si. Os métodos de pré-tratamento estão envolvidos especialmente na cisão efetiva dessas complexas frações interligadas e

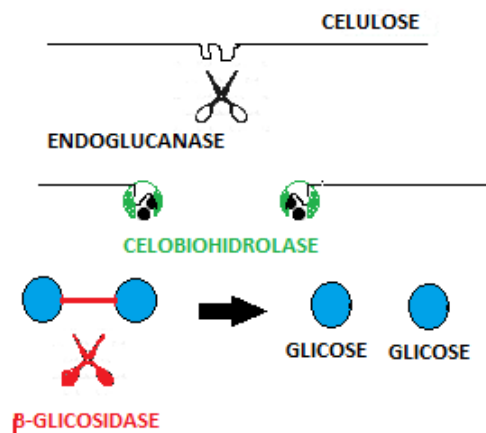
permitem a acessibilidade de cada componente de forma individual, tornando-se uma etapa indispensável em diversas aplicações, sobretudo na valorização da biomassa. No entanto, um grande obstáculo é a remoção da lignina, altamente resistente à solubilização e um importante inibidor da hidrólise da celulose e da hemicelulose (KUMAR e SHARMA, 2017).

Os insumos lignocelulósicos são estudados como açúcares fermentáveis com o objetivo de produzir etanol, por ser um material com grande disponibilidade e de baixo custo. Dentre essas fontes estão resíduos agroindustriais como casca e palha de arroz, palha de cevada e trigo, forragem de milho e sabugo, destacando, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar (MARTÍN; KLINKE; TOMSEN, 2007).

No entanto, há necessidade de um pré-tratamento na palha da cana-de-açúcar possibilitando a conversão deste material em monômeros de glicose, e posteriormente o produto final, como adubo orgânico, produção de biogás e/ou bioetanol.

Na degradação da celulose em glicose, conforme apresentado na Figura 2, estão envolvidas três enzimas principais, a endoglucanase (endo-1,4- β -D-glucanase), celobiohidrolase (exo-1,4- β -D-glucanase) e β -glicosidase (1,4- β -D-glicosidase). A ação da endoglucanase é aleatória, fragmentando as ligações beta presentes na molécula de celulose. A enzima celobiohidrolase retira as unidades de celobiose iniciando pelas extremidades da cadeia da celulose. E por fim a enzima β -glicosidase lisa celobiose em duas glicoses (LEE et al., 2002).

Figura 2 Ação catalítica do complexo enzimático sobre a celulose na geração de glicose

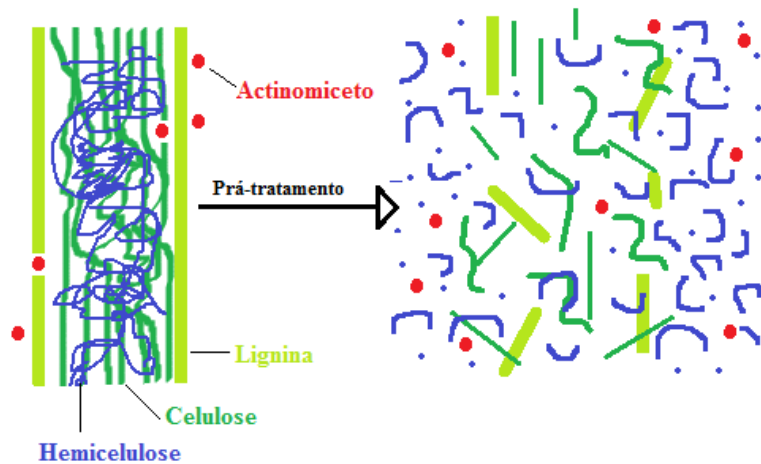


Fonte: Adaptada de Tébeka et al. (2009).

3.2 COMPONENTES PRINCIPAIS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A matéria lignocelulósica (lignocelulose) é formada por estruturas fibrosas e organizada, assim como qualquer célula vegetal, a parede celular da palha de cana-de-açúcar é constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (SANTOS et al., 2012; LIMA, 2014), conforme Figura 3.

Figura 3 Estrutura da lignocelulose, antes e após pré-tratamento.



Fonte: Adaptada de US DOE (2007).

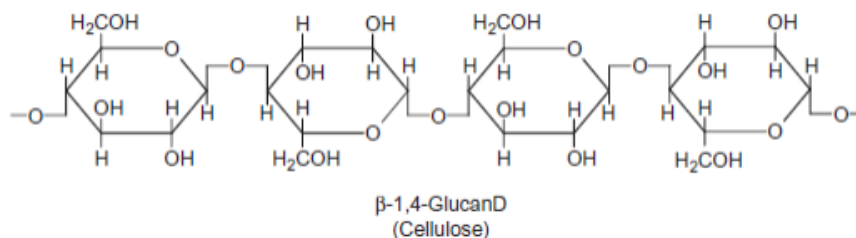
A lignocelulose é um dos principais componentes estruturais das plantas, e rico em carboidratos. Essa biomassa é dividida em três grandes partes, em que a celulose corresponde de 40 a 50% da biomassa da planta, sendo um homopolímero cristalino de glicose. Outro componente, a hemicelulose, corresponde entre 25 e 35% da biomassa lignocelulósica, sendo um polímero com diferentes pentoses e hexoses. Outra parte da biomassa lignocelulósica que representa de 25 a 35%, é a lignina, ligada a celulose e a hemicelulose, compondo barreira física, impenetrável, inferindo resistência e proteção a microrganismos e estresse oxidativo (DOUGHERTY et al., 2012).

3.2.1 Celulose

A celulose é formada por monômeros de D-glicoses conectados por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, como mostra a Figura 4. A conformação dos resíduos de

glicose para os adjacentes é de 180° , resultando em uma cadeia molecular que apresenta estrutura fibrosa e cristalina, resistente a tensão (LIMA, 2014).

Figura 4 Estrutura química da celulose



Fonte: Lima (2014).

As interações físico-químicas presente entre as macromoléculas e os grupos funcionais em sua estrutura, determinam a reatividade da celulose (SANTOS et al., 2012). As camadas adjacentes da celulose são agregadas por de forças de Van der Waals, formando assim uma estrutura compacta com capacidade de impedir a entrada de enzimas, e moléculas menores como a água. No entanto, as regiões amorfas, cristalinas da celulose, são mediadas por regiões menos condensadas, ou seja, os polímeros exibem distância maior entre eles. Além das regiões cristalinas, as fibras possuem irregularidades, que permitem o acesso de moléculas maiores que as da água, como enzimas celulolíticas (ALVES, 2011).

O que mantem as redes cristalinas, fazendo com que a celulose seja muito resistente a tratamentos, sejam eles químicos e biológicos, são as ligações de hidrogênio inter e intramolecular (GAMBARATO, 2010).

A celulose funciona como estrutura das plantas, inferindo proteção osmótica e resistência mecânica à célula. A menor unidade desta estrutura é a celobiose que apresenta sucessivos resíduos de glicose, representando através da degradação desta, uma etapa do ciclo do carbono na biosfera (TURNER et al., 2007).

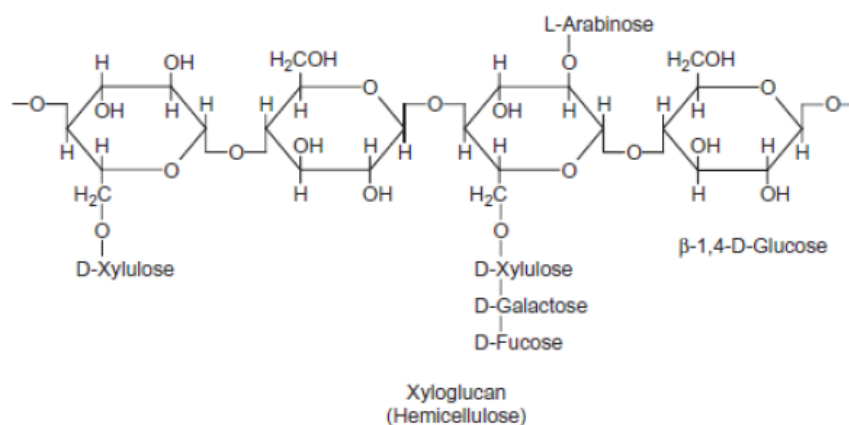
O que forma a celulose é uma cadeia linear de moléculas de glicose que são ligadas entre si. As ligações possuem energia livre, e quando quebradas liberam açúcares fermentáveis. No entanto a celulose é protegida para que os predadores não a utilizem. Desta forma, a conversão da celulose em glicose livre e posterior etanol, ainda é pouco eficiente. Ao permitir um melhor aproveitamento da quebra de celulose, é possível a utilização de grande parte da biomassa vegetal que é

desperdiçada, como as encontradas no bagaço e na palha da cana (BUCKERIDGE, SOUZA e SANTOS, 2010).

3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose apresenta baixa massa molecular e é um polissacarídeo associado á celulose e a lignina. Além de possuir baixo grau de polimerização, compreende mistura de polímeros de pentoses, formando uma cadeia de açúcares. Destacam-se a D-xilose e a L-arabinose e aparecendo em menor quantidade, as hexoses D-glicose, D-galactose, D-manose e ácidos glucurônicos (FERREIRA et al., 2009) ligados entre si por de ligações glicosídicas β -1,4 e as vezes por β -1,3 (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013) conforme Figura 5.

Figura 5 Estrutura química da hemicelulose



Fonte: LIMA (2014).

Depois da celulose, a hemicelulose é o segundo maior constituinte da lignocelulose, representando 15 a 30% da parede celular da planta. Com estrutura aleatória e amorfa, é altamente ramificada, pois é formada por cadeias de açúcares ramificadas. A constituição desse polímero depende da planta originária. Ela difere da celulose pelo aparecimento de cadeias laterais curtas que são formadas por diversos açúcares, variando de acordo com a xilose (ABDEL-HAMID, SOLBIATI e CANN, 2013).

As hemiceluloses encontram-se intercaladas ás microfibrilas da celulose, possibilitando elasticidade do vegetal, além de impedir que se toquem. As

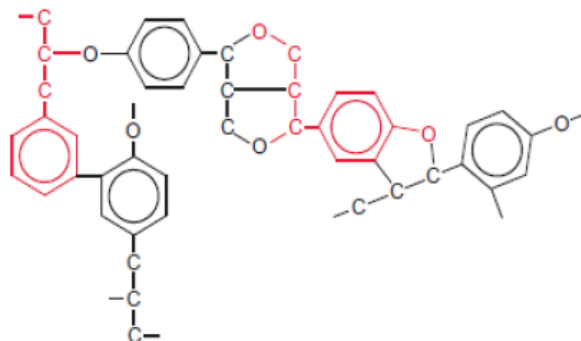
hemiceluloses não são cristalinas e variam na estruturação e composição do vegetal decorrendo de sua fonte natural (FERREIRA et al., 2009).

3.2.3 Lignina

A lignina é localizada nas plantas terrestres, associada à celulose e hemicelulose, dando a planta rigidez, impermeabilidade, resistência a ataques microbiológicos e mecânico aos tecidos vegetais (MANSFIELD, MOONEY, SADDLER, 1999).

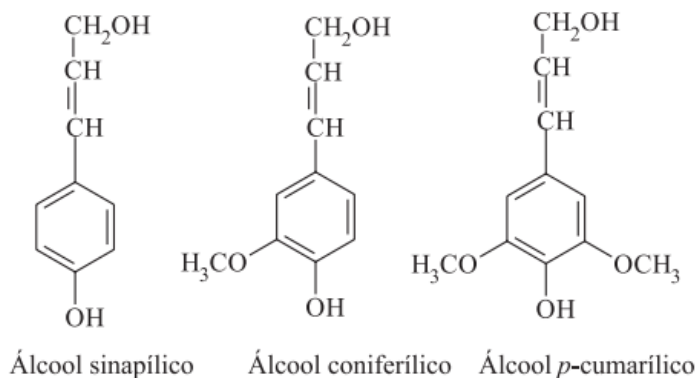
A derivação da lignina é um polímero de unidades fenilpropanóides, como mostra a Figura 6. Amorfa e insolúvel em água, estruturalmente apresentam nove átomos de carbono, repetidos irregularmente, proveniente da polimerização do álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool cumarílico, conforme representada na Figura 7 (SANCHEZ, 2009).

Figura 6 Estrutura química da lignina



Fonte: LIMA (2014).

Figura 7 Precursores básicos na formação de lignina



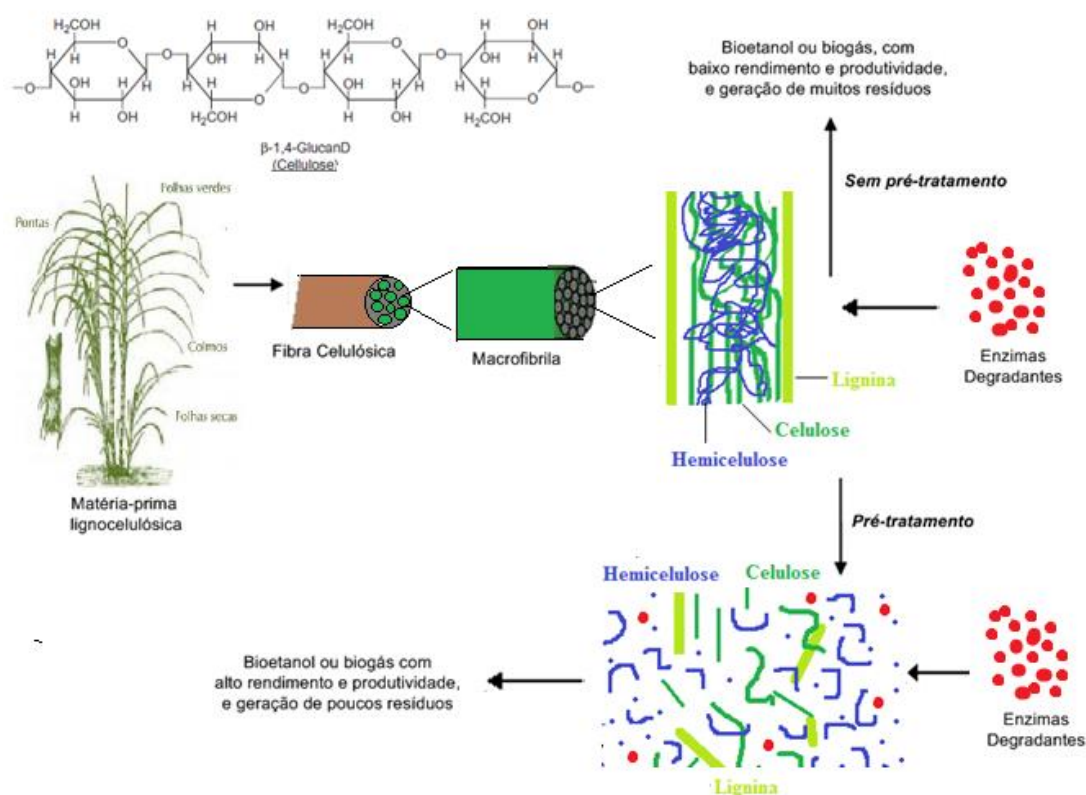
Fonte: BUDZIAK, MAIA e MANGRICH (2004).

3.3 IMPORTÂNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO PARA A BIOMASSA VEGETAL COMO RESÍDUO

Metade do peso seco dos vegetais é composto por lignocelulose e na maioria das vezes a utilização desta resulta em grande quantidade de resíduo lignocelulósico (TURNER et al., 2007). Utilizava-se para este fim a incineração, que, no entanto é uma ação que é proibida atualmente de forma gradativa. Uma saída é a degradação do material lignocelulósico.

Tem se investido muito em tecnologias para converter a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis, pois é uma alternativa que vem para atender a demanda mundial de combustíveis. O problema das tecnologias no processamento da celulose são técnicas e econômicas (ZHENG et al., 2009). No entanto, esse processo tem sido estudado objetivando a produção de bioetanol através da hidrólise enzimática pelos microrganismos, ou ainda pela produção de biogás por digestão anaeróbia (COSTA, 2012), conforme mostra Figura 8.

Figura 8 Representação da importância de um pré-tratamento utilizando enzimas degradantes da biomassa vegetal



Fonte: O autor (2019).

Vários fatores auxiliam no processo de biodigestão anaeróbia dos resíduos lignocelulósicos. Como a composição de resíduos, teor de água, pH, temperatura, tamanho das partículas, densidade, presença de nutrientes destacando os que estão relacionados ao carbono e nitrogênio (MUDAU, 2012).

Para que os microrganismos se desenvolvam, há a necessidade de fontes nutritivas como carbono, nitrogênio, fósforo e potássio, além de outros elementos traço. Carbono, inicialmente funciona como energia aos microrganismos. Nitrogênio é um elemento crítico, por ser um dos componentes das proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas e coenzimas, sendo obrigatório para o crescimento e funcionamento das células. Quando o nitrogênio funciona como limitante no processo de compostagem, este será lento, e do contrário, quando em excesso, é perdido como gás amônia (TUOMELLA et al., 2000).

Atualmente as formas de biodegradar os materiais lignocelulósicos podem ser conduzidas de forma controlada, utilizando fungos e bactérias pré-selecionadas. Pois a biotecnologia permitiu a descoberta da produção de enzimas eficientes na

degradação desses materiais. Sendo esta, uma forma de reciclar os resíduos lignocelulósicos (VILELA, 2013).

Os principais pré-tratamentos realizados para o processo de hidrólise da hemicelulose, permitindo a obtenção de uma conversão enzimática eficiente, são: físico, mecânico, físico-químico (explosão de vapor), radiação de microondas, químicos, alcalino, ácido, biológico, microbiológico e microaeróbico (AMIN et al. 2017).

Os tratamentos físicos ocorrem através de diferentes tipos de irradiação ou também por ultra-sons, que permitem uma maior acessibilidade aos polímeros hidrolisáveis da biomassa vegetal (AMIN et al., 2017). Já o mecânico utiliza diferentes moinhos para o procedimento, que permite acessibilidade à enzima (BARAKAT et al., 2014). No físico-químico (explosão de vapor) o material é exposto ao vapor saturado de alta pressão com temperatura de 160 a 260°C, onde a pressão é de 5 a 50 atm por alguns minutos (AGBOR et al., 2011).

O tratamento que utiliza radiação de micro-ondas acelera os processos químico, físico e biológico por conta do calor aplicado e das extensas colisões provocadas pelas vibrações de moléculas polares e pelo movimento iônico (AMIN et al., 2017). Já nos químicos são utilizados principalmente ácido clorídrico (HCl), ácido acético (CH₃COOH), hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), amoníaco aquoso (NH₃ · H₂O), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (US e PERENDECI, 2012). Para o tratamento alcalino utiliza-se o hidróxido de sódio e hidróxido de potássio. Já o tratamento ácido é feito com ácido clorídrico e ácido sulfúrico (SUN e CHENG, 2005).

A desconstrução de estruturas na parede celular utilizando microrganismos e/ou enzimas como catalisadores é utilizada como pré-tratamento biológico e ocorre na primeira fase de hidrólise com outros processos de pré-tratamento (TANJORE e RICHARD, 2015). Já os pré-tratamentos biológicos utilizam fungos e algumas bactérias, especialmente actinomicetos (SARITHA, 2012).

É preferível a utilização de hidrólise enzimática às hidrólises químicas, pois requerer menos energia, não apresentam problemas de corrosão, e sua condição de ação é em condições que vão de um pH de 4,8 a 6,0 e sua temperatura de 45-50°C (SARKAR et al., 2012).

3.4 BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS

Bioprospecção é a busca por novas moléculas com aplicações biotecnológicas (SHANNON et al., 2012) para extração de compostos com interesse comercial (SYNNES, 2007). No século XX, essa busca por fungos e bactérias foi concentrada principalmente na busca de metabólitos secundários com valor medicinal (como a penicilina e lovastatina) ou ainda para enzimas que apresentem novas aplicações, como enzimas degradadoras de biomassa e termófilos (SHANNON et al., 2012).

Esta busca continua, pois há a necessidade de investigar a biodiversidade visando a produção de novos metabólitos. Os microrganismos são uma fonte poderosa para o desenvolvimento de novos bio-produtos. Além de que, foi verificado que os compostos obtidos dos microrganismos, apresentam diversidade química estrutural funcional (SYNNES, 2007).

