



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E  
TERRITÓRIO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E  
SUSTENTABILIDADE**

**FONTES MICROBIANAS ALTERNATIVAS NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO  
DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE BIOGÁS**

**SUZAN PRADO FERNANDES BERNAL**

Foz do Iguaçu  
2025



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E  
TERRITÓRIO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E  
SUSTENTABILIDADE**

## **FONTES MICROBIANAS ALTERNATIVAS NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE BIOGÁS**

**SUZAN PRADO FERNANDES BERNAL**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Energia e Sustentabilidade.

Área de concentração: Energia e Sustentabilidade

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

Co-orientadora: Profa Dr.<sup>a</sup> Caroline da Costa Silva Gonçalves

Foz do Iguaçu  
2025

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

B518

Bernal, Suzan Prado Fernandes.

Fontes microbianas alternativas no pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar para obtenção de Biogás / Suzan Prado Fernandes Bernal. - Foz do Iguaçu, 2025.  
176 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território. Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade. Foz do Iguaçu-PR, 2025.

Orientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

Coorientador: Caroline da Costa Silva Gonçalves.


1. Biogás. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Biomassa lignocelulósica. 4. Pré-tratamento microbiano. 5. Fungos de serrapilheira. 6. Bactérias intestinais de cupins. I. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano. II. Gonçalves, Caroline da Costa Silva. III. Título.

CDU 620.952

# FONTES MICROBIANAS ALTERNATIVAS NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE BIOGÁS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Energia e Sustentabilidade.


## BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 **MICHEL RODRIGO ZAMBRANO PASSARINI**  
 Data: 28/10/2025 21:52:04-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini


UNILA

Documento assinado digitalmente  
 **CAROLINE DA COSTA SILVA GONCALVES**  
 Data: 28/10/2025 13:02:48-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Coorientadora: Profa. Dra. Caroline Da Costa Silva Gonçalves


UNILA

Documento assinado digitalmente  
 **MARCIA REGINA BECKER**  
 Data: 20/10/2025 11:14:43-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Marcia Regina Becker

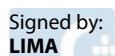
UNILA

Documento assinado digitalmente  
 **NATHALIA CORREA CHAGAS DE SOUZA**  
 Data: 20/10/2025 19:43:24-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Nathália Corrêa Chagas de Souza


UNILA

Signed by:  **NELSON MANUEL VIANA DA SILVA**  
**LIMA**  
 Identification number: 03826724  
 Date: 2025.10.17 17:16:50+01'00'

---

Prof. Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima

UMinho

Documento assinado digitalmente  
 **SUZAN PANTAROTO DE VASCONCELLOS**  
 Data: 21/10/2025 10:27:37-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos

UNIFESP

Foz do Iguaçu, 9 de setembro de 2025.

Aos meus pais, Mac e Vanuza:  
alicerces de amor, exemplo de coragem.

## AGRADECIMENTOS

O doutorado foi uma travessia de muitos desafios que eu não teria conseguido enfrentar sozinha. Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da sabedoria que me concede todos os dias, pelas capacidades e pelas conquistas. Nada foi fácil: tudo nasceu de trabalho e perseverança — e o suor tornou as vitórias mais doces.

À minha família, minha base e fortaleza. Ao meu querido pai, Mac, meu melhor amigo e mentor de vida, e à minha amada mãe, Vanuza, meu porto seguro. Vocês me deram os maiores presentes que uma filha pode receber: amor, apoio e asas para que eu sempre pudesse voar atrás dos meus sonhos. Minha gratidão não cabe em palavras.

Ao meu orientador, Prof. Michel, que me acompanha desde o mestrado. Sou imensamente grata pela oportunidade de aprender com um professor sábio e acolhedor, sempre disposto a ensinar e a auxiliar. Admiro sua trajetória e sua postura; obrigada pela paciência ao longo desses quase oito anos de pesquisa juntos.

À Prof.<sup>a</sup> Carol, muito mais do que coordenadora do PPGIES: uma professora brilhante, generosa e carismática. Obrigada por todo o apoio e suporte.

À UNILA e ao PPGIES, pela formação e por integrarem uma universidade cujos princípios me inspiram e orientam.

À CAPES, pelo fomento à pesquisa e pela concessão da bolsa do PDSE, que viabilizou o doutorado-sanduíche. A experiência de internacionalização da ciência foi decisiva, enriquecendo tanto meu desenvolvimento acadêmico quanto o pessoal.

Ao Prof. Nelson Lima e à Micoteca da Universidade do Minho (UMinho), pelo acolhimento e pela oportunidade de trabalhar em um laboratório de excelência. Sua vasta experiência e orientação foram cruciais para esta tese. Agradeço, também, à Célia Soares, pela presença diária, pelos ensinamentos, pela paciência e pela generosidade em compartilhar conhecimentos, que ampliaram minha experiência.

À Prof.<sup>a</sup> Márcia Regina Becker, pela orientação cuidadosa e dedicada na condução dos experimentos de produção do biogás. Esse período foi desafiador e, ao mesmo tempo, profundamente enriquecedor para meus conhecimentos e para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também à Itaipu Parquetec, onde os experimentos foram realizados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada: obrigada.

*“Quem tem um porquê enfrenta quase  
qualquer como.” — Nietzsche*

BERNAL, Suzan Prado Fernandes. FONTES MICROBIANAS ALTERNATIVAS NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE BIOGÁS. 9 de setembro de 2025. 177 Páginas. Tese. Universidade Federal da Integração Latino-Americana – Unila, Foz do Iguaçu.

## RESUMO

O aumento da demanda por energias renováveis e a necessidade de reduzir emissões de gases de efeito estufa impulsionam o desenvolvimento de alternativas sustentáveis aos combustíveis fósseis. Neste contexto, o biogás se destaca como fonte estratégica de energia limpa. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de um consórcio microbiano composto por fungos filamentosos de solo de serrapilheira e bactérias do intestino de cupins no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, visando otimizar a produção de biogás. Foram isolados 40 fungos filamentosos e 9 bactérias do intestino de cupins. A identificação e caracterização taxonômica polifásica, combinando análises morfológicas, moleculares e filogenéticas, permitiu confirmar a diversidade dos isolados e selecionar aqueles com maior potencial lignocelulolítico. Entre os fungos, destacaram-se espécies dos gêneros *Aspergillus* (*A. versicolor* BR14, com produção de 716,96 U L<sup>-1</sup> de Mnp) e *Talaromyces mycothecae* SC6.3 (64,24 U mL<sup>-1</sup> de xilanase). Entre as bactérias, sobressaíram *Rosellomorea marisflavi* CPM2 (1.737,27 U L<sup>-1</sup> de MnP), *Priestia megaterium* CPM18 (1.863,79 U L<sup>-1</sup> de LiP) e *Bacillus subtilis* CPM6 (12,67 U mL<sup>-1</sup> de celulase). Na etapa de digestão anaeróbica, o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com bactérias (BCA+B) apresentou maior produção de biogás (544,10 mL<sup>-1</sup>; 66,95 LN/kg SV), representando incremento de 26,7% em relação ao controle. Conclui-se que a integração de micro-organismos de habitats distintos, identificados e selecionados por taxonomia polifásica, representa uma estratégia inovadora para reduzir a recalcitrância da biomassa, aumentar a disponibilidade de açúcares fermentáveis e elevar a eficiência da digestão anaeróbica. O impacto da pesquisa reside na proposição de um método sustentável que valoriza resíduos agroindustriais, reduz custos com pré-tratamentos químicos e contribui para mitigação das emissões de gases de efeito estufa. As implicações práticas incluem a aplicação em biorrefinarias e usinas de biogás, fortalecendo a bioeconomia, a gestão de resíduos e a matriz energética renovável no Brasil e em escala global.

**Palavras-chave:** Biogás; Bagaço de cana-de-açúcar; Biomassa lignocelulósica; Pré-tratamento microbiano; Fungos de serrapilheira; Bactérias intestinais de cupins.

## RESUMEN

El aumento de la demanda de energías renovables y la necesidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero impulsan el desarrollo de alternativas sostenibles a los combustibles fósiles. En este contexto, el biogás se destaca como una fuente estratégica de energía limpia. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial de un consorcio microbiano compuesto por hongos filamentosos del suelo de hojarasca y bacterias del intestino de termitas en el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar, con el fin de optimizar la producción de biogás. Se aislaron 40 hongos filamentosos y 9 bacterias del intestino de termitas. La identificación y caracterización taxonómica polifásica, combinando análisis morfológicos, moleculares y filogenéticos, permitió confirmar la diversidad de los aislados y seleccionar aquellos con mayor potencial lignocelulolítico. Entre los hongos, se destacaron especies de los géneros *Aspergillus* (*A. versicolor* BR14, con producción de 716,96 U L<sup>-1</sup> de MnP) y *Talaromyces mycothecae* SC6.3 (64,24 U mL<sup>-1</sup> de xilanasa). Entre las bacterias, sobresalieron *Rosellomorea marisflavi* CPM2 (1.737,27 U L<sup>-1</sup> de MnP), *Priestia megaterium* CPM18 (1.863,79 U L<sup>-1</sup> de LiP) y *Bacillus subtilis* CPM6 (12,67 U mL<sup>-1</sup> de celulasa). En la etapa de digestión anaerobia, el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar con bacterias (BCA+B) presentó mayor producción de biogás (544,10 mL<sup>-1</sup>; 66,95 LN/kg SV), representando un incremento del 26,7% en relación con el control. Se concluye que la integración de microorganismos de hábitats distintos, identificados y seleccionados por taxonomía polifásica, representa una estrategia innovadora para reducir la recalcitrancia de la biomasa, aumentar la disponibilidad de azúcares fermentables y elevar la eficiencia de la digestión anaerobia. El impacto de la investigación reside en la proposición de un método sostenible que valoriza los residuos agroindustriales, reduce costos con pretratamientos químicos y contribuye a la mitigación de emisiones de gases de efecto invernadero. Las implicaciones prácticas incluyen la aplicación en biorrefinerías y plantas de biogás, fortaleciendo la bioeconomía, la gestión de residuos y la matriz energética renovable en Brasil y a escala global.

**Palabras clave:** Biogás; Bagazo de caña de azúcar; Biomasa lignocelulósica; Pretratamiento microbiano; Hongos de hojarasca; Bacterias intestinales de termitas.

## ABSTRACT

The growing demand for renewable energy and the need to reduce greenhouse gas emissions drive the development of sustainable alternatives to fossil fuels. In this context, biogas stands out as a strategic source of clean energy. This study aimed to evaluate the potential of a microbial consortium composed of filamentous fungi from leaf litter soil and bacteria from the termite gut in the pretreatment of sugarcane bagasse, in order to optimize biogas production. A total of 40 filamentous fungi and 9 termite gut bacteria were isolated. Polyphasic taxonomic identification and characterization, combining morphological, molecular, and phylogenetic analyses, confirmed the diversity of the isolates and enabled the selection of those with the greatest lignocellulolytic potential. Among the fungi, species of the genera *Aspergillus* (*A. versicolor* BR14, producing 716,96 U L<sup>-1</sup> of MnP) and *Talaromyces mycothecae* SC6.3 (64,24 U mL<sup>-1</sup> of xylanase) were noteworthy. Among the bacteria, *Rossellomorea marisflavi* CPM2 (1.737,27 U L<sup>-1</sup> of MnP), *Priestia megaterium* CPM18 (1.863,79 U L<sup>-1</sup> of LiP), and *Bacillus subtilis* CPM6 (12,67 U mL<sup>-1</sup> of cellulase) stood out. In the anaerobic digestion stage, pretreatment of sugarcane bagasse with bacteria (BCA+B) showed the highest biogas yield (544,10 mL<sup>-1</sup>; 66,95 LN/kg VS), representing a 26,7% increase compared to the control. It is concluded that the integration of microorganisms from distinct habitats, identified and selected through polyphasic taxonomy, represents an innovative strategy to reduce biomass recalcitrance, increase the availability of fermentable sugars, and enhance anaerobic digestion efficiency. The impact of this research lies in the proposal of a sustainable method that valorizes agro-industrial residues, reduces chemical pretreatment costs, and contributes to mitigating greenhouse gas emissions. Practical implications include applications in biorefineries and biogas plants, strengthening the bioeconomy, waste management, and the renewable energy matrix in Brazil and on a global scale.

**Keywords:** Biogas; Sugarcane bagasse; Lignocellulosic biomass; Microbial pretreatment; Litter fungi; Termite gut bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Oferta interna de energia mais renovável até o mês de setembro (2024)	22
<b>Figura 2</b> – Consumo de energia primária per capita em 2023	23
<b>Figura 3</b> – Estrutura da biomassa lignocelulósica	26
<b>Figura 4</b> – Estrutura da Celulose	28
<b>Figura 5</b> – Estrutura da Hemicelulose	29
<b>Figura 6</b> – Estrutura da Lignina	30
<b>Figura 7</b> – Esquema do processo de produção do biogás e suas vias metabólicas	43
<b>Figura 8</b> – Serrapilheira: camada de matéria orgânica acumulada no solo	47
<b>Figura 9</b> – Micro-organismos provenientes de cupins no pré-tratamento de biomassa	49
<b>Figura 10</b> – Local de coleta do solo	57
<b>Figura 11</b> – Cupins <i>Nasutitermes</i> sp. selecionados para isolamento de bactérias	58
<b>Figura 12</b> – Fungos filamentosos isolados	68
<b>Figura 13</b> – Visualização do crescimento dos fungos e degradação do papel filtro	77
<b>Figura 14</b> – Produção diária de açúcares redutores (mg/mL <sup>-1</sup> )	78
<b>Figura 15</b> – Produção acumulada de açúcares redutores	80
<b>Figura 16</b> – Esquema da metodologia do FT-IR adaptada para fungos filamentosos	93
<b>Figura 17</b> – Dendrograma gerado por MALDI-TOF MS com a identificação das bactérias	101
<b>Figura 18</b> – Árvore filogenética das bactérias isoladas do intestino de cupim	103
<b>Figura 19</b> – Dendrograma gerado por IR Biotyper® com as bactérias isoladas de cupim	105
<b>Figura 20</b> – Diagrama de dispersão bidimensional	106
<b>Figura 21</b> – <i>Aspergillus</i> identificados usando técnica do azul de algodão	108
<b>Figura 22</b> – Árvore filogenética dos isolados afiliados aos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Talaromyces</i>	112
<b>Figura 23</b> – Árvore filogenética dos isolados afiliados aos gêneros <i>Trichoderma</i> e <i>Coniochaeta</i>	113
<b>Figura 24</b> – Dendrograma gerado por IR Biotyper® com fungos filamentosos <i>Tichoderma</i> sp e <i>Talaromyces mycothecae</i>	117
<b>Figura 25</b> – Diagrama de dispersão bidimensional	118
<b>Figura 26</b> – Imagens da PCR em gel de agarose dos isolados de mesma espécie	120
<b>Figura 27</b> – Pré-tratamento físico do bagaço de cana-de-açúcar	126

<b>Figura 28</b> – Esquema de teste de compatibilidade dos micro-organismos	127
<b>Figura 29</b> – Exemplo de placa de teste de compatibilidade fungo-fungo	128
<b>Figura 30</b> – Exemplo de placa de teste de compatibilidade entre bactérias	129
<b>Figura 31</b> – Esquema de montagem do experimento de pré-tratamento biológico do BCA	131
<b>Figura 32</b> – Biodigestores de bancada para produção de biogás	136
<b>Figura 33</b> – Teste de co-cultura com incompatibilidade entre fungo e bactéria	139
<b>Figura 34</b> – Observação de crescimento microbiano após o pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar	140
<b>Figura 35</b> – Produção diária de biogás (LN Biogás/Kg*SV)	143
<b>Figura 36</b> – Produção acumulada de biogás (LN Biogás/Kg*SV)	145
<b>Figura 37</b> – Curva de calibração da glicose	173
<b>Figura 38</b> – Produção acumulada de gás seco Vn (mLN)	174
<b>Figura 39</b> – Produção acumulada de biogás com comparação estatística (Tukey, $p < 0,05$ )	176

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Vantagens e desvantagens dos principais tipos de pré-tratamento de biomassa	34
<b>Tabela 2</b> – Diferentes enzimas degradadoras de biomassa produzidas por bactérias e fungos	37
<b>Tabela 3</b> – Componentes presente no biogás	42
<b>Tabela 4</b> – Cepas bacterianas de intestino de cupins e suas enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica	50
<b>Tabela 5</b> – Ensaio qualitativos com CMC e Guaiacol	71
<b>Tabela 6</b> – Análises de produção de enzimas pelos fungos isolados do solo de serrapilheira	73
<b>Tabela 7</b> – Análises de produção de enzimas pelas bactérias isoladas do intestino de cupins	74
<b>Tabela 8</b> – Total de glicose produzida pelos micro-organismos	81
<b>Tabela 9</b> – Potencial biotecnológico sustentável das bactérias isoladas de intestino de cupins	83
<b>Tabela 10</b> – Potencial biotecnológico sustentável dos fungos isolados do solo de serrapilheira	86
<b>Tabela 11</b> – Identificação morfológica, molecular e proteica das bactérias isoladas dos cupins	100
<b>Tabela 12</b> – Identificações e classificação dos fungos isolados do solo de serrapilheira	110
<b>Tabela 13</b> – Relação de micro-organismos em consórcio para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	139
<b>Tabela 14</b> – Resultados das análises de teor de sólidos	141
<b>Tabela 15</b> – Quantidades calculadas de amostras e componentes nos reatores de biogás	142
<b>Tabela 16</b> – Produção total de biogás	144
<b>Tabela 17</b> – Valores para construção da curva de calibração de glicose	173
<b>Tabela 18</b> – Teste de Tukey (HSD, $\alpha = 0,05$ )	175

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AGU – Anidroglicose

AGVs – Volatile Fatty Acids (Ácidos graxos voláteis)

ANI – Average Nucleotide Identity (Identidade Média de Nucleotídeos)

BCA – Bagaço de cana-de-açúcar

BEN – Balanço Energético Nacional

benA – Gene da  $\beta$ -tubulina

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta Básica de Busca de Alinhamento Local)

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures (Coleção de Culturas Fúngicas, Holanda)

CMC – Carboxymethylcellulose (Carboximetilcelulose)

DNS – 3,5-dinitrosalicylic acid (Ácido 3,5-dinitrosalicílico)

FT-IR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier)

GEE – Gases de Efeito Estufa

IEA – International Energy Agency (Agência Internacional de Energia)

ITS – Internal Transcribed Spacer (Espaçador Interno Transcrito)

ITS2 – Internal Transcribed Spacer 2 (Espaçador Interno Transcrito 2)

LCC – Laccase (Lacase)

LCFA – Long Chain Fatty Acids (Ácidos graxos de cadeia longa)

LiP – Lignin Peroxidase (Lignina Peroxidase)

MALDI-TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas por Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz com Analisador de Tempo de Voo)

MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Análise Molecular de Genética Evolutiva)

MH – Muller Hinton

MnP – Manganese Peroxidase (Manganês Peroxidase)

MSI – Mass Spectrometry Imaging (Imagem por espectrometria de massas)

Mtep – Milhão de Toneladas Equivalentes de Petróleo

MUM – Micoteca da Universidade do Minho

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação em Biotecnologia)

NDC – Contribuição Nacionalmente Determinada

NJ – Neighbor-Joining (Método de Junção por Vizinhança)

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

OIE – Oferta Interna de Energia

OTUs – Operational Taxonomic Units (Unidades Taxonômicas Operacionais)

PDA – Potato Dextrose Agar (Ágar batata-dextrose)

PDB – Potato Dextrose Broth (Caldo batata-dextrose)

PCA – Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PCs – Principal Components (Componentes Principais)

PDSE – Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior

PY-Ca – Meio de cultura contendo Peptona, extrato de Levedura e CaCl<sub>2</sub>

TEF1 – Translation Elongation Factor 1-alpha (Fator de Elongação 1-alfa)

TWh – Terawatt-hora

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana

WBA – World Biogas Association (Associação Mundial de Biogás)

WGS – Whole Genome Sequencing (Sequenciamento de Genoma Completo)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	10
<b>LISTA DE TABELAS</b>	12
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES</b>	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2 CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
2.1 MATRIZ ENERGÉTICA MUNDIAL E BRASILEIRA.	21
2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	26
2.2.1 Celulose	27
2.2.2 Hemicelulose	28
2.2.3 Lignina	30
2.2.4 Biomassa de bagaço de cana-de-açúcar.	31
2.3 PRE-TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	33
2.3.1 Pré-tratamento físico	35
2.3.2 Pré-tratamento químico	35
2.3.3 Pré-tratamento biológico	36
2.3.3.1 <i>Pré-tratamento bacteriano</i>	38
2.3.3.2 <i>Pré-tratamento fúngico</i>	39
2.4 BIOGÁS	41
2.4.1 Processo de produção do Biogás.	42
2.5 BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS	45
2.5.1 Fungos filamentosos do solo e Serrapilheira	46
2.5.2 Bactérias de cupins e degradação de biomassa	48
2.6 TAXONOMIA POLIFÁSICA DE MICRO-ORGANISMOS	52
<b>3 CAPÍTULO II: PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR MICRO-ORGANISMOS PROVENIENTES DE FONTES ALTERNATIVAS</b>	55
3.1 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	55
3.2 OBJETIVOS	55
3.2.1 Objetivo geral	55
3.2.2 Objetivos específicos	55
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	56

3.3.1	Obtenção das amostras	56
3.3.1.1	<i>Coleta de solo de serrapilheira e isolamento dos fungos filamentosos</i>	56
3.3.1.2	<i>Isolamento de bactérias associadas ao intestino de cupins</i>	58
3.3.2	Cultivo dos micro-organismos em meio líquido para testes enzimáticos	59
3.3.2.1	<i>Meio Mínimo Salino – Teste de produção de açúcares redutores</i>	59
3.3.3	Ensaio enzimáticos qualitativos	60
3.3.3.1	<i>Produção de Ligninases com Guaiacol</i>	60
3.3.3.2	<i>Produção de Celulases em CMC</i>	60
3.3.4	Ensaio enzimáticos quantitativos	61
3.3.4.1	<i>Lacase (LCC)</i>	61
3.3.4.2	<i>Lignina peroxidase (LnP)</i>	62
3.3.4.3	<i>Manganês peroxidase (MnP)</i>	63
3.3.4.4	<i>Produção de celulase</i>	63
3.3.4.5	<i>Produção de xilanase</i>	64
3.3.5	Produção de açúcares redutores por <i>Talaromyces mycothecae</i> BR04; BR15; SG3,6 e <i>Rossellomorea marisflavi</i> CPM1; CPM2.	64
3.3.5.1	<i>Preparação do reagente DNS</i>	65
3.3.5.2	<i>Procedimento de estimativa de açúcar redutor</i>	65
3.3.5.3	<i>Preparo da curva analítica</i>	66
3.3.5.4	<i>Calculo da Concentração de açúcares redutores</i>	66
3.3.5.5	<i>Análises estatísticas</i>	67
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.4.1	Isolamento de fungos filamentosos de serrapilheira	68
3.4.2	Isolamento de bactérias do intestino de cupins	69
3.4.3	Ensaio enzimáticos qualitativos	70
3.4.4	Ensaio enzimáticos quantitativos	72
3.4.5	Produção de açúcares redutores	76
3.4.6	Potencial Biotecnológico Sustentável das Bactérias Isoladas de Intestino de Cupins.	82
3.4.7	Potencial Biotecnológico Sustentável dos Fungos Isolados do Solo De Serrapilheira	85
3.5	CONCLUSÃO	89

<b>4. CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA POLIFÁSICA DOS ISOLADOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO SUSTENTÁVEL RECUPERADOS DE FONTES ALTERNATIVAS</b>	90
4.1 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	90
4.2 OBJETIVOS	90
4.2.1 Objetivo geral	90
4.2.2 Objetivos específicos	91
4.3 MATERIAIS E MÉTODO	91
4.3.1 Taxonomia Polifásica dos isolados de interesse biotecnológico	91
4.3.1.1 <i>Caracterização morfológica</i>	91
4.3.1.2 <i>Identificação por MALDI-TOF MS</i>	92
4.3.1.3 <i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	92
4.3.2 Caracterização Molecular	94
4.3.2.1 <i>Extração de DNA genômico de fungos</i>	94
4.3.2.2 <i>Extração de DNA genômico de bactérias</i>	95
4.3.2.3 <i>Amplificação por PCR e Sequenciamento do DNA</i>	96
4.3.4 <i>DNA Fingerprint</i>	97
4.3.5 <i>Análises filogenéticas</i>	97
4.3.6 Local de realização dos experimentos e colaboração internacional	98
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4.4.1 Caracterização taxonômica polifásica das bactérias isoladas de cupim	99
4.4.1.1 <i>Análise dos grupos bacterianos utilizando FT-IR IR Biotyper</i>	104
4.4.2 Caracterização taxonômica polifásica dos fungos isolados do solo de serrapilheira	107
4.4.2.1 <i>Análise do perfil dos isolados de mesma espécie por FT-IR</i>	115
4.5 CONCLUSÃO	122
<b>5. CAPÍTULO IV: CONSORCIO MICROBIANO COM FONTES DIFERENCIADAS NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE BIOGÁS</b>	124
5.1 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	124
5.2 OBJETIVOS	124
5.2.1 Objetivo geral	124
5.2.2 Objetivos específicos	124

5.3 MATERIAIS E MÉTODO	125
5.3.1 Recolha e acondicionamento do bagaço de cana-de-açúcar.	125
5.3.1.1 <i>Secagem e Moagem</i>	125
5.3.2 Seleção dos micro-organismos para pré-tratamento	126
5.3.3 Teste de compatibilidade: Cocultura dos micro-organismos	126
5.3.3.1 <i>Compatibilidade fungo-bactéria</i>	126
5.3.3.2 <i>Compatibilidade fungo-fungo</i>	127
5.3.3.3 <i>Compatibilidade bactéria-bactéria</i>	128
5.3.4 Preparo do Consórcio	129
5.3.4.1 <i>Preparo do consórcio de fungos</i>	129
5.3.4.2 <i>Preparo do consórcio de bactérias</i>	130
5.3.5 Pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar	130
5.3.5.1 <i>Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar.</i>	130
5.3.6 Inóculo: Propriedades e acondicionamento	131
5.3.7 Análises Físico-Químicas	132
5.3.7.1 <i>Teor de Sólidos</i>	132
5.3.7.2 Determinação da Proporção dos Substratos	133
5.3.8 Montagem do experimento de produção de biogás	135
5.3.8.1 <i>Normalização do Biogás</i>	136
5.3.9 Análises estatísticas	137
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	138
5.4.1 Formação de consórcios para pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar	138
5.4.2 Análises Físico-químicas das amostras para produção de biogás	141
5.4.3 Produção de biogás	142
5.5 CONCLUSÃO	147
<b>6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b>	148
<b>APÊNDICE A – Preparo da curva analítica para o teste DNS</b>	173
<b>APÊNDICE B – Gráfico da produção de biogás</b>	174
<b>APÊNDICE C – Testes estatísticos aplicados</b>	175

# 1 INTRODUÇÃO

O crescimento da demanda por energias renováveis tem sido impulsionado globalmente pela escassez de combustíveis fósseis e pelas elevadas emissões de gases de efeito estufa (GEE) associadas ao seu uso (BEKCHANOV *et al.*, 2019; RUSSO *et al.*, 2022). O avanço industrial e tecnológico exige uma abordagem responsável no uso dos recursos naturais, priorizando a preservação ambiental e a segurança energética (OBAIDEEN *et al.*, 2022). Assim, torna-se essencial monitorar as transformações energéticas e garantir que sejam baseadas em fontes limpas e sustentáveis, de modo a mitigar as mudanças climáticas sem comprometer o desenvolvimento econômico e social (RABAIA *et al.*, 2021).

O aumento da temperatura global e os eventos climáticos extremos reforçam a necessidade de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis. Além de intensificarem as emissões de GEE, essas fontes energéticas contribuem diretamente para o aquecimento global, resultando em impactos ambientais e socioeconômicos severos (HANSEN *et al.*, 2023). Nesse contexto, é fundamental viabilizar economicamente as tecnologias de energia renovável e estruturar um modelo energético seguro para o futuro (OSTERGAARD *et al.*, 2020). A transição para energias limpas reduz a poluição do ar, fortalece a segurança energética e promove a preservação ambiental a longo prazo (HOLECHEK *et al.*, 2022).

O Brasil tem adotado metas climáticas ambiciosas, conforme detalhado na Contribuição Nacionalmente Determinada (NDC), publicada inicialmente em 2016 e atualizada em 2020. O país se comprometeu a reduzir suas emissões de GEE em 37% até 2025, ampliando essa meta para 43% até 2030, com o objetivo de alcançar emissões líquidas neutras até 2060 (BRASIL, 2022). Nesse cenário, os biocombustíveis surgem como uma alternativa estratégica para a transição energética, destacando-se pela infraestrutura regulatória bem desenvolvida e pelo histórico do país na produção de etanol desde o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) de 1975. Como resultado, o Brasil tornou-se o segundo maior produtor mundial de biocombustíveis, com uma produção de 276 TWh em 2019, representando 7,9% do consumo total de energia (RITCHIE & ROSADO, 2020).

Entre os biocombustíveis, o biogás se destaca pelo seu elevado potencial e versatilidade, podendo ser empregado no aquecimento, na geração de eletricidade e, após adequado tratamento, como combustível veicular (NEVZOROVA & KUTCHEROV, 2019). Sua produção contínua depende da disponibilidade de matéria orgânica, o que o caracteriza

como uma fonte de energia renovável. Além disso, o aproveitamento de resíduos orgânicos para a geração de biogás contribui para reduzir a emissão de metano (CH<sub>4</sub>) na atmosfera, auxiliando na mitigação dos impactos ambientais (SINIGAGLIA *et al.*, 2022). No Brasil, embora a participação do biogás na matriz energética ainda seja limitada, observa-se um crescimento significativo da infraestrutura dedicada a essa fonte, com o número de usinas aumentando de 127 para 675 unidades nos últimos anos, o que demonstra o interesse crescente nesse setor (SINIGAGLIA *et al.*, 2022).

O aproveitamento de resíduos agrícolas, de laticínios e de resíduos sólidos urbanos para a geração de bioenergia tem sido amplamente estudado, consolidando a valorização de biomassa como uma alternativa viável para a gestão sustentável de resíduos (OLABI *et al.*, 2021). A decomposição desses materiais por micro-organismos leva à produção de biogás, composto majoritariamente por metano e dióxido de carbono (SANTOS *et al.*, 2018), por um processo conhecido como digestão anaeróbica (SIVAMANI *et al.*, 2018). Para garantir a eficiência dessa produção, é necessário atender às condições ideais de crescimento dos micro-organismos envolvidos (SCHNÜRER, 2016).

O pré-tratamento da biomassa é um fator determinante para a eficiência da digestão anaeróbica, sendo a hidrólise um estágio crítico do processo. A conversão de materiais complexos, como celulose, hemicelulose e lignina, em compostos mais simples pode ser acelerada por métodos específicos de pré-tratamento, os quais devem ser ajustados às características da matéria-prima utilizada (ZHEN *et al.*, 2016; KASINATH *et al.*, 2021). O bagaço de cana-de-açúcar, amplamente disponível no Brasil e rico em carboidratos, destaca-se como um substrato promissor para a geração de biogás e outros produtos de valor agregado em biorrefinarias (AGARWAL *et al.*, 2022). Micro-organismos provenientes de diferentes habitats possuem grande potencial na conversão de biomassa em biocombustíveis, sendo fundamentais para a biossíntese de enzimas capazes de degradar materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, um dos principais desafios para a consolidação da indústria de biocombustíveis lignocelulósicos é o alto custo das enzimas utilizadas nesse processo (ADEGBOYE *et al.*, 2021).

Diante desse panorama, este estudo propôs a implementação de uma tecnologia de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizando um consórcio microbiano composto por bactérias da microbiota intestinal de cupins e fungos filamentosos do solo de serrapilheira. O objetivo foi hidrolisar a estrutura lignocelulósica e viabilizar a produção eficiente de biogás, promovendo avanços na utilização sustentável de resíduos agroindustriais.

## 2 CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

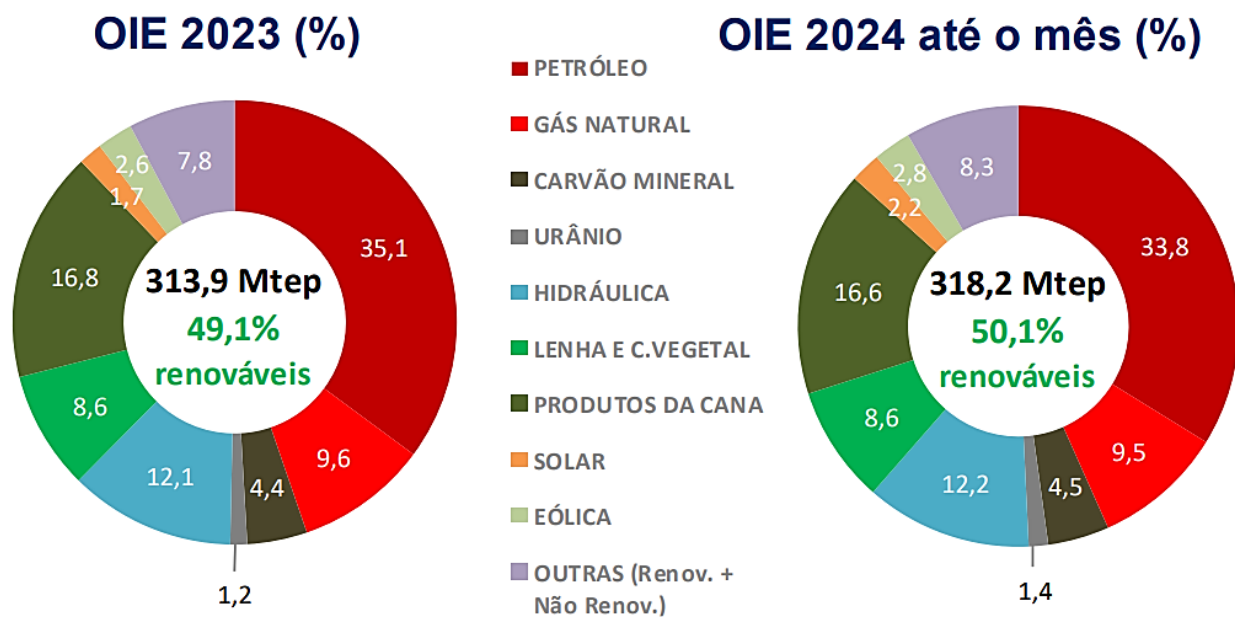
### 2.1 MATRIZ ENERGÉTICA MUNDIAL E BRASILEIRA

As transformações recentes no setor energético têm colocado em evidência a importância da matriz energética como elemento estratégico para o desenvolvimento sustentável. Esse conceito refere-se ao conjunto de fontes utilizadas por um país ou região para suprir suas necessidades de energia, analisado sob critérios de segurança, impacto ambiental e eficiência econômica. A concentração excessiva em poucas fontes torna a matriz vulnerável, aumentando a dependência externa e os riscos ambientais, enquanto a diversificação garante maior estabilidade e sustentabilidade. Esse processo de diversificação tem ocorrido globalmente, impulsionado pela busca por segurança energética e pela necessidade de mitigar as mudanças climáticas. Nesse contexto, países europeus apresentam matrizes mais equilibradas, enquanto regiões como o Oriente Médio permanecem fortemente dependentes de combustíveis fósseis (TRIGUERO-RUIZ *et al.*, 2023).

O consumo global de energia primária atingiu recorde pelo segundo ano consecutivo, com crescimento de 2,2% em 2023, acima da tendência histórica. Os países não pertencentes à Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), como China, Índia e África do Sul, lideraram esse aumento, respondendo por 42% do crescimento do consumo global. Nesses territórios, os combustíveis fósseis continuam predominantes na matriz energética (YOLCAN, 2023; ENERGY INSTITUTE, 2024; ENERDATA, 2024).

No Brasil, a matriz energética de 2023 contou com 49,1% de fontes renováveis. Em 2024, essa participação aumentou para 50,4%, impulsionada principalmente pelo crescimento da geração hidrelétrica e solar, além da redução no consumo de derivados de petróleo. Esse avanço pode ser observado na Figura 1, que apresenta a oferta interna de energia renovável até o mês de setembro de 2024 (BEN, 2024; BRASIL, 2024).

**Figura 1** – Oferta interna de energia mais renovável até o mês de setembro (2024)



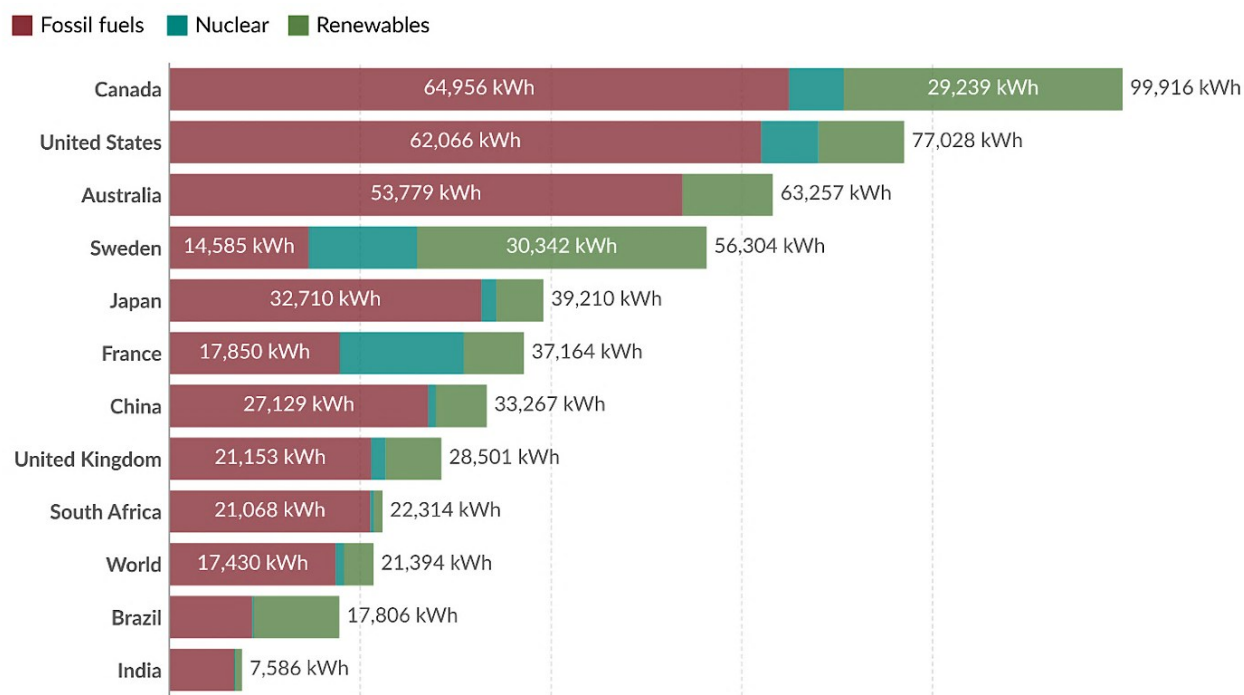
\*OUTRAS: inclui outras renováveis e outras não renováveis

\*OIE: Oferta Interna de Energia; \*Mtep: Milhão de Toneladas Equivalentes de Petróleo

Fonte: BRASIL, 2024.