Muitas bactérias são tolerantes a condições extremas de temperaturas e pH, apresentando-se como fonte para a busca e isolamento de novas enzimas celulolíticas (WATANABE TOKUDA, 2010). No entanto, as celulases produzidas em laboratórios de pesquisa, tem apresentado dificuldades no isolamento dos microrganismos (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012), alguns gêneros de actinomicetos são raros por apresentarem dificuldade em seu isolamento (JOSE e JEBAKUMAR, 2013).

No solo é encontrado um número de microrganismos que dependem diretamente de suas condições físicas, químicas e nutricionais. Em que as bactérias são os maiores representantes, com contagens entre 10^6 a 10^9 por gramas de solo seco (WHITMAN, COLEMAN e WIEBE, 1998). E isso refere-se somente as bactérias cultiváveis em laboratório, pois há problemas na reprodução *in vitro* para a maioria dos microrganismos, já que ainda não se tem mecanismos que supram as necessidades nutricionais destes (HARGREAVES, 2008).

3.5 BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS E SUAS ENZIMAS DEGRADANTES DA BIOMASSA VEGETAL

Os microrganismos celulolíticos fazem parte de grupos taxonômicos muito variados e sua maioria é pertencente às bactérias e fungos. Sua ocorrência é em biotas com acúmulo de resíduos de celulose (RODRIGUES, 2006).

Para que os microrganismos produzam celulasas é preciso um controle que ajuste os mecanismos genéticos e bioquímicos. Estes microrganismos têm desenvolvido um complexo enzimático com diferentes especificidades, atuando em regiões amorfas ou cristalinas da celulose, ou substratos de cadeias com comprimentos distintos. Parte desta diversidade é pela necessidade de competição com a forma do substrato, pois a celulose é modificada estruturalmente durante o processo de hidrólise, exigindo enzimas em diferentes tempos para sua degradação (BÉGUIN e AUBERT, 1994; BISARIA e GHOSE, 1981).

As bactérias, como actinomicetos têm sido consideradas como eficazes em gramíneas, enquanto os fungos ganharam popularidade como fontes de enzimas de decomposição de paredes celulares de plantas comerciais (fungos de podridão branca), produzindo múltiplas enzimas hidrolisantes degradantes de celulose, hemicelulose e lignina. Durante o processo, estes microrganismos secretam enzimas extracelulares como lignina peroxidases e lacases que ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa (SARITHA, 2012).

Outra bactéria que tem sido destaque nos processos biotecnológicos é *Alcaligenes faecalis*, que é estudada na degradação da lignocelulose através da quebra das ligações β -glicosídicas. Como o que foi encontrado por Han e Srinivasan (1969), na busca pelo isolamento, purificação e caracterização da enzima β -glucosidase, que em bagaço da cana, isolou a bactéria *Alcaligenes faecalis*.

3.5.1 Actinomiceto

Actinobactéria é uma palavra de derivação grega “*aktis*” (traço) e “*mykes*” (fungo) (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967). Actinomicetos são procariotos, Gram-positivos, alguns apresentam morfologia filamentosa e produzem esporos, outros se apresentam como bacilos alongados. Encontrados em diversos ambientes, como solo, água doce e água do mar, folhas e raízes (PASSARI et al., 2015).

As actinobactérias também são conhecidas por produzirem filamentos com formato de micélio, muito parecido com as hifas dos fungos, o que permite a produção de esporos, responsáveis pela multiplicação. Cada esporo tem a

possibilidade de germinar e crescer, permitindo a origem de um novo organismo (VENTURA et al., 2007).

Esses microrganismos contêm alta concentração de guaninas e citosinas em seu DNA (ADEGBOYE e BABALOLA, 2013) que faz com que sobrevivam a altas temperaturas, além de apresentarem propriedades metabólicas, o que possibilita habitar diversos ambientes, e também exibem variedade morfológica e fisiológica (NETT, IKEDA, MOORE; 2009).

A análise molecular é realizada utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA, pois o gene escolhido permite diferenciar os gêneros e também algumas espécies de procariotos (MADIGAN et al., 2010). Em alguns casos, o gene 16S rRNA não apresenta informação suficiente para distinguir as espécies de um gênero, sendo possível diferenciar através de sequenciamento multi locos (MLSA) (SAVI et al., 2016).

Na medicina, agricultura e indústria, destacam-se as actinobactérias, por produzirem novos produtos naturais (STROBEL et al., 2004). Estas bactérias representam as produtoras de compostos bioativos, sendo o maior grupo de microrganismos produtores de metabólitos (BÉRDY, 2005). Além de sintetizarem proteínas rapidamente (ALAM et al., 2011), produzem compostos como enzimas extracelulares e antibióticos, com capacidade de degradação de compostos orgânicos diversificados (VASCONCELLOS et al., 2010). A exemplo das enzimas produzidas pelos actinomicetos, que auxiliam na degradação de matérias orgânicos complexos, seja no solo ou em sedimentos, como a protease, celulasas, amilase, gelatinase, lectinase, catalase, quitinase e uréases (GULVE e DESHMUKH, 2012).

Os microrganismos produzem metabólitos primários e especializados. Os primários atuam na sobrevivência e manutenção do microrganismo (NETZKER et al., 2015). Os metabólitos secundários possuem baixo peso molecular, podendo exibir atividade biológica, sua produção está relacionada com sua forma de cultivo e interação entre espécies (BRAKHAGE, 2013).

Os actinomicetos também apresentam a capacidade de induzir as enzimas celulasas para fora da célula (IBRAHIM e EL-DIWANY, 2007), as quais são produzidas enquanto ocorre o crescimento celular em material celulósico. Desta forma, os microrganismos celulolíticos ao serem introduzidos em biomassa vegetal, tornam-se ferramenta microbiológica benéfica para a recuperação de energia, além

de sua ampla aplicabilidade em vários processos industriais (BALAMURUGAN, 2011).

3.5.2 *Alcaligenes sp.*

As bactérias pertencentes ao gênero *Alcaligenes* apresentam forma cocóide, além de flagelos, e são habitualmente encontradas em solo, água, estações de tratamento de esgoto e também associadas a plantas, apesar de pouco se conhecer sobre seus mecanismos de adaptação e colonização do solo, rizosfera e filosfera (OBATA et al., 2010; NAKANO et al., 2014). *Alcaligenes faecalis* é considerada uma bactéria não patogênica, porém oportunista, por causar infecções, como a de urina (POLETO, 2014).

As bactérias do gênero *Alcaligenes sp.* fazem parte do filo das proteobactérias, e identificadas como aeróbias Gram-negativas, apesar de alguns grupos sobreviverem em condições anaeróbias, e em nitrato ou nitrito. Apresentando a capacidade de desnitrificar, ou seja, reduzir o nitrato do ambiente para nitrogênio molecular (LÓPEZ et al., 1998; OLIVEIRA, 2012), e além disso, sob determinadas condições ambientais, pode nitrificar de forma heterotrófica e desnitrificar de maneira aeróbia (JOO, HIRAI e SHODA, 2005). Diante disso, ela tem sido estudada em aplicações no tratamento de esgoto (NAKANO et al., 2014).

Uma linhagem de *Alcaligenes faecalis* foi encontrada atuando na biorremediação, apresentando-se eficiente na degradação de fenol (KOEHNTOPP, 1998). Em determinadas condições atuam na biodegradação de contaminantes orgânicos e xenobióticos (KONG et al., 2014). Além de também ter sido descrita com a capacidade de neutralizar ambientes contaminados com arsênio (PHUNG et al., 2012), na produção de compostos que promovem o crescimento vegetal, e no biocontrole de patógenos de plantas (YOKOYAMA et al., 2013).

Algumas espécies de *Alcaligenes sp.* podem crescer em diferentes fontes de carbono, além de estarem relacionadas com a biodegradação de alguns poluentes, como benzoato e clorobenzoato, policlorados bifenilos, piridina, fenol (BOTT e KAPLAN, 2002; RONEN e BOLLAG, 1992). Além disso, também apresenta a capacidade de sintetizar celulose (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

3.6 ENZIMAS DEGRADANTES DA BIOMASSA VEGETAL

As enzimas são consideradas catalisadores biológicos, por apresentar propriedades que as tornam interessantes para os processos de biotransformação. Na indústria se destaca por apresentar alto desempenho catalítico ao comparar com os catalisadores convencionais (CARVALHO, 2007).

Estes catalisadores são encontrados em células de tecidos animais e vegetais, além dos microrganismos, os quais se destacam pela ampla disponibilidade, custo de produção relativamente baixo, ampla especificidade pelo substrato, e diversas características físico-químicas, além de ser mais suscetível a manipulação genética (CARVALHO, 2007).

Apesar de alguns microrganismos produzirem uma quantidade limitada de enzimas, o que dificulta a aplicação industrial, alguns que se destacam por uma alta produção. Como os actinomicetos, que são destaque na produção de metabólitos especializados, pois produzem aproximadamente dois terços do total de antibióticos conhecidos (ADEGBOYE; BABALOLA, 2013). Em torno de 23.000 metabólitos secundários produzidos por microrganismos estão relatados (MOHSENI et al., 2013). Dentre estes, os actinomicetos produzem mais de 10.000 e as espécies do gênero *Streptomyces* produzem aproximadamente 7.600 metabólitos secundários.

Esses metabólitos produzidos por actinomicetos são muito utilizados na indústria farmacêutica, com ação antibiótica, antifúngica, antiviral, antiprotozoário, e imunossupressores (ADEGBOYE; BABALOLA, 2013; SAVI et al., 2015).

No entanto existem também os de interesse para a agroindústria, destacando-se os degradantes da biomassa vegetal, como as enzimas extracelulares, entre elas, quitinases, proteases, amilases e celulases (SILVA et al., 2012). Estas enzimas atuam na mineralização de nutrientes e decomposição de moléculas orgânicas presentes no solo (GORLACH-LIRA e COUTINHOA, 2007; LIMA et al., 2014).

Apesar de a celulose ser um polissacarídeo complexo, com estrutura cristalina insolúvel (IRFAN et al., 2012), a introdução de um microrganismo celulolítico é benéfico para recuperação da bioenergia quando atua na degradação da celulose (BALAMURUGAN et al., 2011). Diante disso torna-se viável a introdução das actinocelulases, pois são enzimas extracelulares produzidas juntamente com o processo de crescimento celular em material celulósico (IBRAHIM e EL-DIWANY,

2007). Tornando as actinobactérias importantes na indústria, por apresentar aplicabilidade em processos industriais.

A enzima celulase também é definida como um complexo capaz de formar glicose a partir da hidrólise da celulose. Sendo assim, sua classificação é feita de acordo com o local em que ela atua no substrato celulósico, em que, as endoglucanases quebram as ligações glicosídicas β -1,4 das fibras celulósicas; as exoglucanases atuam na região externa da celulose; e as β -glicosidases hidrolisam celobiohidrolases que são solúveis em glicose (CASTRO e PEREIRA, 2010). No entanto, β -glicosidase é limitante da taxa de hidrólise da celulose, pois atua na etapa final do processo lignocelulósico (SINGHANIA et al., 2017).

Já as enzimas envolvidas na biodegradação da lignina são a lignina peroxidase, a manganês peroxidase e a lacase, as quais estão presentes no fungo da podridão branca, *Phanaerochatae chrysosporium*, e actinomicetos representando as bactérias. Essas enzimas possuem grande potencial de aproveitamento para as indústrias de celulose e papel, e também para o tratamento de efluentes difíceis de serem degradados (BREEN e SINGLETON, 1999).

3.7 APLICAÇÕES DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS POSTERIORES AO PRÉ-TRATAMENTO

Os insumos lignocelulósicos são estudados como açúcares fermentáveis com o objetivo de produzir etanol, por ser um material de grande disponibilidade e baixo custo (MARTÍN; KLINKE; TOMSEN, 2007). Mas esta não é a única aplicação do resíduo posterior ao pré-tratamento, além da geração de energia, através do etanol de segunda geração e o biogás, tem-se também a aplicabilidade em solo como biofertilizante.

No processo industrial a co-digestão anaeróbica, composta por substratos ricos em energia (como é o caso da palha-de-cana) são utilizados para obtenção de carga orgânica ideal, visando à melhora da viabilidade econômica (CAVINATO et al., 2010). Tem-se aplicabilidade do bagaço da cana-de-açúcar, que é destinado para co-geração de energia elétrica, e há pouco tempo também a palha, apesar da necessidade de um pré-tratamento, para a produção de etanol de segunda geração (ROSSETTO et al., 2013).

Torta de filtro e vinhaça são subprodutos extraídos durante o processo industrial que utiliza biomassa vegetal, e que após pré-tratamento adequado, podem ser empregados como fertilizantes no próprio setor (SCHMIDT FILHO et al., 2016).

Já o biogás, sendo uma mistura de gases, composto por metano e dióxido de carbono, principalmente, é obtido por meio de biodegradação anaeróbia, feita por microrganismos, utilizando resíduos domésticos, agropecuários e industriais (CIBIOGAS, 2010). Sua composição é basicamente, 60% metano, 35% CO₂ e 5% outros gases. E quando ocorre a purificação deste, onde boa parte do CO₂ é removida, transforma-se o biogás em biometano (CEMPRE, 2016), um dos principais gases do efeito estufa.

Ao ser aproveitado o biogás e o biometano é possível substituir os combustíveis fósseis, o que contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa, além de ser economicamente viável. Pois este gás pode ser utilizado na venda da energia elétrica gerada ou comercializada nos créditos de carbono no Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), advindo do Protocolo de Quioto (ICLEI, 2010).

O Brasil apresenta potencialmente a produção de aproximadamente 78 milhões de m³ diariamente de biogás e biometano de segunda geração, em que 56 milhões de m³ provém dos setores sucroenergético, 15 milhões de m³ de alimentos e 7 milhões de m³ originados do saneamento básico. Este volume representa 73% de gás natural do país, ou seja, pode ser um combustível que faz com que o país não dependa de terceiros, permitindo que a energia seja gerada dentro do país ou das próprias indústrias, além de ser possível estocar este combustível (ABILOGAS, 2017).

4. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

O presente estudo foi realizado nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. De forma específica, nos laboratórios de microbiologia, biologia molecular e biotecnologia.

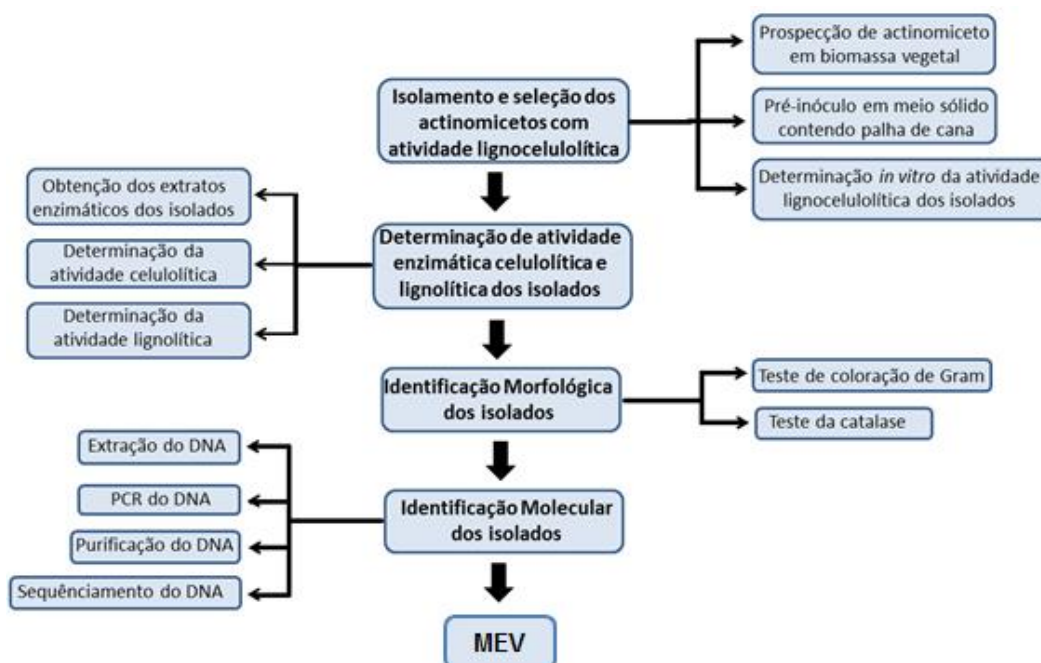
Para a prospecção dos actinomicetos foram utilizadas amostras de fertilizantes orgânicos disponibilizados pela empresa Solo Forte da cidade de Itapejara do Oeste, Paraná e palha de cana-de-açúcar previamente moída, disponibilizada por um produtor rural. Das amostras de fertilizantes, foram

selecionados quatro tipos: *in natura*, 15 dias de compostagem, 45 dias de compostagem e o fertilizante *in natura* com acréscimo de casca de ovo.

As amostras de palha assim que colhidas foram moídas no moinho de facas tipo Willye Star FT 50, do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR Dois Vizinhos, com granulometria de 10 Mesh.

A partir disso, os microrganismos amostrados, foram isolados dos fertilizantes orgânicos, selecionados e caracterizados como descreve os procedimentos representados na Figura 9.

Figura 9 Representação Geral dos procedimentos realizados



4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE LIGNOCELULOLÍTICA

4.1.1 Prospecção de actinomicetos em biomassa vegetal

Das amostras de fertilizantes disponibilizadas, separadamente foram homogeneizadas 1 g de cada amostra bruta em 9 mL de solução salina (0,85% NaCl) esterilizada. Essa suspensão foi diluída em até 10^{-5} e alíquotas 1000 μL espalhadas na superfície dos meios de cultivo comercial seletivo para actinomicetos (Tabela 2), em que é adicionado 5g de glicerol. O glicerol é um composto orgânico 1,2,3-propanotriol, com função de álcool, líquido á temperatura ambiente,

higroscópico e inodoro (QUISPE et al., 2013). É obtido através da saponificação de ácidos graxos com hidróxidos de sódio ou potássio, coprodutos na fabricação de biodiesel.

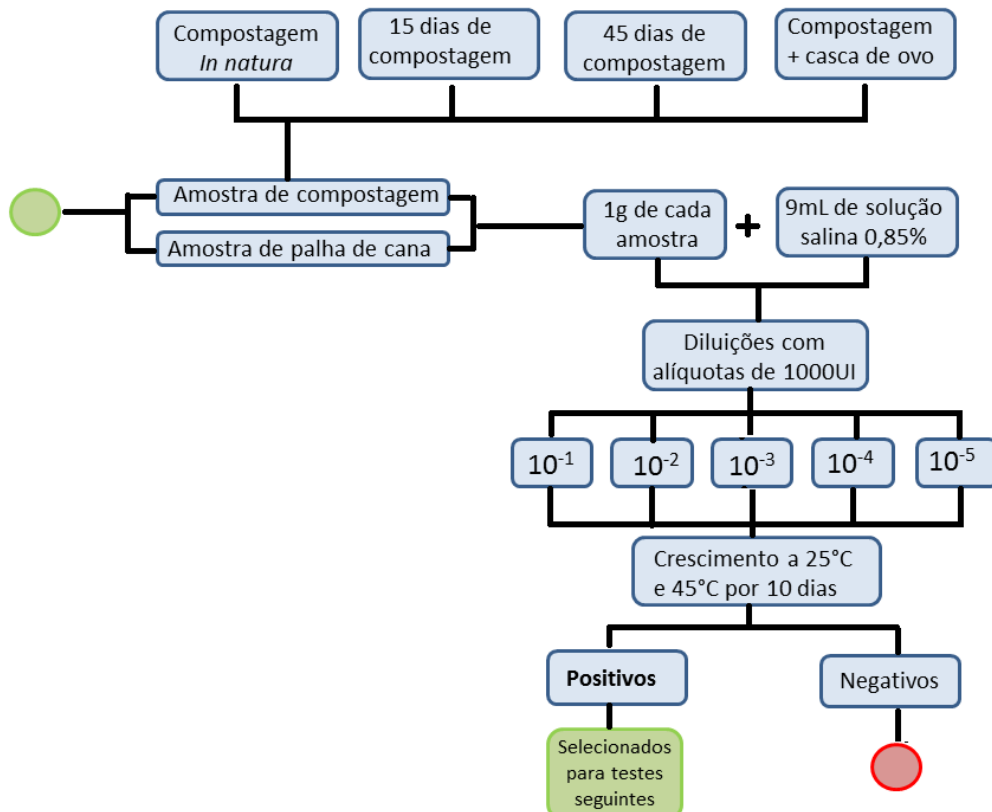
Após esse procedimento, as amostras foram incubadas a 25°C e 45°C por 10 dias, conforme mostra a Figura 10. Posteriormente, as amostras que apresentaram bom crescimento e sem contaminação foram armazenados em geladeira para análises seguintes.