Desde a Revolução Industrial, os combustíveis fósseis dominaram a matriz energética global, provocando impactos climáticos e sobre a saúde humana. Atualmente, sua queima é responsável por cerca de três quartos das emissões globais de gases de efeito estufa, o que torna essencial a transição para fontes de baixo carbono, como as energias renováveis (RITCHIE & ROSADO, 2024). Apesar dos avanços, a dependência global de combustíveis fósseis ainda persiste, mesmo em países altamente desenvolvidos, como Estados Unidos, China, Japão e Austrália, conforme mostra a Figura 2. Em contrapartida, Canadá, Suécia e Brasil se destacam pelo avanço na incorporação de fontes renováveis à matriz energética (IEA, 2024). Esse cenário reforça que a transição global enfrenta obstáculos estruturais e políticos que exigem planejamento, investimentos e cooperação internacional (IEA, 2024).

Os dados da Agência Internacional de Energia (IEA, 2024) confirmam que, embora haja progresso rumo a sistemas energéticos mais sustentáveis, os desafios para ampliar a adoção de energias limpas e reduzir a dependência de combustíveis fósseis ainda são expressivos, sobretudo nos países desenvolvidos. Isso evidencia a urgência de esforços contínuos e coordenados para acelerar a transição energética e mitigar os impactos das mudanças climáticas, que afetam diretamente a segurança ambiental e econômica das nações.

**Figura 2** – Consumo de energia primária per capita em 2023

Os valores de energia são medidos em quilowatts-hora por pessoa

Fonte: Energy Institute - *Statistical Review of World Energy*, 2024.

No contexto brasileiro, o compromisso com a sustentabilidade foi consolidado em 12 de dezembro de 2015, com a assinatura do Acordo de Paris. Esse tratado internacional visa fortalecer a resposta global às mudanças climáticas e ampliar a capacidade dos países para lidar com seus efeitos. Como parte de suas Contribuições Nacionalmente Determinadas (NDCs), o Brasil comprometeu-se a reduzir suas emissões de gases de efeito estufa em 37% até 2025 e em 43% até 2030, tomando como referência os níveis de 2005. Para alcançar essas metas, o país estabeleceu medidas como: aumentar a participação da bioenergia sustentável para cerca de 18% da matriz energética até 2030; restaurar e reflorestar 12 milhões de hectares de florestas; e ampliar a participação das energias renováveis para 45% da matriz no mesmo período (LIMA *et al.*, 2020; BRASIL, 2023). Essas ações reforçam o compromisso brasileiro com a transição para uma economia de baixo carbono.

É importante ressaltar que, no momento da assinatura do Acordo de Paris, o Brasil já apresentava uma matriz energética composta por 41,5% de fontes renováveis, percentual significativamente superior à média global de 13,4% (OIE, 2023). Esse desempenho evidencia o protagonismo do país no uso de energias limpas, mas não reduz a necessidade de contínuos investimentos em políticas e tecnologias capazes de garantir o cumprimento das

metas climáticas e a consolidação de um modelo energético alinhado aos desafios do século XXI (MONTROYA *et al.*, 2021).

O governo brasileiro possui fundamentos sólidos para adotar metas de mitigação das mudanças climáticas, sobretudo por ser um país com biomas diversificados e ecossistemas de importância crucial para o equilíbrio global. A vasta extensão territorial e a riqueza natural trazem riscos significativos, como a redução dos rendimentos agrícolas, a escassez de água e vulnerabilidades associadas à segurança energética. Tais riscos são agravados pela dependência de fontes sensíveis às variações climáticas, como a energia hidrelétrica, o biodiesel e o etanol, cuja produção está diretamente relacionada aos padrões de precipitação (BISOGNIN *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020). Nesse contexto, a adoção de estratégias que assegurem resiliência energética e sustentabilidade ambiental é indispensável.

Para cumprir suas NDCs, o Brasil precisa avançar na incorporação de tecnologias de baixo carbono, considerando a interdependência entre energia e uso da terra. Com sua dimensão continental e a ampla disponibilidade de matéria-prima agroindustrial, o país possui elevado potencial para se destacar no mercado global de bioenergia, especialmente por meio da produção e utilização de biocombustíveis (GURGEL *et al.*, 2019; BASTIDAS & ISAAC, 2019). Além disso, a redução das emissões de gases de efeito estufa também representa uma oportunidade para impulsionar o desenvolvimento econômico sustentável, fortalecendo setores de energia limpa, gerando empregos e agregando valor. Estima-se que os custos associados ao cumprimento das NDCs representem apenas 0,7% do PIB brasileiro em 2030 (CARVALHO *et al.*, 2020), o que reforça a viabilidade econômica dessa transição.

Nesse cenário, o biogás se destaca como uma solução promissora, capaz de substituir combustíveis fósseis e de aproveitar a infraestrutura existente para transformar resíduos orgânicos em energia (BORGES *et al.*, 2021). Para que essa transição seja bem-sucedida, é essencial fomentar a colaboração entre diferentes atores, fortalecer instituições e investir em conhecimento técnico e científico.

A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, lançada pela ONU em 2015, estabeleceu dezessete Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), dos quais ao menos nove podem ser diretamente beneficiados pelo setor de biogás. Entre eles, destacam-se: o ODS 2 (fome zero e agricultura sustentável), com a produção de biofertilizantes que enriquecem o solo; o ODS 3 (saúde e bem-estar), por reduzir poluição e doenças associadas; o ODS 6 (água potável e saneamento), com o tratamento de resíduos e efluentes; e o ODS 7

(energia limpa e acessível), ao substituir combustíveis fósseis. Além disso, o biogás contribui para o ODS 9 (inovação e infraestrutura sustentável), o ODS 11 (cidades e comunidades sustentáveis), o ODS 12 (consumo e produção responsáveis), o ODS 13 (ação climática) e o ODS 15 (vida terrestre), por meio da redução de emissões e da recuperação do solo (BRASIL, 2024).

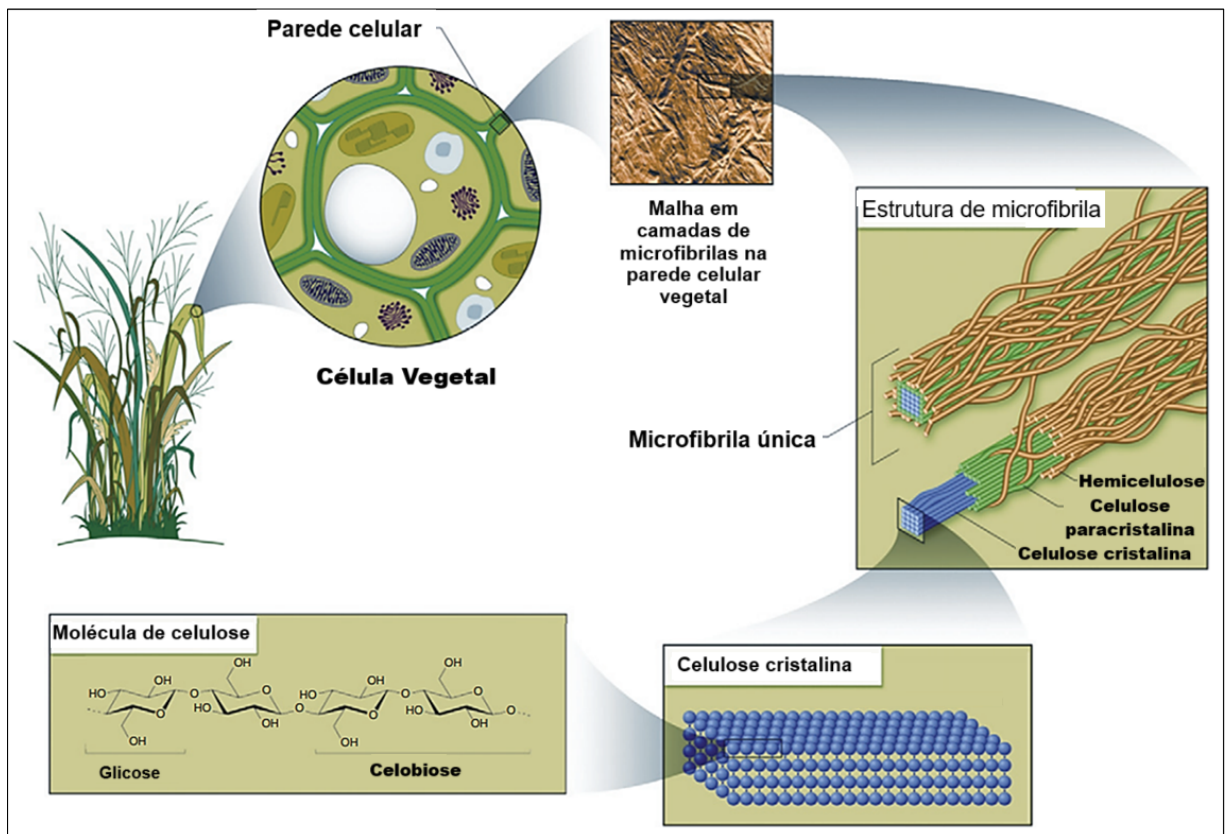
A Associação Mundial de Biogás (WBA, 2021) destaca que essa tecnologia pode transformar resíduos em ativos, melhorar o saneamento básico, combater a poluição aquática, tratar resíduos alimentares domésticos, enriquecer solos, reduzir emissões de gases de efeito estufa e descarbonizar o transporte. Diante da projeção de que a geração global de resíduos aumentará de 2,01 bilhões para 3,40 bilhões de toneladas anuais até 2050, e que a demanda por energia crescerá cerca de 90% no mesmo período, as tecnologias de biogás tornam-se indispensáveis para enfrentar tais desafios futuros.

No Brasil, o interesse por essas tecnologias vem crescendo, impulsionado pela ampla disponibilidade de substratos orgânicos. O aproveitamento desses recursos reforça a segurança energética e estimula a economia circular, consolidando o biogás como elemento estratégico para que o país cumpra suas metas climáticas (BORGES *et al.*, 2021).

## 2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fração da biomassa vegetal existente na Terra, o que a torna uma das fontes mais abundantes para a produção de energia e produtos químicos renováveis. Presente principalmente em resíduos florestais e agrícolas, ela é considerada uma das alternativas mais promissoras para substituir combustíveis fósseis (ONG *et al.*, 2021). Esse biopolímero é constituído por três componentes estruturais principais (Figura 3): celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%) e lignina (5-30%) (YU *et al.*, 2021).

**Figura 3** – Estrutura da biomassa lignocelulósica



Fonte: HEINZE, 2015.

A estrutura complexa da biomassa lignocelulósica torna seu processamento um grande desafio, uma vez que sua resistência à despolimerização dificulta a conversão eficiente em produtos de valor agregado (HAQ *et al.*, 2021). No entanto, a proporção desses componentes varia de acordo com a fonte da biomassa. Por exemplo, o bagaço de cana-de-

açúcar contém cerca de 35% de celulose, 35,8% de hemicelulose e 16,1% de lignina, enquanto a palha de arroz apresenta 35,8% de celulose, 21,5% de hemicelulose e 24,4% de lignina. Essas diferenças influenciam diretamente a eficiência dos processos de pré-tratamento e conversão em biocombustíveis e outros produtos (MANKAR *et al.*, 2021).

A biomassa pode ser transformada em produtos de valor agregado por diferentes rotas, dependendo do tipo e da composição da matéria-prima, bem como dos produtos finais desejados (XIONG *et al.*, 2019). O potencial de aplicação em biorrefinarias está diretamente associado à sua composição química. Resíduos agrícolas, como palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz, são amplamente empregados devido ao menor teor de lignina (geralmente inferior a 30% em peso) e ao maior teor de celulose e hemicelulose. Em contrapartida, resíduos florestais, que possuem maior teor de lignina, são menos indicados como matéria-prima para biorrefinarias, pois a alta lignina dificulta o pré-tratamento e reduz a viabilidade econômica do processo (YU *et al.*, 2021).

Apesar de seu potencial, os métodos tradicionais de processamento da biomassa ainda enfrentam limitações, sendo frequentemente ineficientes, caros, demorados e com impactos ambientais relevantes. Ainda assim, estima-se que até 2050 a biomassa lignocelulósica possa fornecer aproximadamente 38% do suprimento mundial direto de biocombustíveis e 17% da eletricidade global, reforçando sua relevância como alternativa energética sustentável e promissora (SANKARAN *et al.*, 2020).

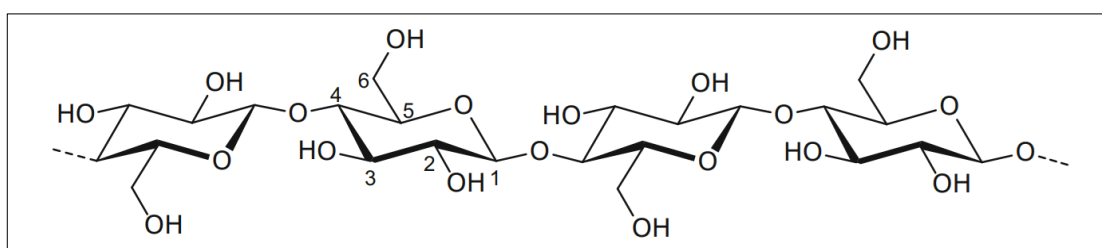
### 2.2.1 Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante da biosfera, com produção global estimada em aproximadamente 1,5 trilhão de toneladas por ano, valor comparável às reservas das principais fontes fósseis e minerais (VU *et al.*, 2020; HAQ *et al.*, 2021). Sua estrutura cristalina é formada por monômeros de D-glicose, ligados por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 que originam cadeias poliméricas lineares. O elevado número de grupos hidroxila em suas fibras laterais favorece a formação de ligações de hidrogênio, conferindo maior estabilidade estrutural e resistência à despolimerização (VU *et al.*, 2020; HAQ *et al.*, 2021).

Independentemente da fonte, cada unidade de anidroglicose da celulose apresenta três grupos hidroxila reativos, um primário em C6 e dois secundários em C2 e C3,

fundamentais para suas propriedades químicas e físicas (Figura 4). As extremidades das cadeias são distintas: a extremidade não redutora contém uma ligação glicosídica, enquanto a extremidade redutora possui uma unidade de D-glucopiranosose em equilíbrio com uma função aldeído. Alterações estruturais da celulose ocorrem, sobretudo, nas superfícies das fibrilas ou em regiões amorfas, sendo investigadas por técnicas de análise de massas molares e distribuição, como a cromatografia de exclusão por tamanho e o espalhamento de luz.

**Figura 4** – Estrutura da Celulose



Três grupos hidroxila reativos em cada unidade de anidroglicose (AGU) dentro da cadeia de celulose, um grupo primário em C6 e dois grupos secundários em C2 e C3 que estão posicionados no plano do anel.

Fonte: HEINZE, 2015.

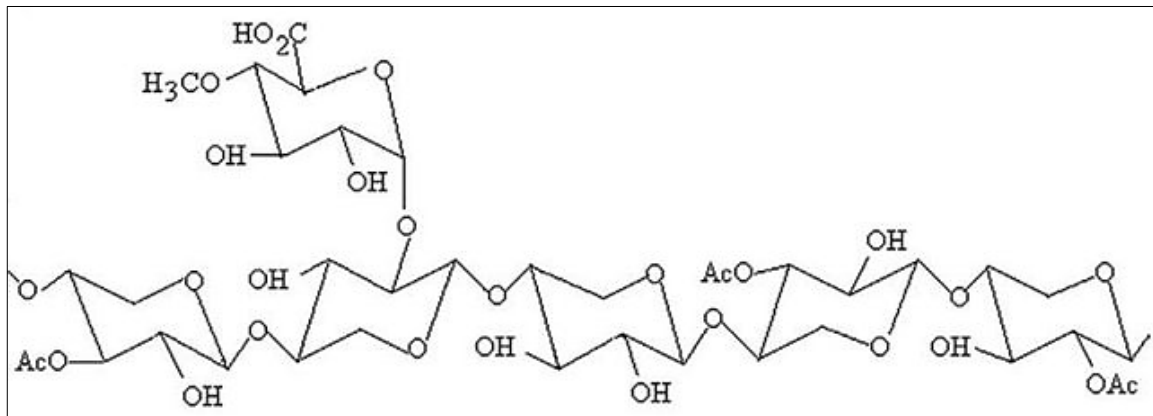
A capacidade dos grupos hidroxila da celulose de formar ligações de hidrogênio é essencial para a organização das moléculas em arranjos cristalinos paralelos, que resultam na formação de fibras. Nas regiões amorfas, as cadeias apresentam orientação aleatória, o que reduz a densidade local. As unidades básicas, denominadas fibrilas elementares, possuem dimensões laterais de 1,5 a 3,5 nm e comprimentos de até 100 nm. Essas fibrilas se associam em microfibrilas com diâmetros entre 10 e 30 nm e comprimentos que variam de centenas de nanômetros a micrômetros (HEINZE & LIEBERT, 2012).

### 2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo ramificado com menor grau de polimerização em relação à celulose, o que a torna mais suscetível à degradação, especialmente por hidrólise ou extração hidrotérmica. Sua estrutura é formada por diferentes unidades de açúcar — como xilose, manose, glicose, galactose, arabinose e ácidos urônicos — ligadas por

ligações  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3-glicosídicas (Figura 5) (GIL, 2021). Essa diversidade estrutural, caracterizada pela predominância de pentoses e hexoses, possibilita a formação de ligações cruzadas com a celulose e a lignina, contribuindo para a resistência da parede celular (ABRAHAM *et al.*, 2020).

**Figura 5** – Estrutura da Hemicelulose



Fonte: THAKUR & THAKUR, 2014.

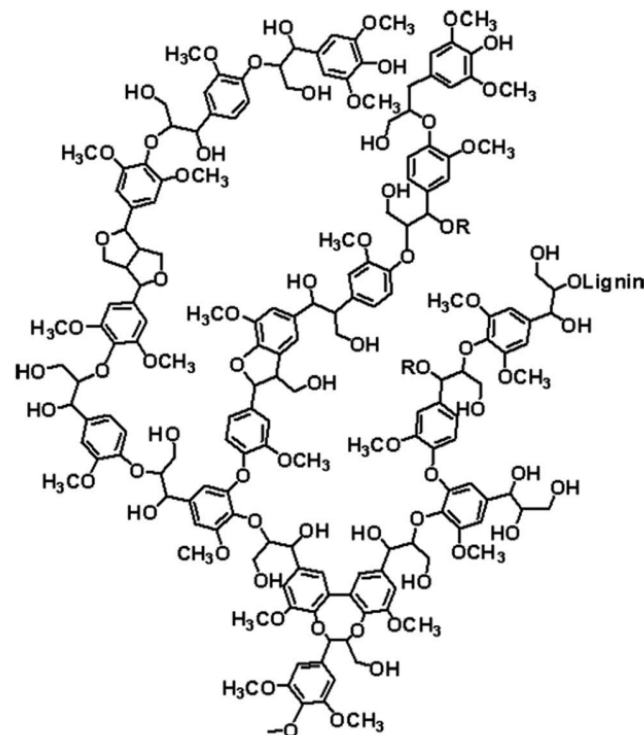
Cabe destacar que as hemiceluloses atuam como uma barreira física, limitando a acessibilidade de enzimas hidrolíticas. No entanto, seu impacto na recalcitrância da biomassa ainda não está totalmente elucidado, uma vez que parte da lignina é frequentemente removida em conjunto com as hemiceluloses. Alguns estudos apontam que a remoção de hemiceluloses é mais eficiente do que a remoção de lignina para melhorar a taxa de hidrólise enzimática, enquanto outros defendem que a remoção da lignina exerce papel mais determinante (GAO *et al.*, 2013; KRUYENISKI *et al.*, 2019).

Embora esteja amplamente disponível, a utilização da hemicelulose é mais complexa do que a da celulose, devido à sua estrutura diversificada e à dificuldade de hidrólise enzimática das pentoses. Por outro lado, essa mesma diversidade estrutural oferece oportunidades para modificações químicas e enzimáticas mais seletivas, em função das diferentes ligações glicosídicas e da presença de grupos hidroxila reativos. Assim, a hemicelulose apresenta elevado potencial para aplicações que requerem adaptações específicas em sua estrutura molecular (YOUSUF *et al.*, 2019).

### 2.2.3 Lignina

A lignina é considerada o segundo heteropolímero hidrofóbico mais abundante da Terra. Ela consiste em monômeros derivados dos álcoois coniferílico, cumarílico e sinapílico (Figura 6) (ABRAHAM *et al.*, 2020). Na biomassa lignocelulósica, a lignina atua como um agente de ligação que conecta as fibras de celulose e hemicelulose, preenchendo os espaços entre elas e formando uma estrutura molecular reticulada em três dimensões. Essa configuração confere recalcitrância e elevada resistência à degradação (HAQ *et al.*, 2021).

**Figura 6** – Estrutura da Lignina



Fonte: PRIEUR, 2017.

É amplamente reconhecido que a lignina desempenha um papel negativo na conversão da celulose, sendo esse efeito influenciado pelo conteúdo total de lignina, bem como por sua composição e estrutura. Assim como a hemicelulose, suas cadeias atuam como barreira física, limitando a acessibilidade das enzimas hidrolíticas ao polissacarídeo. Além disso, a lignina pode adsorver irreversivelmente celulases e outras enzimas durante a hidrólise, devido a suas características hidrofóbicas, como ligações de hidrogênio, grupos metoxi e estruturas

poliaromáticas. A remoção parcial da lignina interrompe a matriz lignina-carboidratos, aumenta a porosidade da biomassa e reduz os locais de adsorção não produtivos, favorecendo a ação enzimática (KRUYENISKI *et al.*, 2019; ZOGHLAMI & PAËS, 2019).

#### 2.2.4 Biomassa de bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é composta por diferentes frações, incluindo água, fibra, açúcares e outros componentes estruturais. O colmo, principal parte da planta, contém entre 10 e 17% de sacarose, além de pequenas quantidades de outros açúcares (0,5–1%) (IRENA, 2019). A fibra, que representa entre 8 e 14% do colmo, é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Além disso, a cana apresenta elevado teor de umidade (65–70%), o que influencia seu processamento e aproveitamento para diversas finalidades, como a produção de biocombustíveis e biomateriais (MASON *et al.*, 2020).

Após a extração do caldo, o bagaço da cana-de-açúcar constitui um resíduo lignocelulósico de grande relevância. Esse material, juntamente com a palha (folhas secas, verdes e pontas), contribui significativamente para a biomassa total da planta. A proporção desses resíduos varia de acordo com a variedade da cana, as condições ambientais e as práticas agrícolas. O aproveitamento eficiente dessas frações é essencial para maximizar o valor da cultura e promover o uso sustentável dos seus subprodutos (MASON *et al.*, 2020).

A natureza heterogênea e fibrosa do bagaço torna a moagem uma etapa crucial para o desenvolvimento de processos de conversão destinados à produção de biocombustíveis celulósicos e coprodutos. Essa etapa aumenta a área de superfície da biomassa e melhora o fluxo da suspensão, otimizando as reações químicas ou bioquímicas subsequentes (DRIEMEIER *et al.*, 2011). Assim, a moagem representa um passo fundamental para viabilizar a conversão industrial da biomassa em produtos de valor agregado.

O manejo sustentável do bagaço é indispensável para evitar práticas como a queima a céu aberto, que contribui para a poluição ambiental e ameaça a flora e a fauna. Inserido no contexto das respostas às crises ambientais e energéticas, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta propriedades ideais para a produção de energia limpa e a redução eficiente de resíduos. Suas aplicações incluem a geração de eletricidade, a produção de enzimas, açúcares,

ácidos orgânicos, ração animal, biossorventes, entre outros produtos de alto valor agregado (ALOKIKA *et al.*, 2021).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o quinto maior produtor de biomassa, com 8,44 milhões de hectares cultivados e uma produção de 642,71 milhões de toneladas de colmos na safra 2019/20 (BARBOSA *et al.*, 2021; WBA, 2023). A cana é amplamente utilizada para a produção de bioetanol devido ao seu elevado teor de açúcares fermentáveis, mas seu potencial se estende também a biocombustíveis avançados e biomateriais (SCHMATZ *et al.*, 2020). Nesse contexto, o bagaço da cana constitui uma matéria-prima versátil, cujo uso sustentável pode impulsionar a transição energética, reduzir resíduos e promover práticas agrícolas mais eficientes e ecológicas.

## 2.3 PRE-TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Como a lignocelulose é um biopolímero complexo, torna-se necessário pré-tratar sua estrutura compacta para superar a recalcitrância e facilitar os processos subsequentes de digestão e fermentação. Os pré-tratamentos têm como objetivo aumentar a acessibilidade da celulose por meio da remoção de hemiceluloses e/ou lignina, da alteração da estrutura celular ou da modificação química da lignina e de suas propriedades superficiais (ZHOU *et al.*, 2021).

De modo geral, as metodologias de pré-tratamento da biomassa podem ser categorizadas em abordagens físicas, químicas e biológicas (Tabela 1) (ANUKAM & BERGHEL, 2021). Para serem eficazes, essas estratégias devem garantir alta eficiência na sacarificação enzimática, com baixo consumo de enzimas, além de serem aplicáveis a diferentes tipos de biomassa. Devem, ainda, requerer o mínimo de capital e reagentes químicos, priorizando a reutilização e reciclagem de substâncias, bem como reduzir a geração de resíduos e a liberação de compostos tóxicos (SHAFIEI *et al.*, 2015).

Outro aspecto fundamental é que o pré-tratamento minimize a degradação dos carboidratos fermentáveis e a formação de compostos inibitórios que possam comprometer a hidrólise enzimática ou a fermentação. Também deve apresentar eficiência em condições de alta carga de sólidos e baixo teor de umidade. Embora nenhum método atual atenda integralmente a todos esses requisitos, tais parâmetros são essenciais para o desenvolvimento de processos economicamente viáveis (ANUKAM & BERGHEL, 2021; SHAFIEI *et al.*, 2015).

Assim, as metodologias de pré-tratamento devem ser especificamente adaptadas à origem da biomassa e às aplicações em bioconversão e biorrefinaria. Entre as principais barreiras enfrentadas destacam-se os elevados custos e a obtenção de um produto pré-tratado de alta qualidade, questões que devem continuar a ser objeto de pesquisas em desenvolvimento (ANUKAM & BERGHEL, 2021).

**Tabela 1** – Vantagens e desvantagens dos principais tipos de pré-tratamento de biomassa.

<b>Métodos de Pré-tratamento</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Referências</b>
Pré-tratamento físico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Operação simples e fácil;</li> <li>• Grandes volumes de biomassa podem ser manuseados;</li> <li>• Aumenta a área de superfície e o tamanho dos poros;</li> <li>• Aumenta as densidades de massa e energia;</li> <li>• Reduz a cristalinidade da celulose;</li> <li>• Não envolve o uso de produtos químicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Consumo de energia bastante alto;</li> <li>• Requer etapas adicionais de pré-tratamento.</li> </ul>	ANUKAM <i>et al</i> , 2019; ANUKAM <i>et al</i> , 2017, PRASAD <i>et al</i> 2007, CHEN <i>et al</i> , 2020
Pré-tratamento químico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta a acessibilidade à celulose;</li> <li>• Altera a estrutura da lignina;</li> <li>• Hidrolisa a hemicelulose em várias frações de açúcar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto custo de produtos químicos;</li> <li>• Problemas relacionados à corrosão com equipamentos;</li> <li>• Sujeito a formar substâncias inibidoras;</li> <li>• Requer longo tempo de tratamento.</li> </ul>	BAK <i>et al</i> , 2009; MOSIER <i>et al</i> , 2005
Pré-tratamento biológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipamento simples;</li> <li>• Degrada com eficiência tanto a celulose quanto a hemicelulose;</li> <li>• Adequado para altos e baixos teores de umidade da biomassa;</li> <li>• Baixos requisitos de energia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Degrada ligeiramente a lignina;</li> <li>• Taxa de hidrólise muito lenta;</li> <li>• O processo requer um grande espaço;</li> <li>• Requer longos tempos de tratamento.</li> </ul>	AGBOR <i>et al</i> , 2011; CHANDRA <i>et al</i> , 2007

Fonte: ANUKAM & BERGHEL, 2021.

### 2.3.1 Pré-tratamento físico

Os métodos físicos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica têm como objetivo reduzir o tamanho das partículas e, conseqüentemente, aumentar a área de superfície, favorecendo a acessibilidade da celulose e elevando sua suscetibilidade à ação enzimática (ZHENG *et al.*, 2014; SHAFIEI *et al.*, 2015).

Entre as técnicas mais utilizadas estão a moagem e a trituração. A moagem, por exemplo, pode reduzir a cristalinidade da celulose e melhorar o acesso das enzimas. Entretanto, sua principal desvantagem está na elevada demanda energética, especialmente em processos como a moagem de bolas, que, além do alto consumo de energia, não promove a remoção da lignina. Como alternativa, a moagem de disco úmido apresenta menor consumo energético, embora possa ser mais lenta em alguns casos (SHAFIEI *et al.*, 2015).

Outros métodos físicos incluem tratamentos por micro-ondas e ultrassom, que utilizam, respectivamente, energia eletromagnética e acústica para romper a estrutura da biomassa e aumentar o acesso enzimático. No caso do pré-tratamento por micro-ondas, a geração de zonas de aquecimento localizado no interior das partículas contribui para maior eficiência na hidrólise (MANKAR *et al.*, 2021).

### 2.3.2 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico tem como principal objetivo a desconstrução da biomassa lignocelulósica por meio do uso de agentes como ácidos, álcalis e solventes orgânicos. O tratamento ácido, por exemplo, é altamente eficaz na remoção de hemicelulose e no aumento da acessibilidade da celulose às enzimas. Contudo, esse processo apresenta desafios, como a corrosão dos equipamentos e a formação de subprodutos que podem inibir a fermentação. Já o pré-tratamento alcalino, geralmente realizado com hidróxido de sódio, é eficiente na remoção da lignina e no aprimoramento da hidrólise enzimática. Entretanto, pode apresentar custos elevados e demandar maior tempo de processamento (MANKAR *et al.*, 2021).

Outra alternativa é o pré-tratamento organosolv, que utiliza solventes orgânicos e se mostra eficaz na ruptura das ligações entre lignina e hemicelulose. Apesar dessa

eficiência, seu alto custo e as dificuldades na recuperação dos solventes limitam a viabilidade do processo em escala industrial. Embora os métodos químicos tenham proporcionado avanços significativos na desconstrução da biomassa, sua aplicação exige um gerenciamento operacional rigoroso, capaz de equilibrar eficiência, custos e desafios técnicos (ZHAO *et al.*, 2022).

### 2.3.3 Pré-tratamento biológico

O pré-tratamento biológico utiliza diferentes micro-organismos capazes de degradar a lignocelulose por meio da produção de enzimas ligninolíticas. Essas enzimas despolimerizam a lignina, levando à abertura da estrutura da parede celular e facilitando a hidrólise subsequente dos biopolímeros. Nesse processo, a celulose e a hemicelulose podem ser convertidas em açúcares monoméricos por micro-organismos especializados. Essa abordagem apresenta vantagens ambientais, por ser menos impactante em comparação com os métodos físicos ou químicos, embora ainda enfrente limitações quanto à eficiência e ao tempo de processamento (FERDES *et al.*, 2020).

A complexidade estrutural da biomassa lignocelulósica, entretanto, impõe obstáculos significativos à sua desconstrução. A lignina, por exemplo, não possui uma sequência estrutural regular, o que dificulta sua degradação. Além disso, a elevada cristalinidade da celulose e a baixa digestibilidade da hemicelulose restringem a ação das enzimas microbianas (AGBOR *et al.*, 2011). A eficiência desse processo depende de fatores intrínsecos, como a capacidade catalítica, a especificidade e o sinergismo entre os componentes do coquetel enzimático, e de fatores extrínsecos, como a acessibilidade da celulose, influenciada pelo teor de hemicelulose e lignina, pela cristalinidade, pela porosidade e pela distribuição da lignina na parede celular. Esses aspectos determinam a viabilidade do pré-tratamento biológico e a eficácia da conversão da biomassa (ZHOU *et al.*, 2021).

Micro-organismos como fungos e bactérias desempenham papel central nesse processo devido à capacidade de secretar enzimas extracelulares que degradam polímeros complexos. Entre as principais enzimas estão as celulasas, responsáveis pela degradação da celulose; as hemicelulasas, que atuam na hemicelulose; e as ligninases, que promovem a despolimerização da lignina. A ação conjunta dessas enzimas permite a conversão da biomassa

em compostos menores e fermentáveis, fundamentais para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado (Tabela 2) (FERDES *et al.*, 2020).

**Tabela 2** – Diferentes enzimas degradadoras de biomassa produzidas por bactérias e fungos

<b>Enzimas</b>	<b>Espécies bacterianas representativas</b>	<b>Espécies fúngicas representativas</b>	<b>Referências</b>
<u>Enzimas</u>			
<u>Celulolíticas</u>			
Endoglucanase	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Trichoderma reesei</i>	
Cellobiohidrolase or exoglucanase	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	
Glycosyltransferases	<i>Thermomonospora</i> sp <i>Streptomyces</i> sp. <i>Fibrobacter succinogenes</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Pedobacter</i> sp. <i>Mucilaginibacter</i> sp.	<i>Penicillium helicum</i> <i>Piptoporus betulinus</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Magnaporthe grisea</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Fusarium gramineum</i>	SUN & CHENG, 2002; LÓPEZ-MONDÉJAR <i>et al.</i> , 2016.
<u>Enzimas</u>			
<u>Hemicelulolíticas</u>			
Xylanases	<i>Bacillus</i> sp	<i>Aspergillus niger</i>	
Mannanase	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	
Endoglucanase	<i>Prevotella bryantii</i>	<i>Piptoporus betulinus</i>	
β-Xylosidas	<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	VALÁŠKOVÁ &
α-Galactosidase	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	BALDRIAN, 2006
Acetyl esterase	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	
β-Glucosidase	<i>Bacteroides succinogenes</i> <i>Pedobacter</i> sp. <i>Mucilaginibacter</i> sp.	<i>Magnaporthe grisea</i> <i>Fusarium gramineum</i>	
<u>Enzimas</u>			
<u>Lignolíticas</u>			
Laccase	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Dichomitus squalens</i>	
Lignin peroxidase	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>	ZHOU <i>et al.</i> , 2000;
Manganese peroxidase	<i>Cupriavidus basilensis</i>	<i>Pleurotus</i> sp.	SARITHA <i>et al.</i> , 2012;
Versatile peroxidase	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	PÉREZ <i>et al.</i> , 2002;
Cellobiose dehydrogenase	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	

---

<i>Prevotella</i> sp	<i>Phanerochaete</i>
<i>Pseudobutyrvibrio</i> sp.	<i>chryso sporium</i>
	<i>Merulius tremellosus</i>
	<i>Ceriporiopsis</i>
	<i>subvermispora</i>
	<i>Phellinus pini</i>
	<i>Phlebia</i> sp.
	<i>Physisporinus</i>
	<i>rivulosus</i>
	<i>Pycnoporus</i>
	<i>cinnabarinus</i>
	<i>Placuna placenta</i>

---

Fonte: Modificado de SHARMA *et al.* 2019.

Entre os micro-organismos mais eficazes listados, estão bactérias como *Clostridium* sp., *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp., *Thermomonospora* sp. e *Streptomyces* sp., além de fungos como *Phanerochaete chryso sporium*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger*, conhecidos por sua habilidade em hidrolisar biopolímeros naturais. Esses agentes biológicos são fundamentais para a desconstrução eficiente da biomassa, embora seu uso em escala industrial ainda exija otimização para superar desafios como custos e tempo de processamento (SHARMA *et al.*, 2019).

### 2.3.3.1 Pré-tratamento bacteriano

O pré-tratamento bacteriano envolve o uso de diversas espécies capazes de produzir enzimas degradadoras de biomassa, desempenhando papel essencial na produção de biocombustíveis (SHARMA *et al.*, 2019). A celulose e a hemicelulose apresentam maior facilidade de degradação em comparação à lignina, e bactérias como *Cellulomonas fimi* e *Thermomonospora fusca* estão entre as mais estudadas para a produção de celulasas. Outras espécies, como *Paenibacillus campinasensis*, demonstram potencial para atuar em condições adversas. Além disso, mais de 30 espécies bacterianas celulolíticas já foram identificadas no rúmen, muitas delas apresentando mecanismos específicos de adesão à celulose e de hidrólise subsequente (SUN & CHENG, 2002; LÓPEZ-MONDÉJAR *et al.*, 2016).

Entre as bactérias anaeróbicas, *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvans* destacam-se por produzirem elevada atividade celulolítica, embora em baixa

concentração enzimática. Cepas gram-positivas e gram-negativas, como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rahnella*, também exibem alta capacidade de degradação celulósica (PAUDEL & QIN, 2015; VAN BLOOIS *et al.*, 2010).

Além do papel na hidrólise da biomassa, algumas bactérias apresentam destaque em processos fermentativos. *Zymomonas mobilis*, por exemplo, é amplamente investigada pela sua eficiência na fermentação para produção de etanol. A degradação bacteriana da lignina também tem despertado crescente interesse científico, sobretudo com a descoberta de enzimas como peroxidases, lacases e  $\beta$ -eterases, associadas à despolimerização desse polímero recalcitrante (CHANDRA *et al.*, 2015; PICART *et al.*, 2015; SHAH *et al.*, 2019).

#### 2.3.3.2 Pré-tratamento fúngico

O crescimento e o metabolismo dos fungos são fatores determinantes para sua utilização eficiente no pré-tratamento microbiano. Entre as variáveis que afetam esse processo, destacam-se o teor de umidade, as características da biomassa, a competição com microorganismos indígenas, a disponibilidade de nutrientes, o pH e a concentração de oxigênio (WAN & LI, 2012).

Os fungos são amplamente reconhecidos por sua capacidade de degradar resíduos lignocelulósicos por meio da secreção de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e ligninolíticas. Entre os mais estudados estão os ascomicetos, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma reesei*, e os basidiomicetos, incluindo fungos de podridão branca e marrom (WENSHENG, 2015). *Trichoderma longibrachiatum*, por exemplo, se destaca pela produção de três tipos de celulasas, fundamentais para a solubilização da celulose cristalina e para uma hidrólise mais eficiente. Ainda assim, a lignina representa um desafio para a degradação, devido à sua estrutura complexa, o que dificulta a seleção de cepas fúngicas eficazes (ZHOU *et al.*, 2000; SARITHA *et al.*, 2012; PÉREZ *et al.*, 2002).

Fungos de podridão branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, desempenham papel central na degradação da lignina, secretando enzimas como lacases e peroxidases que promovem sua despolimerização e mineralização. Outras espécies promissoras incluem *Phellinus pini-2* e *Pholiota mutabilis*, com potencial na degradação da lignina. No

entanto, a identificação de cepas capazes de degradar esse polímero recalcitrante sem comprometer a recuperação da celulose ainda constitui um desafio. Apesar dos avanços, a aplicação comercial desses fungos permanece limitada e demanda maiores desenvolvimentos tecnológicos (SALVACHÚA *et al.*, 2011).

## 2.4 BIOGÁS

O biogás é uma fonte de energia renovável produzida principalmente pela digestão anaeróbica de materiais orgânicos, como resíduos agrícolas, esterco animal e águas residuais. Nesse processo, micro-organismos decompõem a matéria orgânica, liberando uma mistura gasosa composta principalmente por metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (PARSAEE *et al.*, 2019). Com o apoio político e iniciativas governamentais, extensas pesquisas têm se desenvolvido para aprimorar a utilização da biomassa lignocelulósica na produção de biogás (AGARWAL *et al.*, 2022).

A produção de biogás apresenta diversos benefícios ambientais. Além de auxiliar na gestão de resíduos, reduzindo a deposição de matéria orgânica em aterros — que liberariam metano, um potente gás de efeito estufa —, o biogás constitui uma fonte energética versátil, que pode ser utilizada para aquecimento, geração de eletricidade e como combustível veicular. Adicionalmente, os subprodutos gerados, como o digestato, podem ser empregados como fertilizantes orgânicos, promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis (RAFIEE *et al.*, 2020; KABEYI & OLANREWAJU, 2022).

A composição do biogás varia em função do tipo e da proporção das matérias-primas utilizadas, das condições operacionais e das etapas do processo de digestão anaeróbica (RAFIEE *et al.*, 2020). Em digestores operando à temperatura ambiente, o biogás contém tipicamente entre 50% e 70% de metano e de 30% a 50% de dióxido de carbono, além de pequenas quantidades de impurezas, como monóxido de carbono, hidrogênio, sulfeto de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e material particulado. A Tabela 3 apresenta os principais componentes do biogás (DENG *et al.*, 2020).

**Tabela 3** – Componentes presente no biogás

Componentes		Proporção de volume (%)
CH <sub>4</sub>	Metano	50-75
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	25-50
N <sub>2</sub>	Nitrogênio	0-4
O <sub>2</sub>	Oxigênio	0-3
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio	0.03-0.5
H <sub>2</sub>	Hidrogênio	2-7

Fonte: DENG *et al.* 2020.

Diversos substratos orgânicos podem ser utilizados para a produção de biogás, incluindo palha de trigo, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos florestais, sorgo, resíduos alimentares, lodo de esgoto, esterco e águas residuais com elevado teor de matéria orgânica (MORAGA *et al.*, 2019). A produção de biogás a partir de resíduos de plantações tem sido apontada como alternativa promissora para enfrentar crises energéticas (SHARMA & KAR, 2015; MATIN *et al.*, 2020). Essa fonte lignocelulósica renovável pode ser empregada como combustível para veículos, além de gerar eletricidade e calor (MATIN *et al.*, 2018; SUMARDIONO *et al.*, 2023).

O biogás derivado de resíduos orgânicos também pode contribuir para atender à demanda energética de comunidades, ao mesmo tempo em que reduz a necessidade de descarte de resíduos. Dessa forma, garante benefícios ambientais, melhora o saneamento e reforça a segurança energética, representando uma alternativa que contribui diretamente para vários Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), como o acesso à energia, a mitigação das mudanças climáticas e a promoção da saúde pública (NIZAMI *et al.*, 2017; OLABI *et al.*, 2021).

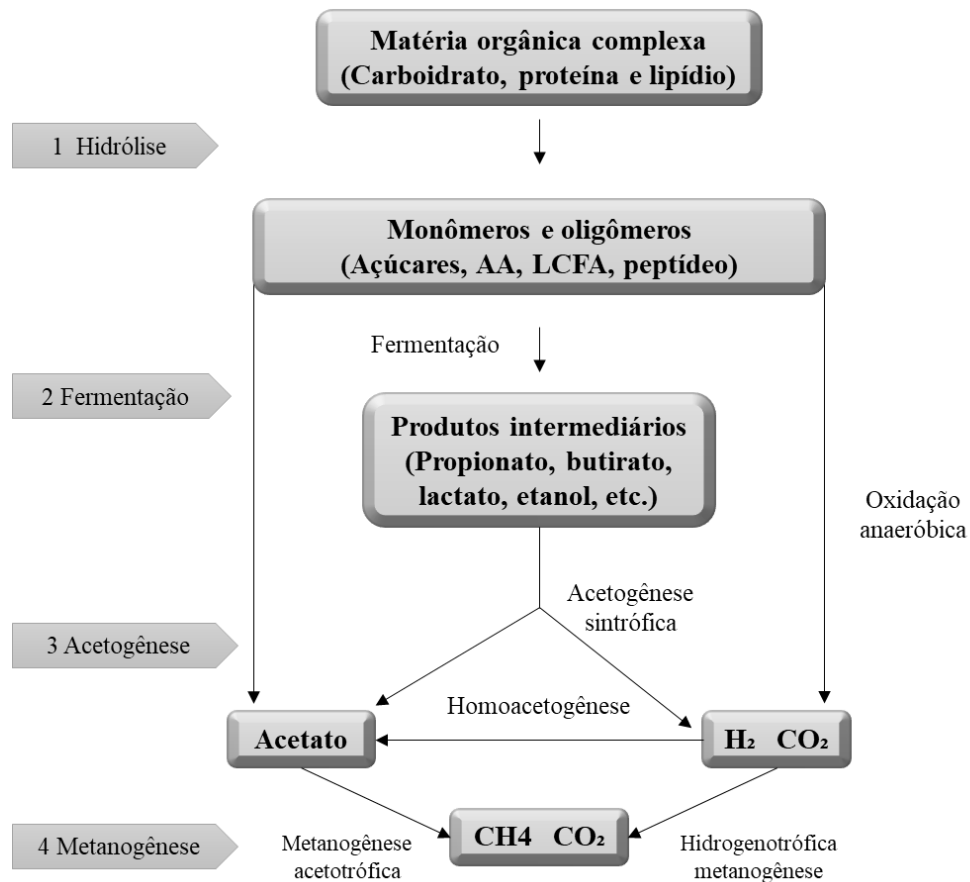
#### 2.4.1 Processo de produção do Biogás.

A conversão de matéria orgânica em biogás ocorre por meio da ação de um consórcio de micro-organismos e de uma série de estágios metabólicos denominados hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 7).

Na primeira etapa, compostos orgânicos complexos, como lipídios, proteínas e polissacarídeos, são convertidos em monômeros ou oligômeros solúveis (por exemplo, aminoácidos, ácidos graxos de cadeia longa, açúcares e glicerol) por meio da hidrólise, conduzida por bactérias hidrolíticas (SURENDRA *et al.*, 2014). Os compostos solúveis resultantes são então fermentados por bactérias acidogênicas, originando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), álcoois e ácidos graxos voláteis (AGV) de baixo peso molecular, como os ácidos propiônico e butírico, em um processo denominado acidogênese (AMARAL & KUNZ, 2019).

Durante a acetogênese, álcoois e AGV são oxidados anaerobicamente por bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio, resultando em acetato,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ . O acetato também pode ser formado a partir de  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  por bactérias acetogênicas oxidantes de hidrogênio, conhecidas como homoacetogênicas (DENG *et al.*, 2020).

**Figura 7** – Esquema do processo de produção do biogás e suas vias metabólicas



AA (aminoácidos); LCFA (*long chain fatty acids* – ácidos graxos de cadeia longa);  $\text{CH}_4$  (metano);  $\text{CO}_2$  (dióxido de carbono);  $\text{H}_2$  (hidrogênio).

Fonte: Adaptado de DENG *et al.* 2020.

Na etapa final, arqueias metanogênicas acetotróficas e hidrogenotróficas convertem acetato,  $H_2$  e  $CO_2$  em uma mistura de  $CH_4$  e  $CO_2$ . As arqueias acetotróficas utilizam o acetato como substrato em um processo denominado metanogênese acetotrófica, enquanto as hidrogenotróficas reduzem  $CO_2$  utilizando  $H_2$  como doador de elétrons, em um processo chamado metanogênese hidrogenotrófica. Do total de  $CH_4$  produzido, aproximadamente 70% se origina da descarboxilação do acetato, enquanto a maior parte do restante provém da redução de  $CO_2$  (ZIEMIŃSKI & FRAC, 2012). Quantidades menores de  $CH_4$  também podem ser formadas a partir de ácidos fórmico, propiônico e butírico, além de outros substratos orgânicos (AMARAL & KUNZ, 2019).

É importante destacar que, para matérias-primas com alto teor de sólidos, a hidrólise constitui a etapa limitante da taxa do processo. Já para substratos altamente solúveis, a etapa limitante é a metanogênese. Os processos anaeróbicos desviam cerca de 14% da energia disponível para o crescimento microbiano (10% para bactérias fermentativas e 4% para arqueias metanogênicas), enquanto a maior parte da energia (aproximadamente 86%) é retida no produto final, o  $CH_4$  (SURENDRA *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2020).

## 2.5 BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Os micro-organismos provenientes de diversos habitats produzem naturalmente uma ampla gama de compostos bioativos utilizados na produção de combustíveis, medicamentos e outros produtos químicos de relevância industrial. Eles têm se destacado na produção de biocombustíveis por meio da biossíntese de enzimas que atuam sobre diferentes matérias-primas em variados processos (AHMED *et al.*, 2018; TAHA *et al.*, 2016).

Grande parte das estratégias de conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis requer a despolimerização de polissacarídeos, catalisada pela ação de enzimas específicas. No entanto, um dos principais entraves para o estabelecimento de uma indústria de biocombustíveis lignocelulósicos economicamente viável é o elevado custo dessas enzimas (ADEGBOYE *et al.*, 2021).

Estudos demonstram que as enzimas lignocelulolíticas constituem um amplo grupo de proteínas extracelulares, composto por hidrolases, como celulases, hemicelulases, mananases e pectinases, e por enzimas ligninolíticas, incluindo lacases, peroxidases e oxidases. Outras enzimas, como quitinases, proteases e amilases, também podem estar associadas à degradação de biomassa (ADEGBOYE *et al.*, 2021). Para a produção eficiente de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos, é essencial a seleção de uma cepa microbiana fermentativa adequada, capaz de metabolizar completamente as frações de açúcares (hexoses e pentoses) liberadas no pré-tratamento e de tolerar a presença de compostos inibitórios (BILAL *et al.*, 2020).

Entretanto, a maioria dos micro-organismos fermentativos apresenta dificuldades em metabolizar açúcares de cinco carbonos. Além disso, aqueles que conseguem utilizá-los são frequentemente inibidos tanto pelos subprodutos gerados quanto pela acumulação de produtos finais (KIM *et al.*, 2013). Entre os micro-organismos fermentadores de etanol, *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae* são amplamente reconhecidos pela capacidade de converter sacarose e hexoses em etanol, embora o acúmulo de produtos finais limite seu crescimento (MOYSÉS *et al.*, 2016). De forma semelhante, cepas fermentadoras de pentoses, como *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*, sofrem inibição devido à presença de subprodutos. Os fungos filamentosos, por sua vez, apresentam maior tolerância a compostos inibitórios; contudo, sua baixa produtividade e o tempo prolongado de

fermentação reduzem seu potencial para aplicações industriais em biocombustíveis (MANKAR *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2022).

A cepa ideal para a produção de biocombustíveis pode ser natural ou geneticamente modificada para expressar genes relacionados à síntese eficiente de enzimas que favoreçam a conversão da biomassa lignocelulósica. Entre as características desejáveis estão: rápido crescimento celular, elevada eficiência na síntese enzimática em hidrolisados, alta tolerância a inibidores e a produtos finais, capacidade de metabolizar tanto hexoses quanto pentoses, além da resistência a condições adversas, como baixo pH e temperaturas elevadas (LI *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2022).

### 2.5.1 Fungos filamentosos do solo e Serrapilheira

Os fungos saprófitos do solo desempenham papéis cruciais nos ecossistemas, como a decomposição da matéria orgânica e a agregação do solo. A compreensão dessas funções requer uma abordagem baseada em características funcionais, com destaque para a taxa de crescimento e para o repertório enzimático desses organismos (ZHENG *et al.*, 2020). A taxa de crescimento reflete a rapidez com que os fungos exploram e consomem substratos, enquanto o repertório enzimático indica sua capacidade de degradar diferentes tipos de compostos. Embora modelos teóricos sugiram uma compensação entre essas duas características, ainda não há evidências experimentais conclusivas que confirmem tal relação (EICHLEROVÁ *et al.*, 2015; CROWTHER *et al.*, 2019).

Estudos iniciais com fungos ectomicorrízicos sugerem uma possível relação entre a produção enzimática e a competitividade na exploração de recursos (MOELLER *et al.*, 2016). Por exemplo, fungos que não produzem enzimas como as fenoloxidasas tendem a explorar fontes de carbono mais facilmente disponíveis em longas distâncias, o que pode indicar uma adaptação evolutiva às condições do solo e à disponibilidade de nutrientes. Entretanto, ainda são necessários estudos mais específicos para testar diretamente essas hipóteses em diferentes grupos de fungos do solo (ZHENG *et al.*, 2020).

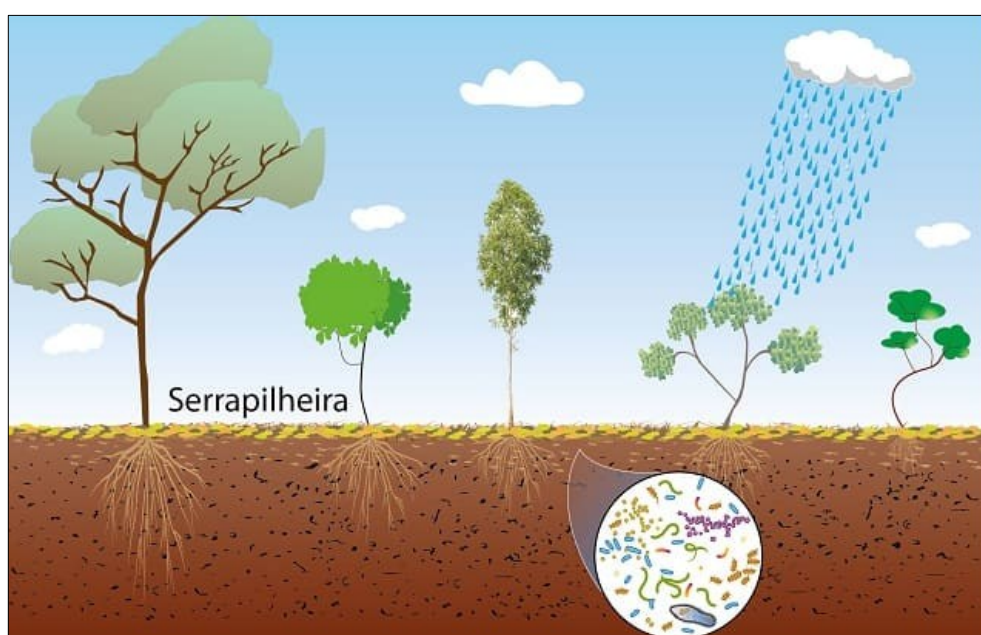
Esses micro-organismos apresentam capacidade de secretar diversas enzimas extracelulares, como lacases e celobiohidrolases, envolvidas na degradação de lignina, celulose, aminoácidos e compostos contendo fósforo. Dessa forma, exercem funções essenciais nos

ciclos do carbono, nitrogênio e fósforo, contribuindo para a dinâmica da matéria orgânica no solo (EICHLEROVÁ *et al.*, 2015; LEHMANN *et al.*, 2019; LEHMANN *et al.*, 2020).

Apesar de seu grande potencial, a aplicação industrial dos sistemas enzimáticos fúngicos ainda enfrenta desafios, como o alto custo e a complexidade da produção em larga escala. Avanços em biotecnologia, como a edição gênica e o uso de consórcios fúngicos, vêm abrindo novas perspectivas para a utilização de fungos lignocelulolíticos na produção sustentável de energia e de produtos derivados da biomassa (SAINI & SHARMA, 2021).

A serrapilheira corresponde à camada de matéria orgânica formada por folhas, galhos, frutos e outros resíduos vegetais que se acumula no solo em ecossistemas naturais e cultivados (Figura 8) (SILVA *et al.*, 2011). Essa camada é fundamental para a ciclagem de nutrientes, liberando elementos essenciais como nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio durante a decomposição, os quais são reabsorvidos pelas plantas e mantêm a fertilidade do solo e o equilíbrio ecológico. Além disso, a serrapilheira protege o solo contra a erosão, melhora a retenção de umidade e regula a temperatura. Em sistemas agroflorestais, desempenha papel relevante ao promover uma ciclagem de nutrientes mais eficiente do que em sistemas agrícolas convencionais, favorecendo a sustentabilidade e a produtividade (AGUIAR *et al.*, 2011).

**Figura 8** – Serrapilheira: camada de matéria orgânica acumulada no solo



Fonte: MONDO, 2023.

A decomposição da serrapilheira é um processo dinâmico que varia em função do clima, da vegetação e da fauna associada. Esse processo é fundamental para o funcionamento dos ecossistemas, especialmente em solos de baixa fertilidade, como os de regiões semiáridas, onde a serrapilheira exerce papel crucial na manutenção da qualidade edáfica e no aporte contínuo de matéria orgânica (OLIVEIRA *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019).

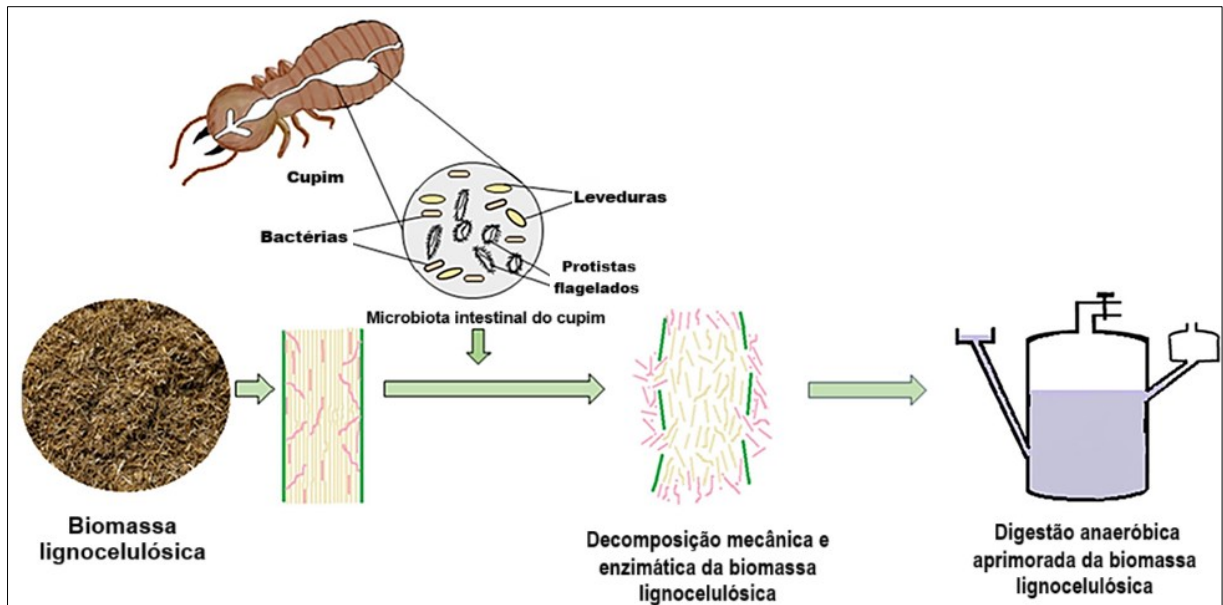
Os fungos do solo, além de sua relevância para a identificação taxonômica das espécies, constituem objeto de estudo importante por revelarem processos metabólicos associados à decomposição da matéria orgânica. Esses processos apresentam grande potencial para aplicações biotecnológicas, além de contribuírem para a compreensão das interações ecológicas nos ecossistemas (SILVA *et al.*, 2011).

### 2.5.2 Bactérias de cupins e degradação de biomassa

Os cupins são decompositores fundamentais nos ecossistemas, particularmente eficientes na degradação da biomassa lignocelulósica. Essa capacidade depende de uma simbiose complexa entre o inseto e micro-organismos presentes em seu intestino, incluindo bactérias, arqueias e protistas, que permitem a digestão eficiente de materiais vegetais, tornando os cupins agentes essenciais no ciclo global do carbono (YADAV *et al.*, 2024).

Nos cupins inferiores, predominam protistas flagelados em associação com bactérias, enquanto os cupins superiores dependem principalmente da atividade bacteriana para a degradação da lignocelulose. As comunidades microbianas intestinais produzem enzimas como celulasas, xilanases e ligninolíticas, que atuam na decomposição da madeira e de outros materiais vegetais (Figura 9) (BIGNELL *et al.*, 2011). Essas enzimas convertem biomassa complexa em compostos mais simples, como açúcares, que servem de fonte energética para os cupins. Além disso, as interações simbióticas no intestino contribuem para a produção de metano, influenciando as emissões globais desse gás de efeito estufa. Por outro lado, esse sistema digestivo natural apresenta grande potencial para aplicações em biotecnologia e soluções energéticas sustentáveis (ENAGBONMA & BABALOLA, 2019).

**Figura 9** – Micro-organismos provenientes de cupins no pré-tratamento de biomassa



Fonte: BHUJBAL *et al.* 2021.

A microbiota intestinal dos cupins tem recebido crescente atenção pelo seu potencial na produção de biocombustíveis, em especial no aprimoramento da digestão anaeróbica de resíduos lignocelulósicos. Esses micro-organismos mostraram-se capazes de aumentar os rendimentos de biogás e de promover a degradação da biomassa de forma mais eficiente do que muitos métodos convencionais (BHUJBAL *et al.*, 2021; YADAV *et al.*, 2024). Pesquisas futuras poderão ampliar o uso desses microrganismos intestinais na conversão de resíduos em bioenergia (Tabela 4).

A densidade bacteriana simbiótica no intestino de cupins pode atingir entre  $10^9$  e  $10^{11}$  UFC/mL (ZHOU *et al.*, 2019). Esses simbioses têm sido identificados por meio da análise de sequências do gene 16S rRNA, sendo classificados principalmente nos filos *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fibrobacteres*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Elusimicrobia*. Entre eles, os *Spirochaetes* são frequentemente relatados como predominantes em análises metagenômicas (LIU *et al.*, 2019).

**Tabela 4** – Cepas bacterianas de intestino de cupins e suas enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica

Cupim	Espécies de Bactérias	Funções das cepas bacterianas	Referências
<i>Reticulitermes santonensi</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Xilanase (endoxilanase)	TARAYRE <i>et al.</i> , 2013.
<i>Heterotermes indicola</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> HI08 <i>Paenibacillus lactis</i> <i>Lysinibacillus macrolides</i>	Celulase	AFZAL <i>et al.</i> , 2019.
<i>Psammotermes hypostoma</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Lysinibacillus fusiformis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Lysinibacillus</i> sp.	Produção de carboximetilcelulase	ALI <i>et al.</i> , 2019.
<i>Coptotermes curvignathus</i>	<i>Bacillus</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp	Produção de enzimas ligninolíticas como peroxidase de manganês, lacase e peroxidase de lignina	AYERONFE <i>et al.</i> , 2019.
<i>Anacanthotermes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. CF96	Produção de b-1,4-glucanase (enzima que apresenta características bifuncionais tanto endo quanto exoglucanase atividade)	JVAHERIKER MANI & ASOODEH, 2019.
<i>Cryptotermes brevis</i>	<i>Bacillus</i> sp. BMP01 <i>Ochrobactrum oryzae</i> BMP03	Produção de xilanase e carboximetilcelulase; Produção de enzimas ligninolíticas como lacase e lignina peroxidase	TSEGAYE <i>et al.</i> , 2019.
Termitidae	<i>Paenibacillus macerans</i> IIPSP3	Produção de xilanase termoestável	DHEERAN <i>et al.</i> , 2012.
<i>Microtermes pakistanicus</i>	<i>Pseudocitrobacter anthropi</i> MP-4	Produção de enzimas ligninolíticas como lacase e lignina peroxidase	LI <i>et al.</i> , 2019.
<i>Bulbitermes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. B1 <i>Bacillus</i> sp. B2 <i>Brevibacillus</i> sp. Br3	Produção de enzimas lignocelulolíticas como endoglucanase, exoglucanase, b-glucosidase, xilanase, lignina peroxidase, manganês peroxidase, e lacas	KAMSANI <i>et al.</i> , 2016.

Fonte: Adaptado de BHUJBAL *et al.* 2021

A diversidade microbiana do intestino dos cupins é considerada uma das mais complexas do reino animal, fornecendo vantagem ecológica para a digestão da lignocelulose. Embora esses insetos sejam mais eficientes que os ruminantes na degradação desse material, seu potencial biotecnológico para a produção de bioetanol e biogás ainda não foi plenamente explorado (BHUJBAL *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2019).

## 2.6 TAXONOMIA POLIFÁSICA DE MICRO-ORGANISMOS

A diversidade microbiana é um elemento fundamental para a vida na Terra, refletindo a notável capacidade dos micro-organismos de evoluir e se adaptar a diferentes nichos ecológicos. Esses organismos desempenham funções essenciais, desde a regulação de ciclos biogeoquímicos até a influência direta na saúde de organismos multicelulares (SHU; HUANG, 2022). O avanço das tecnologias de sequenciamento de alta performance tem impulsionado a exploração dessa diversidade, revelando ecossistemas microbianos vastos e complexos, abrangendo múltiplas funções e adaptações (GIBBONS; GILBERT, 2015; FUKU *et al.*, 2021).

A quantificação da diversidade microbiana é frequentemente realizada por meio das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), que agrupam sequências genéticas com base na similaridade. Entretanto, métodos de maior resolução têm permitido identificar padrões mais refinados (EREN *et al.*, 2014; CHIARELLO *et al.*, 2021). Fatores ambientais, como salinidade, pH e condições físico-químicas, influenciam diretamente a estrutura das comunidades microbianas, cuja diversidade impacta ecossistemas globais, contribuindo para a regulação climática e para a saúde humana. O estudo dessa diversidade tem revolucionado áreas como medicina, agricultura, biotecnologia e engenharia ambiental, além de abrir perspectivas para a exploração espacial (PHILIPPOT *et al.*, 2013; SUMAN *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a avaliação da diversidade alfa, que envolve a riqueza de espécies, a equitabilidade de abundâncias e, em alguns casos, componentes filogenéticos, tem se tornado ferramenta indispensável para compreender a complexidade das comunidades microbianas. Novas abordagens propõem o uso integrado de índices de riqueza (Chao1, OTUs/ASVs observados), diversidade (Shannon, Simpson) e diversidade filogenética (Faith's PD), possibilitando análises mais robustas e menos enviesadas (CASSOL *et al.*, 2025). Além disso, estudos recentes têm expandido a noção de diversidade alfa para além da taxonomia, incluindo a diversidade funcional, baseada na variabilidade de genes codificadores de proteínas, o que permite relacionar a composição das comunidades com o potencial metabólico e adaptativo (FINN, 2024; FAN *et al.*, 2025).

A taxonomia polifásica é a abordagem mais utilizada para a classificação microbiana, combinando características fenotípicas, genotípicas e quimiotaxonômicas. Ao longo do tempo, incorporou avanços como a análise do gene 16S rRNA, essencial para estabelecer relações filogenéticas entre procariontes, e a aplicação de técnicas de fingerprinting

molecular. Com o advento do sequenciamento de genoma completo (WGS), essa abordagem tornou-se ainda mais robusta, permitindo comparações genômicas detalhadas e a descrição de novas espécies (RAINA *et al.*, 2019). A consolidação de diretrizes internacionais e o desenvolvimento de plataformas automatizadas de análise genômica, como o AutoMLST2, têm reforçado a aplicação da taxonomia polifásica, ao mesmo tempo em que demonstram sua relevância para a identificação de novas espécies e compreensão da diversidade microbiana global (JIAO *et al.*, 2024; POURMOHSENIN *et al.*, 2025; NOUIOUI *et al.*, 2025).

A avaliação morfológica das colônias continua sendo uma ferramenta importante para compreender a diversidade bacteriana e suas adaptações, com implicações relevantes na microbiologia clínica e no manejo de infecções (SOUSA *et al.*, 2013). No caso dos fungos, a morfologia também desempenha papel crucial na adaptação e na eficiência em processos biotecnológicos. Em fungos filamentosos, por exemplo, a estrutura pode variar entre micélio disperso e pellets, o que influencia diretamente a transferência de oxigênio e nutrientes, bem como a produção de metabólitos de interesse industrial. Assim, métodos morfológicos constituem etapa preliminar essencial antes da implementação de técnicas de sequenciamento (ZAFRA *et al.*, 2015; HUTH *et al.*, 2017).

O sequenciamento de DNA revolucionou a identificação e caracterização de micro-organismos, permitindo análises precisas da diversidade genética e da evolução. Técnicas como o sequenciamento do gene 16S rRNA para bactérias e 18S para fungos possibilitam a distinção de espécies com alta confiabilidade, superando as limitações de métodos fenotípicos (SABAT *et al.*, 2017). Abordagens mais abrangentes, como o WGS, fornecem uma visão detalhada da genética microbiana e são fundamentais em estudos de epidemiologia, resistência antimicrobiana e aplicações biotecnológicas. Além disso, a possibilidade de identificar micro-organismos diretamente em amostras ambientais ou clínicas, sem necessidade de cultivo, consolidou o sequenciamento como ferramenta poderosa para o diagnóstico de infecções e o monitoramento de comunidades microbianas (FRANCO-DUARTE *et al.*, 2019).

Entre as técnicas modernas, a espectrometria de massas MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) revolucionou a microbiologia ao permitir a identificação rápida e precisa de micro-organismos com base em perfis proteicos. O método utiliza ionização a laser para detectar proteínas ribossômicas e gerar espectros específicos para cada cepa, posteriormente comparados a bancos de dados de referência (ASHFAQ *et al.*, 2022). Desde sua introdução, tem sido amplamente

aplicada na identificação de bactérias e fungos, substituindo métodos convencionais por sua rapidez, custo-efetividade e confiabilidade (KOSTRZEWA *et al.*, 2013). Contudo, desafios permanecem, incluindo interferências espectrais e limitações na identificação de fungos filamentosos, que demandam aprimoramento na preparação de amostras e na ampliação dos bancos de dados (BECKER *et al.*, 2014; FISSEL *et al.*, 2022).

Apesar dessas restrições, o MALDI-TOF MS consolidou-se como ferramenta essencial em laboratórios clínicos, reduzindo significativamente o tempo de identificação e aumentando a eficácia diagnóstica (BISWAS; ROLAIN, 2013). Sua aplicação em fungos continua em expansão, embora a variabilidade morfológica e a rigidez da parede celular ainda representem obstáculos (WILKENDORF *et al.*, 2020).

Outra abordagem promissora é a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizada em plataformas como o sistema IR Biotyper®. Essa técnica baseia-se na absorção de luz infravermelha por carboidratos, lipídios e proteínas celulares, gerando espectros específicos que permitem a tipagem rápida de micro-organismos em nível de espécie ou subespécie (VATANSHENASSAN *et al.*, 2020). Suas aplicações incluem controle de qualidade, vigilância epidemiológica e monitoramento ambiental, destacando-se como alternativa econômica e de alto rendimento em relação ao WGS (NOVAIS *et al.*, 2019). Entretanto, sua precisão pode ser afetada por fatores como preparo da amostra, polimorfismos genéticos e heterogeneidade química dos polissacarídeos bacterianos, exigindo contínua otimização (SHI *et al.*, 2020; ZENDRI *et al.*, 2024).

Embora distintas, as técnicas MALDI-TOF MS e FTIR são complementares. Enquanto a primeira se sobressai na identificação rápida de espécies bacterianas e fúngicas com base em perfis proteicos, a segunda é particularmente eficaz na diferenciação de cepas e na análise metabólica. A integração dessas abordagens amplia a capacidade diagnóstica em laboratórios clínicos e ambientais, permitindo diagnósticos mais precisos e estratégias de controle mais eficazes (ASHFAQ *et al.*, 2022; PASCALE *et al.*, 2022).

## **3 CAPÍTULO II: PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR MICRO-ORGANISMOS PROVENIENTES DE FONTES ALTERNATIVAS**

### **3.1 RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

A produção de enzimas ligninolíticas por micro-organismos de fontes alternativas é de grande importância por seu potencial na degradação da biomassa lignocelulósica, permitindo a conversão de resíduos agrícolas, florestais e industriais em produtos de valor agregado, como biocombustíveis. Além de favorecer a economia circular ao reutilizar resíduos e reduzir impactos ambientais, a bioprospecção em ambientes pouco explorados amplia as chances de descoberta de novas enzimas com propriedades únicas, aplicáveis a setores como papel e celulose, têxtil e bioenergia, impulsionando a inovação tecnológica e promovendo soluções industriais mais eficientes e sustentáveis.

### **3.2 OBJETIVOS**

#### **3.2.1 Objetivo geral**

Investigar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solo de serrapilheira e de bactérias provenientes do intestino de cupins, com ênfase na produção de enzimas ligninolíticas e celulolíticas, visando a degradação de biomassa lignocelulósica e a geração de açúcares fermentáveis, de modo a contribuir para o desenvolvimento de processos sustentáveis em bioenergia e aplicações industriais diversas.

#### **3.2.2 Objetivos específicos**

- Coletar amostras de solo de serrapilheira do refúgio biológico de Foz do Iguaçu e isolar fungos filamentosos;
- Coletar cupins de madeira e isolar bactérias provenientes do intestino;

- Realizar triagens enzimáticas para produção das enzimas celulases e ligninases, a partir dos fungos filamentosos e bactérias isolados;
- Avaliar a produção das enzimas lignolíticas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase), xilanase e celulase, a partir dos fungos filamentosos e bactérias selecionados nos ensaios de triagem enzimática;
- Analisar a produção de açúcares redutores por linhagens de *Talaromyces mycothecae* e *Rossellomorea marisflavi*.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Obtenção das amostras

As amostras de solo de serrapilheira, para posterior obtenção dos fungos filamentosos, foram coletadas em 10 de fevereiro de 2021 no Refúgio Biológico Bela Vista, localizado na Itaipu Binacional (Av. Tancredo Neves, 6702-07 – Jardim Itaipu, Foz do Iguaçu – PR, 85856-970). Já os cupins, para posterior obtenção das bactérias, *Nasutitermes* sp., foram coletados vivos em 26 de agosto de 2021, diretamente de um ninho presente em restos de madeira, em uma residência situada no bairro Jardim Universitário, Foz do Iguaçu – PR (CEP 85869-200).

##### 3.3.1.1 Coleta de solo de serrapilheira e isolamento dos fungos filamentosos

Foram selecionados quatro pontos distintos na superfície do solo para a coleta (Figura 10). As amostras de solo da camada de serrapilheira foram coletadas sob técnica asséptica, usando luvas, espátula estéril e frascos de vidro de boca larga também estéreis. Em cada ponto, após a remoção cuidadosa de detritos grosseiros, coletaram-se aproximadamente 100–200 g da interface serrapilheira–solo (0–5 cm) com espátula estéril e transferiram-se imediatamente para frascos estéreis, que foram vedados e transportados (NARESH *et al.*, 2019). As amostras foram transportadas em temperatura ambiente para o Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA, onde foram armazenadas a 4 °C por um período de 24 horas, até o início do processamento.

**Figura 10** – Local de coleta do solo de serrapilheira em Foz do Iguaçu



a) Foto do primeiro ponto de coleta de solo; b) Mapa indicado com o ponto de coleta do solo de serrapilheira do Refúgio Biológico Bela Vista (Foz do Iguaçu – PR), nas coordenadas -25.448791, -54.556537.

Fonte: A autora, 2025.

As amostras de solo foram submetidas a um processo de lavagem com 300 mL de água destilada estéril. O líquido resultante da lavagem, contendo pequenos fragmentos da massa lignocelulósica, foi utilizado para facilitar o isolamento de células fúngicas presentes no material (MELO *et al.*, 2017).

Para o isolamento dos fungos, alíquotas de 100  $\mu$ L de cada amostra foram submetidas a diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Essas diluições foram semeadas em meio de cultivo PDB (caldo batata-dextrose), preparado com 200 g de batata, 20 g de glicose e 1 L de água destilada, suplementado com 0,5% de carboximetilcelulose (CMC). As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. Após o período de incubação, as colônias que apresentaram características morfológicas distintas foram selecionadas e isoladas em novas placas contendo PDB a 10%. Essas colônias foram mantidas a 28 °C por mais 7 dias, visando ao crescimento e à estabilização dos isolados fúngicos (LEGODI *et al.*, 2019).

### 3.3.1.2 Isolamento de bactérias associadas ao intestino de cupins

Os cupins da espécie *Nasutitermes* sp. (Figura 11), identificados morfológicamente, foram coletados vivos em 26 de agosto de 2021, em uma residência localizada em Foz do Iguaçu – PR. A coleta foi realizada por meio da retirada de um fragmento da colônia com o auxílio de uma espátula, sendo os insetos transferidos para um frasco de vidro estéril, destinado ao transporte até o Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA.

Os cupins foram submetidos à esterilização superficial em etanol 70% (v/v) por 50 segundos, seguida de enxágue com água destilada estéril e secagem à temperatura ambiente por 1 minuto. Sob condições assépticas, o intestino dos cupins, incluindo a região abdominal, foi removido com o auxílio de pinças esterilizadas. O material intestinal foi então suspenso em 10 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v) para a obtenção da suspensão (AZIZI-SHOTORKHOFT *et al.*, 2016).

**Figura 11** – Cupins *Nasutitermes* sp. selecionados para isolamento de bactérias



Cupins *Nasutitermes* sp., em placas de Petri de vidro, no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA.

Fonte: A autora, 2025.

Um volume de 1 mL da suspensão obtida foi inoculado em 100 mL de meio de cultivo suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. O meio foi preparado com os seguintes componentes: 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3,5 g L<sup>-1</sup> de peptona, 2,0 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 1,0 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ajustado para pH 7,0. A mistura foi incubada a 37 °C, sob agitação de 150 rpm, por 24 horas.