Tabela 2 Concentração dos compostos do meio comercial seletivo para actinomiceto

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Caseinato de sódio	2
Aspargina	0,1
Proprio de sódio	4
Fosfato dipotássico	0,5
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato ferroso	0,001
Agar	15
Glicerol	5

Fonte: autoria própria (2019)

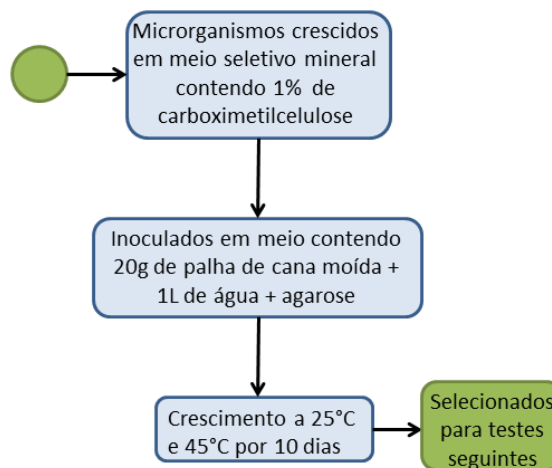
Figura 10 Isolamento de actinomicetos de amostras de compostagem



4.1.2 Pré-inóculo em meio sólido contendo palha de cana de açúcar

Os microrganismos crescidos em meio seletivo para actinomiceto, foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em meio contendo palha de cana de açúcar formulado em estado bruto. Pesou-se 20 g L⁻¹ de palha de cana moída, adicionou-se a 1000 mL de água destilada contendo 20 g L⁻¹ de agarose e posteriormente autoclavado por 20 min a 121 atm. Após preparo do meio, os microrganismos foram inoculados nas placas, utilizando alça bacteriológica. Essa etapa é essencial para ativação metabólica dos isolados, conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11 Seleção e ativação celular dos isolados



Fonte: autoria própria (2019)

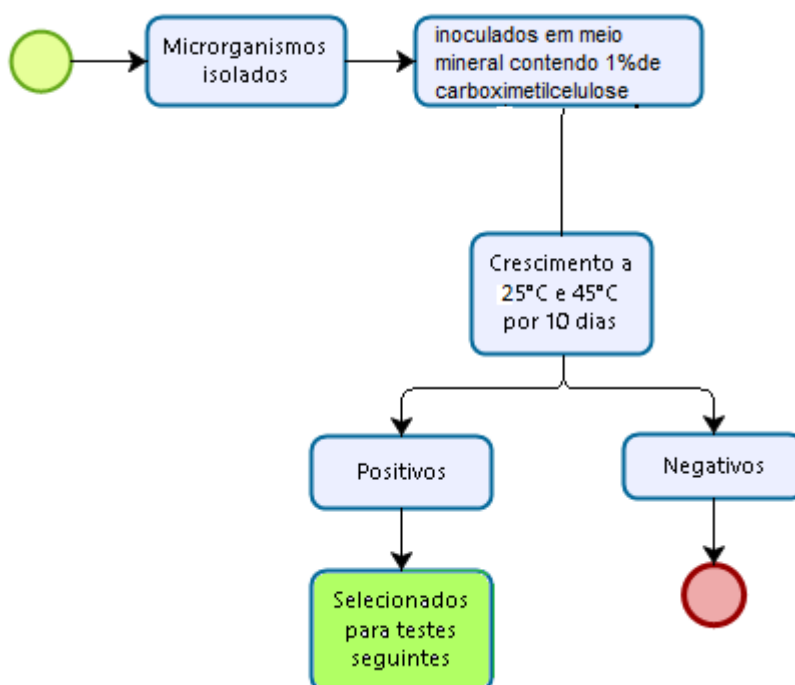
4.1.3 Determinação *in vitro* da atividade lignocelulolítica dos actinomicetos isolados

A atividade lignocelulolítica das bactérias isoladas foi determinada através do método descrito por Bispo (2010). As linhagens cultivadas em meio contendo palha de cana foram posteriormente cultivadas em meio seletivo mineral (MM) contendo 1% de carboximetilcelulose (Tabela 3). A amostragem foi de três para cada isolado placa, e incubação a 25°C e 45°C por 10 dias, conforme Figura 12.

Tabela 3 Composição do meio mineral (MM)

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
NaNO ₃	1,2
KH ₂ PO ₄	3,0
K ₂ HPO	6,0
MgSO ₄	0,2
CaCl ₂	0,05
ZnSO ₄	0,001
MnSO ₄	0,01
Agar	15,0
Carboximetilcelulose	10,0
Água destilada	1000 mL

Fonte: autoria própria (2019)

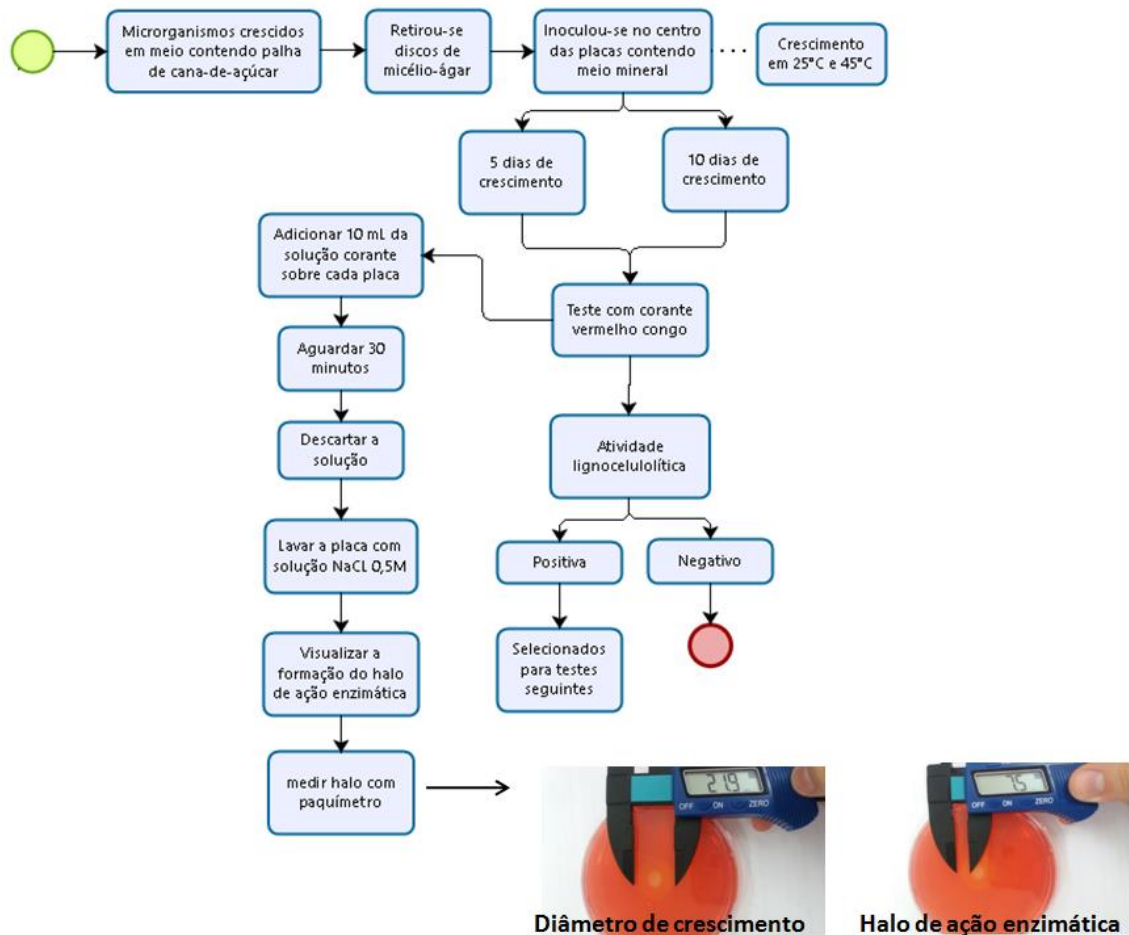
Figura 12 Procedimento inicial para teste *in vitro* da atividade lignocelulolítica

Fonte: autoria própria (2019).

Para determinar as atividades lignocelulolíticas foram retirados discos de micélio-ágar previamente crescidos em meio contendo palha-de-cana (20 g L⁻¹) previamente moídas, mais ágar (20 g L⁻¹), com diâmetros de 5 mm, e posteriormente foram inoculadas no centro da placa de Petri contendo meio mineral. Incubadas por 10 dias a 25°C e 45°C. Em seguida, as placas que apresentaram melhor crescimento, foram verificadas quanto a atividade lignocelulolítica em 5 e 10 dias, através da adição de 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g L⁻¹ em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8), o qual foi mantido em placa por 30 minutos. A solução foi descartada, e a cultura lavada por duas vezes com solução de NaCl 0,5 M. O

índice enzimático foi verificado através de uma correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade de degradação dos microrganismos ($IE = Dh/Dc$), conforme Figura 13 (NOGUEIRA e CAVALCANTI, 1996).

Figura 13 Determinação *in vitro* da atividade lignocelulolítica dos isolados



Fonte: autoria própria (2019).

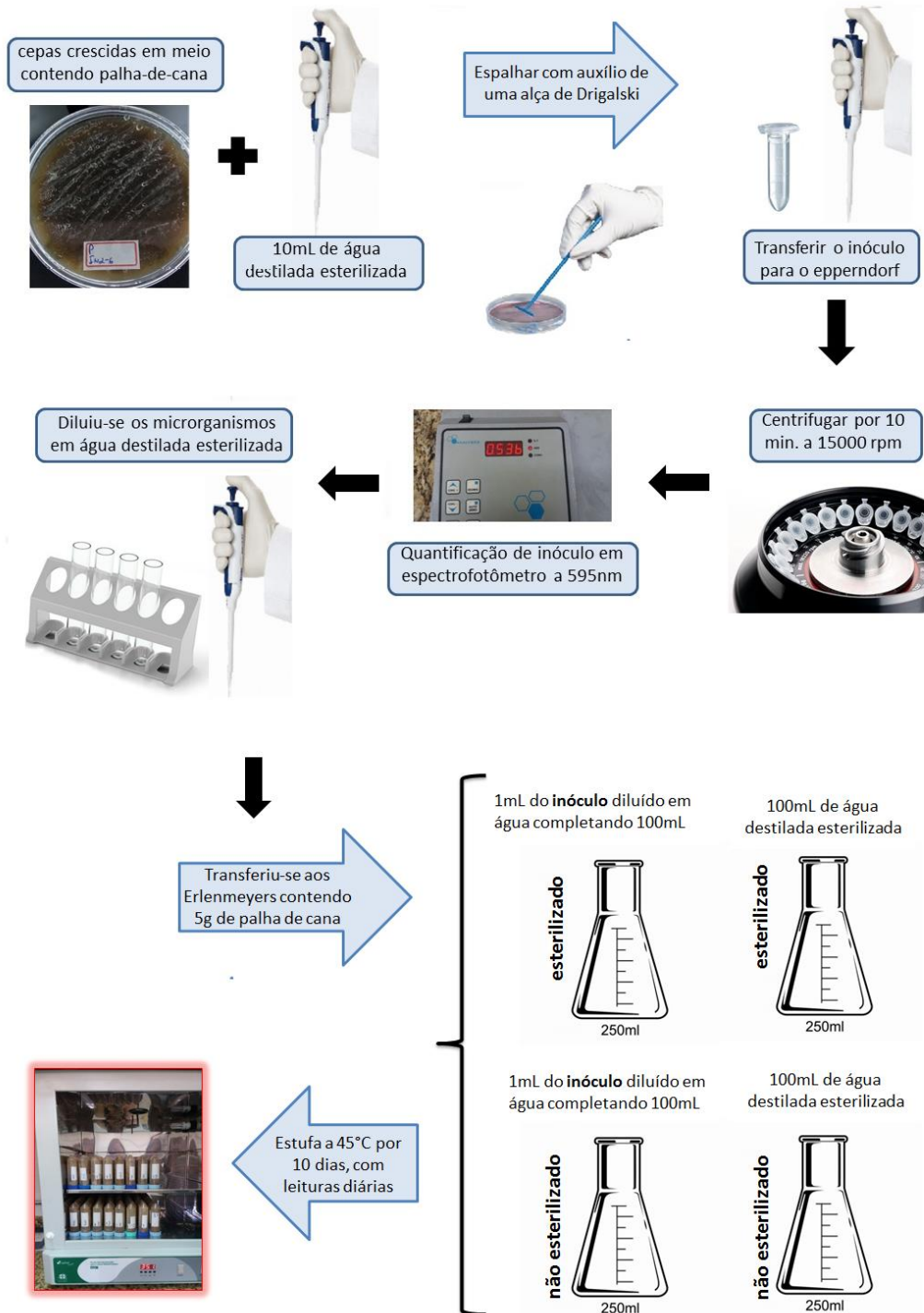
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA E LIGNOLÍTICA DOS ACTINOMICETOS ISOLADOS

4.2.1 Obtenção dos extratos enzimáticos dos actinomicetos

Após verificação da atividade lignocelulolítica em meio mineral, determinando que a melhor temperatura para o desenvolvimento das bactérias é de 45°C, considerando que em biodigestores as temperaturas chegam a 60°C, as amostras foram crescidas novamente em meio sólido contendo palha de cana moída, incubadas em estufa a 45°C por 10 dias. Sobre este material, adicionou-se 10 mL de

água destilada, espalhou-se com auxílio de uma alça de Drigalski, e após transferir 2 mL para o eppendorf, centrifugou-se por 10 minutos a 15000 rpm, e quantificou-se em espectrofotômetro a 595 nm (adaptado de BISPO, 2010). Em seguida, aos microrganismos transferiu-se água destilada esterilizada, totalizando 100 mL de inóculo mais água, o qual foi transferido aos erlenmeyers de 250 mL, que já continha 5 g de palha-de-cana. Este procedimento foi feito para determinação da atividade de enzimas lignolítica e celulolítica de cada cepa isolada. Este mesmo procedimento foi feito, sem acréscimo dos microrganismos isolados, para o controle. Por 10 dias consecutivos, eram retiradas e pesadas em balança 3 g de amostra (palha umedecida) de cada tratamento, para a determinação enzimática, conforme Figura 14.

Figura 14 Procedimento para obtenção dos extratos enzimáticos



Fonte: autoria própria (2019)

Cada amostra foi preparada, conforme descrito: a 1ª continha palha esterilizada e o inóculo (um erlenmeyer para cada uma das quatro cepas isoladas) diluído em água destilada esterilizada; a 2ª, palha esterilizada e água destilada esterilizada sem inóculo; a 3ª, palha não esterilizada e inóculo (um erlenmeyer para

cada uma das quatro cepas isoladas) diluído em água destilada e esterilizada; e a 4ª repetição, palha não esterilizada e água destilada esterilizada sem inóculo, todos completando para 100 mL de água, conforme Quadro 1. O objetivo de utilizar amostras com substrato esterilizado e não esterilizado é a verificação da necessidade ou não de se esterilizar esse material antes de inocular os isolados, se isto irá alterar ou não os resultados finais.

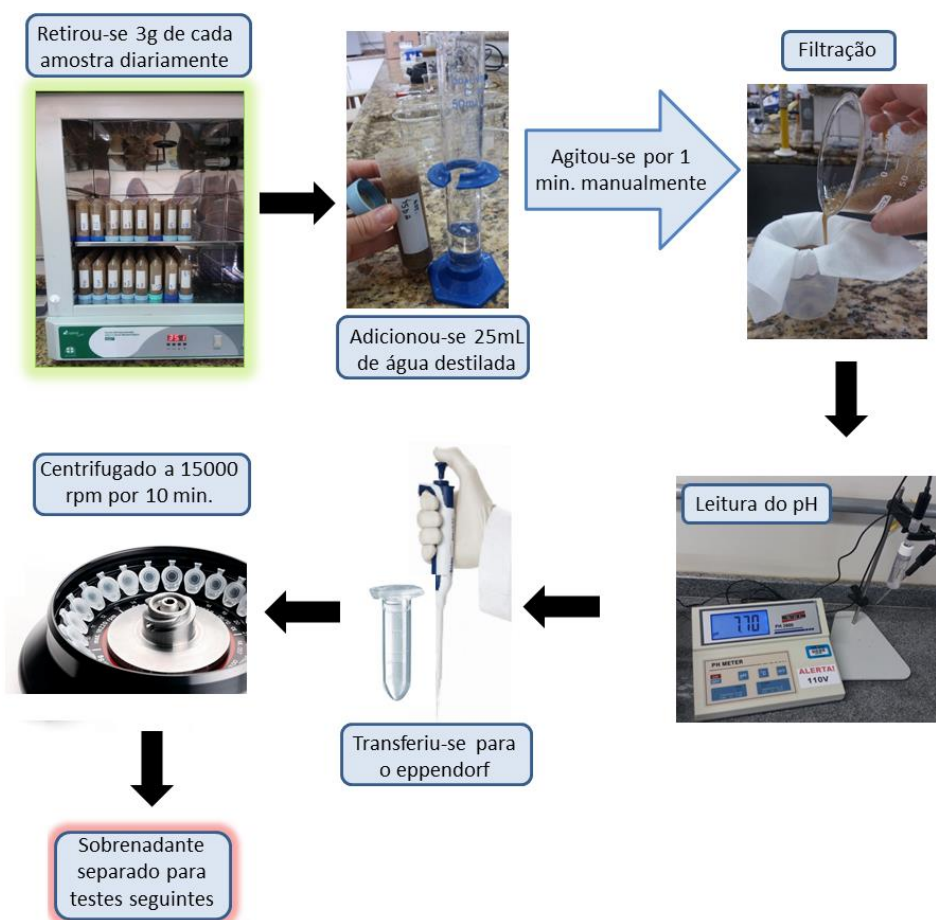
Quadro 1 Amostragens selecionadas para quantificação lignocelulolítica

SUBSTRATO		CEPAS		
Palha-de-cana	Esterilizada	IN	45	CO
Palha-de-cana	Esterilizada	Sem inóculo		
Palha-de-cana	não esterilizada	IN	45	CO
Palha-de-cana	não esterilizada	Sem inóculo		

Legenda: IN: compostagem *in natura*; 45: 45 dias de compostagem; CO: Compostagem com acréscimo de casca de ovo.

Após incubação á 45°C, fez-se a determinação da atividade enzimática a cada 24 horas. Em que foi acrescentado 25 mL de água destilada no tubo falcon, que continha 3 g da amostra (palha umedecida, com e sem inóculo) agitou-se por 1 minuto e filtrou a palha-de-cana, em seguida, foi mensurado o pH do filtrado, e centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante separado para os testes seguintes, conforme Figura 15.

Figura 15 Preparo do extrato enzimático para análises seguintes



Fonte: autoria própria (2019).