Após a incubação, foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-7}$  da suspensão de cultura em água destilada estéril. Aliquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas pela técnica de espalhamento em superfície em placas contendo ágar nutriente (NB) para o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Colônias com morfologias distintas foram selecionadas e cultivadas em meio específico para bactérias (AZIZI-SHOTORKHOFT *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2023; PINTO *et al.*, 2017).

### 3.3.2 Cultivo dos micro-organismos em meio líquido para testes enzimáticos

As bactérias isoladas foram transferidas, utilizando alça de platina estéril, para frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultivo líquido nutriente (NB), composto por 3 g L<sup>-1</sup> de extrato de carne e 5 g L<sup>-1</sup> de peptona. Os frascos foram incubados sob agitação mecânica de 150 rpm, a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante rico em metabólitos extracelulares foi separado das células utilizando pipeta estéril (CHENG *et al.*, 2018).

Para o cultivo de fungos filamentosos, três fragmentos (1 × 1 cm) de micélio foram retirados de culturas recém-crescidas em meio sólido e inoculados em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL de meio de extrato de malte a 3%. Os frascos foram incubados sob agitação mecânica de 150 rpm, a 28 °C por 7 dias. Após o crescimento, as amostras foram filtradas a vácuo em membrana de 0,45 µm e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos, para completa separação das células. O sobrenadante rico em metabólitos extracelulares foi então coletado utilizando pipeta estéril (MENEZES *et al.*, 2017).

#### 3.3.2.1 Meio Mínimo Salino – Teste de produção de açúcares redutores

O meio mínimo salino foi preparado com os seguintes sais (mg L<sup>-1</sup>): nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) 600; nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) 1900; cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 600; sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 300; fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 170; cloreto de potássio (KCl) 300; e sulfato de manganês monoidratado (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 10 (KAO & MICHAYLUK, 1975).

### 3.3.3 Ensaio enzimáticos qualitativos

#### 3.3.3.1 *Produção de Ligninases com Guaiacol*

Os micro-organismos reativados foram submetidos a uma triagem inicial para detecção da produção de enzimas ligninolíticas, utilizando meios de cultura suplementados com guaiacol como indicador de atividade fenol-oxidase. As bactérias reativadas foram semeadas em meio sólido ágar nutriente (NA), acrescido de 425 µL de guaiacol 99%, e incubadas a 37 °C por 3 dias. O aparecimento de coloração marrom-escura no verso do meio foi considerado indicativo de atividade positiva para ligninases.

Para os fungos filamentosos, cubos de 1 cm de aresta contendo colônias fúngicas reativadas foram inoculados em placas de Petri com meio sólido PDA suplementado com 425 µL de guaiacol 99%. As placas foram incubadas a 28 °C por 14 dias, e a formação de halos escuros ao redor das colônias foi considerada indicativa de atividade positiva para ligninases (SUN *et al.*, 2017).

#### 3.3.3.2 *Produção de Celulases em CMC*

A triagem foi realizada utilizando o corante Vermelho Congo. Para a avaliação da produção de celulases, os isolados foram inicialmente cultivados em meios líquidos: NB (Peptona 5,0 g L<sup>-1</sup>; Extrato de carne 3,0 g L<sup>-1</sup>; NaCl 5,0 g L<sup>-1</sup>; Água destilada 1 L) para bactérias e PDB (200 g de batata, 20 g de glicose, 1 L de água destilada) para fungos.

Após o crescimento microbiano, preparou-se o meio sólido de triagem contendo (g L<sup>-1</sup>): sulfato de magnésio (0,2), cloreto de cálcio (0,02), fosfato monopotássico (1,0), fosfato dipotássico (1,0), sulfato de amônio (0,5), nitrato de sódio (0,5), extrato de levedura (0,6), ágar (15) e carboximetilcelulose (CMC) a 0,5%. As bactérias foram cultivadas em 5 mL de NB líquido por 24 h a 37 °C. Em seguida, alíquotas de 10 µL foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido com CMC, que foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Os fungos filamentosos, previamente cultivados em 10 mL de PDB a 28 °C por 7 dias, foram inoculados (10 µL) no centro de placas de Petri contendo meio sólido com CMC e incubados a 28 °C por 7 dias. Após a incubação, adicionaram-se 5 mL de corante

Vermelho Congo ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) às placas, que permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a solução foi descartada, e as culturas foram lavadas com 10 mL de solução de NaCl 1 M, aguardando-se mais 15 minutos para a visualização dos halos de descoloração. A atividade de celulase foi considerada positiva quando houve a formação de halos claros ao redor das colônias (TEATHER & WOOD, 1982).

### 3.3.4 Ensaio enzimáticos quantitativos

#### 3.3.4.1 *Lacase (LCC)*

A quantificação da produção de lacase foi realizada apenas com os isolados considerados positivos no item 3.3.3, por meio do método espectrofotométrico indireto utilizando ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) como substrato indicador de atividade fenol-oxidase.

Para os ensaios, foram preparados frascos Erlenmeyer em duplicata contendo 30 mL de meio de cultivo NA para as bactérias e extrato de malte 3% para os fungos filamentosos. As bactérias foram inoculadas a partir de colônias em meio sólido utilizando alça de platina estéril, e incubadas a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob agitação mecânica de 150 rpm, por 24 h. Os fungos filamentosos foram cultivados a partir de cubos de 1 cm de aresta contendo colônias ativas em meio sólido PDA, inoculados em meio líquido de extrato de malte 3% e incubados a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob agitação mecânica de 150 rpm, por 7 dias.

Após o crescimento, os extratos foram separados: as culturas bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min para coleta do sobrenadante, enquanto os fungos foram submetidos à filtração a vácuo em membranas de filtro de papel de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ , seguida de centrifugação a 5.000 rpm por 10 min, para completa separação celular. As reações enzimáticas foram realizadas em tubos de ensaio de 5 mL, contendo: 1,8 mL de extrato microbiano, 0,9 mL de tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 0,3 mL de solução de ABTS. A leitura da absorbância foi realizada a 420 nm imediatamente após a adição do ABTS e, novamente, após incubação por 10 min em estufa ( $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para fungos e  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para bactérias).

A atividade enzimática da lacase foi determinada espectrofotometricamente pelo aumento da absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma unidade de atividade (U)

foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto, sendo expressa em  $\text{U g}^{-1}$  de biomassa (BUSWELL *et al.*, 1995).

As reações foram conduzidas em triplicata, contendo: 0,6 mL de tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , 1,2 mL da solução enzimática de cada cultivo e 0,2 mL de ABTS, utilizando como controle negativo o meio de cultivo sem crescimento microbiano (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995). A atividade foi calculada conforme a equação de Baltierra-Trejo, Márquez-Benavides e Sánchez-Yáñez (2015):

$$UL = \frac{(\Delta A)(V_t)}{(t)(\epsilon)(V_s)} \times 10^6$$

**U** = atividade enzimática ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ );

**$\Delta A$**  = absorvância final – inicial;

**$V_t$**  = volume total da reação (mL);

**$V_s$**  = volume do extrato enzimático (mL);

**t** = tempo de reação (min);

**$\epsilon$**  = coeficiente de extinção molar ( $36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );

**$10^6$**  = fator de correção ( $\mu\text{mol/mol}$ ).

#### 3.3.4.2 *Lignina peroxidase (LnP)*

A atividade da lignina peroxidase foi determinada conforme a metodologia descrita por Arora & Gill (2001), baseada na oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico. A reação foi realizada em tubos de ensaio contendo: 1 mL de tampão tartarato de sódio (125 mM, pH 3), 500  $\mu\text{L}$  de álcool veratrílico (10 mM), 500  $\mu\text{L}$  de solução de peróxido de hidrogênio (2 mM) e 500  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. O início da reação foi marcado pela adição do peróxido de hidrogênio. A formação do aldeído veratrílico foi monitorada espectrofotometricamente pela leitura da absorvância a 310 nm, após 5 minutos de reação.

#### 3.3.4.3 Manganês peroxidase (MnP)

A atividade de manganês peroxidase (MnP) foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol na presença de manganês e peróxido de hidrogênio, conforme Silva *et al.* (2014). A mistura reacional foi composta por: 0,5 mL de extrato enzimático, 0,1 mL de vermelho de fenol (0,01%), 0,1 mL de lactato de sódio (0,25 M), 0,2 mL de albumina bovina (0,5%), 50 µL de MnSO<sub>4</sub> (2 mM) e 50 µL de peróxido de hidrogênio (2 mM), em tampão succinato de sódio (20 mM, pH 4,5). As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e monitoradas espectrofotometricamente a 610 nm. A reação foi interrompida pela adição de 40 µL de NaOH (2 M), seguida de nova leitura espectrofotométrica para quantificação da atividade enzimática.

#### 3.3.4.4 Produção de celulase

A quantificação da produção de celulase foi realizada utilizando o kit Azo-CM-Cellulase, com os isolados considerados positivos no item 3.4.1. Os isolados foram cultivados novamente em meios líquidos específicos (NB para bactérias e PDB para fungos), repetindo-se o processo de obtenção dos extratos enzimáticos descrito no item 3.2. O crescimento celular foi conduzido a 37 °C por 24 h (bactérias) e a 28 °C por 5 dias (fungos), ambos sob agitação de 150 rpm.

Após a obtenção dos extratos, a atividade da celulase foi avaliada com Azo-CM-Cellulose (Assay of endo-1,4-β-Glucanase using AZO-CMCELLULOSE, Megazyme, Bray, Irlanda), de acordo com as instruções do fabricante, com modificações. Para cada reação, foram misturados 20 µL de extrato microbiano com 20 µL de solução de Azo-CM-Cellulose 2% em tampão McIlvaine 2× (McIlvaine, 1921).

As reações foram incubadas, interrompidas conforme protocolo do kit, e em seguida centrifugadas a 16.000 g por 1 min. Foram coletados 100 µL do sobrenadante, cuja absorbância foi medida a 600 nm em espectrofotômetro. A atividade enzimática foi então calculada segundo o método descrito pela Megazyme (2011).

#### 3.3.4.5 Produção de xilanase

A produção de xilanase foi determinada de acordo com o protocolo do fabricante (Assay of endo-1,4- $\beta$ -Xylanase using AZO-XYLAN Birchwood, Megazyme, Bray, Irlanda), com modificações. Inicialmente, 0,5 mL da amostra enzimática tamponada e pré-equilibrada a 40 °C foi adicionada a 0,5 mL de substrato Azo-Xylan de madeira de bétula (1% p/v), sendo a mistura homogeneizada vigorosamente. Em seguida, a solução foi incubada em banho-maria a 40 °C por 10 min.

Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de etanol 95% (v/v), sob agitação vigorosa, o que promoveu a precipitação do substrato não hidrolisado. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 5 min, agitadas novamente e centrifugadas a 1.000 g ( $\approx$  3.000 rpm) por 10 min. O sobrenadante foi então transferido para cubetas de espectrofotômetro e a absorbância medida a 590 nm contra branco de água destilada. Para o branco de reação, 2,5 mL de etanol (95% v/v) foi adicionado a 0,5 mL da solução de substrato (1% p/v) sob agitação, seguido da adição de 0,5 mL da solução enzimática e nova homogeneização por 10 s.

A atividade enzimática foi calculada em relação a uma curva padrão ou por meio do software MegaCalc™ (Megazyme, 2011), sendo definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de D-xilose por minuto a 40 °C, em pH 4,5 ou 6,0.

#### 3.3.5 Produção de açúcares redutores por *Talaromyces mycothecae* BR04; BR15; SG3,6 e *Rossellomorea marisflavi* CPM1; CPM2

O experimento foi conduzido em triplicata, utilizando metodologia adaptada de Ghose (1987), para avaliar a produção de açúcares redutores por fungos filamentosos e bactérias, tendo o papel de filtro como única fonte de carbono. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 100 mL, cada um contendo 30 mL de meio mínimo estéril. Como fonte exclusiva de carbono, adicionou-se uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1,0  $\times$  6,0 cm; 50 mg), previamente autoclavada a 121 °C por 15 min. Durante o ensaio, foram retiradas alíquotas de 1 mL a cada 24 h, por um período de 7 dias consecutivos, para análise da liberação de açúcares redutores.

### 3.3.5.1 *Preparação do reagente DNS*

O método baseia-se na oxidação do grupo aldeído dos açúcares redutores e na simultânea redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. O produto reduzido apresenta coloração avermelhada, com absorvância máxima a 540 nm, permitindo a quantificação dos açúcares redutores por espectrofotometria. O reagente DNS foi preparado da seguinte forma:

- 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico (Acros Organics) foram dissolvidos em 250 mL de água destilada, aquecida a 80 °C;
- Após resfriamento da solução até temperatura ambiente, foram adicionados 100 mL de NaOH 2 N (Sigma) e 150 g de tartarato de sódio tetrahidratado (Merck);
- O volume foi completado com água destilada até 500 mL.

Devido à sua fotossensibilidade, a solução foi armazenada em recipiente protegido com papel alumínio e mantida sob refrigeração a 5 °C, por até 2 dias (GONÇALVES *et al.*, 2010)

### 3.3.5.2 *Procedimento de estimativa de açúcar redutor*

A metodologia foi adaptada de Deshavath *et al.* (2020). O ensaio DNS foi realizado adicionando-se 100 µL de amostra a tubos Eppendorf de 0,5 mL, seguidos da adição de 100 µL do reagente DNS. As misturas reacionais foram aquecidas em termociclador a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriadas em banho de gelo por 10 min para interrupção da reação. A absorvância foi medida a 540 nm em leitor modular de placas de microtitulação. O controle em branco foi preparado substituindo a amostra por 1 mL de água destilada.

### 3.3.5.3 Preparo da curva analítica

Para a obtenção da curva analítica, foi preparada uma solução padrão de glicose a  $4 \text{ g L}^{-1}$ , a partir da qual foram realizadas diluições seriadas até a concentração final de  $0,062 \text{ g L}^{-1}$  (Apêndice A).

Em tubos Eppendorf de 0,5 mL, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução DNS e 100  $\mu\text{L}$  de cada solução padrão de glicose. Os tubos foram então agitados, aquecidos a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min e resfriados em banho de gelo. Após a reação, cada solução foi transferida para poços de uma placa de microtitulação, e a absorbância foi medida a 540 nm em leitor modular de placas (MILLER, 1959; ZERAIK *et al.*, 2008). Os valores obtidos e a curva de calibração encontram-se no Apêndice A. A partir da curva, foi determinada a equação da reta, expressa como:

$$y = aX + b$$

onde  $y$  representa a absorbância,  $X$  a concentração de açúcares redutores (mg/mL), e  $a$  e  $b$  são os coeficientes obtidos por regressão linear.

### 3.3.5.4 Cálculo da Concentração de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada pela substituição dos valores de absorbância na equação da reta ( $y = aX + b$ ). Os resultados foram expressos em mg/mL de açúcares redutores (MILLER, 1959). A quantidade total de açúcares redutores (mg) produzidos ao longo do tempo foi calculada multiplicando-se a concentração de açúcares redutores (mg/mL) pelo volume total do meio de cultivo (30 mL). Para determinar a produção diária, a quantidade total de açúcares redutores do dia anterior foi subtraída da quantidade total obtida no dia atual (GHOSE, 1987).

### 3.3.5.5 *Análises estatísticas*

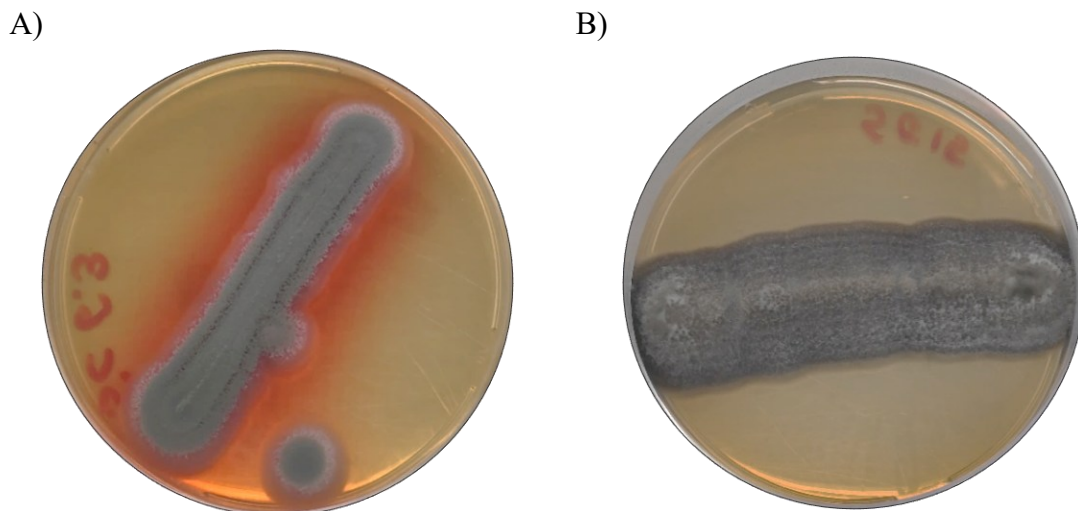
Os dados obtidos de produção acumulada de biogás foram organizados em triplicata e expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por meio de análise de variância de uma via (ANOVA), considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Em caso de significância, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey (HSD) para identificar diferenças entre os grupos. Todas as análises foram realizadas em ambiente Python, utilizando o pacote Statsmodels, adequado para análises estatísticas em experimentos biológicos (MOORE, 2025). Os resultados estatísticos tabulados encontram-se no APÊNDICE D.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Isolamento de fungos filamentosos de serrapilheira

A partir das amostras de solo de serrapilheira coletadas no Refúgio Biológico Bela Vista, localizado nas dependências da Itaipu Binacional, foram recuperados 40 isolados de fungos filamentosos. As amostras foram triadas com base nas características morfológicas das colônias, priorizando aquelas com morfologias distintas (Figura 12). Após a triagem, 28 isolados foram selecionados para estudos posteriores e avaliados quanto à produção de ligninases e celulases, enzimas de interesse biotecnológico.

**Figura 12** – Fungos filamentosos isolados do solo de serrapilheira



A e B: Fungos isolados do solo de serrapilheira com características de colônias diferentes (SC6.3 *Talaromyces mycothecae*; SG12 *Aspergillus tubingensis*).

Fonte: A autora, 2025.

O isolamento de fungos filamentosos a partir de serrapilheira é fundamental para o estudo da diversidade micológica e para a compreensão dos processos de decomposição da matéria orgânica em ecossistemas florestais (Rodrigues *et al.*, 2020). No Brasil, pesquisas em ambientes de serrapilheira têm revelado elevada diversidade desses fungos, com predominância dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Paecilomyces*. Por exemplo, Fraga e Pereira (2012) isolaram 87 fungos, pertencentes a quatro gêneros e 22 espécies distintas, em amostras oriundas da Mata Atlântica brasileira.

Nos últimos anos, técnicas moleculares, como abordagens metagenômicas e o sequenciamento de alto desempenho da região ITS2 do rDNA, têm complementado as metodologias tradicionais, oferecendo uma visão mais abrangente da diversidade fúngica. Yamauchi *et al.* (2021) demonstraram que a composição das comunidades fúngicas em solos do sudeste brasileiro é fortemente influenciada pela cobertura vegetal e pelos teores de matéria orgânica. Além disso, métodos especializados vêm sendo desenvolvidos para o isolamento de grupos funcionais específicos. Sun *et al.* (2020), por exemplo, utilizaram meios seletivos para identificar fungos celulolíticos com alta capacidade de degradação de holocelulose em substratos de serrapilheira florestal, evidenciando o potencial desses micro-organismos.

Os resultados deste estudo reforçam a elevada diversidade de fungos filamentosos em solos de serrapilheira. A identificação de linhagens com potencial enzimático relevante confirma que, além de sua contribuição ecológica para a ciclagem de nutrientes e manutenção da fertilidade do solo, esses micro-organismos representam uma fonte promissora para o desenvolvimento de processos biotecnológicos voltados à valorização de resíduos lignocelulósicos.

#### 3.4.2 Isolamento de bactérias do intestino de cupins

A partir das amostras de cupins *Nasutitermes* sp., foram isoladas nove bactérias, selecionadas em placas de Petri com base em suas diferenças morfológicas, priorizando colônias com aspectos distintos entre si. *Nasutitermes* sp., conhecidos popularmente como “conehead”, constituem um gênero amplamente distribuído nas regiões tropicais das Américas e do Caribe. Esses cupins são considerados invasores devido à elevada capacidade de adaptação e colonização, favorecida pela reprodução acelerada, pela formação de colônias ocultas nos estágios iniciais e pela ampla variedade de substratos que compõem sua dieta (THORNE, 2024).

No gênero *Nasutitermes*, a degradação de celulose está fortemente associada a bactérias simbióticas presentes no intestino, particularmente aderidas às partículas de madeira. Estudos mostram que grande parte da atividade celulolítica ocorre no intestino posterior, diretamente sobre as fibras ingeridas, evidenciando a especialização funcional das comunidades bacterianas (SALGADO *et al.*, 2024). Além disso, análises metagenômicas confirmam que o


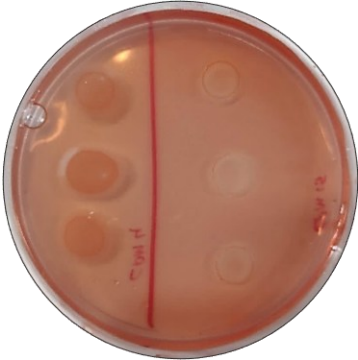
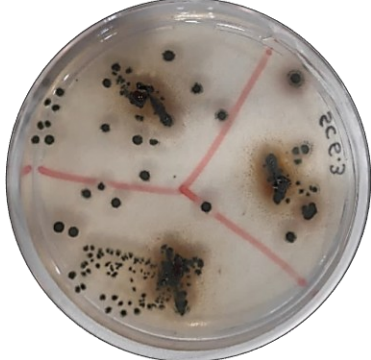
trato digestivo de cupins atua como um verdadeiro biorreator natural, abrigando micro-organismos capazes de produzir um arsenal enzimático direcionado à degradação eficiente da lignocelulose (ENAGBONMA *et al.*, 2025). Esse potencial biotecnológico abre perspectivas promissoras para a utilização de bactérias simbiotes de cupins no desenvolvimento de processos sustentáveis, incluindo a conversão de resíduos lignocelulósicos em produtos de valor agregado e a otimização de bioprocessos industriais de baixo custo e impacto ambiental.

### 3.4.3 Ensaio enzimáticos qualitativos

Neste estudo, os 28 fungos e as 9 bactérias isoladas foram submetidos a triagens enzimáticas para avaliar a produção qualitativa de celulasas e ligninasas. Para a triagem de celulasas, utilizou-se a carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. O CMC, um derivado solúvel da celulose, tem se mostrado um substrato eficaz para a identificação de micro-organismos celulolíticos (ZHAO *et al.*, 2021). A formação de halos transparentes no meio contendo CMC indicou a hidrólise do substrato, confirmando a presença de atividade celulolítica.

A atividade de ligninasas foi avaliada na presença de guaiacol, um composto fenólico utilizado como indicador da atividade de lacases, enzimas multicobre envolvidas na oxidação de fenóis (JOSHI *et al.*, 2022). Os testes foram realizados em placas de Petri, e os halos resultantes foram utilizados como parâmetro para seleção dos micro-organismos mais promissores (Tabela 5).

**Tabela 5** – Ensaio qualitativos com CMC e Guaiacol

Halos em CMC por fungos	Halos em CMC por bactérias de cupim	Fungo em placa com Guaiacol
A)	B)	C)
		
SG14	CPM15; CPM3	SC6.3

A) Halos em CMC por fungos filamentosos (*Coniochaeta velutina* SG14) usando Vermelho Congo; B) Halos em CMC por bactérias de cupim (*Bacillus amyloliquefaciens* CPM3; *Pseudomonas azotoformans* CPM15) usando Vermelho Congo; C) Coloração escura indicativa de ligninases na presença de Guaiacol pelo fungo (*Talaromyces mycothecae* SC6.3).

Fonte: A autora, 2025.

Nos ensaios com fungos, nove isolados foram selecionados com base na formação de halos enzimáticos em meio contendo CMC e na capacidade de produzir lacase em meio suplementado com guaiacol. Em contraste, todas as linhagens bacterianas testadas apresentaram halos em CMC, indicando atividade celulolítica, mas não demonstraram produção detectável de lacases. Assim, a utilização combinada de CMC e guaiacol mostrou-se eficaz como triagem inicial, permitindo distinguir produtores de celulases e lacases. Contudo, como ressaltado por BABINSKAS e MATIJOŠYTĖ (2025), os ensaios em placa com guaiacol apresentam limitações para detecção de lacases, sobretudo bacterianas, que podem requerer condições específicas de pH, temperatura e cofatores para expressão ideal da atividade.

Estudos prévios com fungos de solo de serrapilheira reforçam a aplicação do guaiacol como substrato para detecção de lacases, tanto em meios sólidos quanto em extratos enzimáticos (GRAMSS *et al.*, 1998; CRIQUET *et al.*, 1999; PUNDIR *et al.*, 2016). Para celulases, o método mais empregado é a coloração com vermelho congo em meio contendo CMC, permitindo visualizar halos de hidrólise e calcular índices enzimáticos (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004; SUN *et al.*, 2020), havendo ainda adaptações para maior sensibilidade (MELO *et al.*, 2018; ESCORIÇA *et al.*, 2021).

No caso das bactérias do intestino de cupins, há registros de produção de lacases detectadas com guaiacol, porém em testes mais sensíveis realizados por espectrofotometria (COY *et al.*, 2010; GENG *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2021). Já a atividade celulolítica identificada com CMC e revelada com vermelho congo em placas é amplamente relatada, sendo uma técnica comum em triagens iniciais de bactérias simbióticas de cupins (PERISTIWATI *et al.*, 2018; DAR *et al.*, 2022; ARFAH *et al.*, 2019).

#### 3.4.4 Ensaio enzimáticos quantitativos

Os ensaios realizados com fungos e bactérias evidenciaram diferentes potenciais enzimáticos entre os isolados analisados. Entre os fungos, destacou-se *Aspergillus versicolor* BR14, com maior produção de manganês peroxidase ( $716,97 \text{ U L}^{-1}$ ), enquanto *Talaromyces mycothecae* BR4 apresentou o melhor desempenho na produção de celulase ( $13,52 \text{ U mL}^{-1}$ ) e *T. mycothecae* SC6.3 foi o isolado com maior atividade de xilanase ( $64,24 \text{ U mL}^{-1}$ ). No grupo das bactérias, *Rosellomorea marisflavi* CPM2 foi a maior produtora de manganês peroxidase ( $1.737,27 \text{ U L}^{-1}$ ), *Priestia megaterium* CPM18 apresentou o maior valor de lignina peroxidase ( $1.863,80 \text{ U L}^{-1}$ ) e *Bacillus subtilis* CPM6 destacou-se na produção de celulase ( $12,68 \text{ U mL}^{-1}$ ). Os resultados de produção enzimática estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Estudos prévios confirmam o protagonismo de *Aspergillus* e *Penicillium* como produtores eficazes de celulases, amplamente explorados na biotecnologia para degradação de biomassa lignocelulósica (KUMAR *et al.*, 2021). De forma complementar, trabalhos recentes apontam o gênero *Talaromyces* como promissor na produção dessas enzimas (SILVA *et al.*, 2021). A comparação entre os grupos avaliados revelou que as bactérias isoladas do intestino de cupins apresentaram maior produção de enzimas ligninolíticas, enquanto os fungos provenientes da serrapilheira se destacaram na produção de celulases e, principalmente, xilanases, refletindo adaptações distintas aos seus ambientes de origem (NGALIMAT *et al.*, 2021).

**Tabela 6** – Análises de produção de enzimas pelos fungos isolados do solo de serrapilheira

Fungos Isolados		Triagem em placa		Análises em espectrofotômetro				
Código	Identificação	Ligninase (Guaiacol)	Celulase CMC	Lacase (ABTS) U/L <sup>-1</sup>	Lignina Peroxidase U/L <sup>-1</sup>	Manganês Peroxidase U/L <sup>-1</sup>	Celulase U/mL <sup>-1</sup>	Xilanase U/mL <sup>-1</sup>
SC6,3	<i>Talaromyces mycothecae</i>	+	+				9,09	64,24
BR4	<i>Talaromyces mycothecae</i>		+	0,001			13,51	39,42
BR15	<i>Talaromyces mycothecae</i>	+	+			523,93	4,83	9,53
BR14	<i>Aspergillus versicolor</i>		+		465,94	716,96	11,17	13,51
BG10	<i>Aspergillus hiratsukae</i>		+				5,35	19,69
SG12	<i>Aspergillus tubingensis</i>		+	0,002			8,05	20,53
BR19	<i>Aspergillus fumigatus</i>		+	0,019		1130,60	4,40	8,75
SG16	<i>Trichoderma</i> sp.		+				6,14	24,13
BC01	<i>Trichoderma</i> sp.		+				9,28	28,63

Os fungos filamentosos foram identificados em análises descritas no Capítulo III deste trabalho.

Fonte: A autora, 2025.

**Tabela 7** – Análises de produção de enzimas pelas bactérias isoladas do intestino de cupins

Bactérias Isoladas		Triagem em placa		Análises em espectrofotômetro				
Código	Identificação	Lacase Guaiacol	Celulase CMC	Lacase (ABTS) U/L <sup>-1</sup>	Lignina Peroxidase U/L <sup>-1</sup>	Manganês Peroxidase U/L <sup>-1</sup>	Celulase U/mL <sup>-1</sup>	Xilanase U/mL <sup>-1</sup>
CPM1	<i>Rossellomorea marisflavi</i>		+			319,87	11,30	7,92
CPM2	<i>Rossellomorea marisflavi</i>		+		501,79	1.737,27	4,66	4,00
CPM3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		+	0,156	1290,32	209,57	6,25	9,56
CPM6	<i>Bacillus subtilis</i>		+		1505,37		12,67	7,93
CPM8	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		+		1003,58	60,66	12,33	6,38
CPM13	<i>Bacillus cereus</i>		+		286,73	292,30	9,40	3,05
CPM15	<i>Pseudomonas azotoformans</i>		+			485,33	7,91	4,44
CPM16	<i>Bacillus subtilis</i>		+			237,15	3,80	2,25
CPM18	<i>Priestia megaterium</i>		+		1863,79	330,90	10,69	8,17

As bactérias foram identificadas em análises descritas no Capítulo III deste trabalho.

Fonte: A autora, 2025.

Entre os fungos, *T. mycothecae* SC6.3 se destacou pela elevada atividade xilanásica, superando valores previamente relatados para fungos de solo, como *Trichoderma viride* (22,37 U mL<sup>-1</sup>; OYEDEJI *et al.*, 2018) e *T. funiculosus* (SYRCHIN *et al.*, 2023). Este é o primeiro registro de *T. mycothecae* como produtora de enzimas ligninolíticas, espécie até então conhecida apenas pela síntese de extrólitos como duclauxina e rubropunctatina (BARBOSA *et al.*, 2018). Embora já existam relatos de produção de xilanases, β-xilosidases e outras enzimas termoestáveis em espécies do gênero (GOYARI *et al.*, 2015; ROMDHANE *et al.*, 2010; GUERFALI *et al.*, 2009), os resultados aqui obtidos ampliam o conhecimento sobre a diversidade metabólica de *T. mycothecae* e revelam seu potencial biotecnológico em processos de valorização de resíduos lignocelulósicos.

Na atividade celulolítica, destacaram-se *A. versicolor* BR14 e *Trichoderma* sp. BC01, com valores comparáveis ou superiores aos relatados na literatura (QAISAR *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2011). *A. versicolor* BR14 também foi o único a produzir lignina peroxidase detectável, além de expressiva produção de manganês peroxidase e atividade de xilanase, reforçando seu caráter multifuncional. Estudos recentes confirmam sua capacidade de produzir β-glicosidases e xilooligossacarídeos de interesse biotecnológico (HUANG *et al.*, 2021; FORSAN *et al.*, 2023). De modo geral, observou-se uma complementaridade entre gêneros: *Talaromyces* mostrou especialização em xilanases, enquanto *Aspergillus* revelou versatilidade enzimática, o que reflete a dinâmica sinérgica da decomposição na serrapilheira (ORENCIO-TREJO *et al.*, 2016).

As bactérias isoladas do intestino de cupins também apresentaram atividades expressivas. *B. subtilis* CPM6 e *B. amyloliquefaciens* CPM8 exibiram valores superiores aos relatados para *B. subtilis* RLI2019 (4,06 U mL<sup>-1</sup> de endoglucanase; LIU *et al.*, 2023) e para isolados de *Macrotermes gilvus* (2,5 U mL<sup>-1</sup>; ARFAH *et al.*, 2019). Em alguns trabalhos, atividades variaram entre 0,12 e 3,36 U mL<sup>-1</sup>, o que reforça a eficiência dos isolados deste estudo. Também se destacou *P. megaterium* CPM18, com alta atividade celulolítica e ligninolítica, consolidando-se como linhagem versátil para degradação de biomassa.

A produção de xilanases também foi relevante, especialmente por *B. amyloliquefaciens* CPM3 e *B. cereus* CPM13, alinhando-se a relatos prévios de variabilidade na síntese dessas enzimas entre bactérias intestinais de cupins (LIU *et al.*, 2023). Algumas cepas, como *B. amyloliquefaciens* CPM3 e *P. megaterium* CPM18, produziram simultaneamente celulasas e xilanases, caracterizando-se como degradadores versáteis. Entre as ligninases, *P. megaterium* CPM18 apresentou a maior atividade de lignina peroxidase,

enquanto *R. marisflavi* CPM1 e CPM2 exibiram os maiores níveis de manganês peroxidase. Também foi detectada baixa produção de lacase em *B. amyloliquefaciens* CPM3, achado relevante dado que essa enzima é pouco comum em bactérias (XIAO *et al.*, 2021).

Esses resultados demonstram a adaptação ecológica dos micro-organismos aos seus respectivos nichos: as bactérias simbiotes do intestino de cupins desempenham papel fundamental na degradação da lignina (XIE *et al.*, 2023), enquanto os fungos da serrapilheira atuam como decompositores primários da matéria vegetal, especialmente de celulose e hemicelulose (SOUZA *et al.*, 2022). Essa divisão funcional reforça o potencial biotecnológico tanto das bactérias simbiotes quanto dos fungos decompositores (ADESIOYE *et al.*, 2022).

Por fim, ressalta-se que os valores obtidos foram alcançados em condições não otimizadas de cultivo. Ajustes em variáveis como pH, temperatura, inóculo e composição do meio podem aumentar significativamente a produção enzimática. Estratégias de otimização estatística, como demonstrado em estudos recentes, reforçam a importância de buscar condições ideais para explorar plenamente o potencial desses micro-organismos (MA *et al.*, 2024; SHAIKH *et al.*, 2025).

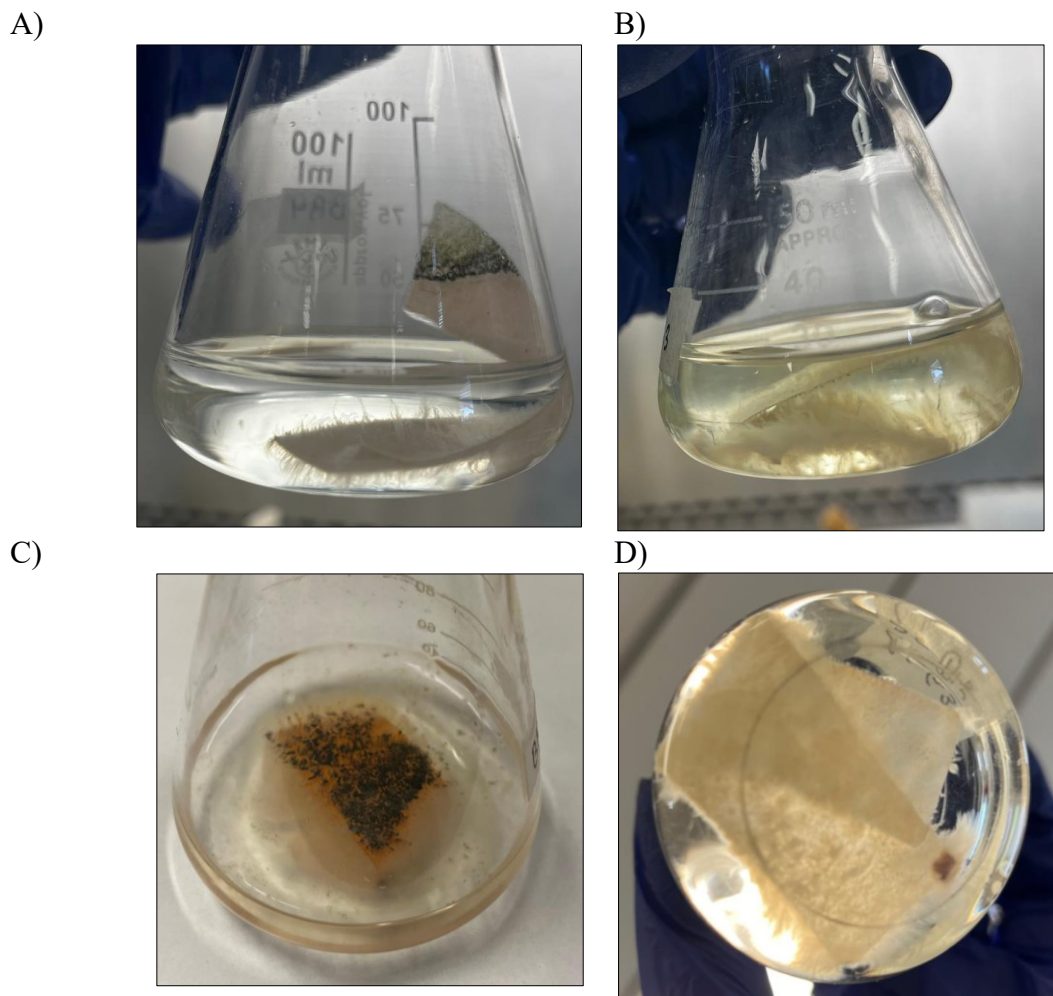
#### 3.4.5 Produção de açúcares redutores

A produção de açúcares redutores a partir de diferentes substratos é amplamente estudada devido à sua relevância para as indústrias de biocombustíveis, alimentos e biotecnologia (ZOLOTAREV *et al.*, 2022; NATH, 2024). Esses açúcares, resultantes da degradação de polissacarídeos como celulose e amido, são essenciais em processos fermentativos, servindo como fonte de carbono para micro-organismos na síntese de diversos produtos biotecnológicos (DUSABE *et al.*, 2023). A eficiência dessa conversão depende da escolha dos micro-organismos, das condições de cultivo e dos métodos de quantificação utilizados (YU *et al.*, 2016).

No presente estudo, foi utilizada uma tira de papel filtro como única fonte de carbono para três linhagens de fungos (*Talaromyces mycothecae* BR04, BR15 e SG3.6) e uma bactéria (*Rosellomorea marisflavi* CPM2). Esses micro-organismos foram selecionados com base não apenas nos resultados enzimáticos obtidos neste trabalho, mas também pelo fato de representarem linhagens ainda pouco exploradas na literatura quanto à produção de enzimas.

Ao longo do experimento, observou-se a olho nu o crescimento dos fungos filamentosos (*T. mycothecae* BR04, BR15 e SG3.6) e a degradação progressiva do papel filtro (Figura 13). Diversos fungos, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor racemosus*, *Hypocrea lixii* e *Laetisaria arvalis*, já foram descritos como capazes de crescer e degradar papel filtro (BERGADI *et al.*, 2014; NAVARRO *et al.*, 2014). Entretanto, não foram encontrados registros anteriores na literatura de cepas de *T. mycothecae* com essa capacidade, tampouco de sua atuação na produção de açúcares redutores.

**Figura 13** – Visualização do crescimento dos fungos e degradação do papel filtro



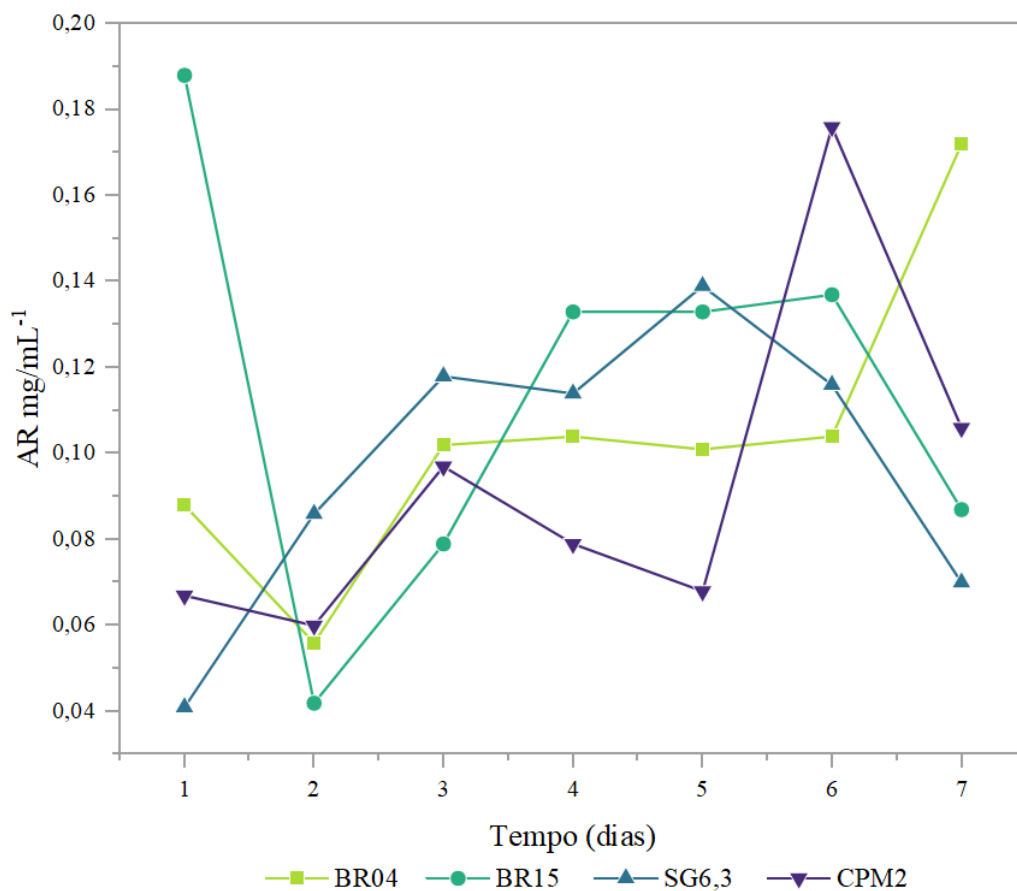
A) e B) Crescimento fúngico com formação de longas hifas filamentosas; C) Formação de esporos na parte sobrenadante do papel filtro; D) Degradação do papel filtro observada pela ação do *Talaromyces mycothecae*.

Fonte: A autora, 2025.

Com relação à bactéria *Rosellomorea marisflavi* CPM2, não foi possível observar crescimento visível no meio de cultivo, embora tenha ocorrido a produção de açúcares redutores. O primeiro registro dessa espécie produzindo açúcares redutores foi descrito recentemente, em estudos auxiliados por nanopartículas de óxido de cálcio (CaONPs) com aplicação voltada à produção de bio-hidrogênio (YOUSEF *et al.*, 2024). Esse resultado reforça o potencial degradador da linhagem, estimulando investigações adicionais sobre suas capacidades metabólicas, especialmente considerando sua origem no intestino de cupins.

Todas as linhagens avaliadas apresentaram tendência de aumento na produção de açúcares redutores ao longo do tempo, embora com variações na quantidade produzida diariamente (Figura 14).

**Figura 14** – Produção diária de açúcares redutores ( $\text{mg/mL}^{-1}$ )



*Talaromyces mycothecae* BR04; BR15; SG3,6; *Bacillus amyloliquefaciens* CPM2

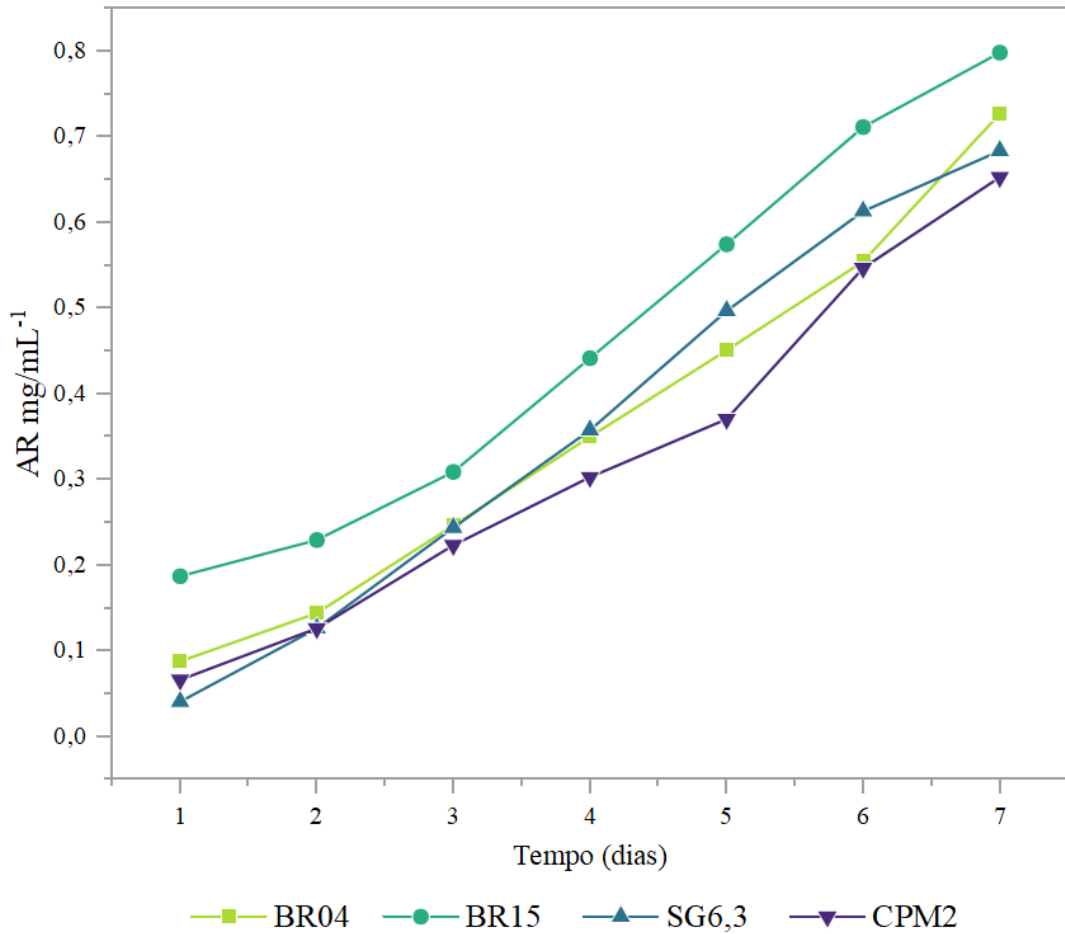
Fonte: A autora, 2025.

A linhagem BR04 demonstrou perfil crescente e consistente, atingindo os maiores valores ao final do período (0,17 mg mL<sup>-1</sup>). Já a BR15 também exibiu incremento progressivo, mas em níveis ligeiramente inferiores, apresentando um pico logo no primeiro dia (0,18 mg mL<sup>-1</sup>). A linhagem SG6.3 apresentou comportamento intermediário, com aumento gradual até atingir 0,139 mg mL<sup>-1</sup> no quinto dia. Por fim, a linhagem CPM2 (*R. marisflavi*) iniciou com baixa produção (0,06 mg mL<sup>-1</sup>), mas apresentou expressivo incremento a partir do sexto dia, alcançando 0,17 mg mL<sup>-1</sup> e aproximando-se dos valores obtidos pelas demais linhagens no final do experimento. Os resultados obtidos indicam que todas as linhagens foram capazes de produzir açúcares redutores ao longo do tempo, destacando-se *Talaromyces mycothecae* BR15, que alcançou um total de 23,95 mg de açúcares produzidos ao final do experimento.

Outro ponto relevante observado no gráfico de produção diária de açúcares redutores foi a oscilação nas curvas de produção, com períodos de declínio seguidos por retomada do aumento. Esse comportamento está relacionado ao metabolismo microbiano durante a delignificação da biomassa lignocelulósica: os micro-organismos liberam açúcares redutores, mas também podem consumi-los como fonte de energia. Estudos indicam que a delignificação microbiana favorece a liberação de polissacarídeos, mas a eficiência do processo pode ser comprometida pelo consumo simultâneo desses açúcares (TSEGAYE *et al.*, 2019). Além disso, o equilíbrio entre produção e consumo é fator crítico para a viabilidade de processos fermentativos industriais, demandando estratégias que reduzam esse consumo para otimizar rendimentos (SINGH *et al.*, 2014).

O gráfico de produção acumulada de açúcares redutores (AR) ao longo de sete dias (Figura 15) evidenciou uma tendência crescente em todas as linhagens, indicando liberação contínua de AR durante o período experimental. A linhagem BR15 manteve o melhor desempenho, enquanto BR04 e SG6,3 apresentaram produção intermediária, e CPM2 obteve o menor valor acumulado. Embora tenham sido observadas diferenças aparentes entre os isolados, o teste de Kruskal–Wallis não indicou significância estatística, sugerindo capacidade equivalente de produção entre eles. Esses resultados corroboram a literatura, que destaca a maior eficiência dos fungos na secreção de coquetéis enzimáticos voltados à degradação da biomassa lignocelulósica (TAMBOLI *et al.*, 2017), bem como a relevância das  $\beta$ -glicosidases fúngicas, geralmente mais eficazes do que as bacterianas, resultando em maiores rendimentos fermentativos (CASA-VILLEGAS *et al.*, 2018).

**Figura 15** – Produção acumulada de açúcares redutores



*Talaromyces mycothecae* BR04; BR15; SG3,6; *Bacillus amyloliquefaciens* CPM2

Fonte: A autora, 2025.

A produção total de AR ao final do experimento reforçou o desempenho superior da linhagem BR15 (23,96 mg ± 4,3), seguida por BR04 e SG6,3, com CPM2 exibindo a menor produção. Esses resultados demonstram que tanto fungos de serrapilheira quanto bactérias intestinais de cupins são capazes de converter substratos celulósicos simples, como papel filtro, em açúcares redutores, o que está em consonância com achados prévios sobre a eficiência de micro-organismos na hidrólise de resíduos lignocelulósicos (MAGRI; DIAS, 2016; RITIKA *et al.*, 2023; SALGADO *et al.*, 2024).

**Tabela 8** – Total de glicose produzida pelos micro-organismos

Micro-organismo	Glicose (mg)	
<b>BR04</b>	21,81	±3,4
<b>BR15</b>	23,95	±4,3
<b>SG6,3</b>	20,51	±2,9
<b>CPM2</b>	19,59	±3,4

*Talaromyces mycothecae* BR04; BR15; SG3,6. *Bacillus amyloliquefaciens* CPM2

Fonte: A autora, 2025.

Apesar disso, os valores obtidos foram inferiores aos relatados em estudos que utilizaram resíduos agroindustriais mais complexos ou estratégias de co-cultivo e pré-tratamento. Magri e Dias (2016) observaram maior eficiência em palha de milho a partir da interação entre *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispora*, enquanto RITIKA *et al.* (2023) reportaram valores muito superiores em fermentação simultânea. De forma semelhante, DUSABE *et al.* (2023) atingiram 16,5 g L<sup>-1</sup> de AR após 48 h de hidrólise de resíduos alimentares com consórcios de fungos e leveduras. Esses resultados reforçam que a escolha do substrato e o uso de consórcios microbianos são determinantes para elevar os rendimentos de AR.

A utilização do papel filtro neste estudo, embora menos complexa estruturalmente que resíduos agroindustriais, evidenciou o potencial das linhagens em liberar AR a partir de um substrato celulósico simples. O método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) mostrou-se eficiente para quantificação da atividade, já empregado em trabalhos com *Talaromyces funiculosus* (SYRCHIN *et al.*, 2023) e *T. thermophilus* (MALLEK *et al.*, 2016). No entanto, estudos envolvendo bactérias do gênero *Rosellomorea* ainda são raros e se concentram principalmente em aspectos taxonômicos e filogenéticos (NAVARRO-TORRE *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2025), sem detalhar sua capacidade hidrolítica. Assim, os resultados apresentados reforçam a originalidade deste estudo, que explora o potencial enzimático de fungos de serrapilheira e bactérias intestinais de cupins em condições pouco investigadas. Considerando que a literatura ainda se concentra principalmente em gêneros como *Trichoderma* e *Aspergillus* (BASSO, 2010; SIVARAMANAN, 2014), esta pesquisa contribui de forma pioneira para ampliar a compreensão da diversidade funcional microbiana em processos de bioconversão de biomassa, com potencial aplicação em estratégias biotecnológicas de valorização de resíduos.

### 3.4.6 Potencial Biotecnológico Sustentável das Bactérias Isoladas de Intestino de Cupins.

O presente estudo analisou bactérias isoladas do intestino de cupins *Nasutitermes* sp., destacando seu potencial para aplicações na produção de biocombustíveis e bioenergia. O microbioma intestinal desses insetos desempenha um papel essencial na degradação da biomassa lignocelulósica, um fator-chave para processos biotecnológicos sustentáveis (HE *et al.*, 2013; VIKRAM *et al.*, 2021). Algumas das principais aplicações sustentáveis dessas bactérias foram apresentadas na Tabela 9.

Entre as bactérias analisadas, *Bacillus amyloliquefaciens* é uma espécie que se destaca pela produção de enzimas termostáveis e alcalifílicas, como alfa-amilase e proteases, essenciais para a conversão de resíduos agrícolas em bioetanol. Sua capacidade de sacarificar amido cru e outros substratos reforça seu potencial na economia circular, contribuindo para a valorização de resíduos em biocombustíveis e biopolímeros (PRAJAPATI *et al.*, 2017; NGALIMAT *et al.*, 2021). De forma complementar, *Bacillus subtilis* apresenta metabolismo flexível e robustez fisiológica, características que permitem sua aplicação em processos fermentativos de baixo custo e curta duração. Além disso, sua versatilidade inclui a secreção de diversas enzimas hidrolíticas, relevantes para a produção de biocombustíveis e compostos bioativos (SU *et al.*, 2020; KOVÁCS, 2019; ARNAOUTELI *et al.*, 2021; ERRINGTON *et al.*, 2020).

Outros isolados também mostraram potencial biotecnológico descrito na literatura. *Pseudomonas azotoformans* apresenta capacidade de degradar polímeros sintéticos, como filmes de poliuretano, além de perspectivas para a biorremediação de solos contaminados (ZHANG *et al.*, 2010; ARKATKAR *et al.*, 2012). Já *P. megaterium* destaca-se na produção de enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos e à biossíntese de moléculas de interesse industrial, como vitamina B12 e heme (WANG *et al.*, 2018; BIEDENDIECK *et al.*, 2021).

Tabela 9 – Potencial biotecnológico sustentável das bactérias isoladas de intestino de cupins

Código	Identificação	Enzimas e Metabólitos	Potencial Sustentável	Referências
CPM1 CPM2	<i>Rossellomorea marisflavi</i>	Lacases; Catalase-positivo; Esculina e caseína são hidrolisadas.	Produção renovável de biohidrogênio; Descoloração de corantes sintéticos; Biocatalisador em células de combustível microbianas; Síntese de nanopartículas de prata; Biofoculante.	GUPTA <i>et al</i> , 2020; YOUSEF <i>et al</i> , 2024; WANG <i>et al</i> , 2015; YEN <i>et al</i> , 2013; LONG <i>et al</i> , 2013 SEGUNDO <i>et al</i> 2024;
CPM3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Queratinolítica, atividade proteolítica; celulolítica; $\alpha$ -amilolítica	Excelente hospedeiro em biorreatores; Biocontrole eficaz contra doenças fúngicas pós-colheita; Biofertilizante;	YE <i>et al</i> , 2018; PRAJAPATI, <i>et al</i> , 2017; ZALILA-KOLSI <i>et al</i> , 2023; wang <i>et al</i> , 2022
CPM6 CPM16	<i>Bacillus subtilis</i>	Hidrolases de peptidoglicano; Muramidases. Amilases; Endopeptidases	Formação de biofilmes complexos com potencial para produzir biomateriais; Produção sustentável de surfactina;	KOVÁCS, 2029; SU <i>et al</i> , 2020; ARNAOUTELI <i>et al</i> , 2021; JANEK <i>et al</i> , 2021
CPM13	<i>Bacillus cereus</i>	Proteases; Amilase; amiloglicosidase; DNase;	Substituição de fertilizantes convencionais; Biocontrole de pragas; Diminuição de metais em amostras; Produção de enzimas industriais.	RATHNASAMY <i>et al</i> , 2020; YANG <i>et al</i> , 2023; KULKOVA <i>et al</i> , 2023; JUN <i>et al</i> , 2020
CPM15	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Ureases; Proteínases.	Degradação de filmes de poliuretano degradar uma ampla gama de outros herbicidas Reparo de fissuras em concreto.	ARKATKAR <i>et al</i> , 2010; ZHANG <i>et al</i> , 2017; HEIDARI NONAKARAN <i>et al</i> , 2015

---

			Melhora o desenvolvimento das plantas e a fitorremediação em ambientes de seca,	
<b>CPM18</b>	<i>Priestia megaterium</i>	Biossíntese de vitamina B12; levansucrases, $\alpha$ -ciclodextrina glicosiltransferase, dextransucrase, xilanase, glicose desidrogenase, $\beta$ -galactosidase e manitol desidrogenase	Biossíntese de Biomoléculas Biotransformações e Biorremediação Aplicações em Processos Industriais	WANG <i>et al.</i> 2018; BIEDENDIECK <i>et al.</i> , 2021; LAKOWITZ <i>et al.</i> , 2017; ABDULMUGHNI <i>et al.</i> , 2017; BIEDENDIECK <i>et al.</i> , 2021

---

Fonte: A autora, 2025.

Os resultados obtidos na avaliação do potencial biotecnológico das bactérias isoladas reforçam a relevância do microbioma de cupins como uma fonte valiosa de micro-organismos com capacidade de degradar biomassa lignocelulósica. Essa diversidade funcional revela um arsenal enzimático capaz de atuar na conversão de resíduos vegetais em moléculas de interesse energético, evidenciando seu papel estratégico na busca por alternativas sustentáveis. A exploração dessas bactérias pode impulsionar a produção de biocombustíveis e bioenergia de forma mais eficiente, contribuindo para a valorização de resíduos agroindustriais e para a inserção da economia circular no setor energético. Além disso, sua aplicação reduz a dependência de combustíveis fósseis, promove a mitigação de impactos ambientais e abre perspectivas para o desenvolvimento de bioprocessos inovadores, alinhados às demandas globais por soluções renováveis e ecologicamente responsáveis.

#### 3.4.7 Potencial Biotecnológico Sustentável dos Fungos Isolados do Solo De Serrapilheira

A biodiversidade fúngica apresenta um vasto potencial para a bioenergia e a produção de biocombustíveis, especialmente devido à capacidade de algumas espécies de degradar biomassa lignocelulósica e converter resíduos em produtos de valor agregado. A exploração de fungos ligninolíticos é essencial para ampliar as opções de micro-organismos utilizados na conversão de biomassa (OSONO *et al.*, 2020).

No presente estudo, foram identificadas diferentes espécies fúngicas com potencial para aplicações bioenergéticas e outras aplicações sustentáveis (Tabela 10). Dentre elas, destaca-se o *Aspergillus fumigatus*, conhecido por sua capacidade de degradar biomassa vegetal e converter resíduos agrícolas em substratos fermentáveis (JIN *et al.*, 2020; MONDAL *et al.*, 2020). Outro fungo relevante para a bioenergia é *Aspergillus tubingensis*, que se destaca na degradação de bagaço de cana-de-açúcar, liberando açúcares fermentáveis como glicose e xilose sem necessidade de suplementação enzimática comercial. Sua aplicação pode reduzir custos na produção de etanol de segunda geração (PRAJAPATI *et al.*, 2020). Já *Aspergillus hiratsukae* não apresenta pesquisas evidenciando a produção de enzimas de interesse industrial, o que indica uma lacuna científica e abre espaço para futuras investigações sobre seu potencial biotecnológico.

**Tabela 10** – Potencial biotecnológico sustentável dos fungos isolados do solo de serrapilheira

<b>Código</b>	<b>Identificação</b>	<b>Enzimas e Metabólitos</b>	<b>Potencial Sustentável</b>	<b>Referências</b>
<b>SC6.3</b>				
<b>BR04</b>	<i>Talaromyces mycothecae</i>	Duclauxina; alcalóides, peptídeos, lactonas, policetídeos	Ainda não explorado.	BARBOSA <i>et al</i> , 2018
<b>BR15</b>				ZHAI <i>et al</i> , 2016
<b>BR19</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CMCase, FPase e $\beta$ -glicosidase), xilanase, pectinase e amilase MnP e lacase	Produzir altos títulos de celulases e hemicelulases a baixo custo; Degradação da palha de arroz; recicla fontes de carbono e nitrogênio;	GILL <i>et al</i> , 2023 DAGENAIS & KELLER, 2009; WIEMANN <i>et al</i> , 2013
<b>SG12</b>	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Esterase e Lipase Cellulase and hemicellulase	Biodegradação de lixo; Fungos que podem biodegradar o plástico; Geração de açúcares fermentáveis; Hidrólise de agrorresíduos; Degrada PU – Polyurethane.	NASRABADI <i>et al</i> , 2023; PRAJAPATI <i>et al</i> , 2020
<b>BG10</b>	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	Antibacterianos notáveis em <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>E. coli</i> . $\alpha$ -pirona	Biorremediação de cobre; sem evidências sobre produção de enzimas de interesse industrial.	PALANIVEL <i>et al</i> , 2023; SAIED <i>et al</i> , 2020; PRIGITANO <i>et al</i> , 2023; CHEN <i>et al</i> , 2022
<b>SG16</b>				
<b>BC01</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	Endoxilanasas; $\beta$ -xilosidasas; glucanases $\alpha$ -galactosidase, acetileno xilanesterases, lacases (benzendiol: oxigênio	Biocontrole fúngico contra micro-organismos patogênicos; Decomposição natural e agente biológico de biorremediação.	SOOD <i>et al</i> , 2020; ZIN & BADALUDDIN

---

	oxidoreductases, poligalacturonase, pectina liase e pectina	, 2020; GOORUEE <i>et al.</i> , 2024	
<b>BR14</b> <i>Aspergillus versicolor</i>	Beta-glucosidase, Proteases, peptidases, glutaminases, $\gamma$ -glutamil transpeptidases, diversas glicosidases, lipases, tanases e oxidorredutases	Elevada atividade na degradação de celulose; Produção de enzimas lignocelulolíticas para degradação de resíduos vegetais e geração de bioenergia	HUANG <i>et al.</i> , 2021; PÓCSI <i>et al.</i> , 2024;

---

Fonte: A autora, 2025.

*Trichoderma* spp. é amplamente estudado por sua eficiência na decomposição de resíduos orgânicos e na produção de enzimas lignocelulolíticas, especialmente celulasas e xilanases, fundamentais para a conversão de biomassa em biocombustíveis (ZIN *et al.*, 2020; GOORUEE *et al.*, 2024). *T. reesei* é um exemplo clássico desse potencial tecnológico, reconhecido pela produção em larga escala dessas enzimas, tornando-se um agente central em processos industriais de bioenergia (YAN *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2020).

Outro fungo de interesse, segundo as pesquisas, *Aspergillus versicolor* representa uma fonte versátil de enzimas e metabólitos com elevado potencial biotecnológico sustentável. Esta espécie se destaca pela produção de beta-glucosidase e outras enzimas hidrolíticas, aplicáveis na conversão de biomassa lignocelulósica e na biorremediação de poluentes (HUANG *et al.*, 2021; PÓCSI *et al.*, 2024), além de apresentar capacidade de gerar quitosana a partir de resíduos agrícolas, contribuindo para a produção de biopolímeros biodegradáveis (SANTHOSH; UMESH, 2025). Seus metabólitos secundários incluem compostos bioativos como phyccion, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras (ELAWADY *et al.*, 2023), e asperversilactonas, com atividade citotóxica contra células cancerígenas (QUANG *et al.*, 2021). Essa combinação de capacidade enzimática e metabólica posiciona *A. versicolor* como recurso promissor para aplicações industriais, farmacêuticas e ambientais alinhadas a estratégias sustentáveis.

*Talaromyces mycothecae* merece destaque neste estudo por unir novidade científica e potencial aplicado. Embora a literatura descreva sobretudo seus metabólitos secundários, como a duclauxina com cromóforo de rubropunctatina (BARBOSA *et al.*, 2018), e dados de classificação, não há registros publicados que atribuam a essa espécie a produção de enzimas ligninolíticas. Esse cenário contrasta com o que se conhece, em termos gerais, para o gênero *Talaromyces*, notável pela diversidade metabólica e aplicações biotecnológicas (FRISVAD *et al.*, 2013). Ao evidenciar atividade enzimática de interesse em *T. mycothecae*, os resultados apresentados inauguram uma frente promissora para a bioconversão sustentável de biomassa, reforçando a importância de explorar e conservar cepas nativas como recurso estratégico para inovação em bioenergia.

### 3.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que tanto os fungos filamentosos isolados de serrapilheira quanto as bactérias simbiontes do intestino de cupins apresentam elevado potencial enzimático, refletindo suas adaptações ecológicas e capacidades complementares na degradação da biomassa lignocelulósica. Enquanto os fungos se destacaram pela produção de celulases e xilanases, essenciais para a decomposição de polissacarídeos estruturais, as bactérias mostraram forte atividade ligninolítica, desempenhando papel fundamental na quebra da lignina, polímero mais recalcitrante da parede celular vegetal.

De forma inédita, este estudo revelou o potencial de espécies pouco exploradas, como *Talaromyces mycothecae*, na produção de enzimas ligninolíticas e xilanolíticas, ampliando o conhecimento sobre sua diversidade metabólica e aplicações biotecnológicas. Da mesma maneira, bactérias como *Priestia megaterium* e *Rossellomorea marisflavi* se mostraram versáteis na secreção de diferentes classes de enzimas, reforçando a relevância do microbioma intestinal de cupins como fonte estratégica para a prospecção de novos biocatalisadores.

Assim, os achados não apenas contribuem para o avanço científico no campo da microbiologia aplicada, mas também oferecem bases sólidas para o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis voltados à valorização de resíduos lignocelulósicos. A diversidade funcional e a complementaridade entre fungos e bactérias demonstram um potencial promissor para aplicação em áreas como bioenergia, biorremediação e produção de biocombustíveis, alinhando-se às demandas globais por soluções inovadoras e ambientalmente responsáveis.

## **4. CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA POLIFÁSICA DOS ISOLADOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO SUSTENTÁVEL RECUPERADOS DE FONTES ALTERNATIVAS**

### **4.1 RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

A bioprospecção de micro-organismos de fontes diferenciadas é crucial para descobrir novas espécies com potencial biotecnológico. A taxonomia polifásica é fundamental para a identificação confiável de microrganismos, integrando análises morfológicas, bioquímicas e moleculares. Sua aplicação assegura precisão em pesquisas de biodiversidade, bioprospecção e biotecnologia. Os fungos da serrapilheira, que decompõem matéria orgânica, e as bactérias simbióticas dos cupins, que digerem celulose, podem ser explorados para o desenvolvimento de biotecnologias voltadas à reciclagem de nutrientes, produção de biocombustíveis e tratamento de resíduos orgânicos. A identificação precisa desses micro-organismos permite o aproveitamento de suas capacidades biológicas, promovendo soluções inovadoras e sustentáveis para desafios ambientais.

### **4.2 OBJETIVOS**

#### **4.2.1 Objetivo geral**

Aplicar a taxonomia polifásica para a identificação precisa de fungos filamentosos isolados do solo de serrapilheira e de bactérias do intestino de cupins, integrando análises morfológicas, espectrométricas e moleculares, de modo a contribuir para a bioprospecção de micro-organismos com potencial biotecnológico e aplicações em processos sustentáveis.

#### 4.2.2 Objetivos específicos

- Realizar a identificação macroscópica e microscópica dos isolados com potencial biotecnológico selecionados de intestino de cupins e do solo de serrapilheira;
- Identificar os isolados por MALDI-TOF MS;
- Analisar o agrupamento das linhagens em FT-IR;
- Identificar todos os isolados por biologia molecular;
- Caracterizar os isolados identificados através da taxonomia polifásica.

### 4.3 MATERIAIS E MÉTODO

#### 4.3.1 Taxonomia Polifásica dos isolados de interesse biotecnológico

##### 4.3.1.1 *Caracterização morfológica*

As células bacterianas foram cultivadas em meio NA (3 g L<sup>-1</sup> de extrato de carne; 5 g L<sup>-1</sup> de peptona; 15 g L<sup>-1</sup> de ágar) por 24 h a 37 °C. Após o crescimento, foi preparado um esfregaço em lâminas, onde uma pequena quantidade de células foi depositada para coloração e posterior identificação. A coloração de Gram foi realizada segundo protocolo padrão disponibilizado pelo Ministério da Saúde (2001), utilizando os seguintes corantes: violeta de metila a 1%, lugol a 5%, álcool a 95% e fucsina a 0,2%.

As amostras de fungos foram cultivadas em placas de Petri contendo meio PDA (15 g L<sup>-1</sup> de ágar; 20 g L<sup>-1</sup> de dextrose; 4 g L<sup>-1</sup> de extrato de batata). Uma pequena alçada contendo esporos de cada fungo foi inoculada no centro das placas, que foram incubadas por 7 dias a 25 °C. Após esse período, as colônias foram analisadas quanto à morfologia e, em seguida, utilizou-se a técnica do azul de algodão associada à microscopia. Para isso, foi realizado microcultivo, onde as lâminas foram preparadas com o crescimento do fungo por 7 dias a 28 °C e posteriormente coradas com azul de metileno a 20% (FORTUNA, 2020). O exame direto das colônias também foi realizado por meio da coleta de uma alçada do crescimento fúngico e sua transferência para lâmina.

#### 4.3.1.2 Identificação por MALDI-TOF MS

O método de transferência direta de colônias, sugerido para bactérias e fungos (bactérias previamente cultivadas em NA por 24 h a 28 °C e fungos cultivados em PDA por 5 dias a 25 °C), consistiu na transferência de uma alçada de colônias das linhagens selecionadas para a placa do MALDI-TOF MS (MALDI target plate). Em seguida, cada ponto foi coberto com 1 µL de ácido fórmico a 70% (v/v) e seco em temperatura ambiente. Posteriormente, aplicou-se a solução de matriz composta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (solução saturada em 50/50 [v/v] de acetonitrila/H<sub>2</sub>O contendo 2,5% de ácido trifluoroacético).

Após a secagem ao ar, as amostras foram analisadas no equipamento Bruker MALDI-TOF MS Biotyper®. Os espectros bacterianos gerados foram comparados com o banco de dados da Bruker®, enquanto os espectros de fungos filamentosos foram analisados utilizando o banco de dados Mass Spectrometry Imaging (MSI) (CALDERARO & CHEZZI, 2024).

#### 4.3.1.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As bactérias analisadas em equipamento FT-IR (Bruker Fourier Transform Infrared spectroscopy system, IR Biotyper®) foram previamente cultivadas em meio NA a 28 °C por 24 h. Para a preparação das amostras, adicionaram-se 50 µL de etanol a 70% ao frasco de suspensão contendo cilindros de metal. A biomassa da cultura foi coletada com uma alça de inoculação de 1 µL e submersa no etanol do frasco de suspensão, sendo removida da alça em seguida. O frasco foi fechado e agitado em agitador tipo Vortex para obtenção de uma suspensão homogênea. Para aumentar a tensão superficial, adicionaram-se 50 µL de água deionizada a cada frasco. Em seguida, pipetaram-se 15 µL de cada suspensão em pelo menos três pontos da placa de silício. A secagem da placa de amostra foi realizada por incubação a 37 °C por um período entre 10 e 30 min.

Após a secagem, a placa foi introduzida no equipamento. Os espectros obtidos foram avaliados pelo software dedicado, com classificação automática de qualidade: “Passed” (Aprovado): indicando que a amostra foi identificada corretamente e atende aos critérios de qualidade da análise; “Failed” (Reprovado): indicando que a amostra não atendeu

aos critérios de qualidade, seja por baixa qualidade do espectro, baixa similaridade com a referência ou falha na análise (Bruker, 2021).

Para a análise de fungos filamentosos por FT-IR, foi necessário adaptar a metodologia original. As quantidades de água e álcool a 70% foram aumentadas, e a homogeneização foi realizada em equipamento FastPrep em substituição ao agitador Vortex, devido à maior potência de agitação. Essa modificação considerou a composição da parede celular dos fungos filamentosos, formada principalmente por polissacarídeos como quitina,  $\beta$ -glucanos e  $\alpha$ -glucanos, que conferem resistência estrutural e proteção contra estresses ambientais. Em comparação com as bactérias, os fungos possuem parede celular mais espessa e complexa (YOSHIMI *et al.*, 2022). O esquema a seguir (Figura 16) exemplifica os passos do protocolo adaptado.

**Figura 16** – Esquema da metodologia do FT-IR adaptada para fungos filamentosos

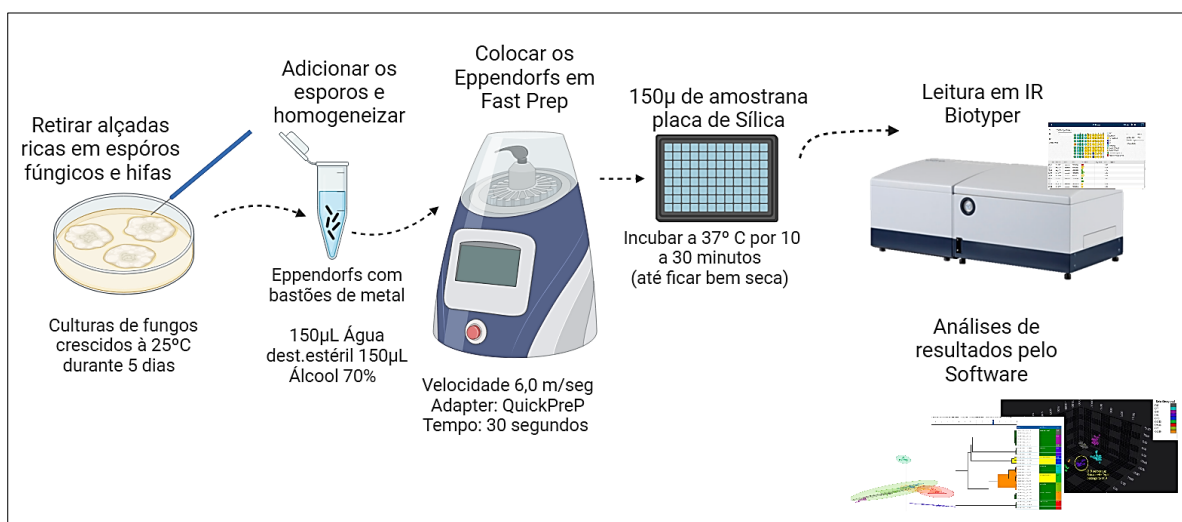


Figura construída na ferramenta Biorender.

Fonte: A autora, 2025.

Inicialmente, foram coletadas alçadas ricas em esporos fúngicos e hifas a partir de culturas crescidas a 25 °C em estufa por cinco dias. Em seguida, os esporos foram adicionados a tubos Eppendorf contendo bastões de metal fornecidos pelo fabricante (Bruker, 2021), 150 µL de água destilada estéril e 150 µL de álcool a 70%. A mistura foi então homogeneizada e submetida ao equipamento FastPrep, operando a 6,0 m s<sup>-1</sup> com adaptador QuickPrep, por 30 s. Posteriormente, 150 µL de cada amostra, em triplicata, foram depositados em uma placa de sílica, incubada a 37 °C por 10 a 30 min, garantindo a secagem completa.

Após esse processo, a leitura foi realizada no FT-IR, seguida da análise dos espectros pelo software específico.

#### 4.3.2 Caracterização Molecular

##### 4.3.2.1 *Extração de DNA genômico de fungos*

O DNA genômico de cada isolado fúngico foi extraído utilizando um protocolo modificado descrito por Rodrigues *et al.* (2009). Os fungos foram cultivados em meio líquido PDB por 5 dias a 28 °C sob agitação de 150 rpm. Após o crescimento, a biomassa fúngica foi filtrada. Para a extração de DNA, 200 mg de biomassa foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL contendo 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl 200 mM, pH 8,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; 0,5% [p/v] SDS).