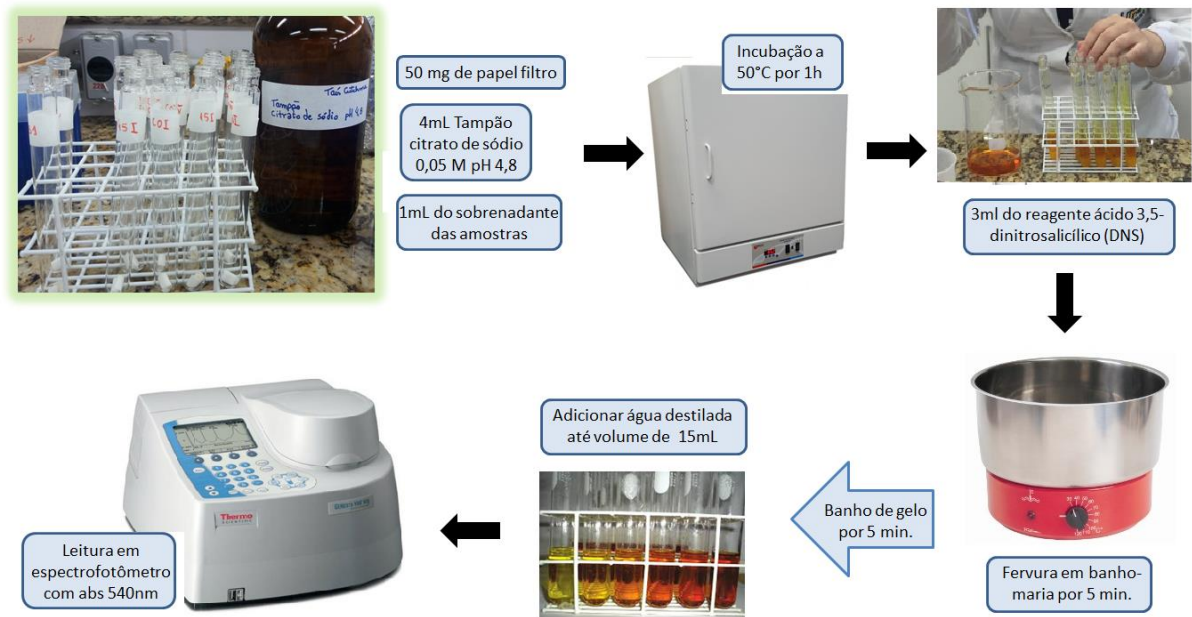
4.2.2 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

As enzimas celulolíticas foram determinadas conforme Ghose (1987) em que a atividade é medida em termos de unidades de papel de filtro por milímetro da solução enzimática inicial, com incubação de 1 hora a 50°C. A avaliação de substâncias redutoras foi verificada através da adição do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O qual foi preparado uma solução com 25 mg de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 75 g de tartarato de sódio e potássio em 50 mL de NaOH 2 M e água destilada até volume de 250 mL. Adicionou-se uma alíquota de 500 µL da amostra com volume igual ao do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico em microtubos e fervido por 5 minutos em banho-maria. Posterior ao resfriamento fez-se leitura em espectrofotômetro a 575 nm.

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 50 mg de papel filtro; 4 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M e 1 mL do sobrenadante das amostras. A incubação do

material foi a 50°C por 1h. Após esse período, foi acrescentado 3 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico bloqueando a reação. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min. e após, adicionadas em gelo. Seguido do resfriamento completou-se para 15 mL com água destilada e fez-se leitura em espectrofotômetro com absorvância de 540 nm, conforme Figura 16.

Figura 16 Análise quantitativa da enzima celulolítica



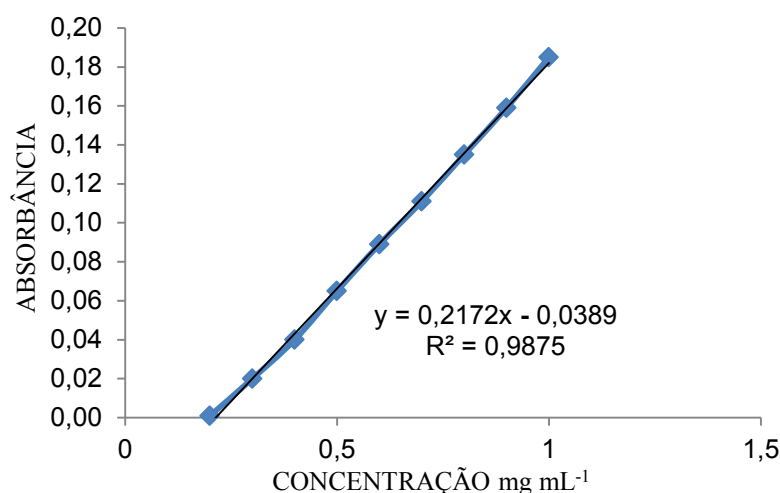
Fonte: autoria própria (2019).

Os tubos padrões foram incubados em solução de 1 mL de glicose com adição de 4 mL de tampão. Com a utilização de uma curva de calibração realizada com glicose, foi determinada a concentração de glicose liberada em cada reação enzimática. De acordo com Ghose (1987), em uma unidade de ação enzimática é liberado 1 μmol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto ($U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$). Os resultados da ação enzimática são expresso em $U \text{ mL}^{-1}$. Foi determinada a concentração conforme apresentado na Tabela 5 e absorvância obtida na leitura da curva de glicose (Gráfico 1), utilizada posteriormente no teste de celulose.

Tabela 4 Curva padrão de glicose

Concentração (mg mL ⁻¹)	Absorbância (nm)
1,0	0,185
0,9	0,159
0,8	0,135
0,7	0,111
0,6	0,089
0,5	0,065
0,4	0,040
0,3	0,020
0,2	0,001

Gráfico 1 Curva Padrão de Glicose



4.2.3 Determinação da atividade de enzimas lignolíticas

Para determinar a atividade de enzimas lignolíticas fez-se testes com a enzima Lacase, descrita por Szklarzet et al. (1984).

O teste de Lacase é mensurado através da utilização de siringaldazina como substrato enzimático. Para este, utilizou-se 0,6 mL do sobrenadante das amostras de actinomicetos; 0,1 mL de tampão citrato-fosfato a 0,05 M e pH 5; 0,1 mL de água destilada e 0,1 mL de siringaldazina a 0,1%. A siringaldazina é oxidada até quinona, sendo monitorada por 10 minutos a 525 nm, conforme Figura 17, e a sua atividade é expressa em UI L⁻¹ (unidade internacional/litro, sendo UI = $\mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Figura 17 Análise quantitativa da enzima lignolítica

- 0,6 mL do sobrenadante
- 0,1 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5
- 0,1 mL de água destilada
- 0,1 mL de siringaldazina a 0,1%



siringaldazina é oxidada até quinona, com monitoramento por 10 min. a 525nm

Fonte: autoria própria (2019).

A ação enzimática é calculada através da equação:

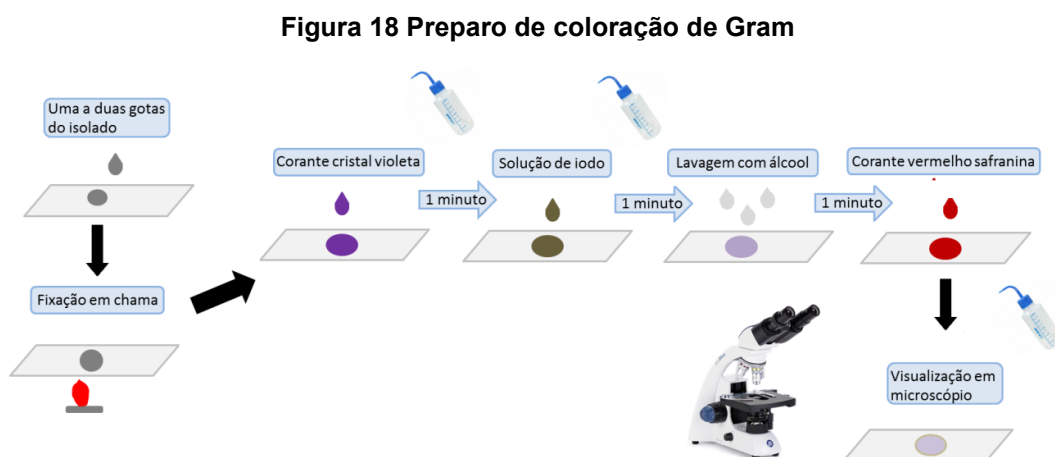
$$\text{Enzima UI/L} = \frac{\Delta \text{ Abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times T}$$

Em que: Δ Abs: Absorbância final – Absorbância inicial, ϵ : coeficiente de extinção da enzima, dependente do comprimento de onda em que é lida (siringaldazina: 525nm= 65000 L/M.cm), R: volume, em mL, do sobrenadante utilizado na reação; T: tempo de reação.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE ACTINOMICETOS

Os isolados obtidos em meio seletivo para actinomicetos foram examinados quanto sua morfologia celular utilizando a técnica de coloração de Gram. É uma técnica que permite diferenciar as bactérias Gram-positivas das Gram-negativas, onde o esfregaço é tratado com reagentes na seguinte ordem: primeiramente é acrescentado uma gota da suspensão contendo os microrganismos selecionados em uma lâmina, após fixação em chama, acrescenta-se uma gota do corante púrpura cristal violeta; após um minuto a lâmina é lavada com água corrente e acrescentado uma gota de solução de iodo (substância que permite a fixação do corante no interior das células), após um minuto de reação, a lâmina é novamente lavada com água corrente, e posteriormente com álcool-cetona (que irá remover o corante de

algumas das células); por último, é acrescentado uma gota do corante vermelho, safranina ou fucsina fenicada, após um minuto de reação, a lâmina é finalmente lavada com água corrente e posta sobre o esfregaço uma lamínula para posterior visualização em microscópio (PELCZAR, 1997, p. 91), conforme apresentado na Figura 18.



Fonte: autoria própria (2019).

Como as actinobactérias são Gram-positivas, a coloração desejada é o violeta-escuro, pois bactérias Gram-positivas retêm o corante cristal violeta. Esta coloração será visualizada em microscópio, e os microrganismos que apresentarem a coloração violeta-escuro serão selecionados para análise molecular, para confirmação de actinobactérias (PELCZAR, 1997).

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE ACTINOMICETO

Para identificação molecular dos actinomicetos, cultivou-se uma placa contendo a cepa em meio de cultura específico para actinomiceto. Após obter o crescimento da cepa realizou-se a extração do DNA genômico utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) segundo as recomendações do fabricante. Após obtenção do DNA genômico realizou-se a quantificação do mesmo em gel de agarose 1%, revelado através do aparelho transluminador UV, para verificar a qualidade do material.

Para a amplificação do DNA genômico, realizou-se uma reação em cadeia da Polimerase (PCR) utilizando a região gênica, específica ACTINO para a amostra *in*

natura, através dos oligonucleotídeos S-C-Act-0235-a-S-20 (5') CGCGGCCTATCAGCTTGTTG (3') e S-C-Act-0878-a-A-19 (5') CCGTACTCCCCAGGC-9+GGGG (3'), já para as demais amostras, devido a dificuldade na realização do PCR, devido ao fato de que elas não pertencem ao grupo dos actinomicetos, optou-se pela utilização da região gênica específica 16S pois o permite diferenciar os gêneros e também algumas espécies de procariotos (MADIGAN et al., 2010), através dos oligonucleotídeos 1541r (5') AAGGAGGTGATCCAGCC e 634r (3') GAGTTTGATCCTGGCTACG. Um mix para a reação de PCR foi feito contendo a solução de tampão buffer 10x (2,5µl), mg+ (1,5µl), dNTPsmix (2,5µl), primers (1µl), Taq (0,4µl), DNA (1µl), água (15,1µl) completando um volume final 25 µl.

As condições usadas na reação foram de 98°C por 3 minutos; 40 ciclos de 98°C por 30 segundos; 68°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e temperatura final de 72°C por 15 minutos para a cepa da amostra *in natura*. Para as demais amostras, utilizaram-se as condições de reação, 94°C por 3 minutos; 39 ciclos de 94°C por 30 segundos; 55°C por 1 minuto; 72°C por 3 minutos, com extensão final de 72°C por 10 minutos, e os produtos do PCR foram purificados e sequenciados.

As amostras foram sequenciadas utilizando o aparelho AB13730 com corridas em capilares utilizando polímero POP7. E para visualizar os resultados das sequências nucleotídicas que foram obtidas foi através da utilização do software BigDye® Terminator v3.1. As análises filogenéticas utilizadas possuem várias sequências disponibilizadas pelo banco de dados do GenBank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Comparou-se com as sequências já disponibilizadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn, a qual mostra a porcentagem de similaridade dos isolados.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas na central de análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Pato Branco (UTFPR/PB). As amostras selecionadas foram às mesmas para quantificação lignocelulolítica (Quadro 1) após 30 dias em estufa a 45°C.

Aproximadamente 5 g de cada amostra foi congelada para posterior liofilização, objetivando a retirada do líquido presente nos tratamentos, por 3 (três) dias no

Liofilizador L108, do Laboratório de Análise de alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos (UTFPR/DV). Em seguida, obteve-se micrografias em um microscópio eletrônico de varredura marca HITACHI TM3000, operando com tensão de aceleração variável (5kV e 15 kV), com capacidade de aumento de 30 a 1000 vezes. As imagens obtidas foram registradas em arquivo digital. As micrografias permitiram visualizar a superfície da palha de cana-de-açúcar depois de ocorrido o pré-tratamento com os microrganismos isolados.

5. RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE LIGNOCELULOLÍTICA

No total, 3 (três) cepas foram isoladas das amostras: *in natura*, 45 dias de compostagem e compostagem com acréscimo de casca de ovo. Estas linhagens indicaram bom crescimento inicial em meio seletivo para actinomiceto, conforme Quadro 2. Desta forma, posteriormente foram verificadas quanto ao crescimento em meio contendo somente palha como substrato, importante para ativação das cepas.

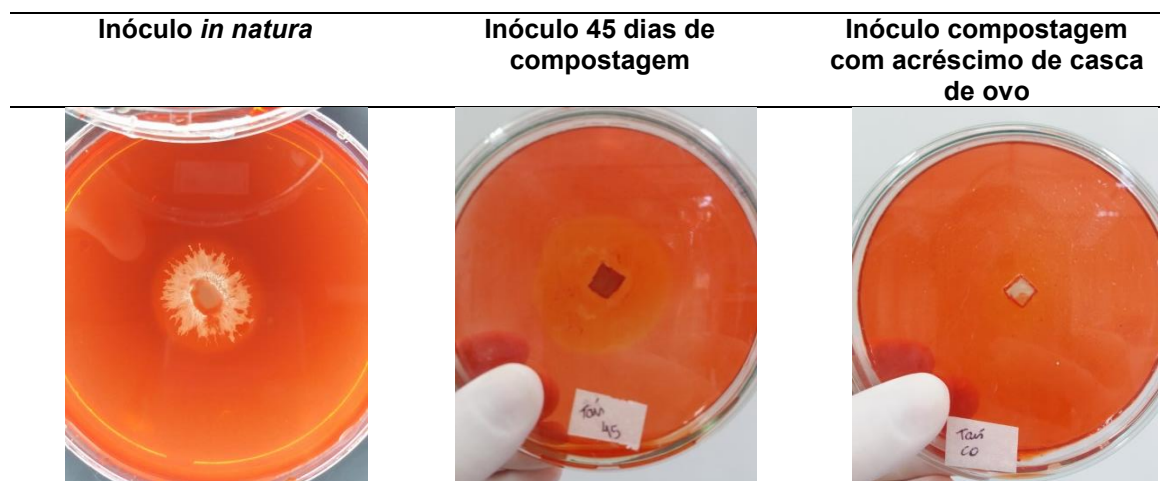
Quadro 2 Isolamento e seleção das cepas



Na determinação *in vitro* da atividade lignocelulolítica dos actinomicetos isolados, também indicaram bom crescimento, sendo verificado através das medidas do halo de ação enzimática. Em que a zona mais clara em torno das colônias, corresponde ao halo indicador da ação enzimática, ou seja, degradação da celulose

presente no meio. Esta ação está representada no Quadro 3, em que após o acréscimo do corante vermelho congo revelou a ação enzimática.

Quadro 3 Resultado da ação enzimática dos isolados



Por meio das medidas de crescimento do organismo e de ação enzimática, representadas na Tabela 5, foi possível verificar que as cepas isoladas apresentaram bom resultado para a enzima celulolítica. Também foi verificado que ao comparar as diferentes temperaturas de crescimento dos isolados, as cepas se desenvolveram melhor a 45°C, apresentando assim uma melhor ação enzimática. De acordo com Tuomella et al. (2000), a temperatura ótima para os fungos termofílicos é de 40 a 50 ° C, apresentando-se também como temperatura ideal para a degradação de lignina. Além de que a hidrólise enzimática age em condições que vão de um pH de 4,8 a 6,0 e temperatura ideal de 45-50°C (SARKAR et al., 2012).

Sendo a análise da atividade enzimática uma propriedade microbiológica da qualidade do solo (CARNEIRO et al., 2008).

Tabela 5 Índice enzimático dos isolados em milímetros

T.	Cepa	5 dias de crescimento			10 dias de crescimento		
		Diâmetro de crescimento	Halo de ação enzimática	IE	Diâmetro de crescimento	Halo de ação enzimática	IE
25°C	IN	26,2	1,1	23,8	44,2	5,3	8,3
	45	19,2	1,4	13,7	40,6	2,1	16,2
	CO	5,5	0,8	6,8	12,3	1	12,3
45°C	IN	37,2	7,4	5,02	44,4	15,4	2,8
	45	24,6	2,2	11,1	60	4,5	13,3
	CO	7,6	1,2	6,3	18,7	1,6	11,7

Legenda: T: temperatura; IE: Índice enzimático; IN: amostra da compostagem *in natura*; 45: amostra com 45 dias de compostagem; CO: amostra de compostagem com acréscimo de casca de ovo.

Fungaro e Maccheroni (2002) sugerem que o índice enzimático é indicativo de excreção enzimática quando for maior do que 1,0 mm, assim como foi encontrado neste trabalho, em que as cepas apresentaram um IE superior a 1,0 mm.

Assim como Silva, Martins e Martins (2015), que obtiveram resultados da ação enzimática em 21 cepas de actinobactérias isoladas do solo no Parque Nacional de Ubajara, no Estado do Ceará, destacando o índice enzimático de uma cepa que apresentou o valor de 6,90 mm, e 36% das demais apresentaram um resultado de IE (índice enzimático) superior a dois milímetros.

Já Bispo (2010) ao avaliar 80 cepas de actinobactérias, de uma região da Caatinga, encontrou atividade celulolítica em 33% dos isolados, em que uma cepa se destacou por apresentar um halo de ação enzimática de 3,2 cm.

Bomba, Cotta e Marriel (2018), ao avaliar a atividade enzimática, observou em actinomicetos um índice enzimático (IE) maior que 2,0 em 92,3 % das cepas avaliadas para produção de celulase, demonstrando o alto potencial dos actinomicetos para prospecção em processos biotecnológicos.

Já Rodrigues (2006), ao isolar 195 actinomicetos, verificou *in vitro* a atividade celulolítica, em que 178 (91%) isolados apresentaram crescimento em meio mínimo com 0,5% de carboximetilcelulose. Os gêneros isolados que se destacaram são *Terrabacter* (100%), *Nocardia* (85%), *Nocardiopsis* (50%) e *Streptomyces* (93%).

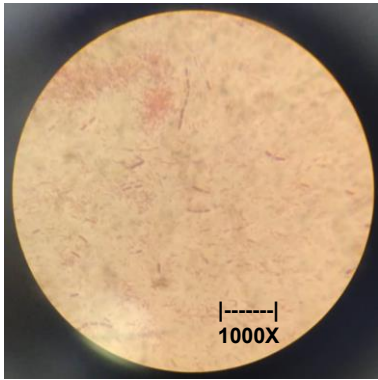
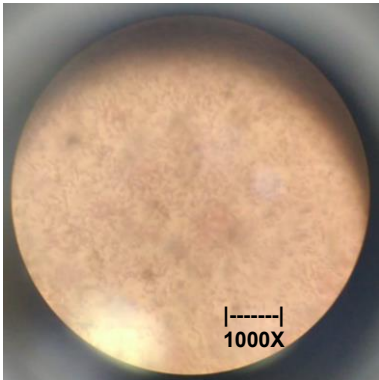
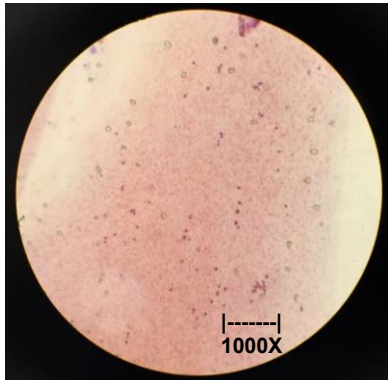
Mergel (2014), ao verificar halos de hidrólise de 42 linhagens de actinomicetos, constatou que a maioria das cepas apresentaram bom desempenho em testes em meio sólido contendo CMC (carboximetilcelulose), concluindo que os actinomicetos são bons produtores de enzimas celulolíticas, e hemicelulolíticas, assim como encontrado neste trabalho, em que em meio contendo carboximetilcelulose, os isolados apresentaram halos de hidrólise que indicam boa ação enzimática.