A lise celular foi realizada no equipamento FastPrep por 30 s, utilizando esferas de vidro (glass beads). Após a lise mecânica, foram adicionados 900 µL de tampão de lise, e as amostras foram incubadas por 1 h a 65 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $14.000 \times g$  por 10 min à temperatura ambiente, e 800 µL da fase superior foram transferidos para um novo microtubo de 2 mL. Polissacarídeos e proteínas foram precipitados pela adição de 1 mL de acetato de sódio frio (3 M, pH 5,5). As amostras foram misturadas por inversão, incubadas a  $-20$  °C por 10 min e centrifugadas a  $14.000 \times g$  por 10 min à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o DNA precipitado com um volume de isopropanol frio ( $-20$  °C). As amostras foram suavemente misturadas por inversão por 2 min, incubadas a  $-20$  °C por 2 h e centrifugadas a  $14.000 \times g$  por 10 min. Os pellets de DNA foram lavados duas vezes com 1 mL de etanol a 70% frio, centrifugados a  $14.000 \times g$  por 10 min e secos. As amostras de DNA foram avaliadas quanto à qualidade por quantificação no equipamento NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA) e por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) por 30 min a 80 V. Para coloração utilizou-se SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e como marcador de peso molecular foi utilizado NZYDNA ladder III (NZYTech Lda, Lisboa, Portugal).

#### 4.3.2.2 Extração de DNA genômico de bactérias

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o innuPREP DNA Mini Kit 2.0 (IST Innuscreen GmbH, 2023), seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, células bacterianas cultivadas em meio sólido NA foram coletadas com uma alçada e transferidas para um tubo de 1,5 mL. As células foram sedimentadas por centrifugação a  $3.000 \times g$  por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE.

A etapa de lise enzimática foi conduzida conforme a classificação bacteriana. Para bactérias Gram-negativas, adicionou-se opcionalmente lisozima ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $400 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ), seguida de incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min sob agitação contínua. Para bactérias Gram-positivas, foi necessária uma etapa adicional de pré-lise com lisozima nas mesmas condições, seguida da adição de 5  $\mu\text{L}$  de mutanolizina ( $0,4 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ) e incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por mais 30 min.

Após a lise enzimática, procedeu-se à lise proteolítica com a adição de 280  $\mu\text{L}$  da solução de lise CBV e 20  $\mu\text{L}$  de Proteinase K. A mistura foi vortexada brevemente e incubada a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min em termomisturador ajustado a 550 rpm. Para amostras que necessitavam de DNA livre de RNA, adicionou-se RNase A (2  $\mu\text{L}$  de uma solução a  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), seguida de incubação por 10 min à temperatura ambiente.

Em seguida, adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  da solução de ligação SBS à amostra lisada, que foi misturada vigorosamente por pipetagem. A amostra foi aplicada no Spin Filter posicionado em um tubo coletor de 2 mL, e a centrifugação foi realizada a  $11.000 \times g$  por 2 min. O filtrado foi descartado e o Spin Filter reposicionado. Foram realizadas duas lavagens sucessivas com 650  $\mu\text{L}$  da solução de lavagem MS, cada uma seguida de centrifugação a  $11.000 \times g$  por 1 min. Após uma etapa adicional de centrifugação a velocidade máxima por 3 min, para remoção de etanol residual, o Spin Filter foi transferido para um tubo de eluição.

Para eluição, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de água, com incubação a temperatura ambiente por 2 min, seguida de centrifugação a  $11.000 \times g$  por 1 min. Uma segunda eluição pôde ser realizada para aumentar o rendimento. O DNA foi armazenado entre  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  para uso a curto prazo.

As amostras de DNA foram avaliadas quanto à qualidade por quantificação no equipamento NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA) e por

eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) por 30 min a 80 V. Para coloração utilizou-se SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e como marcador de peso molecular foi utilizado NZYDNA ladder III (NZYTech Lda, Lisboa, Portugal).

#### 4.3.2.3 Amplificação por PCR e Sequenciamento do DNA

Para identificar as cepas fúngicas, foi realizada a amplificação parcial do espaçador interno transcrito da região do DNA ribossômico (ITS) e/ou do gene da  $\beta$ -tubulina (*benA*). O ITS foi amplificado utilizando os primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCC-3'), descritos por White *et al.* (1990). O gene *benA* foi amplificado com os primers Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') e Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'), projetados por Glass e Donaldson (1995).

Para bactérias, a identificação dos isolados e a construção de bibliotecas gênicas foram realizadas a partir da amplificação e sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA, utilizando os primers 10f (5'-AGT TTG ATC CTG GCT C-3') e 1100r (5'-GGG TTG CGC TCG TTG-3') (BELGINI *et al.*, 2013).

As reações de PCR incluíram 25  $\mu$ L de Taq DNA polimerase Master Mix 2 $\times$  (VWR Life Science, Leuven, Bélgica), 2  $\mu$ L de cada primer (10 mM) e 2  $\mu$ L de DNA total, em volume final de 50  $\mu$ L. Os parâmetros de PCR no termociclador foram:

- Para ITS: 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; seguido de extensão final a 72 °C por 5 min.
- Para *benA*: 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 56 °C por 45 s e 72 °C por 90 s; seguido de extensão final a 72 °C por 10 min.

O sucesso da amplificação foi verificado em gel de agarose a 1% (p/v). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit NZYGelpure (NZYTech Lda, Lisboa, Portugal), conforme instruções do fabricante, e enviados para sequenciamento no laboratório da Universidade do Minho. Todas as sequências foram submetidas ao GenBank, e os códigos de acesso obtidos foram tabulados.

### 3.3.4 DNA *Fingerprint*

Cepas selecionadas de fungos da mesma espécie, identificadas pelo sequenciamento genético, foram submetidas a análises de PCR fingerprinting genético. Foi utilizado o primer (GACA)<sub>4</sub> (5'-GACAGACAGACAGACA-3'), conforme metodologia adaptada de Khalaf & Shabaa (2022).

As reações foram preparadas com 12,5 µL de Master Mix, 1 µL de DNA das amostras, 2 µL de primer (GACA)<sub>4</sub> e 9,5 µL de H<sub>2</sub>O.

As condições do termociclador foram:

- Estágio 1 (desnaturação inicial): 95 °C por 2 min (1×);
- Estágio 2 (ciclagem): 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 2 min;
- Estágio 3 (extensão final): 72 °C por 5 min (1×).

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% (p/v), submetido à eletroforese sob as condições de 120 V por 4 min e 60 V por 90 min. Os resultados foram visualizados em transiluminador

### 4.3.6 Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram comparadas com dados de ITS1/ITS2, β-tubulina e 16S rRNA de cepas disponíveis em bancos públicos (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio de busca BLAST. As análises evolutivas foram conduzidas no software MEGA 11, utilizando o modelo de dois parâmetros de Kimura para estimar distâncias evolutivas. As árvores filogenéticas foram reconstruídas pelo método de neighbor-joining (NJ), com suporte estatístico de bootstrap obtido a partir de 1.000 repetições (NEWMAN *et al.*, 2016).

### 4.3.3 Local de realização dos experimentos e colaboração internacional

A maioria dos experimentos destinados à identificação dos isolados foi conduzida na Universidade do Minho (Campus de Gualtar, Braga – Portugal), durante estágio de doutorado sanduíche realizado com apoio da CAPES (PDSE – Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, processo nº 88881.846749/2023-01), entre novembro de 2023 e julho de 2024. As amostras foram previamente enviadas à instituição (outubro de 2023), reativadas e analisadas no laboratório da Micoteca da Universidade do Minho (MUM), sob orientação do Prof. Nelson Manuel Viana da Silva Lima e com suporte técnico da curadora Célia Maria Gonçalves Soares.

A Micoteca da Universidade do Minho (MUM) é uma coleção de culturas de fungos filamentosos e leveduras reconhecida internacionalmente, com infraestrutura para preservação, identificação molecular, criopreservação e cultivo de micro-organismos. Essa instituição desempenha papel estratégico na conservação da diversidade fúngica e no suporte a pesquisas aplicadas em áreas biotecnológicas, médicas e ambientais, possibilitando a caracterização de estirpes de interesse científico e industrial.

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 Caracterização taxonômica polifásica das bactérias isoladas de cupim

As nove linhagens bacterianas analisadas nesta fase foram selecionadas com base no desempenho nos testes de atividades enzimáticas descritos no Capítulo II. A caracterização taxonômica polifásica incluiu análises morfológicas (coloração de Gram e observação de colônias em microscopia), moleculares (sequenciamento do gene 16S rRNA), perfis proteicos obtidos por MALDI-TOF MS e análise de estruturas químicas celulares por FT-IR.

Na coloração de Gram, apenas o isolado *Pseudomonas azotoformans* CPM15 apresentou coloração rósea, sendo identificado como Gram-negativo. As demais linhagens foram Gram-positivas. Todos os isolados foram submetidos à identificação por MALDI-TOF MS, e os resultados foram posteriormente validados por sequenciamento do gene 16S rRNA (Tabela 11).

**Tabela 11** – Identificação morfológica, molecular e proteica das bactérias isoladas dos cupins

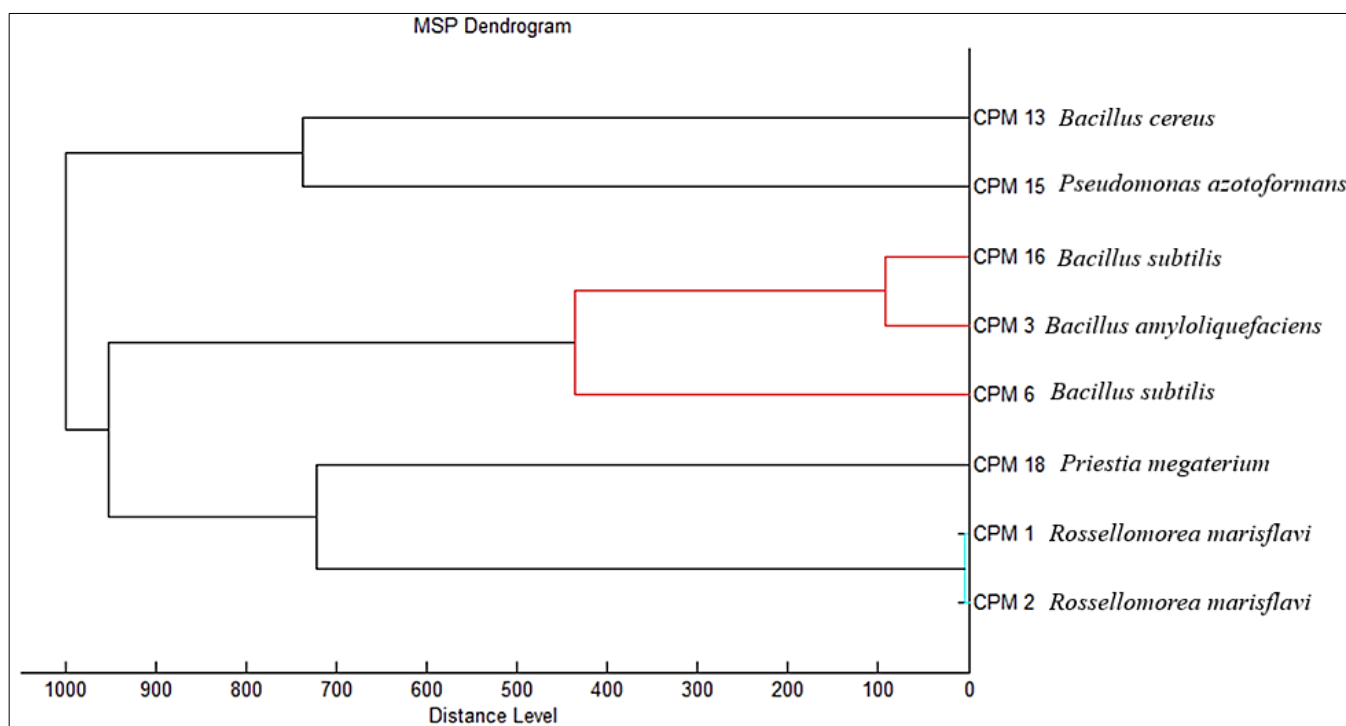
Código	Gram	Nº de acesso atribuídos no Gen Bank	Ident. 16S rRNA	% Ident	Nº acesso das Linhagens Referência	Coleção de Cultura	Ident. MALDI-TOFF MS	Log score
CPM1	+	PV715725	<i>Rossellomorea marisflavi</i>	99.64%	NR_118437.1	JCM 11544 <sup>T</sup>	<i>Rossellomorea marisflavi</i>	2,02
CPM2	+	PV715726	<i>Rossellomorea marisflavi</i>	99.68%	NR_118437.1	JCM 11544 <sup>T</sup>	<i>Rossellomorea marisflavi</i>	2,07
CPM3	+	PV715727	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100.00%	MK182997.1	NBRC 15535 <sup>T</sup>	<i>Bacillus velensis</i>	1,88
CPM6	+	PV715728	<i>Bacillus subtilis</i>	99.55%	OP572158.1	DS54 <sup>T</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	2,05
CPM8	+	PV715729	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	MK182997.1	NBRC 15535 <sup>T</sup>	unidentified	1,68
CPM13	+	PV715730	<i>Bacillus cereus</i>	99.70%	MN326684.1	ATCC 14579 <sup>T</sup>	<i>Bacillus cereus</i>	2,15
CPM15	-	PV715731	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	99.80%	LC130639.1	IAM 1603 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	1,97
CPM16	+	PV715732	<i>Bacillus subtilis</i>	99.13%	OP572158.1	DS54 <sup>T</sup>	<i>Bacillus velensis</i>	1,76
CPM18	+	PV715733	<i>Priestia megaterium</i>	100.00%	MK424276.1	NBRC 15308 <sup>T</sup>	<i>Priestia megaterium</i>	2,00

% Ident: BLAST NCBI; as cores em Log score correspondem ao grau de consistência na identificação, sendo indicadas pelo software do próprio MALDI-TOFF MS: Verde: Alto grau de identificação; Amarelo: Baixo grau de identificação (aborda grupos taxonômicos próximos); Vermelho: Não identificado (espectros não identificados).

FONTE: A autora, 2025.

A análise por MALDI-TOF MS gerou um dendrograma de similaridade proteica (Figura 17). O isolado *Bacillus amyloliquefaciens* CPM8 foi excluído por não apresentar espectros comparáveis. O agrupamento obtido refletiu de forma geral as relações esperadas entre as espécies: *Bacillus subtilis* CPM6 e CPM16 foram agrupados juntos; *Bacillus cereus* CPM13 e *Bacillus velezensis* CPM3 também se agruparam, em concordância com sua proximidade filogenética (Vater *et al.*, 2023). A cepa *Priestia megaterium* CPM18, anteriormente classificada como *Bacillus megaterium*, posicionou-se próxima de espécies do gênero *Bacillus*, refletindo sua história taxonômica. De forma inesperada, *Pseudomonas rhodesiae* CPM15 foi agrupada junto a *Bacillus cereus* CPM13, evidenciando que o MALDI-TOF MS pode aproximar espécies com perfis proteicos semelhantes, ainda que geneticamente distantes (Pereyre *et al.*, 2013; Torres-Sangiao *et al.*, 2021).

**Figura 17** – Dendrograma gerado por MALDI-TOF MS com a identificação das bactérias



Fonte: A autora, 2025.

Cinco isolados (CPM1, CPM2, CPM6, CPM13 e CPM18) apresentaram LOG score > 2,0, sendo identificados de forma consistente e confirmados pelo sequenciamento. Outros três (CPM3, CPM15 e CPM16) obtiveram LOG scores entre 1,76 e 2,0, mostrando divergências a nível de espécie, mas concordância no nível de gênero. Já o isolado CPM8,

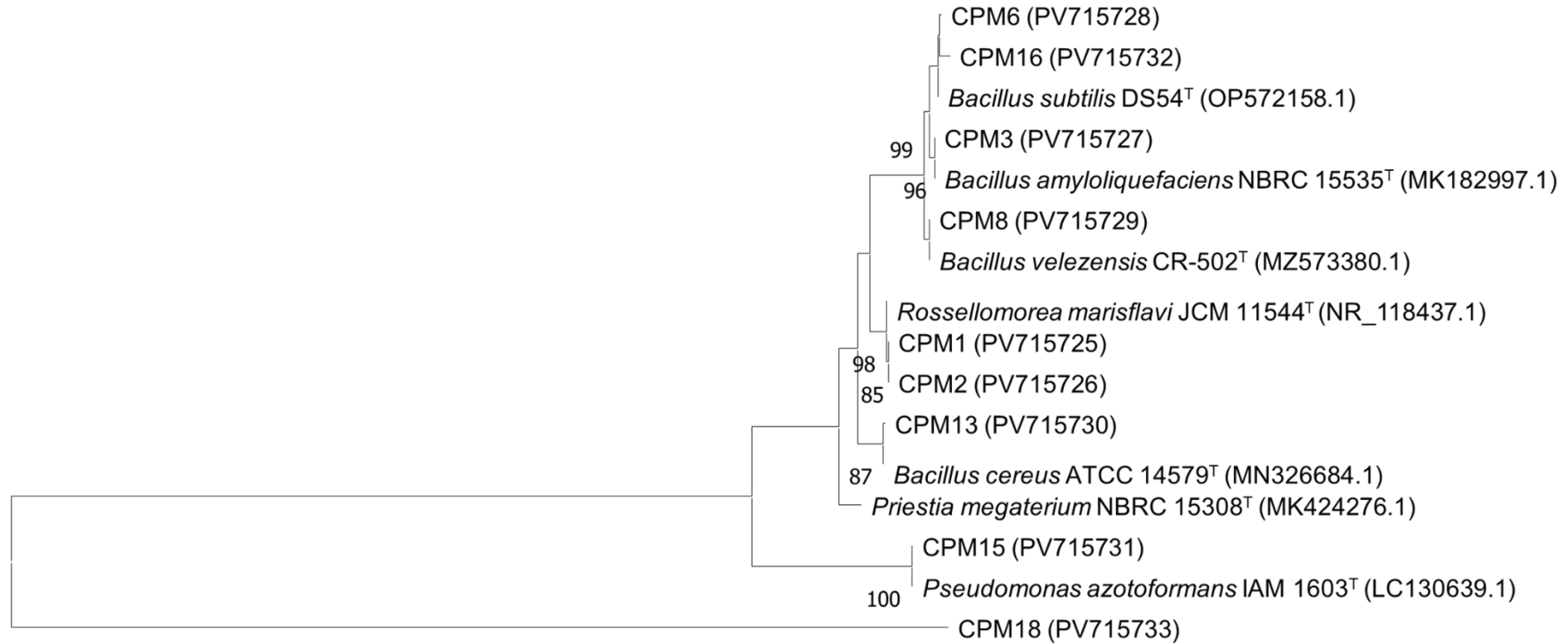
identificado como *Bacillus amyloliquefaciens* pelo sequenciamento, não foi reconhecido pela biblioteca da Bruker®, sugerindo lacuna nos bancos de referência para bactérias ambientais. Surányi *et al.* (2023) também relataram que o MALDI-TOF MS falhou em identificar até um terço dos isolados ambientais, reforçando a limitação das bibliotecas disponíveis. Por outro lado, Ashfaq *et al.* (2022) demonstraram a aplicabilidade do método em contextos ambientais, embora recomendem a contínua expansão das bases de dados.

A árvore filogenética baseada no sequenciamento (Figura 18) corroborou alguns agrupamentos do dendrograma, como a proximidade entre *Rosellomorea marisflavi* CPM1 e CPM2, e entre *B. subtilis* CPM6 e CPM16. Entretanto, divergências também foram observadas: *Pseudomonas rhodesiae* CPM15 e *Priestia megaterium* CPM18 formaram ramos bem definidos e distantes de *Bacillus* na filogenia, mas foram associados a esse gênero no dendrograma. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de o MALDI-TOF MS basear-se em perfis proteicos, enquanto o sequenciamento de 16S reflete relações genéticas.

O gênero *Bacillus* merece destaque, por ser altamente diverso e polifilético. Estudos genômicos recentes sugerem a subdivisão do grupo em novos gêneros, como o clado “Subtilis”, com base em marcadores moleculares e proteínas conservadas (Harirchi *et al.*, 2022). Além disso, a classificação das espécies do grupo *Bacillus cereus* é particularmente desafiadora devido à elevada similaridade genética, o que dificulta a distinção em nível de espécie mesmo por 16S rRNA (Carroll *et al.*, 2022).

Apesar dos resultados obtidos, algumas lacunas ainda permanecem e podem ser exploradas em trabalhos futuros. A ampliação das bibliotecas de referência do MALDI-TOF MS, com a inclusão de isolados provenientes de habitats específicos como o intestino de cupins, representa um passo essencial para aumentar a acurácia da identificação em ambientes não convencionais. Paralelamente, análises genômicas de maior resolução, como o sequenciamento de genomas completos e a comparação por Average Nucleotide Identity (ANI), poderiam esclarecer relações filogenômicas pouco definidas. Estudos de proteômica comparativa e metabolômica também são recomendados, pois permitiriam compreender melhor a base funcional das semelhanças e divergências observadas entre dendrogramas proteicos e árvores filogenéticas. Finalmente, a integração de dados fenotípicos, moleculares e genômicos em uma abordagem de taxonomia polifásica expandida contribuirá para consolidar a identificação e caracterização de linhagens bacterianas associadas a cupins, fortalecendo o entendimento de sua diversidade e potencial biotecnológico.

**Figura 18** – Árvore filogenética das bactérias isoladas do intestino de cupim



Análise filogenética baseada em sequências do gene rDNA 16S dos isolados recuperados do intestino de cupins e espécies relacionadas. Valores de Bootstrap (1000 execuções replicadas, mostradas em%) acima de 70% são listados.

Fonte: A autora, 2025.

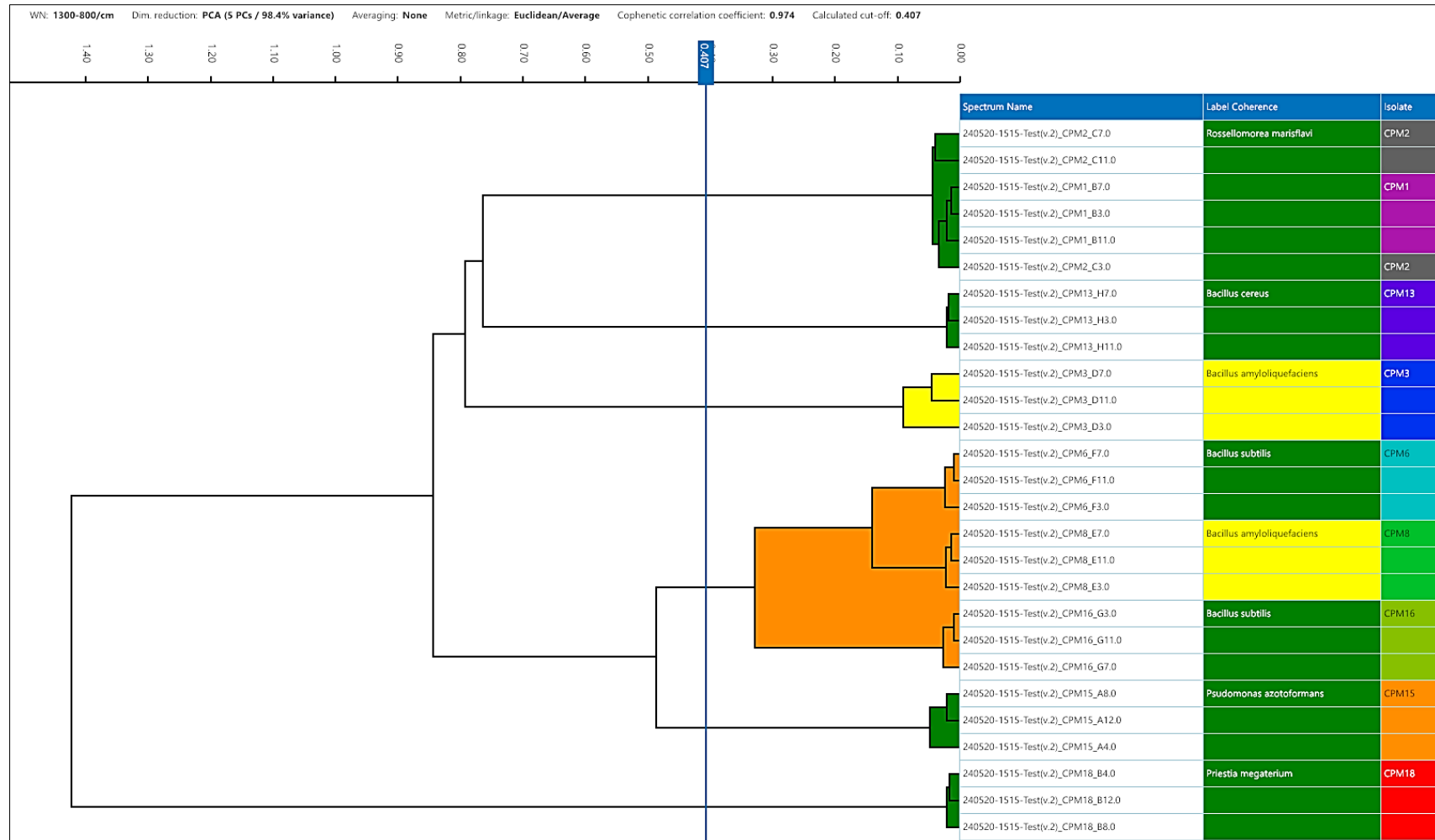
#### 4.4.1.1 Análise dos grupos bacterianos utilizando FT-IR IR Biotyper

Para uma análise taxonômica mais detalhada, empregou-se a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) por meio do sistema IR Biotyper®, destinado à diferenciação de micro-organismos em nível de espécie e subespécie. O dendrograma gerado utilizou a métrica euclidiana com ligação média, a partir de componentes principais (5 PCs explicando 98,4% da variância), apresentando um coeficiente de correlação cofenética de 0,974, o que indica confiabilidade no agrupamento (Figura 19).

Os resultados mostraram a formação de clusters bem definidos, com *Rosellomorea marisflavi* CPM1 e CPM2 agrupadas entre si, assim como *Bacillus cereus* CPM13 e *Bacillus amyloliquefaciens* CPM3. *Bacillus subtilis* CPM6 e CPM16 também se agruparam, embora separados por *B. amyloliquefaciens* CPM8, espécie que, coincidentemente, não havia sido identificada pelo MALDI-TOF MS. De modo geral, os arranjos do IR Biotyper® reforçaram a proximidade entre espécies do gênero *Bacillus*, enquanto *Pseudomonas azotoformans* CPM15 apareceu isolada, refletindo sua divergência composicional.

A separação de *Pseudomonas* em relação a *Bacillus* é consistente com sua distância filogenética: enquanto *Pseudomonas* pertence ao filo Proteobacteria e é Gram-negativa, *Bacillus* faz parte do filo Firmicutes e é Gram-positiva. Essas diferenças estruturais e metabólicas explicam o distanciamento observado (Guan *et al.*, 2018; Carroll *et al.*, 2022). Além disso, estudos transcriptômicos demonstram que a interação entre *Bacillus* e *Pseudomonas* pode modular perfis de expressão gênica em ambas as bactérias (Lyng & Kovács, 2023), o que pode justificar a similaridade parcial detectada por MALDI-TOF MS (Figura 17) e a maior divergência revelada pelo FT-IR (Figura 19).

**Figura 19** – Dendrograma gerado por IR Biotyper® com as bactérias isoladas de cupim

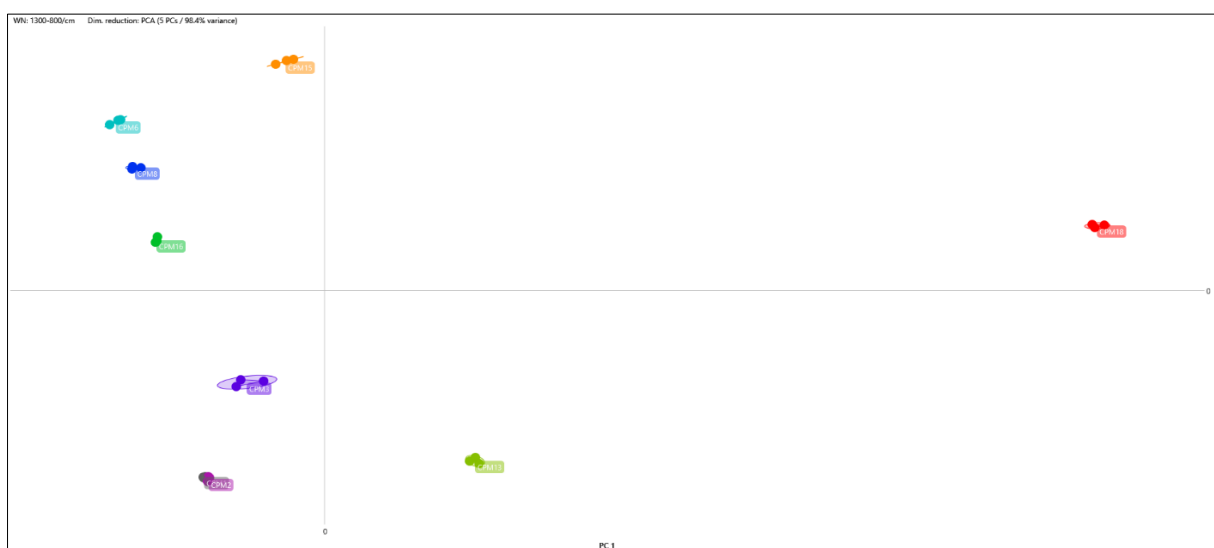


O dendrograma gerado por IR Biotyper® utiliza a métrica euclidiana com ligação média para agrupar diferentes isolados bacterianos com base em suas características espectrais, reduzidas por PCA (5 PCs explicando 98,4% da variância). O coeficiente de correlação cofenética (0,974) indicando um agrupamento confiável

Fonte: A autora, 2025.

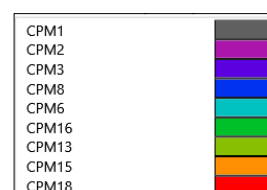
Outro ponto relevante foi o isolamento de *Priestia megaterium* CPM18, que permaneceu distante de todas as demais espécies no dendrograma do FT-IR, reforçando sua singularidade em termos de composição química estrutural. Esse resultado já havia sido observado na árvore filogenética (Figura 18) e foi novamente confirmado pelo diagrama de dispersão gerado pela Análise Discriminante Linear (Figura 20). Tais achados sugerem que essa espécie apresenta perfis únicos de carboidratos, lipídios e componentes de parede celular (Bruker, 2023; IR Biotyper®, 2021).

**Figura 20** – Diagrama de dispersão bidimensional



Distanciamento entre as réplicas dos isolados destacando CPM18 *Priestia megaterium* (Vermelho), consideravelmente distante das outras cepas bacterianas. Os espectros são codificados por cores por isolado, com cada

Fonte: A autora, 2025.



Comparando-se os métodos, observa-se que o MALDI-TOF MS agrupou *P. megaterium* CPM18 com *R. marisflavi* CPM1 e CPM2 (Figura 17), provavelmente devido à proximidade de perfis proteicos, enquanto o FT-IR destacou sua distinção química. Esses resultados reforçam que técnicas complementares podem fornecer perspectivas distintas e enriquecedoras sobre a diversidade microbiana.

Até o momento, a aplicação do IR Biotyper® tem se concentrado principalmente em microbiologia clínica (Candela *et al.*, 2025; Uribe *et al.*, 2023; Hong *et al.*,

2022; Teng *et al.*, 2022). Portanto, o presente estudo se destaca por explorar sua aplicação em bactérias de origem ambiental, associadas ao intestino de cupins. Esse enfoque é relevante, pois a microbiota intestinal desses insetos constitui um “microbioma central” adaptado à digestão de celulose, com forte influência da dieta e da evolução simbiótica (Vikram *et al.*, 2021).

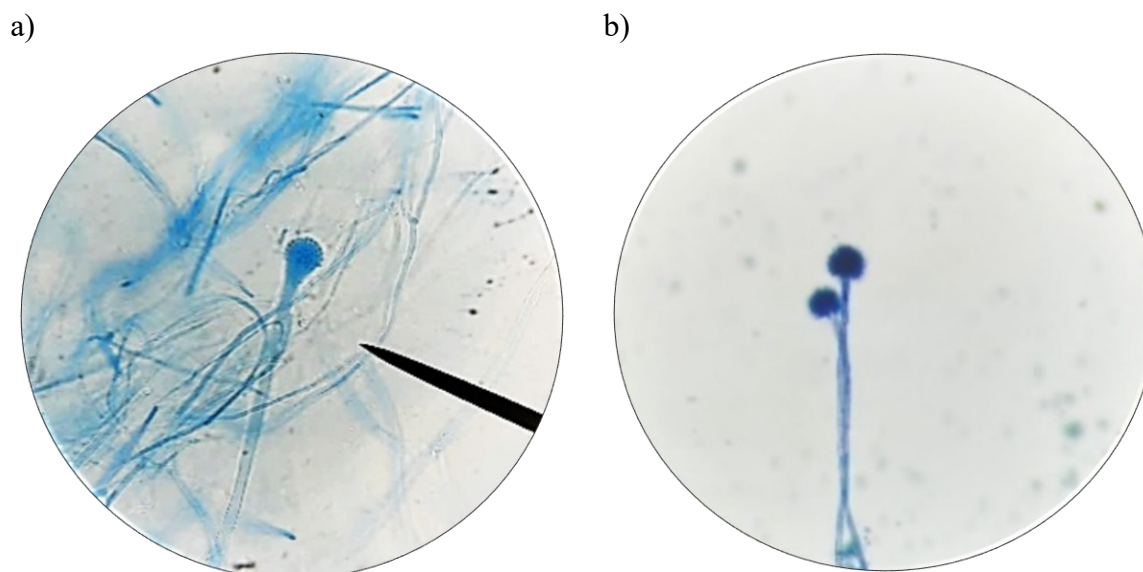
A integração entre FT-IR e MALDI-TOF MS permitiu identificar tanto similaridades quanto divergências nos perfis químicos e proteicos das linhagens. Estudos anteriores demonstram que a combinação dessas metodologias pode aumentar significativamente a precisão da tipagem microbiana (Feng *et al.*, 2020). De forma semelhante, os resultados aqui obtidos evidenciam o potencial dessas abordagens complementares para caracterização da microbiota intestinal de cupins, abrindo novas perspectivas para compreender suas interações metabólicas, diversidade filogenética e papel ecológico.

#### 4.4.2 Caracterização taxonômica polifásica dos fungos isolados do solo de serrapilheira

Assim como realizado com os isolados bacterianos, a caracterização das linhagens de fungos filamentosos de serrapilheira com potencial biotecnológico seguiu uma abordagem polifásica. Para isso, foram empregadas técnicas morfológicas, moleculares e espectrais (MALDI-TOF MS e FT-IR), o que garantiu uma identificação detalhada e precisa dos micro-organismos estudados. Foram selecionadas nove linhagens de fungos filamentosos, com base no desempenho nos testes de atividades enzimáticas descritos no Capítulo II. Inicialmente, todos os isolados foram submetidos à observação de características morfológicas microscópicas.

Na análise em lâmina, foram identificados os principais gêneros, incluindo três isolados de *Aspergillus* (Figura 21) e dois de *Trichoderma*. Essa identificação preliminar permitiu a seleção das regiões mais adequadas para amplificação e sequenciamento, incluindo os genes da  $\beta$ -tubulina e da região ITS do rDNA.

**Figura 21** – *Aspergillus* identificados usando técnica do azul de algodão



Microscopia óptica, objetiva 40X; Após análises moleculares os respectivos fungos foram identificados: a) BG10 – *Aspergillus hiratsukae*; b) BR14 – *Aspergillus versicolor*.

FONTE: A autora, 2025.

Após a análise microscópica, os isolados foram submetidos ao sequenciamento dos genes ITS e  $\beta$ -tubulina. Os resultados do BLAST/NCBI apresentaram altos índices de similaridade, confirmando a identidade dos isolados. SG16 e BC01 foram identificados como pertencentes ao gênero *Trichoderma*, com 98,97% e 100% de identidade, respectivamente. SC6.3, BR04 e BR15 foram classificados como *Talaromyces mycothecae*, com percentuais variando entre 99,45% e 99,47%. A análise morfológica revelou colônias com centro esverdeado e halo alaranjado, padrão semelhante entre os três isolados, embora a intensidade da coloração fosse mais discreta no isolado BR04.

Por fim, os isolados BR19, SG12, BG10 e SG14 foram identificados como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus hiratsukae* e *Coniochaeta velutina*, respectivamente. Os percentuais de identidade variaram entre 99,61% para *C. velutina* (SG14) e 100% para *A. fumigatus* (BR19) e *A. tubingensis* (SG12), confirmando a precisão da identificação. A integração da análise molecular com os dados morfológicos aumentou a confiabilidade dos resultados e favoreceu a compreensão da diversidade fúngica presente nas amostras.




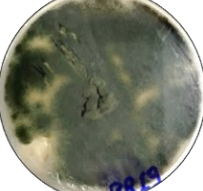
Nas análises por MALDI-TOF MS, nenhum isolado foi identificado pelo banco de dados da Bruker®, embora espectros tenham sido gerados. Para contornar essa






limitação, os espectros foram reavaliados pela plataforma Mass Spectrometry Imaging (MSI), que permitiu a identificação de dois isolados: BR19 como *A. fumigatus* (score 34,36) e BG10 como *A. hiratsukae* (score 20,61).

A Tabela 12 apresenta também a morfologia das colônias cultivadas em meio PDA, destacando diferenças fenotípicas entre os isolados: colônia verde-escura e difusa para BR19; preta e esporulada para SG12; branca e aveludada para BG10; e marrom aveludada para SG14. Essas variações evidenciam a diversidade morfológica dos isolados e complementam os dados moleculares e proteômicos obtidos.

Após a identificação, foram construídas árvores filogenéticas a partir das sequências gênicas comparadas ao GenBank, visando avaliar a proximidade evolutiva dos isolados com espécies de referência. Para essa análise, utilizou-se o gene da  $\beta$ -tubulina em BR19, BG10, SG12, BR15, BR04 e SC6.3 (Figura 22), e o gene ITS do rDNA em BC01, SG14 e SG16 (Figura 23). As árvores foram elaboradas no software MEGA 11.