5.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE ACTINOMICETOS

Com esta etapa foi possível verificar que a bactéria isolada do tratamento *in natura* (a) é Gram-positiva, pois apresentou uma parede celular com coloração violeta e forma de bacilo alongado. Já os tratamentos 45 dias de compostagem (b) e compostagem com acréscimo de casca de ovo (c), apresentaram coloração

vermelha, constatando que são Gram-negativas, além de forma cocóide. O teste de coloração de Gram é apresentado no Quadro 4.

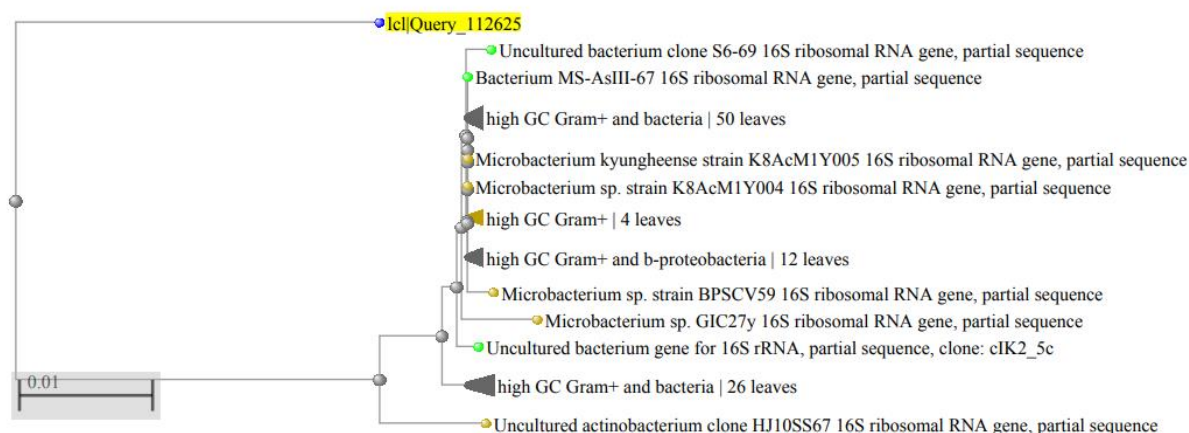
Quadro 4 Resultado do teste de Coloração de Gram nos isolados

Compostagem <i>in natura</i>	45 dias de compostagem	Acréscimo de casca de ovo
		

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE ACTINOMICETO

A sequência obtida utilizando os primers ACTINO foi do inóculo *in natura*, constatando 96% de significância com a sequência “EU532511.1”, de acordo com o banco de dados do GenBank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), que foi utilizado na montagem da árvore filogenética (Figura 19) a qual apresenta a similaridade do isolado com actinobactéria. Este banco de dados é aplicado na comparação do DNA de organismos, utilizando a ferramenta BLASTn, que apresenta a porcentagem de similaridade dos isolados em relação às sequências já disponibilizadas no GenBank.

Figura 19 análise do sequenciamento do inóculo obtido do biofertilizante *in natura*.



Na árvore filogenética, destacado em amarelo, está representado o sequenciamento desejado. Nas representações a baixo, estão os microrganismos com sequencias parciais com 96% de significância ao comparados com a sequência obtida. Podendo assim verificar que o sequenciamento do microrganismo tem 96% de possibilidade de pertencer as actinobactéria (acesso EU532511.1), bactéria (acesso JF177308.1, JF215590.1) ou microbactérias que são gram-positivas (acesso MH394203.1, MF666752.1, MG016448.1, MF767916.1).

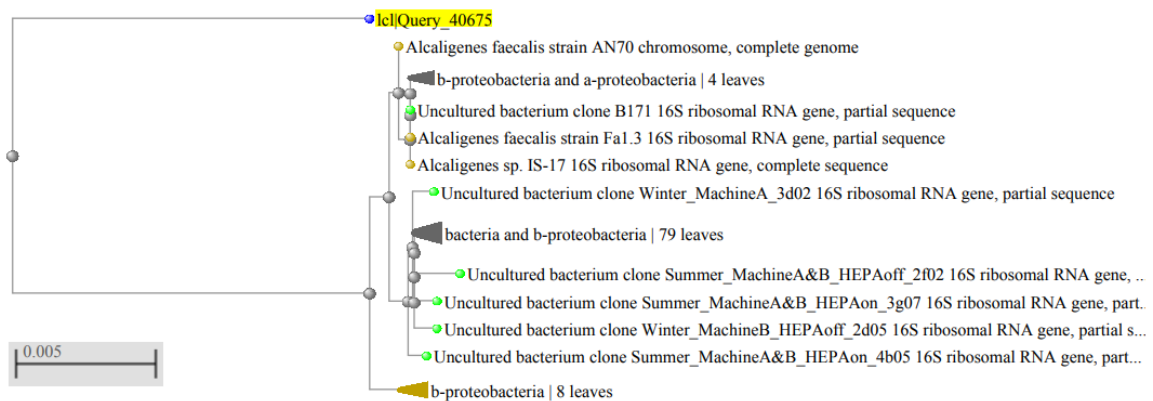
Tuomella et al. (2000) apresentaram como gêneros predominantes, encontrados em material em decomposição, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Sccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*.

Charousová et al. (2017) nos apresentaram que os actinomicetos, como *Streptomyces scabrissporus*, *Streptomyces sparsogenes*, *Streptomyces misakiensis*, *Streptomyces cirratus*, *Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces endophyticus*, *Streptomyces chartreusis* e *Streptomyces alboniger*, mostrou um amplo espectro de atividades enzimáticas, além de servirem como produtores de antibióticos e de enzimas.

De acordo com Tuncer et al, (2004), os gêneros dos actinomicetos com boa atividade celulolítica são *Microbispora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*, e também os mesofílicos e termofílicos. Destacando as celulases produzidas por *Streptomyces sp.* por apresentar uma ótima atividade em temperaturas de 50°C a 55°C, além de apresentarem estabilidade em ampla faixa de pH (LI et al., 1998).

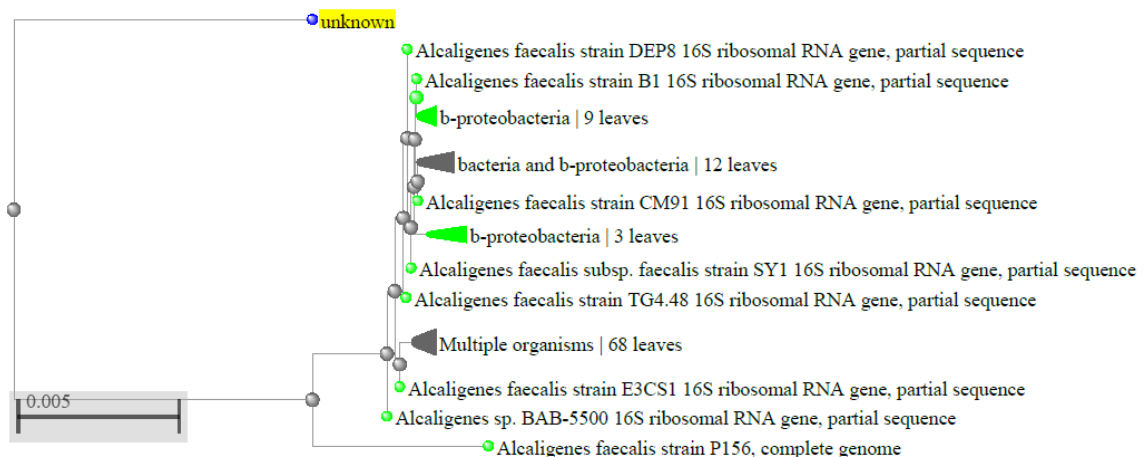
Já para os isolados dos tratamentos com 45 dias de compostagem e com acréscimo de casca de ovo, utilizando o primer 16S, constatando que, os isolados com 45 dias de compostagem e com acréscimo de casca de ovo, ambos, com 95% de similaridade, de acordo com o GenBank, são pertencentes ao grupo *Alcaligenes*, possivelmente são *Alcaligenes faecalis*, conforme apresentado nas árvores filogenéticas construídas, nas Figuras 20 e 21.

Figura 20 Árvore filogenética da cepa do tratamento com 45 dias de compostagem



Na árvore filogenética, em amarelo está representado o sequenciamento selecionado para análise, os demais são os microrganismos que apresentam sequências parciais com 95% de significância com a sequência obtida. Desta forma, o isolado do tratamento com 45 dias de compostagem tem 95% de probabilidade de pertencer a *Alcaligenes faecalis* (total de CP036294.1) (parcial de KU860464.1).

Figura 21 Árvore filogenética da cepa do tratamento com acréscimo de casca de ovo



Na árvore filogenética, em amarelo está representado o sequenciamento selecionado para análise, os demais são os microrganismos que apresentam sequências parciais com 96% de significância com a sequência obtida. Desta forma, o isolado do tratamento com acréscimo de casca de ovo, tem 96% de possibilidade de pertencer a *Alcaligenes sp.* (acessoKT316401.1), *Alcaligenes faecalis* (acesso KP761416.1, KC172062.1).

Cassman et al. (2018) ao caracterizarem os componentes microbianos da vinhaça como resíduo de uma indústria de etanol e açúcar, encontrou 6 (seis) principais gêneros bacterianos, dentre eles: *Lactobacillus*, *Megasphaera* e *Mitsuokella* (filo Firmicutes, 35-97% das amostras lidas); *Arcobacter* e *Alcaligenes* (filo Proteobacteria, 0-40%); *Dysgonomonas* (Filo Bacteroidetes, 0-53%); e *Bifidobacterium* (filo Actinobacteria, 0-18%).

Os resultados encontrados por Lima (2014) constataram que os organismos apresentam similaridade com as sequências do filo Proteobacteria (92% dos identificados), Firmicutes (4,2%) e Actinobactérias, Streptophyla e Cynobacterias, os mais abundantes.

Viana (2016) ao isolar bactérias associadas a bromélias de cangas, retirando amostras da raiz, e utilizando para o sequenciamento o gene 16S, que mostrou maior representatividade para o gênero *Bacillus* (54%), seguido por *Alcaligenes*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*.

Diante do objetivo do trabalho e dos resultados obtidos, tem-se a necessidade de explicar o crescimento da bactéria *Alcaligenes faecalis*, em meio seletivo para actinomiceto, e apesar de ser apresentada como Gram-negativa, optou-se por fazer o sequenciamento, diante do bom resultado obtido no decorrer das análises.

O crescimento inicial da *Alcaligenes sp.* no isolamento é explicado através da presença de glicerol no meio seletivo para actinomiceto, pois estas bactérias apresentam bom crescimento e desenvolvimento em meio contendo glicerol. Alguns estudos apontam o glicerol como nutritivo (como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio), em sua forma bruta, podendo ser utilizado pelos microrganismos para seu crescimento em fermentações (SABARATMAN e ALI HASSAN, 2012).

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS

Antes da determinação das atividades celulolíticas e lignolíticas, foi verificado o pH das amostras no decorrer dos dias analisados, conforme Tabela 7.

Tabela 6 Determinação diária do pH dos tratamentos

	Amostras	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10
Estétil	CONTROLE	8,50	8,80	8,60	8,07	8,70	8,70	8,90	8,60	8,30	8,40
	<i>in natura</i>	7,90	8,70	8,60	7,50	6,70	8,50	8,60	8,00	7,40	7,30
	45 dias	8,10	8,80	8,80	7,80	7,80	9,00	8,80	9,00	8,70	8,70
	CO	7,90	8,90	9,00	8,60	8,50	8,40	9,00	9,30	8,60	8,90
Não estétil	CONTROLE	8,70	9,00	8,90	7,10	6,20	8,40	8,50	8,00	7,00	6,80
	<i>in natura</i>	8,10	9,10	8,80	6,00	5,80	6,00	5,80	6,20	6,20	6,60
	45 dias	7,50	9,00	8,90	7,50	6,70	6,20	5,80	5,90	6,80	7,30
	CO	7,50	9,00	8,80	7,30	5,90	6,80	6,00	9,40	8,70	8,60
	Confiabilidade	95%	92%	89%	93%	93%	93%	94%	89%	93%	95%
	Água destilada	9,00	9,50	8,20	9,50	9,00	8,20	8,20	9,30	7,70	7,30

Legenda: Controle: palha de cana sem inóculo; IN: amostra de compostagem *in natura*; 45: amostra de 45 dias de compostagem; CO: amostra de compostagem com acréscimo de casca de ovo; Estétil: palha de cana esterilizada; Não estétil: palha de cana não esterilizada; Confiabilidade: refere-se à calibração do peagâmetro; Água destilada: a qual foi utilizada para a diluição das amostras e posterior leitura do pH.

Através das medidas de pH, foi observado que no decorrer dos dia, no geral todos os caldos enzimáticos, dos três diferentes tratamentos, manteve-se acima de 5,8 e a baixo de 9,4. Apresentando maior estabilidade do 1° ao 3° dia, com queda em todas as amostras no 4° dia de análise, e oscilação nos dias seguintes.

Os actinomicetos, no processo de degradação, utilizam primeiramente fontes de carbono de fácil degradação como mossacarídeos, amido e lipídeos, e a presença de ácidos orgânicos resultantes, faz com que o pH diminua. Em seguida, degradam moléculas maiores, como as proteínas, liberando amônio e conseqüentemente, aumentando o pH do meio, e por último, degradam celulose, hemicelulose e lignina (TUOMELLA et al., 2000).

Segundo McCarthy e Willians (1992), os actinomicetos são favorecidos em pH neutro a alcalino. Em processo de compostagem, o pH pode chegar a 4,8, devido a fermentação dos resíduos, mas no decorrer do processo, pode chegar á 9,0, devido a amonificação dos compostos nitrogenados presente (JANG et al., 2002).

O processo de amonificação, conhecido também por mineralização de nitrogênio, é a conversão do nitrogênio orgânico á amônio (NH_4^+) e/ou amônia (NO_3^-)

), o qual ocorre através da degradação enzimática dos compostos orgânicos, pelos microrganismos presente no solo, (CANTARELLA, 2007).

Vilella (2013) ao analisar a atividade celulolítica do gênero *Streptomyces*, verificou a influência do pH (indo de 3,0 a 10,0), e da temperatura (40 a 80°C) constatando que a atividade foi maior quando em pH 4,5 e temperatura de 50°C e a atividade da enzima β -glicosidase em pH 4,5 na temperatura de 65°C.

Silva e Gouveia (2008) ao analisarem a produção de endoglucanases por *Streptomyces spp.*, em bagaço de açúcar de cana verificou um pH ótimo de produção em 4,8, variando de 4,0 a 8,0.

Bispo (2010), ao verificar a atividade celulásica de *Streptomyces sp.* em bagaço de cana (fonte de carbono) e milhocina (fonte de nitrogênio), verificou um pH ótimo de produção de 4,0, variando de 2,0 a 9,0.

Outros microrganismos também apresentam atuação enzimática em uma faixa de pH ampla, assim como as enzimas de *Alcaligenes sp.*, que apresentam faixa de pH entre 5,8 e 9,4, como apresentado nas leituras diárias deste trabalho. Peng et al., (2010), com um sistema microbiano, o qual a *Alcaligenes* estava presente, encontraram um pH ótimo de 6,0, para a enzima xilanase, sendo sua atividade vista em uma ampla faixa de pH, de 3,0 a 10,0.

Han e Srinivasan (1969) em sua pesquisa, objetivando isolamento, purificação e caracterização da enzima β -glucosidase, isolaram do bagaço da cana, a bactéria *Alcaligenes faecalis*. Essa enzima apresentou ampla faixa de pH, com atividade ótima entre 6,0 e 7,0, sendo estável em pH 6,5 a 7,8 a 30°C, e destruída a temperaturas acima de 55°C. E ao ser testado em celobiose, apresentou uma atividade ótima de 11,18 U g⁻¹.

5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

A conversão de celulose em glicose está representado na Tabela 8.

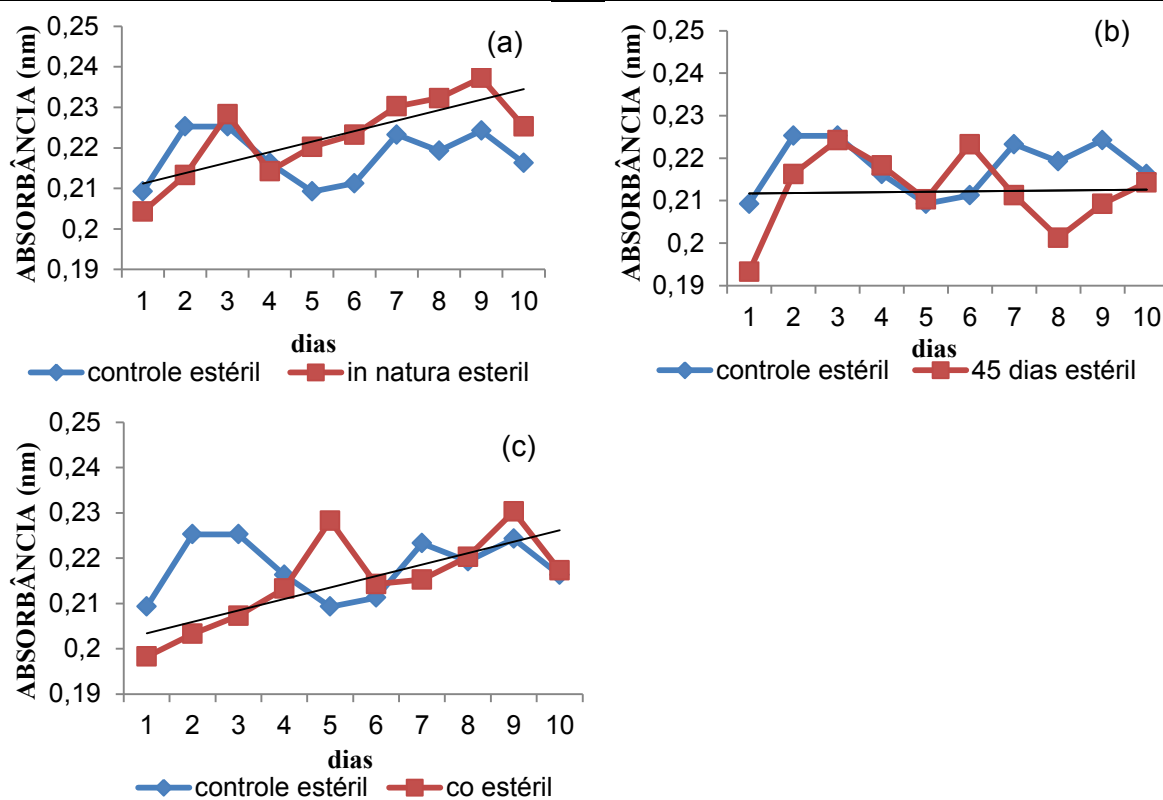
Tabela 7 Leitura diária da ação da enzima celulolítica dos isolados em absorbância

AMOSTRAS	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10	
Estéril	Controle	0,209	0,225	0,225	0,216	0,209	0,211	0,223	0,219	0,224	0,216
	<i>in natura</i>	0,204	0,213	0,228	0,214	0,220	0,223	0,230	0,232	0,237	0,225
	45 dias	0,193	0,216	0,224	0,218	0,210	0,223	0,211	0,201	0,209	0,214
	CO	0,198	0,203	0,207	0,213	0,228	0,214	0,215	0,220	0,230	0,217
Não estéril	Controle	0,196	0,221	0,220	0,215	0,212	0,213	0,225	0,212	0,217	0,221
	<i>in natura</i>	0,198	0,214	0,225	0,230	0,211	0,218	0,233	0,212	0,220	0,227
	45 dias	0,217	0,212	0,223	0,205	0,215	0,217	0,225	0,208	0,213	0,208
	CO	0,210	0,212	0,230	0,217	0,220	0,212	0,229	0,209	0,219	0,228

Legenda: Controle: palha de cana sem inóculo; *in natura*: amostra de compostagem *in natura*; 45: amostra de 45 dias de compostagem; CO: amostra de compostagem com acréscimo de casca de ovo; Estéril: palha de cana esterilizada; Não estéril: palha de cana não esterilizada.