Tabela 12 – Identificações e classificação dos fungos isolados do solo de serrapilheira

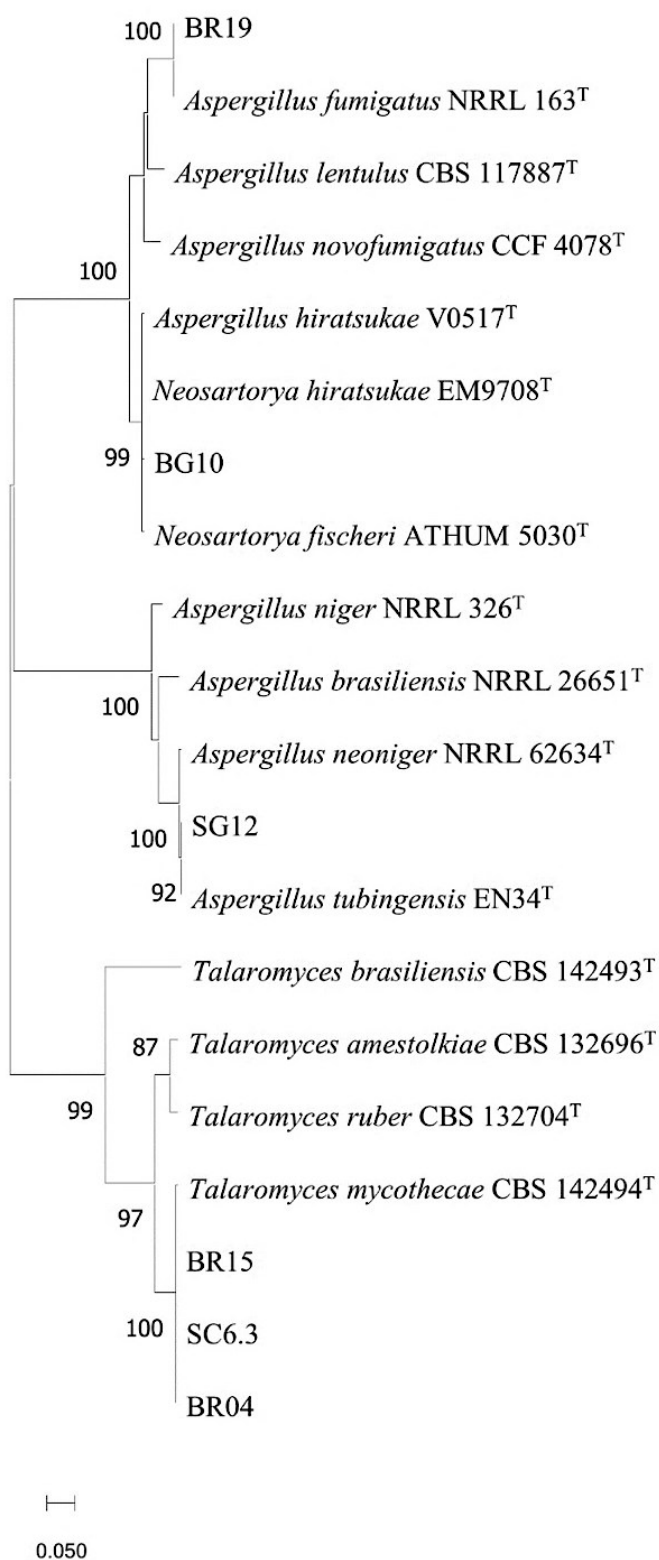
Código	Nº de acesso atribuídos no Gen Bank	Identificação	% Ident.	Nº acesso das Linhagens Referência	Coleção de Cultura	MALDI-TOFF MS + MSI-2	Score MSI-2	Fotos Meio – PDB
<b><math>\beta</math>-tubulina</b>								
SC6.3		<i>Talaromyces mycothecae</i>	99.45%					
BR04		<i>Talaromyces mycothecae</i>	99.47%	LT855561	CBS 142494 <sup>T</sup>			
BR15		<i>Talaromyces mycothecae</i>	99.47%					
BR19		<i>Aspergillus fumigatus</i>	100.00%	LC589344.1	NRRL 163 <sup>T</sup>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	34,36	

<b>SG12</b>		<i>Aspergillus tubingensis</i>	100.00%	KT965711.1	en 34 <sup>T</sup>			
<b>BG10</b>		<i>Aspergillus hiratsukae</i>	99.78%	FJ433874.1	UOA/HCPF EM9708 <sup>T</sup>	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	20,61	
ITS								
<b>SG16</b>	PV730329	<i>Trichoderma</i> sp.	98.97%					
				MT065756.1	Thar22 <sup>T</sup>			
<b>BC01</b>	PV730328	<i>Trichoderma</i> sp.	100.00%					
<b>SG14</b>	PV730330	<i>Coniochaeta velutina</i>	99.61%	MK656234.1	8878 <sup>T</sup>			

% Ident: BLAST NCBI;

Fonte: A autora, 2025.

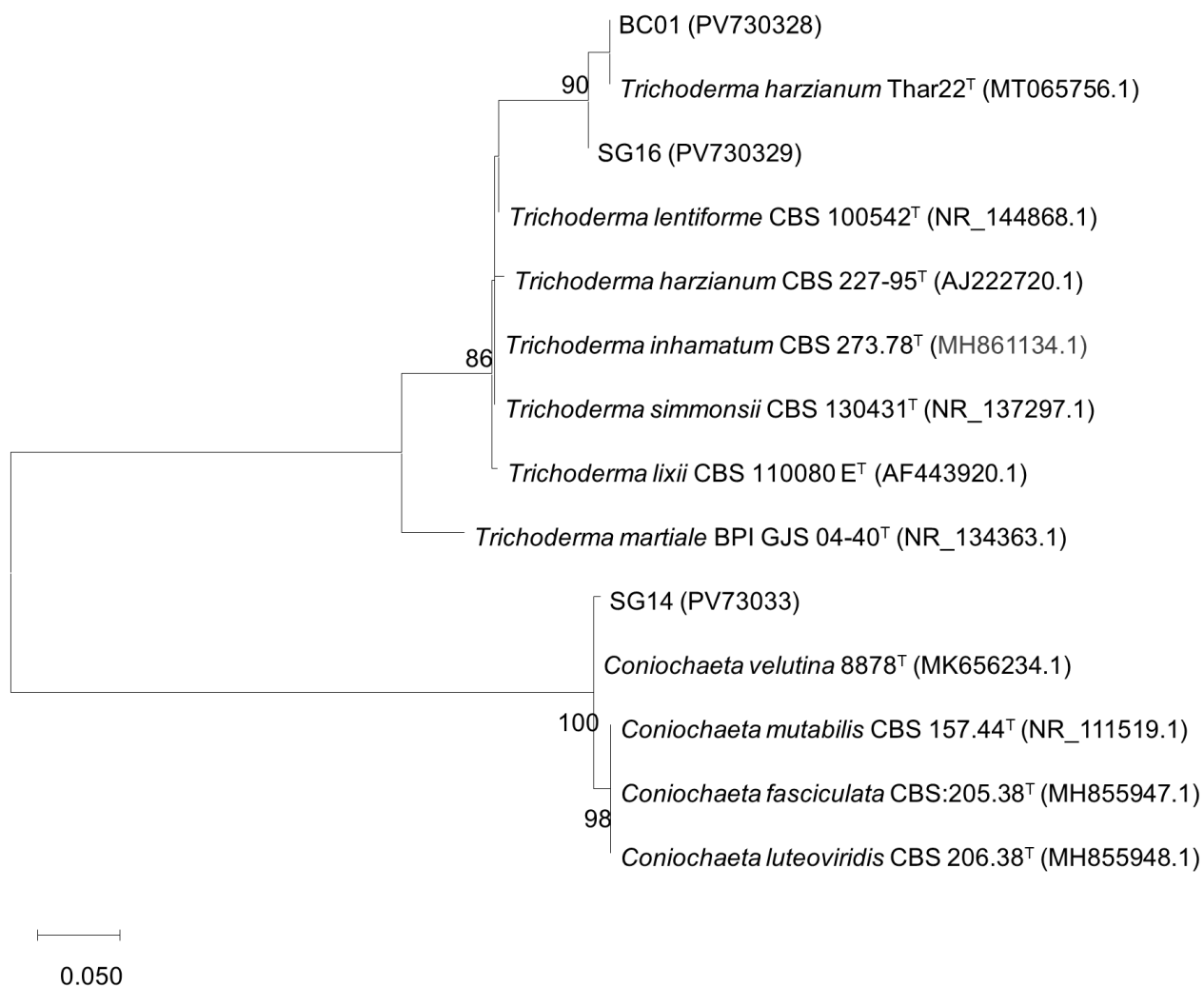
**Figura 22** – Árvore filogenética dos isolados afiliados aos gêneros *Aspergillus* e *Talaromyces*.



Análise filogenética baseada em sequências do gene  $\beta$ -tubulina dos isolados recuperados de serrapilheira. Valores de Bootstrap (1000 execuções replicadas, mostradas em%) acima de 70% são listados.

Fonte: A autora, 2025.

**Figura 23** – Árvore filogenética dos isolados afiliados aos gêneros *Trichoderma* e *Coniochaeta*.



Análise filogenética baseada em sequências do gene rDNA ITS dos isolados recuperados de serrapilheira. Valores de Bootstrap (1000 execuções replicadas, mostradas em%) acima de 70% são listados.

Fonte: A autora, 2025.

A análise filogenética realizada permitiu avaliar as relações evolutivas entre os isolados fúngicos e espécies de referência, fornecendo uma identificação precisa, bem suportada pelos valores de bootstrap. Quanto mais próximo de 100, maior a confiabilidade dos agrupamentos. Os isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram claramente diferenciados na árvore filogenética (Figura 22). O isolado BR19 agrupou-se com *Aspergillus fumigatus* NRRL 163<sup>T</sup>, com suporte de bootstrap de 100. De forma semelhante, BG10 mostrou proximidade com *Aspergillus hiratsukae* V0517<sup>T</sup> e *Neosartorya hiratsukae* EM9708<sup>T</sup>, também com bootstrap de 100. O isolado SG12 foi identificado como *Aspergillus tubingensis* EN34<sup>T</sup>, igualmente com bootstrap de 100, corroborando sua classificação taxonômica.

Os isolados BR15, SC6.3 e BR04, pertencentes ao gênero *Talaromyces*, apresentaram forte suporte filogenético, agrupando-se com *Talaromyces mycothecae* CBS 142494<sup>T</sup> (bootstrap 100). Além disso, *T. mycothecae* mostrou proximidade evolutiva com outras espécies do gênero, como *Talaromyces ruber*, *T. amestolkiae* e *T. brasiliensis*, com valores de bootstrap entre 87 e 99, indicando uma relação filogenética consistente.

A segunda árvore filogenética (Figura 23) evidenciou separação clara entre os gêneros *Trichoderma* e *Coniochaeta*, refletindo diferenças evolutivas significativas. No topo da árvore, o isolado BC01 agrupou-se com *Trichoderma harzianum* Thar22<sup>T</sup>, com suporte de bootstrap de 68, indicando relação moderada. Dentro do mesmo clado, o isolado SG16 mostrou proximidade com espécies como *Trichoderma lentiforme*, *T. harzianum* CBS 227-95<sup>T</sup>, *T. inhamatum*, *T. simmonsii*, *T. lixii* e *T. martiale*, com valores de bootstrap de 50 a 85, refletindo diferentes níveis de suporte.

A identificação precisa das espécies de *Trichoderma* permanece um desafio, conforme destacado por Cai *et al.* (2022), que recomendam a análise de pelo menos três genes barcode: ITS (Internal Transcribed Spacer), *tef1* (fator de alongação 1-alfa) e *rpb2* (subunidade 2 da RNA polimerase). Atualmente, conjuntos completos desses três loci estão disponíveis para apenas 273 espécies, muitas ainda com sequências incompletas ou compartilhando filótipos de *tef1* ou *rpb2* com outras espécies, dificultando a identificação inequívoca. Assim, estima-se que apenas 224 espécies (cerca de 60% do total conhecido) possam ser identificadas com precisão, enquanto aproximadamente 40% ainda apresentam ambiguidade molecular.

O outro clado identificado na árvore corresponde ao gênero *Coniochaeta*, incluindo *C. velutina*, *C. mutabilis*, *C. fasciculata* e *C. luteoviridis*. Esse agrupamento apresentou valores de bootstrap elevados, entre 98 e 100, demonstrando alta confiabilidade das

relações inferidas. A separação entre os clados de *Trichoderma* e *Coniochaeta* confirma divergência genética bem definida entre esses grupos. A escala de 0,050 na árvore sugere distância evolutiva significativa entre as espécies analisadas. O agrupamento dentro de cada gênero reflete coerência taxonômica e robustez da análise filogenética, permitindo melhor compreensão das relações entre os isolados estudados.

#### 4.4.2.1 Análise do perfil dos isolados de mesma espécie por FT-IR

Após as análises de identificação dos fungos de serrapilheira, observou-se a presença de cinco isolados pertencentes a duas espécies: três *Talaromyces mycothecae* e dois *Trichoderma* spp. A disponibilidade do equipamento IR Biotyper® na Micoteca da Universidade do Minho (MUM) possibilitou a realização de novos testes, nos quais foram selecionados os fungos pertencentes às mesmas espécies, a fim de uma caracterização mais aprofundada, complementando e enriquecendo os dados já obtidos.

Embora o FT-IR seja amplamente utilizado na identificação de microrganismos, especialmente bactérias, sua aplicação em fungos filamentosos ainda é pouco explorada (WANG-WANG *et al.*, 2022). A complexidade estrutural e a variabilidade das paredes celulares desses organismos representam desafios para a padronização de protocolos de identificação.

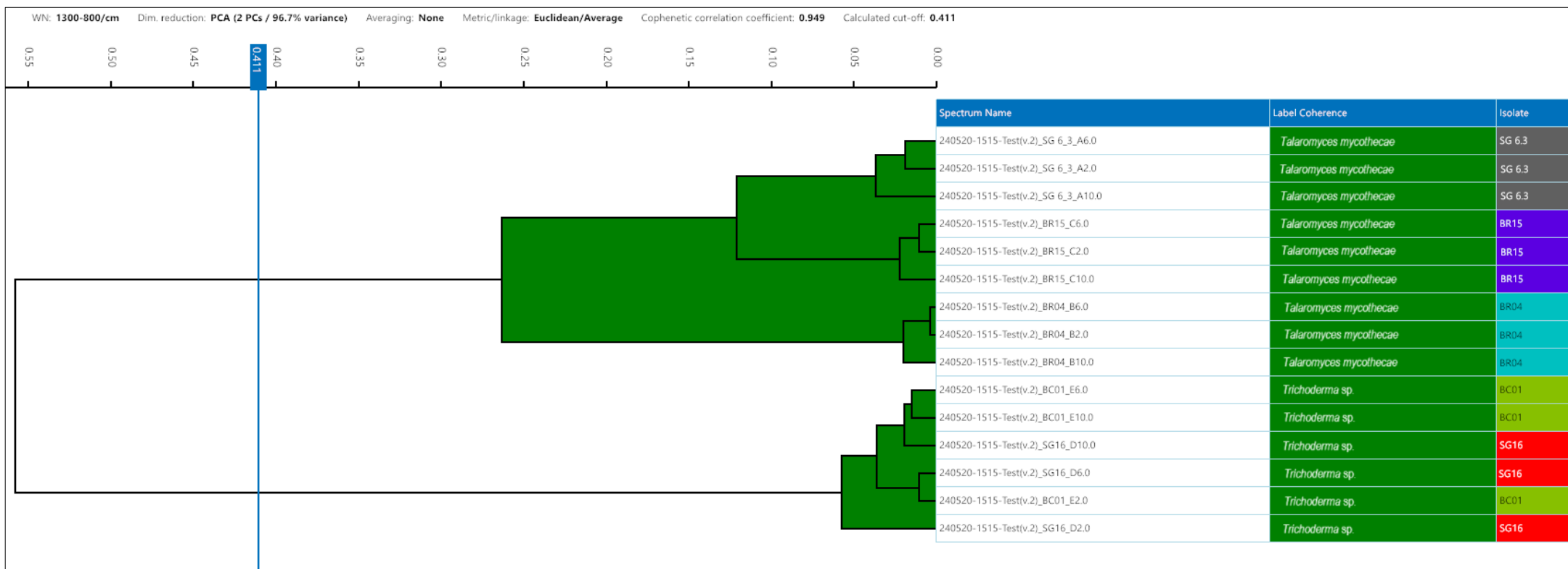
O estudo de Dzurendová *et al.* (2021) destaca que o FT-IR é eficaz na detecção de fosfatos na biomassa de fungos, devido às fortes bandas de absorção desses compostos. No entanto, apresenta limitações para a identificação de carotenoides, que não podem ser detectados diretamente pela técnica em razão de sua baixa concentração na biomassa. Apesar dessas restrições, o FT-IR continua sendo uma ferramenta relevante na análise de fungos filamentosos, especialmente para caracterização de lipídios, polissacarídeos da parede celular e proteínas, demonstrando valor para pesquisa e monitoramento da biomassa fúngica.

Outro estudo, realizado com fungos filamentosos de queijo, demonstrou que o FT-IR possui alta capacidade de diferenciação rápida com base em seus espectros (Kirtil *et al.*, 2024). Entretanto, relatos sobre a aplicação da técnica em amostras de fungos filamentosos são praticamente inexistentes. Em decorrência dessas limitações, ainda não há protocolos amplamente estabelecidos para a identificação desses fungos pelo IR Biotyper®. Pesquisas

adicionais são necessárias para o desenvolvimento de metodologias padronizadas que possibilitem sua aplicação eficaz.

A metodologia adaptada neste estudo mostrou-se eficaz, gerando espectros que puderam ser analisados. Os resultados obtidos após a leitura da placa de sílica com as amostras de *Talaromyces mycothecae* (BR04, BR15 e SC6.3) e *Trichoderma* sp. (BC01 e SG16) foram representados em um dendrograma (Figura 24) e em um diagrama de dispersão bidimensional (Figura 25), analisados a seguir.

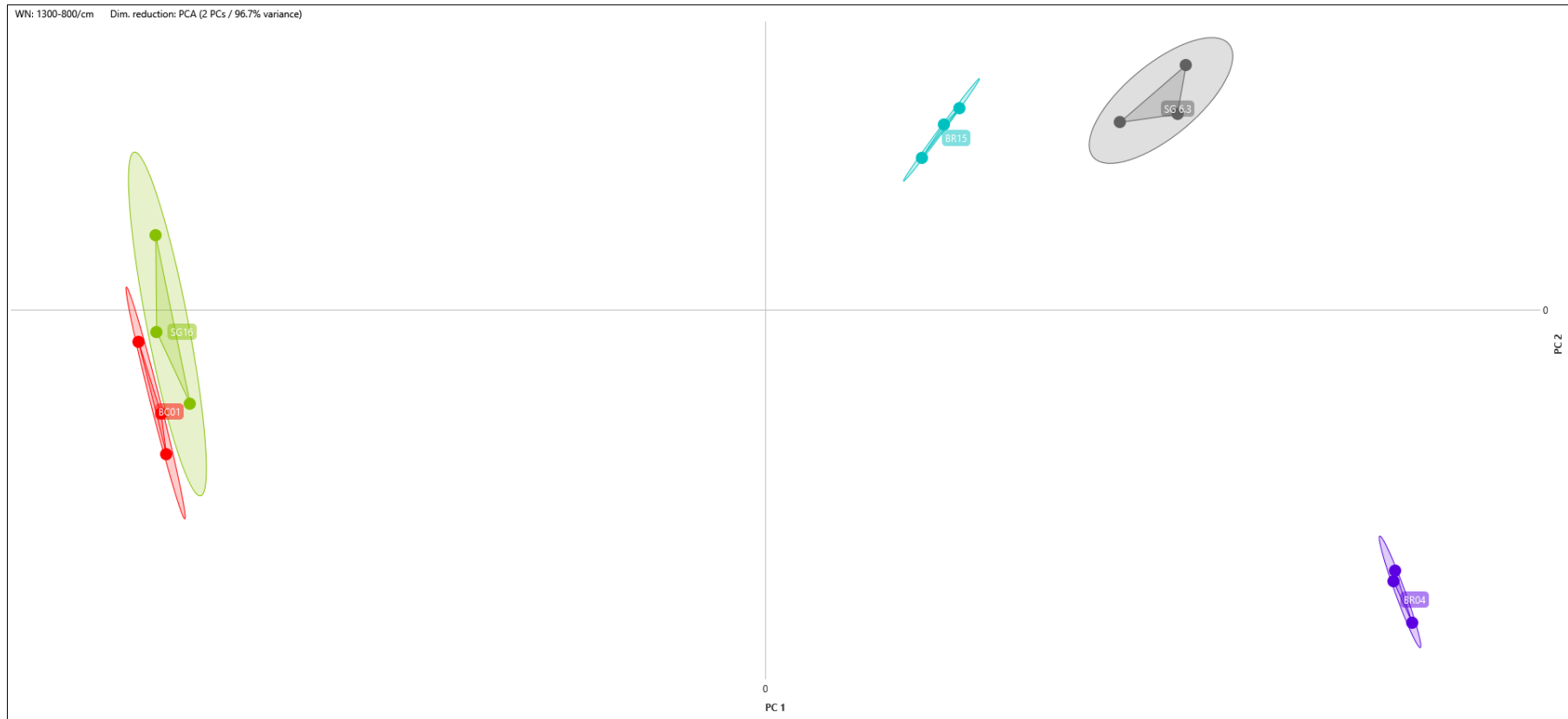
**Figura 24** – Dendrograma gerado por IR Biotyper® com fungos filamentosos *Tichoderma* sp e *Talaromyces mycothecae*.



O dendrograma gerado por IR Biotyper® utiliza a métrica euclidiana com ligação média para agrupar as cepas de fungo com base em suas características espectrais, reduzidas por PCA (5 PCs explicando 96,7% da variância). O coeficiente de correlação cophenética (0,949) indicando um agrupamento confiável

Fonte: A autora, 2025.

**Figura 25** – Diagrama de dispersão bidimensional



Distanciamento entre os isolados considerados mesma espécie (*Tichoderma* sp e *Talaromyces mycothecae*). Os espectros são codificados por cores por isolado, com cada Região de número de onda 1300–800  $\text{cm}^{-1}$

Indicação das cores de cada isolado à direita.

Fonte: A autora, 2025.

Color (Isolate)	
SG 6.3	
BR04	
BR15	
SG16	
BC01	

O dendrograma apresentado (Figura 24) exibe a relação de similaridade entre os isolados de fungos analisados por FT-IR, com base em agrupamento hierárquico. O método utilizou distância euclidiana com ligação média, classificando os isolados em dois grupos principais, separados pelo valor de corte de 0,411. O primeiro grupo reuniu isolados identificados como *Talaromyces mycothecae* (SG6.3, BR15 e BR04), enquanto o segundo grupo correspondeu a isolados de *Trichoderma* sp. (BC01 e SG16). A alta correlação cophenética (0,949) indica que o agrupamento reflete adequadamente as distâncias reais entre as amostras. Esse resultado mostra que o FT-IR foi capaz de diferenciar eficientemente os gêneros *Talaromyces* e *Trichoderma*, demonstrando sua aplicabilidade na identificação fúngica (PASCALE *et al.*, 2022).

A Análise de Componentes Principais (PCA) já foi aplicada para representar separações entre grupos microbianos, mostrando que isolados de diferentes sorogrupos formam clusters distintos, reforçando a capacidade do FT-IR de discriminar espécies e subespécies de forma rápida e econômica (PASCALE *et al.*, 2022).

O diagrama de dispersão bidimensional (Figura 25), obtido por PCA, manteve 96,7% da variância dos dados, permitindo visualizar os agrupamentos. Os isolados de *Trichoderma* sp. SG16 e BC01 formaram um grupo coeso, com elipses de variância sobrepostas, indicando alta similaridade espectral. Já os isolados de *Talaromyces mycothecae* se dividiram em dois subgrupos: BR15 e SG6.3 apareceram bem agrupados, enquanto BR04 ficou mais afastado, sugerindo variação espectral significativa. Essa diferença pode representar variações intraespecíficas, embora a separação eficiente entre os gêneros *Talaromyces* e *Trichoderma* confirme a aplicabilidade do FT-IR para diferenciação fúngica. Ressalta-se que a análise experimental no IR Biotyper® foi possível porque as espécies de referência já eram conhecidas, permitindo que o equipamento comparasse os espectros químicos estruturais entre os isolados.

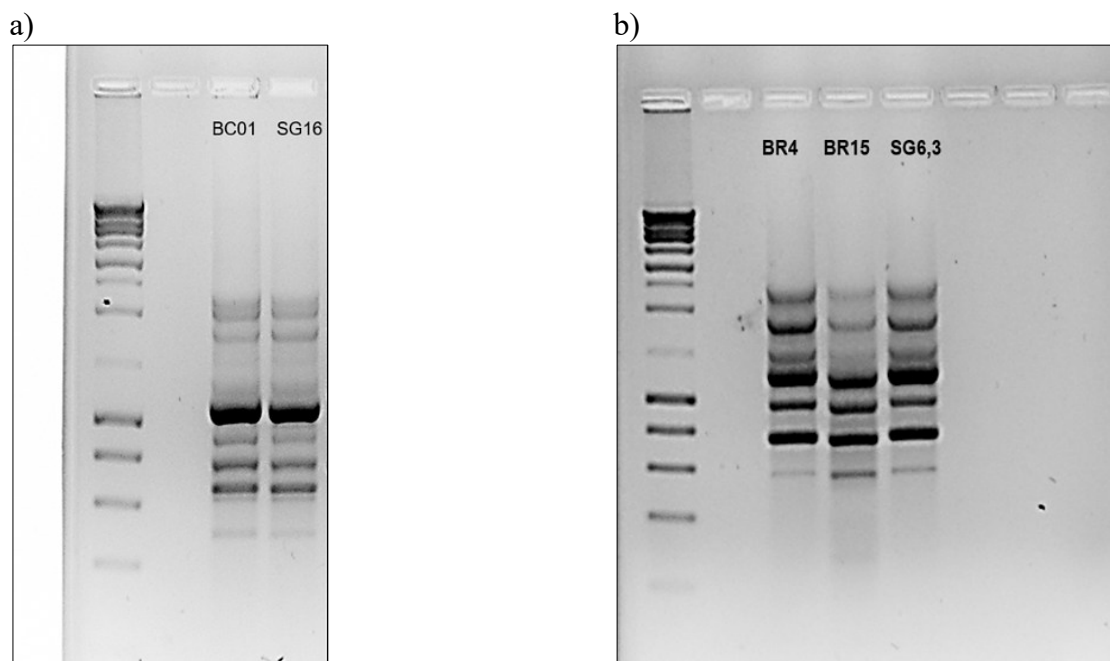
Entre as limitações do FT-IR estão: a necessidade de micro-organismos cultiváveis e em culturas puras; a dependência de condições de crescimento controladas e padronizadas para resultados reprodutíveis; a incompatibilidade entre bancos de dados espectrais de diferentes laboratórios devido a variações experimentais; e a escassez de bibliotecas especializadas. Embora a técnica seja reconhecida como eficaz para tipagem bacteriana abaixo do nível de espécie, sua sensibilidade às condições de preparação dificulta a criação de um banco de dados FT-IR globalmente acessível, essencial para aplicações em microbiologia clínica, alimentar e ambiental (YANG *et al.*, 2023). No caso dos fungos

filamentosos, a carência de referências em bases espectrais agrava ainda mais essas limitações, reforçando a necessidade de novas investigações que enriqueçam a plataforma do IR Biotyper®.

Para afirmar que os isolados verificados pertencem à mesma linhagem, seria necessário estabelecer um critério quantitativo mais rigoroso, como um limiar de similaridade espectral ou a realização de análises genéticas complementares. Assim, com base apenas nos dados de PCA, não é possível confirmar que os isolados de *Talaromyces mycothecae* e *Trichoderma* sp. representam a mesma cepa. Para tal, seria necessária a aplicação de técnicas adicionais, como estudos moleculares complementares ou a definição prévia de um valor de similaridade espectral.

Com base nos resultados obtidos pelo FT-IR, as cepas de fungos foram submetidas a análises de PCR fingerprinting genético. Para isso, utilizou-se o primer (GACA)<sub>4</sub> (5'-GACAGACAGACAGACA-3') (Figura 26). A eficiência desse primer na diferenciação de espécies de fungos já foi relatada por Liu *et al.* (2014).

**Figura 26** – Imagens da PCR em gel de agarose dos isolados de mesma espécie



- a) Representando a corrida das amostras de *Trichoderma* sp. b) Representando a corrida das amostras de *Talaromyces mycothecae*

Fonte: A autora, 2025.

As imagens apresentam um marcador de peso molecular (*Ladder*) no primeiro poço, utilizado como referência para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA. O segundo poço foi destinado à verificação da pureza do primer, confirmando que não há interferência na presença de bandas das amostras testadas, atuando como controle negativo.

As bandas das amostras BC01 e SG16 são praticamente idênticas, indicando forte evidência de que pertencem à mesma espécie e possivelmente à mesma cepa de *Trichoderma* sp. No gel de agarose contendo as três amostras de *Talaromyces mycothecae* (BR04, BR15 e SG6.3), os padrões de bandas também se mostraram bastante semelhantes, sugerindo alta relação genética entre elas. Essa similaridade indica que pertencem à mesma espécie e podem representar variantes muito próximas ou até a mesma cepa.

Entretanto, para confirmação definitiva, é necessário um critério quantitativo de similaridade. A identificação e diferenciação de fungos da mesma espécie representam desafios na micologia, devido à elevada diversidade morfológica e genética. Métodos tradicionais, baseados em características morfológicas e bioquímicas, muitas vezes são insuficientes, exigindo abordagens moleculares com marcadores de DNA (TEKPINAR & KALMER, 2019).

O DNA fingerprinting é um conjunto de técnicas que possibilita diferenciar linhagens dentro de uma mesma espécie. Métodos como o uso de microssatélites têm sido amplamente empregados (IUEBAL *et al.*, 2021). A combinação de diferentes abordagens moleculares tem permitido maior precisão na identificação de fungos, sendo essencial em áreas como agricultura, medicina e indústria, nas quais a correta diferenciação impacta diretamente o controle de doenças e o desenvolvimento biotecnológico (TEKPINAR & KALMER, 2019).

Atualmente, a introdução do sequenciamento de genoma completo (*Whole-Genome Sequencing* – WGS) na identificação fúngica tem proporcionado uma abordagem mais robusta e precisa para fungos filamentosos (SALEM-BANGO *et al.*, 2023). Portanto, embora métodos como fingerprinting de DNA e análise de bandas em gel continuem úteis em análises comparativas iniciais, apenas a incorporação de técnicas de sequenciamento avançadas pode fornecer uma identificação definitiva e confiável.

#### 4.5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo evidenciam a importância da caracterização polifásica na identificação e compreensão da diversidade microbiana associada a ambientes específicos, como o intestino de cupins e o solo de serrapilheira. A utilização de técnicas morfológicas, moleculares e espectroscópicas permitiu a identificação precisa das linhagens bacterianas e fúngicas, ressaltando sua relevância para aplicações biotecnológicas sustentáveis.

A análise das bactérias isoladas revelou a presença de espécies com alto potencial biotecnológico, destacando-se *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas azotoformans* e *Priestia megaterium*, cujas capacidades metabólicas indicam aplicações promissoras na conversão de biomassa e produção de biocombustíveis. Além disso, a aplicação de MALDI-TOF MS e FT-IR demonstrou a eficácia dessas ferramentas na diferenciação taxonômica e na análise da similaridade espectral dos isolados.

No contexto fúngico, a identificação de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus tubingensis* e *Trichoderma* sp. reforça seu papel essencial na degradação da biomassa lignocelulósica e produção de enzimas lignocelulolíticas, fundamentais para processos bioenergéticos. A espécie *Talaromyces mycothecae*, ainda pouco explorada, mostrou características metabólicas promissoras, sugerindo sua relevância na produção de bioenergia e degradação de resíduos lignocelulósicos.

A originalidade deste estudo reside na aplicação conjunta de diferentes metodologias analíticas para a caracterização microbiana, ampliando a compreensão sobre a diversidade e o potencial biotecnológico dos microrganismos estudados. A combinação de técnicas inovadoras proporcionou uma abordagem robusta para a identificação e diferenciação dos isolados, contribuindo para a ampliação do conhecimento sobre microrganismos de ambientes naturais. Dessa forma, os achados desta pesquisa reforçam a importância da preservação e exploração de microrganismos como fontes valiosas para aplicações sustentáveis. Estudos futuros poderão aprofundar as investigações sobre a funcionalidade dessas espécies em processos industriais e ambientais, favorecendo o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para a produção de biocombustíveis e outras aplicações biotecnológicas.

A realização dos experimentos nesse centro de referência (Micoteca da Universidade do Minho) permitiu a utilização de tecnologias avançadas e a aplicação de protocolos consolidados para identificação e caracterização de fungos e bactérias. A colaboração internacional estabelecida ampliou o rigor metodológico da pesquisa, garantindo maior confiabilidade nos resultados obtidos e fortalecendo a integração científica entre a Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) e a Universidade do Minho.

## **5. CAPÍTULO IV: CONSÓRCIO MICROBIANO COM FONTES DIFERENCIADAS NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE BIOGÁS**

### **5.1 RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

O uso de um consórcio microbiano, combinando bactérias do intestino de cupins e fungos do solo de serrapilheira, no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar é promissor para a produção de biogás. As bactérias especializadas na degradação de celulose e lignina, aliadas aos fungos produtores de enzimas como celulases e hemicelulases, podem acelerar a decomposição da biomassa, tornando os açúcares mais acessíveis para a fermentação. Esse método biológico é mais sustentável, evitando o uso de produtos químicos, reduzindo custos e promovendo uma solução eficiente para o aproveitamento de resíduos agrícolas na geração de energia renovável.

### **5.2 OBJETIVOS**

#### **5.2.1 Objetivo geral**

Investigar o uso de consórcios microbianos, formados por bactérias intestinais de cupins e fungos filamentosos de serrapilheira, no pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar, com foco na eficiência da degradação lignocelulósica e no aumento da produção de biogás, visando soluções sustentáveis e de baixo impacto ambiental.

#### **5.2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver um consórcio microbiano visando otimizar o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar;

- Determinar a produção de biogás a partir da biomassa pré-tratada pelo consórcio microbiano;
- Comparar a eficiência dos tratamentos (bactérias, fungos e consórcios) quanto à produção de biogás;
- Analisar a contribuição individual e sinérgica de bactérias e fungos, identificando vantagens, limitações e potenciais ajustes necessários.

### 5.3 MATERIAIS E MÉTODO

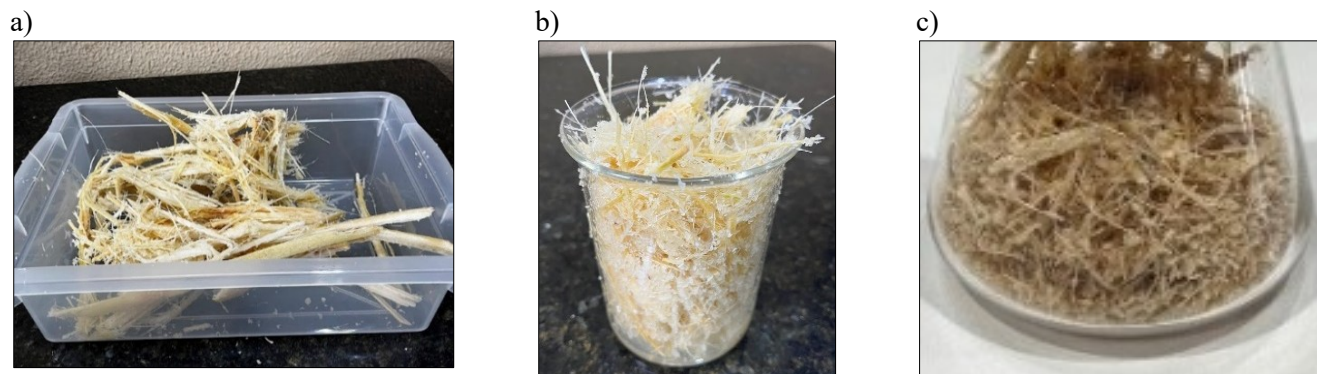
#### 5.3.1 Recolha e acondicionamento do bagaço de cana-de-açúcar.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi cedido por um estabelecimento comercial no centro de Foz do Iguaçu e levado ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA, onde foi acondicionado em refrigerador à 4 °C.

##### 5.3.1.1 *Secagem e Moagem*

O bagaço da cana-de-açúcar (BCA) coletado foi seco em estufa a 50 °C até atingir peso constante e, a seguir, foi triturado em um liquidificador industrial de baixa rotação Modelo: MF012 (Metalferreira®). Foram triturados inicialmente 500 g de bagaço de cana-de-açúcar por 5 minutos por duas vezes consecutivas (Figura 27). As amostras trituradas foram armazenadas a temperatura ambiente (PAIVA *et al*, 2009).

**Figura 27** – Pré-tratamento físico do bagaço de cana-de-açúcar



a) Primeira trituração; b) Segunda trituração; c) BCA após secagem  
Fonte: A autora, 2025.

### 5.3.2 Seleção dos micro-organismos para pré-tratamento

Foram selecionados três fungos filamentosos recuperados de solo de serrapilheira (*Talaromyces mycothecae* BR04; *Trichoderma* sp. BC01; *Aspergillus versicolor* BR14) e quatro bactérias isoladas do intestino de cupins (*Rosellomorea marisflavi* CPM2; *Bacillus amyloliquefaciens* CPM3; *Bacillus subtilis* CPM6; *Priestia megaterium* CPM18). A escolha foi baseada nos resultados enzimáticos apresentados no Capítulo II, visando à aplicação no processo de produção de biogás.