A partir da curva padrão ($y = 0,2172x - 0,0389$), os resultados obtidos são analisados no Gráfico 2 (“a”, “b”, e “c”), comparando controle (em substrato esterilizado) e os tratamentos com as cepas *in natura* (a), 45 dias de compostagem (b) e com acréscimo de casca de ovo (c).

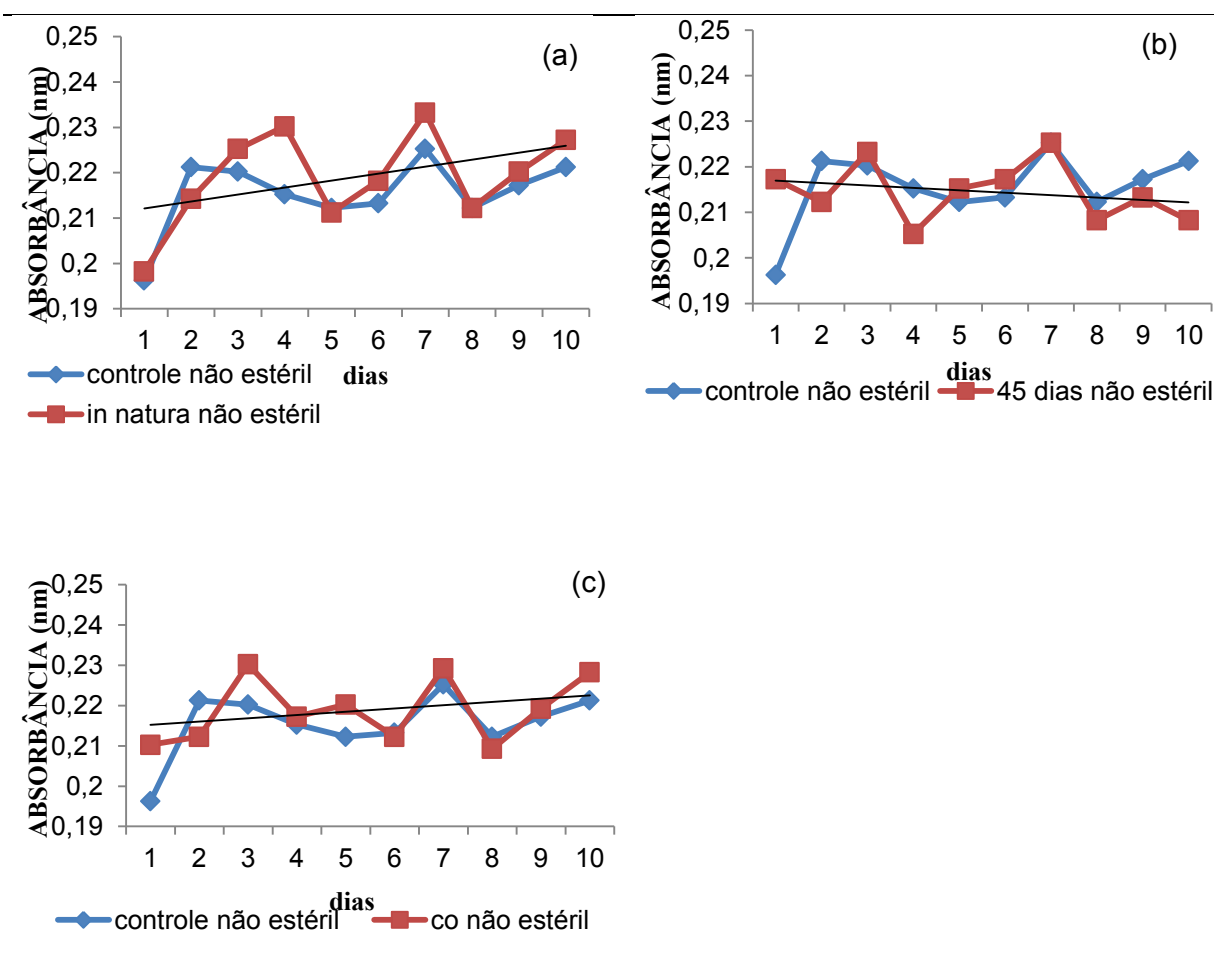
Gráfico 2 Ação enzimática dos isolados em substrato estéril



Diante dos resultados apresentados foi possível verificar que a cepa *in natura* (a) formou mais monômeros de glicose, no 3º dia, e de forma crescente a partir do 5º dia de análise, apresentando uma queda na produção no dia 4 e 10. No isolado do substrato com 45 dias de compostagem (b) foi verificar que nos dias 3 e 6 ocorreu maior formação de monômeros de glicose. Já os resultados obtidos com a cepa isolada da compostagem com acréscimo de casca de ovo (c), nos mostra que houve um pico de quebra de celulose em monômeros de glicose no 5º dia, e apesar da queda ocorrida no dia seguinte, posteriormente de forma crescente, apresentou outro pico de produção no 9º dia de análise.

Já na comparação feita nos tratamentos controle (substrato não esterilizado) e contendo as cepas isoladas das compostagens *in natura* (a), 45 dias de compostagem (b) e com acréscimo de casca de ovo (c), com substratos (palha de cana) não esterilizados conforme Gráfico 3 (“a”, “b”, e “c”).

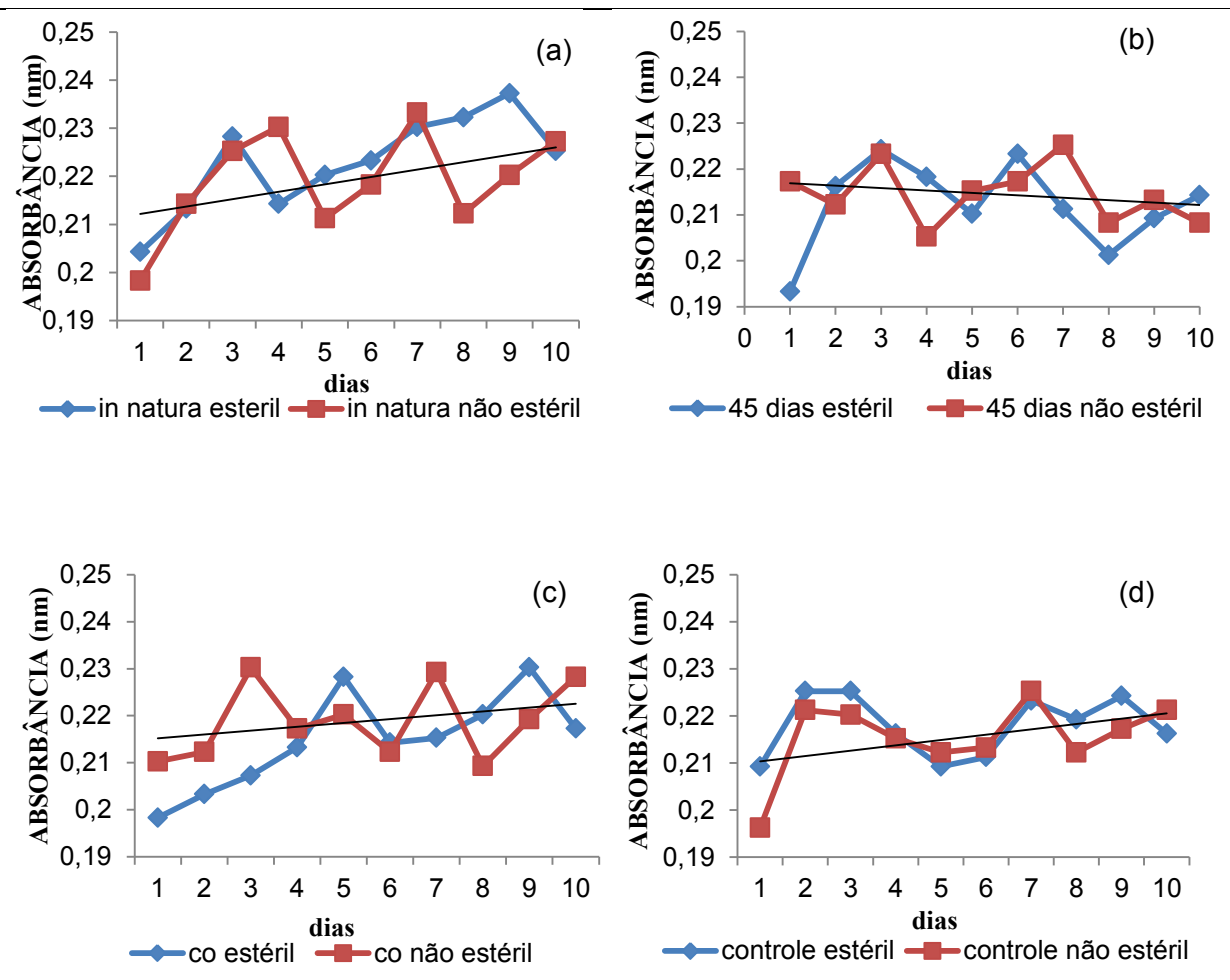
Gráfico 3 Ação enzimática dos isolados em substrato não esteril



Verificamos que houve produção de monômeros de glicose nos dias 4 e 7 de análise das cepas *in natura* (a), no entanto houve redução, nos dias 5 e 8. Com o isolado de 45 dias de compostagem (b) houve pico de produção no dia 3 e 7, e nos dias seguintes queda na quebra de celulose em monômeros de glicose. A compostagem com acréscimo de casca de ovo (c) apresentou pico de produção de glicose nos dias 3, 7 e 10, com queda nos dias seguintes.

Nos Gráficos 4 (“a”, “b”, e “c”), está apresentado a comparação dos substratos contendo as cepas dos isolados da compostagem *in natura* (a), 45 dias de compostagem (b), compostagem com acréscimo de casca de ovo (c), e controle (d), em substrato esterilizado e não esterilizado.

Gráfico 4 Ação enzimática dos isolados comparando os substratos esterilizados e não esterilizados



De modo geral o tratamento com a cepa *in natura* (a), com o substrato esterilizado apresentou produção de monômeros de glicose de forma crescente a

partir do 4º dia de análise, apresentando um pico no 9º dia, e queda no dia seguinte. Já o tratamento contendo o substrato não esterilizado, apresentou picos de produção de glicose nos dias 4, 7 e 10, com queda nos dias seguintes. Isso pode ocorrer devido ao fato de que pode haver neste substrato microrganismos que consomem a glicose produzida pela quebra das moléculas de celulose através do microrganismo inoculado (cepa *in natura*).

Ao comparar as cepas do adubo com 45 dias de compostagem (b), foi possível verificar que apesar de ter produzido quantidade maior de glicose no 7º dia em substrato não esterilizado, houve queda na produção, diferente do que ocorreu em substrato estéril, em que também ocorreu queda na produção de glicose, porém menor.

Com os isolados da compostagem com acréscimo de casca de ovo (c), foi verificado que a quebra de celulose em monômeros de glicose ocorreu em dias diferentes. Em substrato esterilizado, a produção de glicose ocorreu nos dias 5 e 9, e em substrato não esterilizado, a produção ocorreu nos dias 3, 7 e 10. Foi verificado também que a produção de glicose do substrato esterilizado é crescente, diferente do que ocorre no substrato não esterilizado.

Ao comparar os tratamentos esterilizados e não esterilizados, pode-se compreender a queda de glicose nos dias recorrentes ao pico nos tratamentos não esterilizados, devido a presença de outros microrganismos já presentes na palha de cana, o qual podem ser consumidores de glicose. Quando, após a hidrólise da celulose em glicose, esta é consumida, chama-se de sacarificação e fermentação simultâneas (SILVA, 2015).

As quedas de produção nos dias recorrentes aos picos de glicose podem ocorrer devido às altas concentrações de glicose, como encontrado no trabalho de Wachinger (1989), que observou uma forte inibição enzimática quando em alta presença de glicose no meio.

Isso pode ocorrer devido aos mecanismos de controle e produção enzimática, o *feedback*. Esse mecanismo permite que a enzima atue somente quando necessário, e diante disso, nos processos industriais é desfavorável, pois ao pensar em larga escala, é esperado que a enzima funcione com capacidade máxima para converter a maior parte do substrato de interesse em produto (açúcares redutores), para que o custo de produção seja reduzido (NELSON et al., 2006). Sendo assim, deve pensar em uma forma de retirar os produtos como a glicose para que o sistema

seja mantido na conversão do substrato em produto pelas enzimas, evitando que a atividade enzimática seja inibida (INFORSATO e PORTO, 2016).

Esse *feedback* pode ser evitado quando se utiliza microrganismos em co-cultura ou comunidades complexas, pois tem sido verificado com uma abordagem altamente eficiente no uso biotecnológico, por evitar problemas de regulação de *feedback* e inibição de metabólitos associados ao uso de isolados (HARUTA et al., 2002).

A utilização de um sistema microbiano com a finalidade de pré-tratamento é benéfico para a produção de biomassa em larga escala, pois no geral, a esterilização do material lignocelulósico com posterior inoculação de microrganismos é inviável (ZHENG et al., 2014). Pois a presença de lignina no meio torna difícil o acesso de enzimas nos complexos celulósicos e hemicelulósicos (KUMAR e WYMAN, 2009).

A capacidade dos actinomicetos de degradar celulose envolve uma ação sinérgica de várias enzimas, em que a endoglucanase cliva os derivados da celulose, como a carboximetilcelulose; exoglucanase libera as unidades de celobiose; e a β -glucosidase catalisa a hidrólise de celobiose e celooligossacarídeos à glicose (WACHINGER et al., 1989).

Bispo (2010) ao utilizar o método DNS para verificar a atividade da enzima celulolítica de uma linhagem de *Streptomyces sp.*, observou uma maior produção de celulases ($0,740 \text{ U.mL}^{-1}$) em bagaço de cana, após 5 dias, á 60°C e pH 4,0.

Santos (2010) ao realizar o isolamento de 166 actinomicetos do solo e de resíduo da cultura de sisal, e estudar seus potenciais celulolíticos, encontrando 17 promissores, e devido ao crescimento rápido de uma estirpe, realizou a fermentação desta em meio contendo bagaço de sisal e bagaço de cana. Neste, encontrou boa produção de enzima, atingindo 630 U L^{-1} no bagaço de sisal e 260 U L^{-1} em bagaço de cana, constatando que a fonte de nitrogênio que foi disponibilizada pela milhocina influenciou a produção de enzima, o que não ocorreu quando inseriu-se fontes de carbono.

Isso sugere análise futura da produção enzimática ao introduzir juntamente com o carbono disponibilizado pela palha de cana-de-açúcar, uma fonte de nitrogênio, visando melhorar a produção de enzima e conseqüentemente a quebra de celulose em monômeros de glicose.

Como no que foi proposto em Bispo (2010), que encontrou uma produção máxima da estirpe de *Streptomyces sp.* CDPA-01, ao acrescentar milhocina, como fonte de nitrogênio, juntamente com o bagaço de cana, como fonte de carbono, após 5 dias de fermentação (0,740 U.mL⁻¹).

PENG et al. (2010) ao estudar um sistema microbiano na degradação da lignocelulose, composto por bactérias relacionadas aos gêneros, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, entre outras, observou degradação da palha de arroz em 60,3% após 15 dias de fermentação, destacando a atividade da enzima extracelular xilanase, no 6º dia de fermentação, com 8,357 U.mL⁻¹ de hidrolização lignolítica.

A produção de enzimas hidrolases por bactérias pode ser melhorada com adição de altas fontes de nitrogênio, devido á presença de açúcares simples. Ou ainda a adição de fontes complexas de extrato de levedura, triptona e peptona, ao liberar amônia no meio, estimulam o crescimento e aumenta o rendimento produtivo da enzima (SUBRAMANIYAN et al., 2002)

Outro fator que auxilia na análise do resultado obtido é que como comentado anteriormente a celulose é um polímero de glicose formado por ligações β -1,4 e influenciado pelas enzimas, endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidase (SINGHANIA et al., 2013). As quais agem de forma sinérgica convertendo o polímero de celulose em monômeros de glicose (SINGHANIA et al., 2010). Em que, a endoglucanase atua de forma aleatório ao longo da cadeia, permitindo a atuação das exoglucanases (celobiohidrolases) que hidrolisam polímeros de celulose nas extremidades reductoras ou não, produzindo assim, as celobioses e oligossacarídeos. As celobioses por sua vez, são convertidas em glicose, pela ação das β -glucosidases, que acabam sendo limitantes na conversão da celulose (SINGHANIA et al., 2013). O acúmulo de celobiose acaba inibindo a ação da exoglucanase e reduzindo a sacarificação, necessitando da conversão em glicose, que por sua vez, quando acumulada inibe a atividade das β -glucosidase. Sendo necessário, portanto, outro componente que não seja deficiente em β -glucosidase, que é o caso das xilanases, também produzidas por alguns microrganismos, que permite um aumento da eficiência geral da sacarificação (HU et al., 2011).

A compreensão estrutural e conversão da lignocelulose por enzimas hidrolíticas podem vir a fornecer melhores resultados de sacarificação, quando se mistura diferentes microrganismos na biomassa como resíduo (HU et al., 2011).

Desta forma, faz-se necessária uma melhor triagem de microrganismos e bioprospecção de enzimas, que possam agir de forma sinérgica com as celulases comerciais, permitindo a quebra da lignocelulose e posterior conversão á açúcares fermentáveis (SINGHANIA et al., 2017).

Sindhu, Binod e Pandey (2016), também destacam a importância de um pré-tratamento utilizando um consórcio microbiano para a deslignificação da biomassa vegetal.

De acordo com Ravindran e Jaiswal (2016) a escolha do pré-tratamento da biomassa vegetal deve ser baseada nas propriedades físico-químicas desta, visando á máxima liberação de açúcares redutores, visa hidrólise enzimática. Além de que, nesses processos, ocorre a liberação de algumas moléculas que inibem a atividade enzimática, o qual deve ser evitado, necessitando de uma remoção após a sua formação. E após isso, essas técnicas podem ser elaboradas para sua utilização em larga escala, o que irá contribuir muito com a degradação de resíduos lignocelulósicos, de forma sustentável.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

Conforme oxidação da siringaldazina até quinona, a qual foi monitorada por dez minutos em comprimento de onda de 525 nm, foi possível verificar que os actinomicetos isolados não apresentaram atividade lignolítica, pois não houve alteração no comprimento de onda conforme verificado no monitoramento da oxidação da siringaldazina até quinona.

Como resultado foi verificado que nenhuma das cepas isoladas, da compostagem *in natura*, 45 dias de compostagem e adubo com acréscimo de casca de ovo não apresentaram atividade lignolítica nos dias analisados, e isso pode ser devido á lignina ser o composto de maior rigidez, que afere proteção da biomassa á ataques microbianos, restringindo assim o acesso ás celulosas. No entanto esse processo de quebra é possível através da utilização de enzimas como lacase, apesar de estas enzimas serem bastante lentas (SAINI et al., 2016).

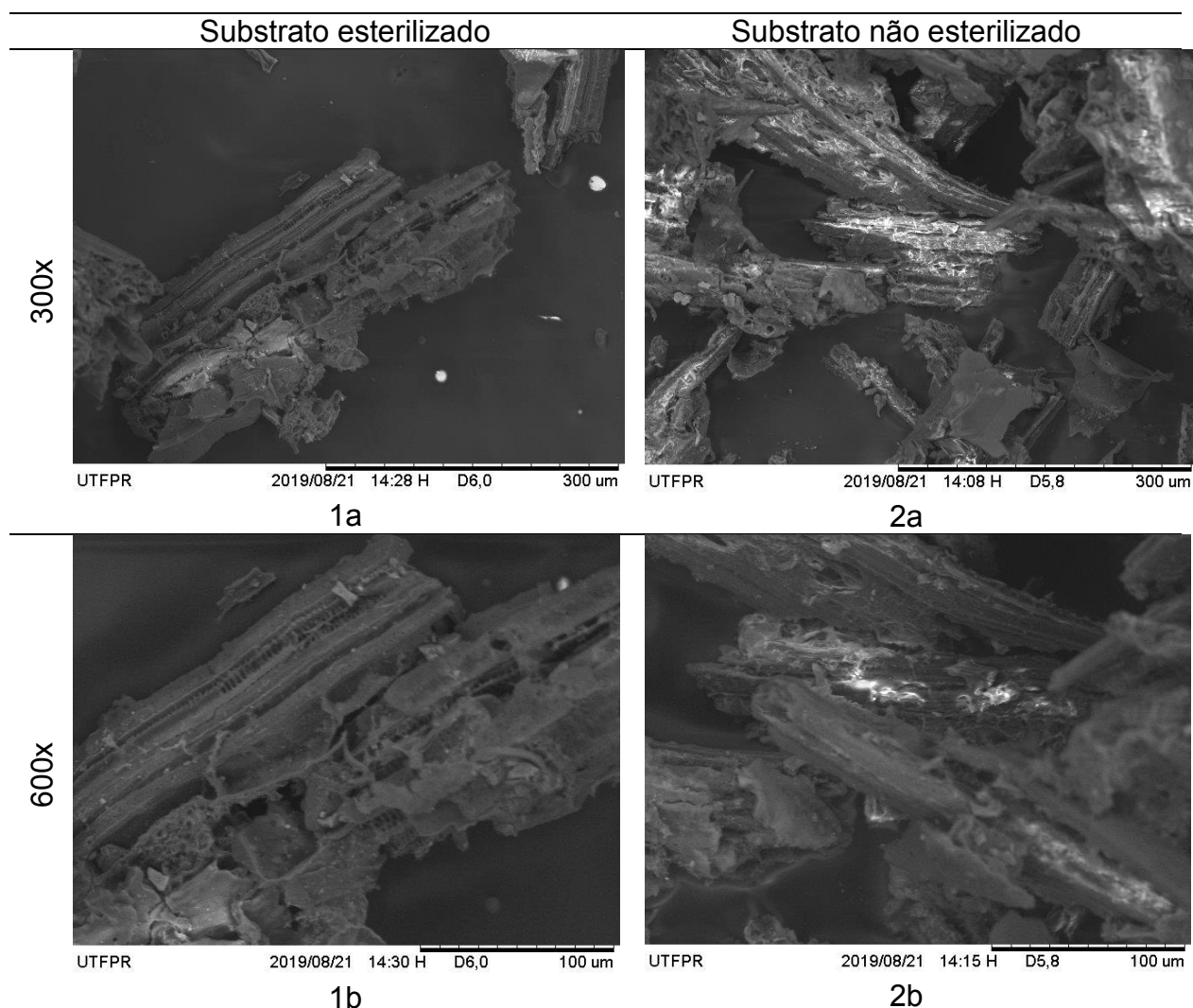
O que explica o fato de não ter ocorrido á quebra de lignina nos primeiros dias de análise, e conseqüentemente baixa produção de glicose diante do resultado obtido na análise da atividade celulolítica.

Desta forma, o resultado obtido indica a necessidade de um período maior de análise, para averiguar a função de quebra da lignina da biomassa pelos microrganismos. Assim também, verifica-se que esta ainda é uma das maiores barreiras para a bioconversão econômica da biomassa (SAINI et al., 2016).

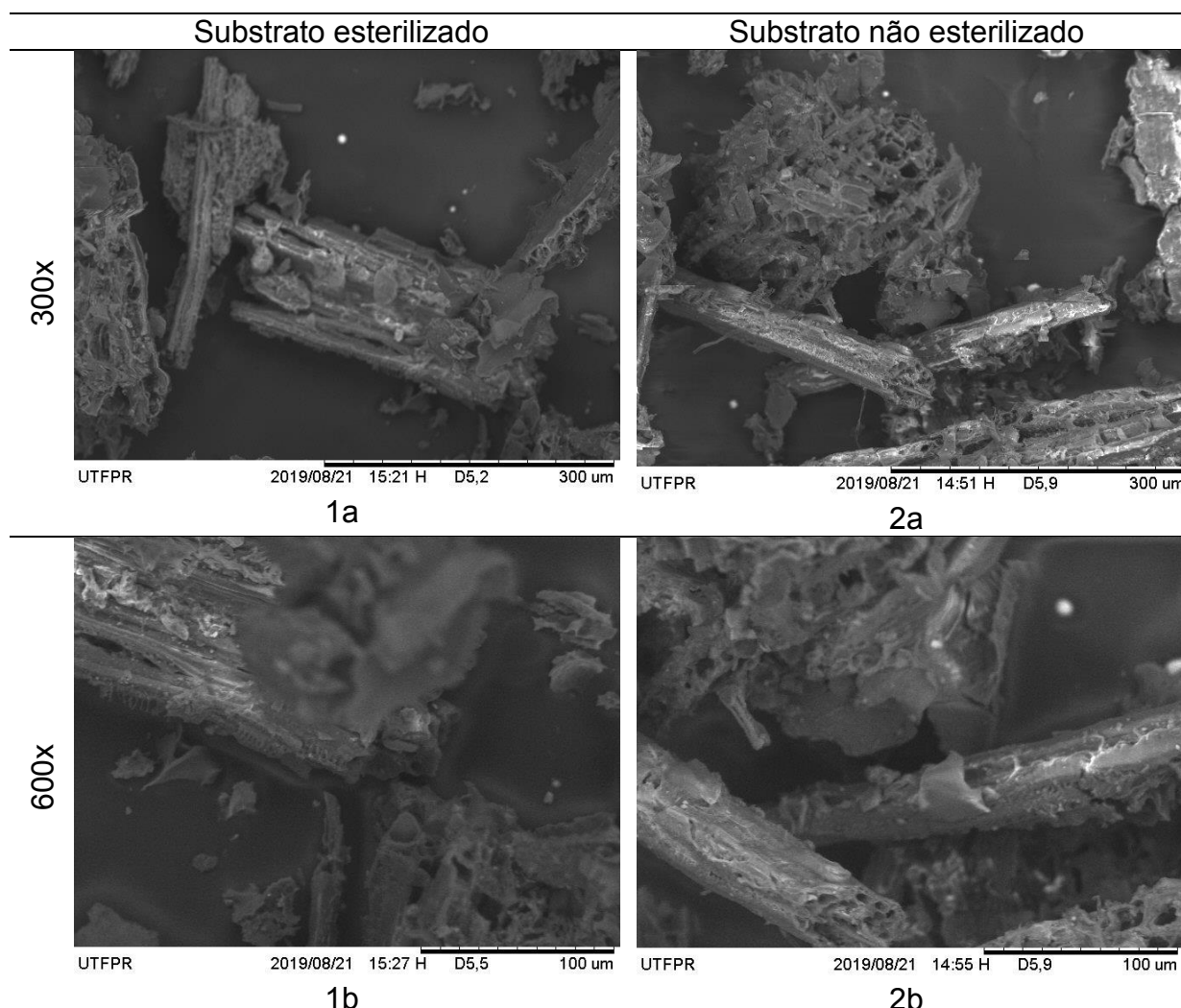
5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Nos quadros abaixo são apresentadas às micrografias com aproximação de 300x e 600x realizadas na palha de cana-de-açúcar após a ação dos microrganismos isolados dos tratamentos: controle esterilizado (1a - 300x e 1b - 600x) e não esterilizado (2a - 300x e 2b - 600x) na Quadro 5; *in natura* esterilizado (1a - 300x e 1b - 600x) e não esterilizado (2a - 300x e 2b - 600x) no Quadro 6; 45 dias de compostagem esterilizado (1a - 300x e 1b - 600x) e não esterilizado (2a - 300x e 2b - 600x) no Quadro 7; compostagem com acréscimo de casca de ovo em substrato esterilizado (1a - 300x e 1b - 600x) e não esterilizado (2a - 300x e 2b - 600x) no Quadro 8.

Quadro 5 Micrografia em Microscópio Eletrônico de Varredura do tratamento Controle

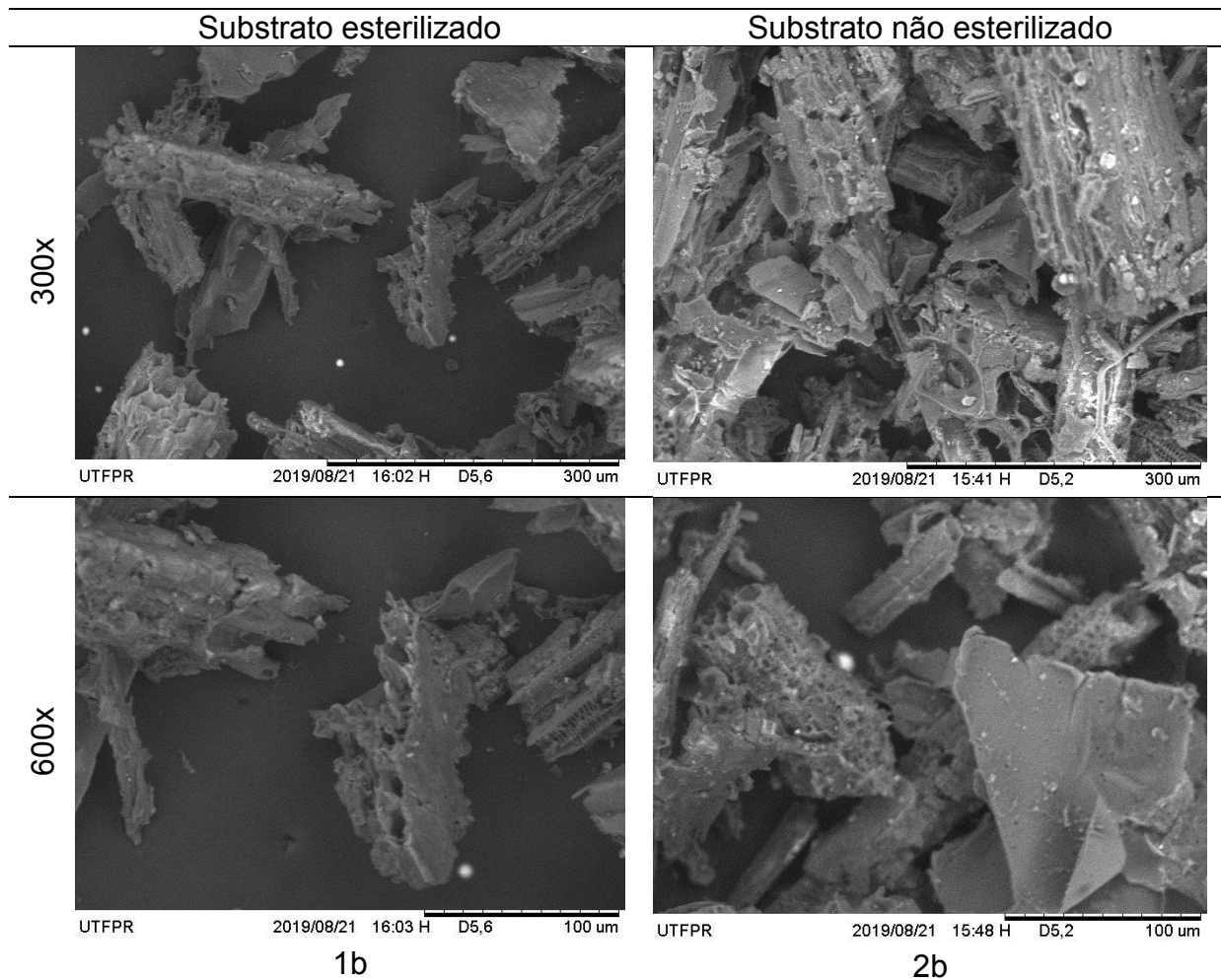


De acordo com as micrografias das amostras controle, é possível verificar que o substrato não esterilizado (2a e 2b) apresentou pequena degradação do substrato, podendo ser observada comparando com o substrato esterilizado, pois a estrutura da palha apresentar-se menor do que no observado em substrato esterilizado, que foi somente moído. E apesar de, não ter sido inoculado nenhum microrganismo nestas amostras, é identificado diante da degradação obtida, que a palha como resíduo, já apresenta organismos degradantes, no entanto, de acordo com a metodologia proposta, não são actinomicetos, pois não foram obtidos isolados com capacidade de degradação lignocelulolítica *in vitro*, sendo excluídos dos testes seguintes. Mostrando a importância de se isolar organismos diretamente da palha e estudar sua atividade lignocelulósica.

Quadro 6 Micrografia em Microscópio Eletrônico de Varredura do tratamento *in natura*

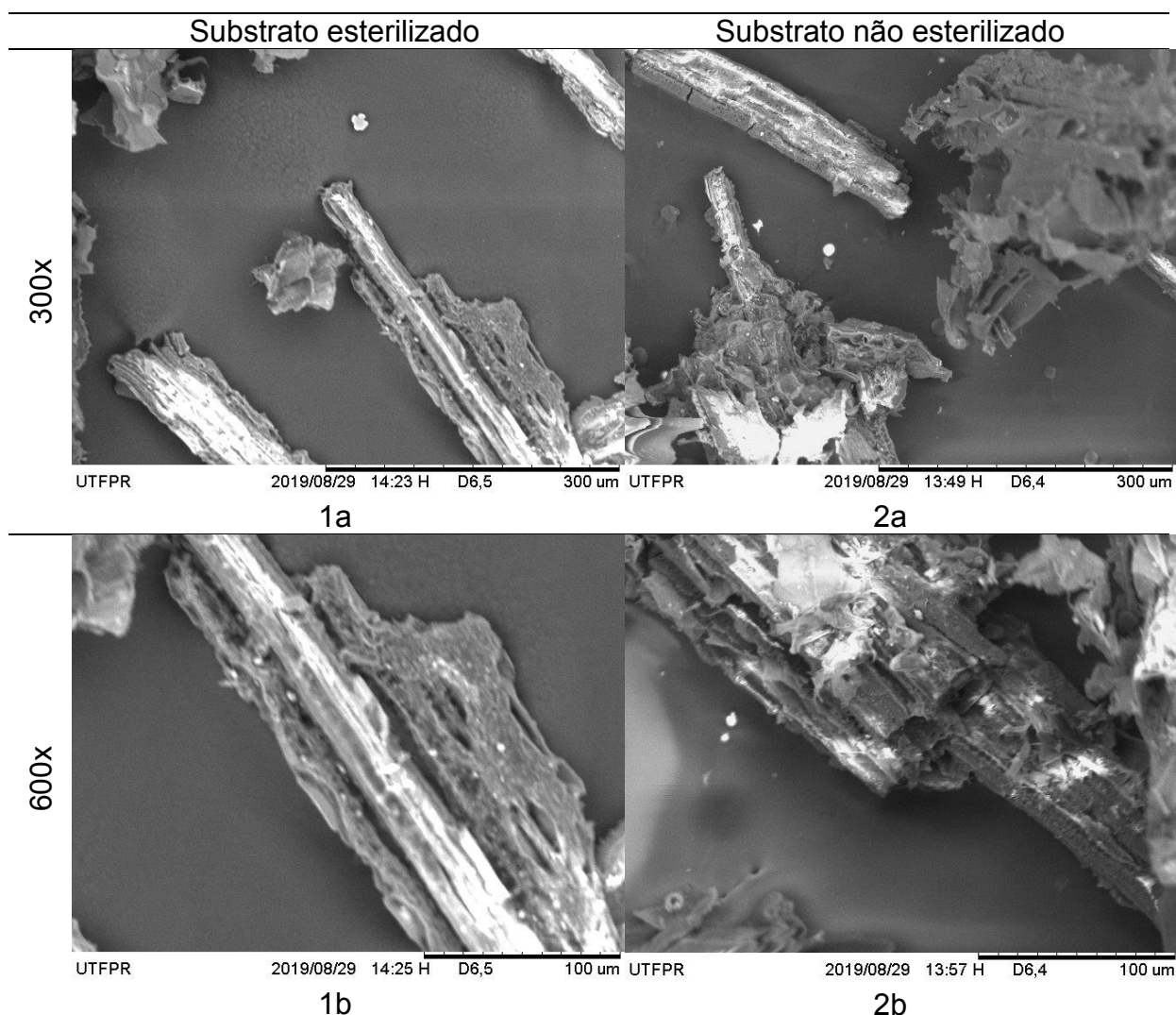
As micrografias das amostras *in natura* apresentam a capacidade do isolado actinomiceto na degradação da celulose, sendo que em substrato não esterilizado (2a e 2b), sua degradação foi maior, ao comparar com o substrato esterilizado (1a e 1b), que também apresentou degradação. No entanto, verifica-se que o actinomiceto quando se encontra em substrato não esterilizado, a sua capacidade de degradação é maior, indicando a ação de outros microrganismos já existente na palha de cana-de-açúcar.

Quadro 7 Micrografia em Microscópio Eletrônico de Varredura do tratamento com 45 dias de compostagem



As micrografias das amostras do isolado *Alcaligenes sp.*, do biofertilizante com 45 dias de compostagem, apresentou ótima degradação em substrato não esterilizado (2a e 2b), quando comparado ao substrato esterilizado (1a e 1b).

Quadro 8 Micrografia em Microscópio Eletrônico de Varredura do tratamento com acréscimo de casca de ovo



Assim como para o tratamento com 45 dias de compostagem, as micrografias das amostras do isolado *Alcaligenes sp.*, do biofertilizante com compostagem com acréscimo de casca de ovo, apresentou ótima degradação em substrato não esterilizado (2a e 2b), quando comparado ao substrato esterilizado (1a e 1b), nos mostrando a importância de se estudar mais a bactéria *Alcaligenes sp.*, quando utilizada na degradação de celulose juntamente com outros microrganismos, além de entender melhor o funcionamento de suas enzimas.

6. CONCLUSÃO

A bioprospecção de actinomicetos é viável em material lignocelulósico em decomposição, pois este ambiente apresenta microrganismos diversificados que atuam com a degradação deste material.

No entanto a purificação e caracterização do actinomiceto ainda são dificultadas, pois a maioria destes são bactérias com características de fungos, além de apresentarem bom crescimento em temperaturas variadas, sendo, a temperatura de 45°C ideal, como verificado neste trabalho.

Além disso, os meios de cultura utilizados para o isolamento de determinados microrganismos, apresentam propriedades que não isolam somente uma espécie, como ocorrido neste trabalho, em que um dos compostos do meio de cultura seletivo para actinomicetos, apresentou-se como meio para crescimento de outra bactéria.

Ao avaliar *in vitro* a ação lignocelulósica dos isolados, é possível a utilização de meios diversificados, em que se tenha somente uma fonte de carbono, e a palha de cana-de-açúcar é apresentada como boa fonte de carbono, assim como meios sintéticos contendo carboximetilcelulose, como fonte de carbono. Constatando assim, que os isolados testados neste trabalho, actinomiceto e *Alcaligenes faecalis*, apresentam enzimas com potencial de degradação de material celulósico.

Observou-se a importância da destinação adequada destes resíduos, sendo o pré-tratamento com microrganismos degradantes de celulose e lignina, uma forma sustentável de lidar com este problema. Além da possibilidade de gerar biofertilizantes naturais, e energia, como o bioetanol e biogás.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, M.A; SOLBIATI, O.J; CANN, O. K. I. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 1-28, 2013.

ABIOGAS. Associação Brasileira de Biogás e de Biometano. **Biogás tem potencial equivalente a 25% da energia do país, aponta ABiogás.** (Org). Por: Canal Energia. Abril, 2017. Disponível em: <<https://www.abiogas.org.br/potencial-biogas-canal-energia>> Acesso em: 28 jun. 2018.

ADEGBOYE, M. F.; BABALOLA, O. O. Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, **technology and education**, p. 786–795, 2013.

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnol Adv.** v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.

ALAM, M. T.; MEDEMA, M. H.; TAKANO, E.; BREITLING, R. Comparative genomescale metabolic modeling of actinomycetes: the topology of essential core metabolism. **FEBS Lett**, v. 585, n. 14, p. 2389-2394, 2011.

ALANI, F.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalo tolerant cellulases. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 1, p. 123-126, 2008.

ALMEIDA, M.B.B. Bio-óleo a partir da pirólise rápida, térmica ou catalítica, da palha da cana-de-açúcar e seu co-processamento com gás-óleo em craqueamento catalítico. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ALVES, R. E. Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais). Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2011.

AMIN, F. R.; KHALID, H.; ZHANG, H.; RAHMAN, S.; ZHANG, R.; LIU, G.; CHEN, C. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **AMB Express**. v.7, n. 72, 2017.

BALAMURUGAN, A., JAYANTHI, R., NEPOLEAN, P., VIDHYA, P.R., PREMKUMAR, R. Studies on cellulose degrading bacteria in tea garden soils. **African Journal of Plant Sciences**, v.5 n.1, p. 22–27, 2011.

BARAKAT, A.; MAYER- LAIGLE, C.; SOLHY, A.; ARANCON, R.; DE VRIES, H.; LUQUE, R.; Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. **RSC Advances**, 2014.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.13, p.25-58, 1994.

BÉRDY J. Bioactive microbial metabolites. **Journal Antibio.** v. 58, n.1, p. 1-26, 2005.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology.** New York, v.3, p. 90-104, 1981.

BISPO, A. S. R. Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2010.

BOMBA, J. P.; COTTA, S. P. M.; MARRIEL, I. E. Prospecção de Microrganismos para a produção de biocombustível. **Revista Brasileira de Ciências da Vida.** V. 6, n. especial. Maio 2018.

BOTT, T.L.; KAPLAN, L.A. Autecological properties of 3- chlorobenzoate-degrading bacteria and their population dynamics when introduced into sediments. **Microbial. Ecol.**, v. 43, p. 199-216, 2002.

BNE, Balanço Energético Nacional. In: EPE, Empresa de Pesquisa Energética. 2018. Disponível em: < <http://epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2018>> Acesso em: 25 jan. 2017.

BRASIL. Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002. Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar e dá providência correlata. Disponível em: <<https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2002/lei-11241-19.09.2002.html>> Acesso em: maio de 2018.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nat. Rev. Microbiol.** v.11. p. 21–32, 2013.

BREEN, A. & SINGLETON, F.L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Current Opinion Biotechnology**, v. 10, n.3, p. 252-8, 1999.

BUCKERIDGE M.S., SOUZA A.P., DOS SANTOS W.D. Routes for Cellulosic Ethanol in Brazil. In: Luiz Augusto Barbosa Cortez. (Org.). Sugarcane Bioethanol: R&D for productivity and sustainability. Blucher. São Paulo, 2010.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Quím. Nova**, v. 27, n. 3, São Paulo, 2004.

CARVALHO, R. V. Produção e caracterização de α -amilase por *Bacillus sp.* SMIA-2 termofílico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campo dos Goytacazes, 2007.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVARES, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B. NEVES, J. C. L. (Ed.). Fertilidade do solo. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**, p. 375-470, 2007.

CASSMAN, N.; LOURENÇO, K.; CARMO, J. B. do; CANTARELLA, H. KURAMAE, E. E. Genome-resolved metagenomics of sugarcane vinasse bactéria. **Biotechnol Biofuels**, v.11, n.48, 2018.

CASTRO, H. F. de; Processos Químicos Industriais II, Apostila 4, Papel e Celulose. Universidade de São Paulo – EEL, 2009. Disponível em: <<http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840556/434/apostila4papelecelulose.pdf>> Acesso em: 25/01/2017.

CASTRO, A.M.; PEREIRA, J.R.N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p. 181-188, jan. 2010.

CARNEIRO, M. A. C., ASSIS, P. C., MELO, L. B. C., PEREIRA, H. S., PAULINO, H. B., SILVEIRA NETO, A. N. Atributos bioquímicos em dois solos de cerrado sob diferentes sistemas de manejo e uso. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.38, n.4, p. 276-283, 2008.

CAVINATO, C.; FATONE, F.; BOLZONELL, D.; PAVAN, P. Therophilic anaerobic co-digestion of cattle manure with agro-wastes and energy crops: comparison of pilot and full scale experiences. **Bioresour. Technol.**, v.101, p.545-550, 2010.

CEMPRE. Compromisso Empresarial para Reciclagem. **O alto potencial do Biogás como fonte de energia e combustível.** (Org) 2016. Disponível em: <<http://cempre.org.br/informa-mais/id/63/o-alto-potencial-do-biogas-como-fonte-de-energia-e-combustivel>> Acesso em: 28, jun. 2018.

CHAROUSOVA, J.; MEDO, E.; HALENAROVA, S.; JAVOREKOVA. Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. **Journal Adv. Pharm. Technol. Res.** v. 8, p.46 e 51, 2017.

CHELIKANI, P., FITA, I, LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.192-208, 2004.

CIBIOGAS, Energias renováveis. O que é biogás? Foz do Iguaçu, 2010? Disponível em: <<https://cibiogas.org/>> Acesso em: 14 março 2018.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Monitoramento agrícola: Cana-de-açúcar. Safra 2018/2019, segundo levantamento. Agosto de 2018. Disponível em:

<file:///C:/Users/Ta%C3%ADs/Downloads/BoletimZCanaZ2ZLevantamentoZ18-19.pdf> Acesso em: 28 Maio 2019.

COSTA, L. V. C. da. Produção de biogás utilizando cama de frango diluída em água e em biofertilizante de dejetos de suínos. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.

DAS, M.; ROYER, T. V.; LEV, L. G. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 756–767, 2007.

DING, C. H.; JIANG, Z. Q.; LI, X. T.; LI, L. T.; KUSAKABE, I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 7-10, 2004.

DOUGHERTY, M., J., D'HAESELEER, P., HAZEN, C., J., SIMMONS, B., A., ADAMS, P., D., HADI, M. Glycoside Hydrolases from a targeted compost metagenome, activity screening and functional characterization. **BMC Biotechnology**, v.12, n.38, p.1472-6750, 2012.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. da; SILVA, F. de C. da. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FORTES, Caio. Produtividade de cana-de-açúcar em função da adubação nitrogenada e da decomposição da palhada em ciclos consecutivos. 2010. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64134/tde-03112010-005326/pt-br.php>>. Acesso em: 23 fev 2018.

FUNGARO, M. H. P, MACCHERONI Jr, W. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas a Indústria de Alimentos. In: MELO, I. S, VALADARES INGLIS, M. C., NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., ed. Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo. Jaguariúna, São Paulo, Brasil: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 426-453, 2002.

GAMBARATO, B. C. Estabelecimento e validação de modelos de oxidação de ligninas. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

GORLACH-LIRA, K., COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 135-141, 2007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p.257-268, 1987.

GULVE, R. M.; DESHMUKH, A. M. Antimicrobial activity of the marine Actinomycetes, **Inter. multidiscipl. Res. J.** v.2, p. 16-22, 2012.

HAN, Y. W.; SRINIVASAN, V. R. Purification and Characterization of β -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 100, n.3, p. 1355-1363, 1969.

HARGREAVES, P. I. Bioprospecção de novas celulasas de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2008.

HARUTA, M. Catalysis of Gold Nanoparticles Deposited on Metal Oxides. **CATTECH**, v. 6, n. 3. P. 102-115, 2002.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of Actinomycetes Communities by Specific Amplification of genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.8, p. 3233-3241, 1997.

HU, J., ARANTES, V., SADDLER, J.N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect. **Biotechnol. Biofuels** 4, p. 36–48, 2011.

IBRAHIM, S. A., EL-DIWANY, A. I. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 1, n.4, p. 473-478, 2007.

ICLEI, Brasil. “**Manual para aproveitamento do biogás: volume dois, efluentes urbanos**”. ICLEI – Governos Locais pela Sustentabilidade, Secretariado para América Latina e Caribe, Escritório de projetos no Brasil, São Paulo, 2010.

INFORSATO, F. J.; PORTO, A. L. M. Atividade enzimática de celulasas pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**.4º trimestre de 2016.

IRFAN, M., ASMA, S., QURATULAIN, S., MUHAMMAD, N. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. **Turkish Journal of Biochemistry**, v.37, p.287-293, 2012.

JANG, J. et al. Glucose effect on the biodegradation of plastics by compost from food garbage. **Polymer degradation and stability**, Oxford, v. 76, p. 155-159, 2002.

JOO, H.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.2, p.184-191, 2005.

JOSE, P. A.; JEBAKUMAR, S. R.D. Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar Salt Lake, India. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 190, 2013.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al., The challenge of enzyme cost in the production

of lignocellulosic biofuels. **Biotechnol Bioeng.** n.109, p. 1083-1087, 2012.

KOEHNTOPP, Paulo Ivo. Degradação de 2-Clorofenol, 3-Clorofenol, 2,4-diclorofenol e ácido 2,4-diclorofenoxiacetato por *Alcaligenes faecalis*. Dissertação (Pós-graduação em Biotecnologia) Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 1998.

KONG, L. et al. Colonization of *Alcaligenes faecalis* strain JBW4 in natural soils and its detoxification of endosulfan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* n. 98, p.1407–1416, 2014.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresour. Bioprocess**, v.4, n.7, 2017.

KUMAR R, W.C.E. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology. **Bioresour Technol** n.100, p.4193–4202, 2009.

LECHEVALIER, H.; LECHEVALIER, M. P. Biology of Actinomycetes. Institute of Microbiology, Rutgers – The State University, **New Brunswick**, New Jersey, 1967.

LEE, R.L.; PAUL, J.W.; WILLEM, H.; VAN ZYL; ISAK, S.P. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p.506-577, 2002.

LI, X. et al. Endoglucanase S, a novel endocellulase exhibiting exoglucanase activity from a newly isolated *Streptomyces* sp LX. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 347-358, 1998.

LIMA, J. V. L., PINHEIRO, M. S., FIÚZA, L. M. C. G., MARTINS, S. C. S., MARTINS, C. M. Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p. 2300-2316, 2014.

LIMA, M. T. Análise funcional de um consórcio microbiano de solo e prospecção de genes envolvidos na desconstrução da biomassa. Dissertação, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, 2014.

LÓPEZ, A.; JESUS, H.S. de; ROCHA, M. de M.; FRIES, M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. Diagnóstico do potencial de nitrificação e desnitrificação em solo sob pastagens de *Bracharia* sp. e solo sob plantio direto convencional. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, nov. 1998. 24p.(Embrapa-CNPAB. Documentos, 78).

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK; D.P. **Microbiologia de Brock**. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MANSFIELD, S., MOONEY, C., SADDLER, J. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol Prog**, n.15, p.804–816, 1999.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.426-432, 2007.

MATSUOKA, S.; BRESSIANI, J. A.; MACCHERONI, W.; FOUTO, I. Cana-de-Açúcar: Bioenergia, Açúcar e Etanol. Tecnologias e Perspectivas. 1ª Edição, Capítulo 20, Editores: Santos, Fernando; Borém, Aluizio; Caldas, Celso. Pp. 547-577, Janeiro de 2010. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/302932714_Bioenergia_de_Cana>. Acesso em: 02 jun. 2019.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agentes of biodegradation in the environmental – a review. **GENE**, Viena, v.115, p. 189-192, 1992.

MERGEL, C. M. Bioprospecção de enzimas lignocelulolíticas a partir de actinomicetos endofíticos. Dissertação (Mestrado Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo, 2014.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour Technol**, n. 96, p. 673-686, 2005.

MUDAU, A. A laboratory investigation of the effects of water content and waste composition on leachate and gas generation from simulated MSW. Dissertation (Faculty of Engineering and the Built Environment) - University of the Witwatersr and Johannesburg, 2012.

NAKANO, M., NIWA, M. & NISHIMURA, N. Development of a PCR-based method for monitoring the status of *Alcaligenes* species in the agricultural environment. **Biocontrol Sci** n.19, p. 23–31, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 4a.ed., São Paulo: Sarvier, 2006, cap. 7: Carboidratos e Glicobiologia, p. 236-270.

NETT M, IKEDA H, MOORE BS. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Nat Prod Rep**. v.26, n.11, p.1362-84, 2009.

OBATA, T., GOTO, Y., KUNISAWA, J., SATO, S., SAKAMOTO, M., SETOYAMA, H., MATSUKI, T., NONAKA, K., SHIBATA, N., GOHDA, and other 13 authors. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n.107, p. 7419-7424, 2010.

OLIVEIRA, A. C. DEL G. Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel. 2012. 130 f. Dissertação - Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR, 2012.

PASSARI, A. K.; MISHRA, V. K.; SAIKIA, R.; GUPTA, V. K.; SINGH, B. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with

medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. **Frontiers in Microbiology**. v.6, 2015.

PARAISO, M. L. de S.; GOUVEIA, N. Riscos á saúde devido á queima prévia da palha de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.18, n.3, p. 691-701, 2015.

PELCZAR, Michael Joseph. Microbiologia; conceitos e aplicações, v. 1, 2ª ed. São Paulo: **Pearson Makron Books**, 1997.

PENG, G. et al., Functional Characteristics and Diversity of a Novel Lignocelluloses Degrading Composite Microbial System with High Xylanase Activity. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, n.2, p. 254-264, 2010.

PHUNG, L. T., TRIMBLE, W. L., MEYER, F., GILBERT, J. A. & SILVER, S. Draft genome sequence of *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* NCIB 8687 (CCUG 2071). **J. Bacteriol.** n.194, p.5153, 2012.

POLETO, L. Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a partir do glicerol residual. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2014.

QUISPE, C.A.G.; CORONADO, C.J.R.; CARVALHO Jr., J.A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 27, p. 475-493, 2013.

RAMÍREZ, Pablo; COHA, Juana M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. **Ver. Peru Biol.** v. 10 n.1 Lima ene./jul. 2003.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for linocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresouce Technology**. n. 199, p. 92-102, 2016.

RODRIGUES, Katiane. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. (Dissertação) Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

RONEN, Z.; BOLLAG, J.M. Rapid anaerobic mineralization of pyridine in a subsurface sediment inoculated with a pyridine-degrading *Alcaligenes* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**,n.37, p.264-269, 1992.

ROSS P., MAYER R., BENZIMAN M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35-38, 1991.

SABARATMAN, V.; ALI HASSAN, M. Biohydrogen Production via Fermentation of Biowastes by Microorganism.State of the art and Progress in Production of Biohydrogen. **Betham e Books**, 112-126, 2012.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **Biotech.**v.5, p. 337-353, 2015.

SAINI, J. K.; PATEL, A. K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R. R. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. **Renewable Energy**, v. 98, p. 29-42, 2016.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv.** Mar – Apr; v.27, n.2, p. 185-194, 2009.

SANTOS, Dayse B. dos. Bioprospecção de micro-organismos produtores de celulase de resíduos do sisal. Dissertação (Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas – Bahia, 2010.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, São Paulo, 2012.

SARKAR, Nibedita et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SARITHA, M. biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. **Indian J Microbiol** n. 52, p.122–130, 2012.

SAVI, D. C. et al. *Microbispora* sp. LGMB259 Endophytic Actinomycete Isolated from *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil) Producing β -Carbolines and Indoles with Biological Activity. **Current Microbiology**, v.70, n.3, p.345–354, 2015.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GALLI-TERASAWA, L. 16S-gyrB-rpoB multilocus sequence analysis for species identification in the genus *Microbispora*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, p.109-801, 2016.

SCHIMIDT FILHO, E.; GONÇALVES, J. C.; MATOS, N. C. da S.; AZEVEDO, R. E. C. de. Redução dos impactos ambientais do setor sucroalcooleiro com a utilização da torta de filtro na adubação do solo. **Revista Uningá Review**, v. 27, n. 3, 2016.

MORATH, S. U.; HUNG, R. BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. BMS, British Mycological Society, **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 73-83, 2012.

SILVA, V. F. N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. Dissertação, Universidade de São Paulo, Lorena/SP Brasil, 2009.

SILVA, k., CASSETARI, A. S, LIMA, A. S, BRANDT, E., , PINNOCK, E., VANDAMMEC, P., MOREIRA, F. M. S. Diazotrophic Burkholderia species isolated

from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, p.253-262, 2012.

SILVA, J. C.; GOUVEIA, E. R. Some properties of endoglucanases produced by *atreptomycetes* spp. In medium based on sugar cane bagasse. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, n.2, p. 60-70, 2008.

SILVA, E. P.; CARREIRO, M. de A.; GOMES, R. C.; Metodologia para identificação de *Staphylococcus sp.* na superfície do colchão da maca no pronto socorro. **Revista Pró-UniverSUS**. Jul./dez.; v. 7, n.3, p. 15-19, 2016.

SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 11, n. 21, p. 2026, 2015.

SCIBIOR, D., CZECZOT, H. Catalase: structure, properties, functions. **Postepy Hig Med Dosw**, n.60, p.170-180, 2006.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGHANIA, R.R., SUKUMARANA, R.K., PATEL, A.K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Technol.** n.46, p.541–549, 2010.

SINGHANIA, R.R., PATEL, A.K., SUKUMARAN, R.K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresour. Technol.** n.127, p.500–507, 2013.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; PANDEY, A.; GANANSOUNOU, E. Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. **Bioresource Technology**, n. 245, p. 1352-1361, 2017.

STROBEL G, DAISY B, CASTILLO U, HARPER J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **J Nat Prod**, v.67, n.2, p. 257-268, 2004.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethaol production. **Bioresource Technology**, v.96, p.1599-1606, 2005.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidasas and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v.81, p.234-240, 1984.

SYNNES, M. Bioprospecting of organisms from the deep sea: scientific and environmental aspects. **Clean Techn Environ Policy**, v. 9, p. 53-59, 2007.

TANJORE, D.; RICHARD, T. L. A systems view of lignocellulose hydrolysis. In: Ravindra P (ed) *Advances in bioprocess technology*. **Springer International Publishing**, Cham, p. 387–419, 2015.

TUOMELLA, M. et al., Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Esses, v.72, p. 169-183, 2000.

TUNCER, M. et al., Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F261 isolated in Turkey. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, p. 783-791, 2004.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. Potential and utilization of thermophiles and termistable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*. **Bio Med Central Ltd**, 2007.

US DOE. *Biofuels Primer Placemat: From Biomass to Cellulosic Ethanol and Understanding Biomass: Plant Cell Walls*. **US Department of Energy Office of Science**, May 2007.

US, E.; PERENDECI, N. A. Improvement of methane production from greenhouse residues : optimization of thermal and H₂SO₄ pretreatment process by experimental design. **Chem Eng J** 181–182:120–131, 2012.

VASCONCELLOS R. L. F.; SILVA M. C. P.; RIBEIRO C. M.R.; CARDOSO E. J. B.N. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Sci Agric**, v.67, n. 6, p.743–6. 2010.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. V. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and molecular biology reviews**, p. 495-548, sept. 2007.

VIANA, T. F. C. Isolamento, caracterização morfológica e molecular de bactérias endofíticas e epifíticas em espécies de bromeliaceae de bancadas lateríticas, Corumbá, Mato Grosso do Sul. *Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)* - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campo Grande / MS, 2016.

VILELLA, E. D. de S. Análise da produção de celulases e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces* sp. *Dissertação (Mestrado em Biologia)* - Universidade Federal de Goiás. Instituto de Ciências Biológicas. Goiânia, 2013.

YOKOYAMA, S., ADACHI, Y., ASAKURA, S. & KOHYAMA, E. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. **J. Gen. Appl. Microbiol.**n.59, p.89-95, 2013.

YU, H.; ZENG, G.; HUANG, H.; XI, X.; WANG, R.; HUANG, D.; HUANG, G.; LI, J. Microbial community succession and lignocelluloses degradation during agricultural waste composting. **Biodegradation**, v. 18, p. 793–802, 2007.

WACHINGER, G.; BRONNENMEIER, K.; STAUDENBAUER, W. L.; SCHREMPF, H. Identification of Mycelium-Associates Cellulase from *Streptomyces reticuli*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, n.10, p. 2653-2657, 1989.

WATANABE, H. TOKUDA, G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 609-632, 2010

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl Acad Sci U S A**. v. 95, n.12, p. 6578-83, 1998.

ZHENG, Y. I.; PAN, Z.; ZHANG, R. & WANG, D. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy** n.86, p. 2459, 2009.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F., LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Prog. Energy Combust. Sci.** n.42, p.35-53, 2014.