### 5.3.3 Teste de compatibilidade: Cocultura dos micro-organismos

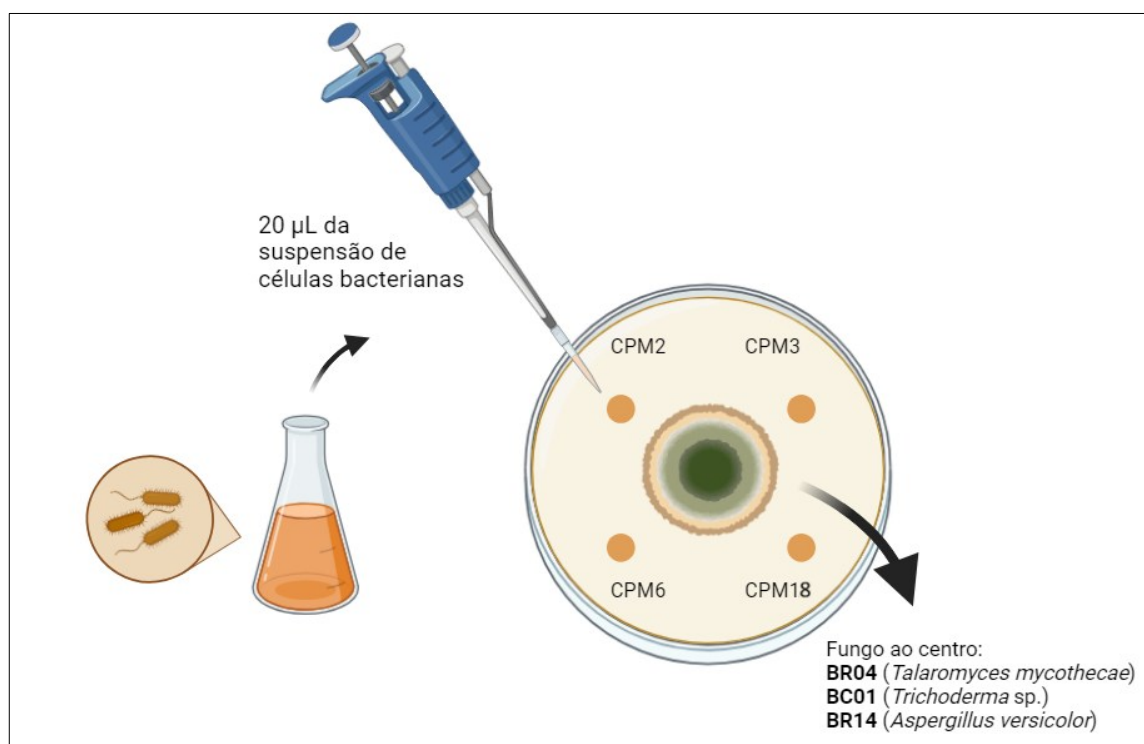
#### 5.3.3.1 Compatibilidade fungo-bactéria

Para selecionar combinações microbianas fungo-bactéria compatíveis, as quatro cepas de bactérias e as três cepas de fungos foram submetidas ao teste de antagonismo *in vitro*, de acordo com método modificado de Molina-Romero *et al.* (2017). As bactérias foram cultivadas em meio líquido apropriado (NB, 24 h a 37 °C, com agitação de 150 rpm), e os fungos em meio sólido (PDB, 5 dias a 28 °C). As placas de Petri utilizadas para o teste de compatibilidade foram preparadas com meio sólido PY-Ca (Peptona: 5 g L<sup>-1</sup>; extrato de levedura: 3 g L<sup>-1</sup>; cloreto de cálcio – CaCl<sub>2</sub>: 0,7 g L<sup>-1</sup>; ágar: 15 g L<sup>-1</sup>), adequado para o

crescimento simultâneo dos micro-organismos. Para a realização do teste, alíquotas de 20 µL de cada uma das quatro bactérias foram inoculadas em pontos distintos do meio de cultivo, enquanto uma alçada do fungo foi depositada no centro da placa (Figura 28).

Os três fungos selecionados foram testados frente às quatro bactérias, em triplicata. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas. Após esse período, avaliou-se o crescimento do fungo na presença das bactérias (MOLINA-ROMERO *et al.*, 2017; SANDERS, 2012).

**Figura 28** – Esquema de teste de compatibilidade dos micro-organismos



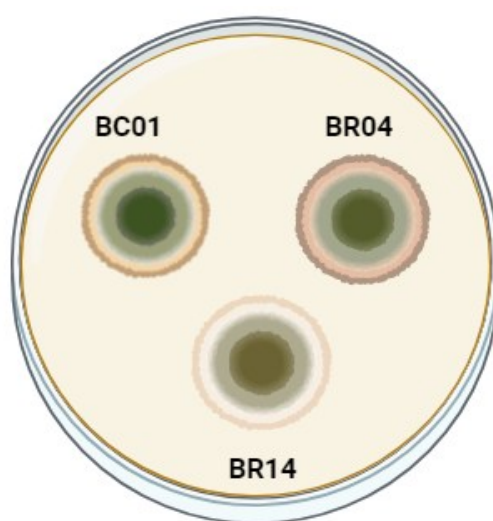
Fonte: A autora, 2025.

### 5.3.3.2 Compatibilidade fungo-fungo

Para o teste de compatibilidade fungo-fungo, utilizou-se o método modificado de Mohammad *et al.* (2011). Os três fungos (*Talaromyces mycothecae* BR04, *Trichoderma* sp. BC01 e *Aspergillus versicolor* BR14) foram cultivados simultaneamente em placas de Petri contendo meio PDA, com distância de 4,0 cm entre os pontos de inoculação (Figura 29).

Devido às diferenças nas taxas de crescimento, a inoculação foi realizada em duas etapas: primeiro foram inoculados os fungos de crescimento mais lento, *T. mycothecae* (BR04) e *A. versicolor* (BR14); após três dias, inoculou-se *Trichoderma* sp. (BC01). As placas foram incubadas, em triplicata, a 28 °C por sete dias, e as interações foram avaliadas visualmente com base no crescimento e na formação de zonas de inibição ou sobreposição entre as colônias.

**Figura 29** – Exemplo de placa de teste de compatibilidade fungo-fungo



Fonte: A autora, 2025.

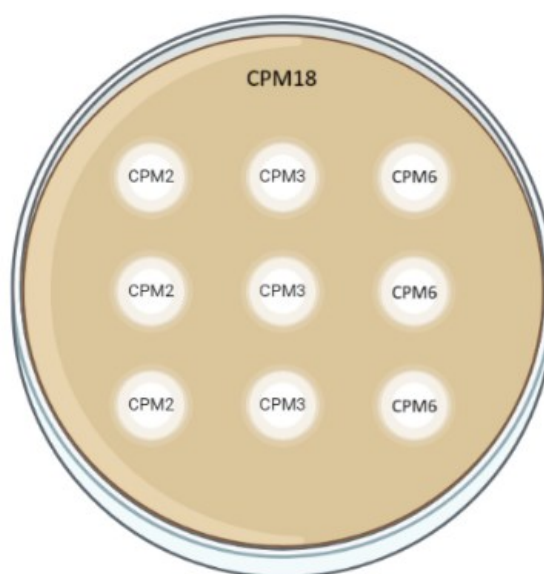
#### 5.3.3.3 Compatibilidade bactéria-bactéria

O teste de compatibilidade entre bactérias foi realizado com base em ensaios de antibiograma utilizando discos de papel-filtro (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A atividade antagônica foi avaliada por ensaios biológicos conduzidos em triplicata. As bactérias *Rossellomorea marisflavi* CPM2, *Bacillus amyloliquefaciens* CPM3, *Bacillus subtilis* CPM6 e *Priestia megaterium* CPM18 foram cultivadas em meio NB (24 h a 37 °C, sob agitação) e, em seguida, semeadas separadamente com auxílio de swab estéril em placas de Petri contendo meio MH (*Mueller-Hinton*).

Após a semeadura, discos de papel-filtro estéreis (Ø 6 mm), previamente embebidos com 10 µL da cultura celular das demais bactérias, foram depositados

equidistantemente sobre cada placa (Figura 30). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antagonista foi avaliada pela formação de halos de inibição ao redor dos discos. Esses experimentos permitiram identificar quais combinações de fungos e bactérias foram compatíveis e, portanto, poderiam ser utilizadas em co-inoculações, considerando a ausência de antagonismo nos testes *in vitro*.

**Figura 30** – Exemplo de placa de teste de compatibilidade entre bactérias



Fonte: A autora, 2025.

### 5.3.4 Preparo do Consórcio

#### 5.3.4.1 Preparo do consórcio de fungos

Primeiramente, os isolados fúngicos foram cultivados em meio PDA e incubados a 28 °C por sete dias. As colônias formadas foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (0,1% NaCl), e suspensões foram obtidas sondando-se suavemente a superfície com a ponta de uma pipeta Pasteur, gerando uma mistura de fragmentos e esporos.

As concentrações dessas suspensões foram ajustadas em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 520 nm, até atingir um nível de transmitância entre 70 e 72%. A viabilidade do inóculo foi testada por plaqueamento de 10 µL da suspensão em meio

PDA, incubado a 28 °C durante sete dias, sendo posteriormente examinada a presença de crescimento das colônias fúngicas (SANTOS *et al.*, 2006).

#### 5.3.4.2 *Preparo do consórcio de bactérias*

Inicialmente, as bactérias CPM2, CPM3, CPM6 e CPM18 foram cultivadas em meio NB, a 37 °C por 24 h. O inóculo bacteriano para os ensaios foi preparado diluindo-se a massa celular em solução salina (NaCl 0,85%), ajustada à escala de McFarland 0,5 e confirmada por leitura espectrofotométrica a 580 nm. As suspensões celulares foram posteriormente diluídas até atingirem a concentração de  $1,0 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> (ELLEUCH *et al.*, 2015; SETTE *et al.*, 2006).

#### 5.3.5 Pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar

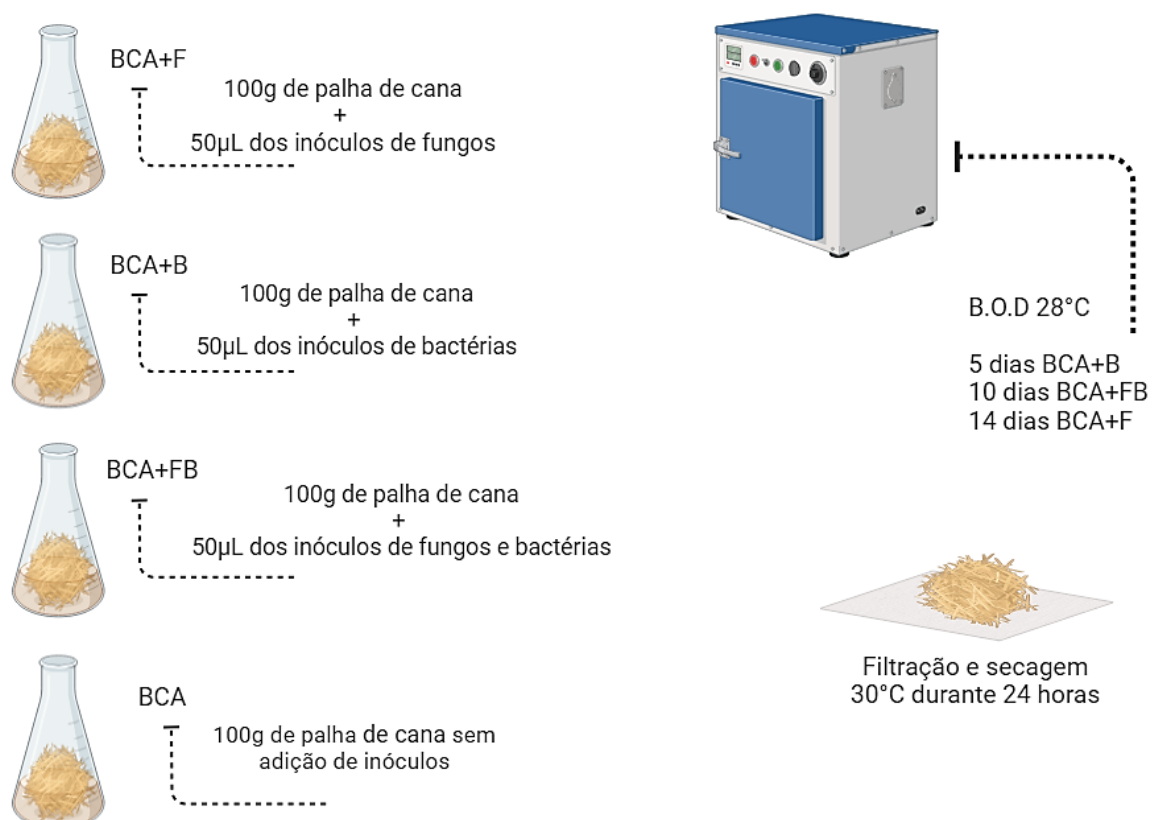
##### 5.3.5.1 *Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar.*

Antes do início dos ensaios de pré-tratamento biológico, foram preparados 12 frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 10 g de bagaço de cana-de-açúcar (base seca) imersos em 400 mL de água destilada estéril, mantidos em repouso à temperatura ambiente por 24 h. Após esse período, utilizado como etapa de lavagem, a água foi retirada e o bagaço de cana (BCA) novamente seco.

Em seguida, os BCAs secos foram umedecidos com 100 mL de solução salina autoclavada (NaCl 0,85%) e inoculados com 50 µL do inóculo de micro-organismos, conforme representado na Figura 31 (MASARIN & FERRAZ, 2008). Os frascos inoculados foram mantidos sem agitação a 28 °C por períodos de 7 a 14 dias.

Após cada período de biotratamento, os sólidos residuais foram suspensos em 400 mL de água, filtrados em tela de 0,074 mm e secos a 30 °C por uma noite (AKHTAR *et al.*, 1998).

**Figura 31** – Esquema de montagem do experimento de pré-tratamento biológico do BCA



Esquema experimental do pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) com diferentes consórcios microbianos: fungos (BCA+F), bactérias (BCA+B), fungos+bactérias (BCA+FB) e controle sem inoculação (BCA). As amostras foram incubadas em B.O.D. a 28 °C por diferentes períodos (5, 10 e 14 dias) e, em seguida, submetidas à filtração e secagem a 30 °C por 24 h.

Fonte: A autora, 2025.

### 5.3.6 Inóculo: Propriedades e acondicionamento

O inóculo mesofílico anaeróbico, utilizado como *starter* e contendo uma comunidade microbiana metanogênica produtora de biogás (LUIZ *et al.*, 2023), foi doado pelo Laboratório de Biogás do Centro Internacional de Energias Renováveis – CIBiogás (Av. Presidente Tancredo Neves, 6731 – Parque Tecnológico Itaipu – Ed. das Águas, sala 11).

A composição do inóculo consistia em uma mistura de efluentes de dejetos de suínos e bovinos, na razão 1:1 (v/v), previamente submetidos ao processo de biodigestão anaeróbia. Esse material foi armazenado sob refrigeração a 4 °C até o uso, de modo a minimizar reações enzimáticas e preservar a comunidade microbiana (ALENCAR, 2017).

Antes da utilização, o inóculo foi aclimatado em condições de anaerobiose, sem adição de solução tampão, por sete dias, na mesma temperatura dos ensaios ( $37,5 \pm 1,0$  °C), conforme a norma alemã VDI 3630 (2006). O objetivo dessa aclimação foi reduzir a produção de biogás proveniente do próprio inóculo, permitindo que a análise se concentrasse nos gases derivados da biomassa (ALENCAR, 2017).

### 5.3.7 Análises Físico-Químicas

#### 5.3.7.1 Teor de Sólidos

Os substratos, compostos por dejetos bovinos, bagaço de cana-de-açúcar e inóculo, foram caracterizados quanto ao teor de sólidos totais (ST), sólidos fixos (SF) e sólidos voláteis (SV). As análises foram realizadas de acordo com o método 2540 descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Inicialmente, os cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 570 °C por uma hora. Após esse preparo, as amostras dos substratos, com aproximadamente 2 g cada, foram pesadas e submetidas à secagem em estufa a 105 °C até atingirem massa constante (aproximadamente duas horas), visando à determinação dos sólidos totais (ST).

Em seguida, os substratos secos foram submetidos à calcinação a 570 °C para a determinação dos sólidos fixos (SF) e, por diferença, dos sólidos voláteis (SV) (WEBER *et al.*, 2014; LINS, 2017). Para obtenção do teor de ST, aplica-se o seguinte cálculo (APHA, 2005):

$$ST\% = \frac{A - B}{C - B} \times 100$$

Onde:

ST = Sólidos Totais.

A = Peso da amostra seca (g)

B = Peso do cadinho (g)

C = Peso da amostra úmida (g)

D = Peso da amostra calcinada (g)

Para evitar a formação de ácidos, como o acético e outros ácidos graxos voláteis, e manter a estabilidade do processo, a relação mássica dos sólidos voláteis (SV) do inóculo e do substrato foi ajustada para a razão 2:1 (inóculo:substrato), conforme recomendado pela norma alemã VDI 4630 (2006) (ALENCAR, 2017; VDI, 2006). Os cálculos para obtenção dos teores de sólidos fixos (SF) e sólidos voláteis (SV) são apresentados nas Equações 2 e 3, respectivamente

$$SF\% = \frac{D-B}{A-B} \times 100 \qquad SV\% = \frac{A-D}{A-B} \times 100$$

SF = Sólidos Fixos

SV = Sólidos Voláteis

A = Peso da amostra seca (g)

B = Peso do cadinho (g)

C = Peso da amostra úmida (g)

D = Peso da amostra calcinada (g)

#### 5.3.7.2 Determinação da Proporção dos Substratos

Com base na capacidade dos biodigestores, definiu-se que, em todos os ensaios, seriam adicionados 15 g de massa úmida, correspondendo a 12,39% do volume total do biodigestor (W). Essa massa apresentava 9% de sólidos totais (ST, representados por K), equivalente a 1,35 g de massa seca (Ms). O percentual de 9% de ST adotado seguiu a recomendação de Yavini, Chia e John (2014) para codigestão com dejetos bovinos.

A partir dos resultados obtidos da análise de sólidos totais do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e do dejetos bovinos, calcularam-se as quantidades de massa úmida dos substratos a serem adicionadas aos biodigestores, de modo a alcançar 1,35 g de massa seca, utilizando-se as equações adaptadas de Albuquerque e Araujo (2016):

$$M_s = \frac{(K \cdot W)}{100}$$

$$M_s = M_{sd} + M_{sm}$$

$$M_s = \frac{M_s}{ST} \times 100$$

$$M_s = W - M_u$$

Sendo que:

W= Massa total que será adicionada ao biodigestor;

M<sub>s</sub>= Massa seca de substratos;

M<sub>sd</sub> = Massa seca de dejetos bovinos;

M<sub>sm</sub> = Massa seca de BCA;

K = Porcentagem de sólidos totais;

ST = Porcentagem de sólidos totais contidos na amostra;

M<sub>u</sub>= Massa de amostra úmida/fresca;

A= Massa da solução tampão a ser misturada com M<sub>u</sub> para se obter W;

Para o cálculo dos substratos a serem adicionados na codigestão com o inóculo (razão 2:1 de inóculo e substratos), foi preciso realizar uma pequena adaptação, sendo utilizadas as equações seguintes (COSTA, 2015):

$$2 = \frac{M_i \times SV_i}{(M_s \times SV_s)} = \frac{M_i \times SV_i}{(M_d \times SV_d) + (M_b \times SV_b)}$$

M<sub>i</sub> = Massa do inóculo

SV<sub>i</sub> = Sólidos Voláteis do Inóculo

M<sub>s</sub> = Massa do substrato

SV<sub>s</sub> = Sólidos Voláteis do substrato

M<sub>d</sub> = Massa do dejetos bovino

SVd = Sólidos Voláteis do dejetto bovino

Mb = Massa do bagaço de cana

SVb = Sólidos Voláteis do bagaço de cana

Foi adicionado H<sub>2</sub>O para completar 30 g de massa úmida no reator.

### 5.3.8 Montagem do experimento de produção de biogás

A Tabela 15 apresenta as quantidades calculadas de amostras e componentes utilizadas na montagem do experimento. Foram avaliadas diferentes combinações de substratos: bagaço de cana-de-açúcar (BCA) in natura, BCA tratado com fungos (BCA+F), com bactérias (BCA+B), com ambos os micro-organismos (BCA+FB), além de uma amostra contendo apenas celulose cristalina para efeito comparativo.

**Tabela 15** – Quantidades calculadas de amostras e componentes nos reatores de biogás

<b>Amostras</b>	<b>Dejeto Bovino (g)</b>	<b>Bagaço (g)</b>	<b>Água (g)</b>	<b>Inóculo (g)</b>	<b>Celulose cristalina (g)</b>	<b>Total no reator (g)</b>
<b>BCA+FB</b>	5	3,83	6,17	40,61	-	55,61
<b>BCA+F</b>	5	5,07	4,93	40,49	-	55,49
<b>BCA+B</b>	5	4,44	5,56	40,58	-	55,58
<b>BCA</b>	5	4,01	5,99	40,47	-	55,47
<b>Celulose</b>	5	-	9,53	41,01	0,47	56,01
<b>Inóculo</b>	-	-	-	55,5	-	55,5

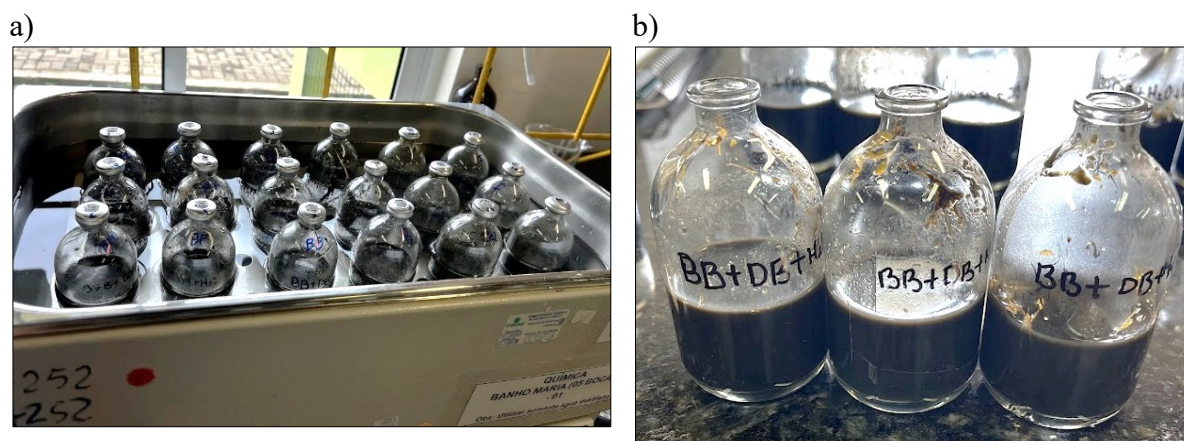
Total proporcional para 15 g de substratos.

Fonte: A autora, 2025.

Os biodigestores, com capacidade de 121 mL, foram preparados com as proporções previamente estabelecidas de BCA (pré-tratado conforme cada condição experimental), dejetto bovino e água, totalizando 15 g de substrato. Em seguida, adicionou-se o inóculo até atingir um volume aproximado de 55 mL em cada reator. Todos os componentes foram pesados individualmente, assegurando padronização entre as amostras.

Após a preparação, os reatores foram vedados e mantidos em banho-maria a 37 °C. Para garantir a homogeneização e favorecer a digestão anaeróbia, os frascos foram agitados manualmente todos os dias (Figura 32).

**Figura 32** – Biodigestores de bancada para produção de biogás



- a) Reatores com as amostras em banho-maria; b) Reatores antes de serem vedados com as quantidades determinadas de componentes calculados.

Fonte: A autora, 2025.

A produção de biogás foi monitorada diariamente por 35 dias. O volume acumulado foi medido por deslocamento com seringa, e a pressão interna aferida com manômetro digital portátil, possibilitando maior precisão dos resultados. Ao término de cada medição, o biogás produzido era liberado, zerando a pressão interna do biodigestor e permitindo a correta quantificação da produção no dia subsequente, conforme metodologia descrita por Holliger (2016).

#### 5.3.8.1 Normalização do Biogás

A produção de biogás foi padronizada às condições normais de temperatura e pressão (CNTP: 273 K e 1.013 hPa), conforme descrito por Kunz, Steinmetz e Amaral (2019).

$$VN = \frac{V \times (p - p_w) \times T_0}{p_0 \times T}$$

Onde:

VN = Volume de biogás normalizado às condições normais de temperatura e pressão (L)

V = Volume de biogás produzido (mL)

p = Pressão do biogás no momento da leitura (hPa)

p<sub>w</sub> = Pressão de vapor da água em função da temperatura ambiente (hPa)

T<sub>0</sub> = Temperatura nas condições normalizadas (273 K)

p<sub>0</sub> = Pressão nas condições normalizadas (1.013 hPa)

T = Temperatura do biogás (K)

### 5.3.9 Análises estatísticas

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para avaliar as diferenças significativas entre as medianas de produção de biogás. O pós-teste de Dunn foi aplicado com um nível de significância de 5% para comparação das diferenças, após verificar a ausência de normalidade nos dados utilizando o software PAST 4.03 (RANI *et al.*, 2022).

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1 Formação de consórcios para pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar

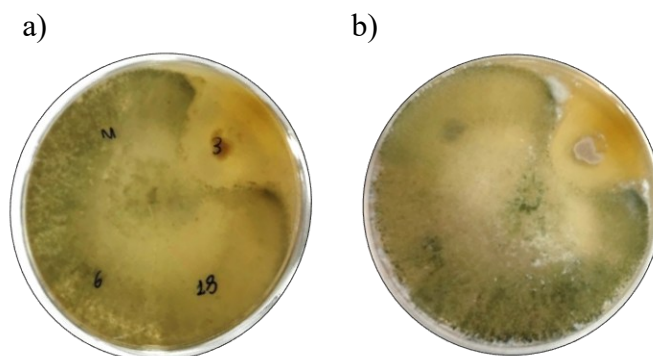
Consórcios microbianos possuem grande potencial para a produção de bioenergia, pois permitem a utilização eficiente de substratos complexos e aumentam o rendimento dos processos fermentativos. No caso de biocombustíveis, esses consórcios possibilitam a conversão mais eficaz da biomassa em etanol, butanol e hidrogênio, ao combinar micro-organismos especializados na degradação de materiais lignocelulósicos com aqueles capazes de fermentar os açúcares liberados (GOPINATH *et al.*, 2014; BHATIA *et al.*, 2018).

Com base nesse princípio, o presente trabalho agrupou isolados microbianos com produções atrativas de enzimas ligninolíticas, estudadas no Capítulo II, para formar um consórcio microbiano capaz de hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar e auxiliar no processo de obtenção de biogás a partir desse substrato.

Para a criação de um consórcio microbiano eficiente, é fundamental realizar testes de compatibilidade entre os micro-organismos selecionados (NUNES *et al.*, 2024). Esses testes são essenciais para evitar interações negativas, como competição por nutrientes ou produção de compostos inibitórios. O co-cultivo em meio de cultura é uma das metodologias mais utilizadas para avaliar essas interações (MOHAMMAD *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2024), sendo também a empregada neste estudo.

Os micro-organismos selecionados para o teste de compatibilidade foram: os fungos filamentosos *Talaromyces mycothecae* BR04, *Trichoderma* sp. BC01 e *Aspergillus versicolor* BR14; e as bactérias *Rosellomorea marisflavi* CPM2, *Bacillus amyloliquefaciens* CPM3, *Bacillus subtilis* CPM6 e *Priestia megaterium* CPM18. O co-cultivo foi realizado conforme descrito na metodologia (Item X.X) e resultou na compatibilidade de quase todos os micro-organismos testados, tanto fungos quanto bactérias. A única exceção foi o *Trichoderma* sp. BC01, que apresentou antagonismo quando cultivado com *Bacillus amyloliquefaciens* CPM3, inibindo o crescimento fúngico próximo às colônias da bactéria (Figura 33).

**Figura 33** – Teste de co-cultura com incompatibilidade entre fungo e bactéria.



a) Verso da placa com crescimento de *Trichoderma* sp. BC01 e antagonismo de *Bacillus amyloliquefaciens* CPM3 no canto superior direito; b) Frente da placa com crescimento microbiano.  
Fonte: A autora, 2025.

Diversos trabalhos relatam co-cultivos de *Trichoderma* sp. e *Bacillus amyloliquefaciens*, destacando essa associação como importante e recomendada para biocontrole agrícola (MA *et al.*, 2022; PLOCEK *et al.*, 2024; WU *et al.*, 2018; KUANG *et al.*, 2024). Entretanto, apesar dos inúmeros relatos de sinergismo entre esses micro-organismos, a incompatibilidade pode ocorrer quando um deles não recebe suporte metabólico suficiente ou quando há competição por recursos essenciais, limitando o crescimento ou a eficiência do sistema (RAVIKRISHNAN *et al.*, 2020).

Diante desses resultados, optou-se por seguir os experimentos de formação do consórcio microbiano excluindo *Bacillus amyloliquefaciens* CPM3 da associação fungo-bactéria. Os micro-organismos compatíveis foram então organizados em consórcios (Tabela 13) para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

**Tabela 13** – Relação de micro-organismos em consórcio para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Tratamento	Micro-organismos utilizados	
BCA + FB	<i>Talaromyces mycothecae</i> BR04	<i>Rossellomorea marisflavi</i> CPM2
	<i>Trichoderma</i> sp. BC01	<i>Bacillus subtilis</i> CPM6
	<i>Aspergillus versicolor</i> BR14	<i>Priestia megaterium</i> CPM18
BCA + F	<i>Talaromyces mycothecae</i> BR04	
	<i>Trichoderma</i> sp. BC01	
	<i>Aspergillus versicolor</i> BR14	

---

	<i>Rossellomorea marisflavi</i> CPM2
<b>BCA + B</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CPM3
	<i>Bacillus subtilis</i> CPM6
	<i>Priestia megaterium</i> CPM18

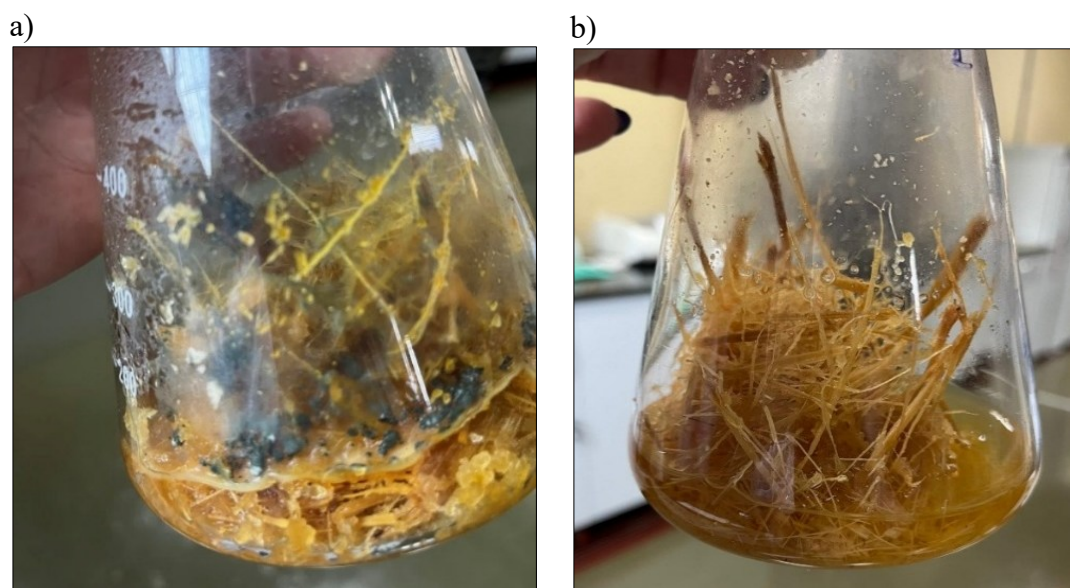
---

BCA+F: Bagaço de cana-de-açúcar e Fungos; BCA+B: Bagaço de cana-de-açúcar e Bactérias; BCA+FB: Bagaço de cana-de-açúcar, Fungos e Bactérias.

Fonte: A autora, 2025.

Os pré-tratamentos foram elaborados e resultaram na observação de alguns crescimentos microbianos em Erlenmeyer de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço pré-tratado foi então submetido a análises físico químicas, para posterior produção de biogás (Figura 34).

**Figura 34** – Observação de crescimento microbiano após o pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar



a) Crescimento fúngico observado após o pré-tratamento BCA+F; b) Turbidez observada no líquido, indicando presença de colônias bacterianas no pré-tratamento BCA+B

Fonte: A autora, 2025.

#### 5.4.2 Análises Físico-químicas das amostras para produção de biogás

A hidrólise inicial do bagaço de cana-de-açúcar desempenha um papel essencial na acessibilidade dos micro-organismos aos polímeros estruturais, favorecendo a liberação de compostos fermentáveis (ESHORE *et al.*, 2017). Após o pré-tratamento, as amostras foram conduzidas ao laboratório situado no complexo Itaipu Parquetec, onde foram analisadas as composições físico-químicas.

Os sólidos totais (ST) são um importante parâmetro para avaliação da digestão anaeróbia, pois representam a quantidade total de material sólido presente na amostra, incluindo a fração orgânica que será transformada em biogás (MOUSANIA *et al.*, 2024). Todos os substratos apresentaram razão SV/ST superior a 0,5, indicando uma maior composição de matéria orgânica e suscetibilidade à degradação biológica (WANG *et al.*, 2017). A tabela a seguir (Tabela 14) apresenta os resultados das análises de teor de sólidos para diferentes amostras contendo bagaço de cana-de-açúcar (BCA) combinado com micro-organismos (fungos e/ou bactérias), além de amostras de celulose pura e inóculo. Os parâmetros analisados incluem sólidos totais (ST), sólidos fixos (SF), sólidos voláteis (SV) e a relação SV/ST.

**Tabela 14** – Resultados das análises de teor de sólidos

Amostra	ST (%)	SF (%)	SV (%)	SV/ST
BCA+FB	11,75 ± 0,3	2,54 ± 0,9	97,45 ± 0,9	8,29
BCA+F	8,87 ± 1,8	3,27 ± 1,5	96,72 ± 1,5	10,90
BCA+B	10,13 ± 0,7	2,71 ± 0,7	97,29 ± 0,7	9,59
BCA	11,22 ± 1,6	3,39 ± 2,2	96,60 ± 2,2	8,60
Celulose	95,39 ± 0,1	0,06 ± 0,05	99,93 ± 0,05	1,04
Inóculo	3,07 ± 0,07	38,56 ± 4,1	61,43 ± 4,1	19,97
DB	18 ± 2	24 ± 2	76 ± 2	4,22

BCA: Bagaço de cana-de-açúcar; BCA+F: Bagaço de cana-de-açúcar e Fungos; BCA+B: Bagaço de cana-de-açúcar e Bactérias; BCA+FB: Bagaço de cana-de-açúcar, Fungos e Bactérias; DB: Dejeito bovino.

Fonte: A autora, 2025.

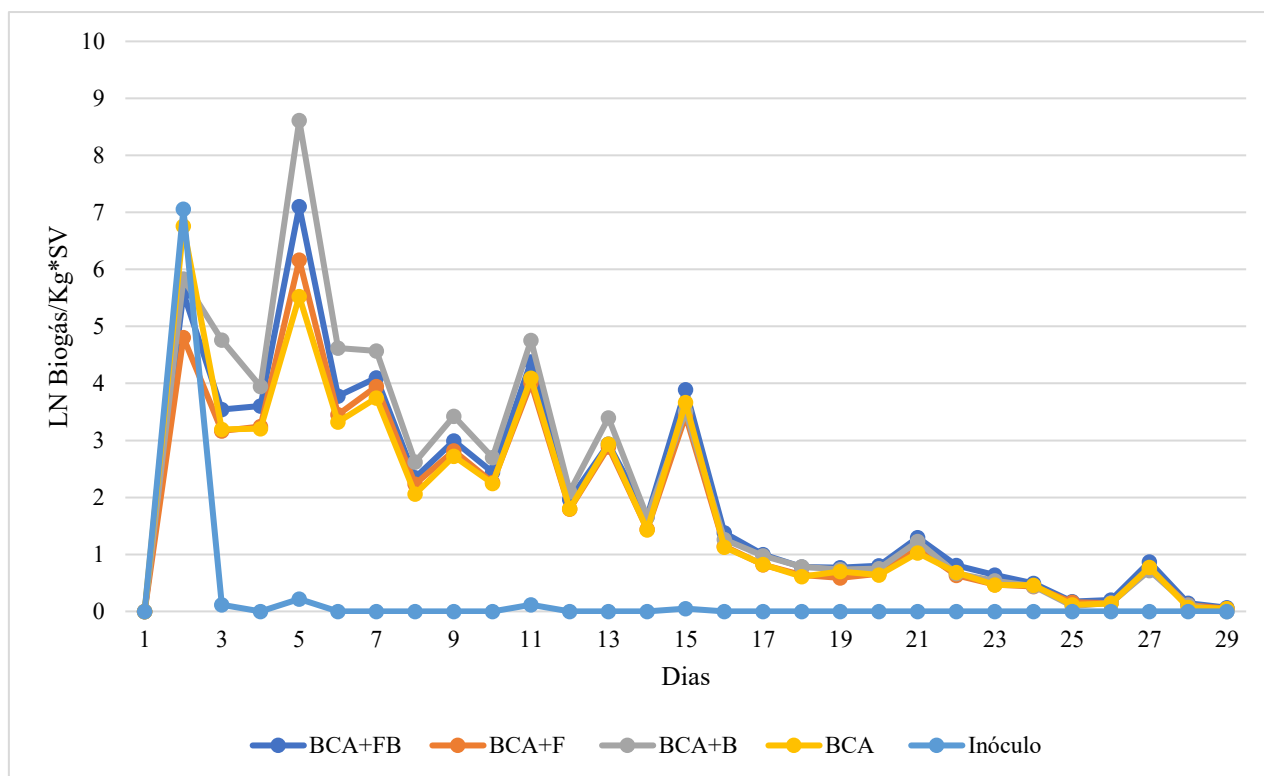
De maneira geral, as amostras de BCA apresentam alto teor de sólidos voláteis, indicando uma elevada fração orgânica. O inóculo, por outro lado, tem a maior fração

de sólidos fixos, o que pode refletir sua composição microbiológica e possíveis impurezas minerais. O teor de cinzas calculado para o bagaço de cana-de-açúcar corresponde aos valores expressos na literatura (VIVIAN *et al.*, 2022), assim como os valores de ST e SF (GROTTO *et al.*, 2021). Os valores de SV também corresponderam aos valores encontrados na literatura (96%) para o bagaço (JANKE *et al.*, 2015). A princípio, não foram constatadas grandes diferenças entre os resultados das análises físico-químicas entre o bagaço de cana-de-açúcar sozinho (BCA) com tratamento microbiano em comparação com as amostras que tiveram pré-tratamento microbiano. Todos os resultados do Bagaço de cana-de-açúcar corroboram com resultados de análises físico-químicas previstas na literatura.

Tanto os substratos quanto os digestatos analisados nesse estudo seguiram as recomendações da literatura, apresentando valores de sólidos totais próximos a 10%. Essa faixa de concentração é essencial para garantir uma transferência de massa eficiente e evitar possíveis sobrecargas no sistema (KUNZ; STEINMETZ & AMARAL, 2019).

#### 5.4.3 Produção de biogás

Com base na metodologia descrita anteriormente, a avaliação da produção diária de biogás evidenciou que todos os tratamentos contendo bagaço de cana-de-açúcar (BCA) apresentaram picos de produção logo nos primeiros dias, especialmente entre o 2º e o 4º dia de digestão (Figura 35). O tratamento BCA+B destacou-se nesse período inicial, atingindo os maiores valores registrados, o que sugere maior eficiência na etapa de adaptação microbiana. Já os tratamentos BCA, BCA+F e BCA+FB apresentaram comportamento semelhante, com picos próximos, mas em menor intensidade. Após esses primeiros dias, a produção diminuiu gradualmente, apresentando oscilações típicas do processo anaeróbio até aproximadamente o 15º dia, quando a produção se estabilizou em níveis baixos. O tratamento com inóculo isolado apresentou valores praticamente nulos durante todo o período experimental, confirmando que a contribuição principal para a produção de biogás esteve associada aos substratos adicionados.

**Figura 35** – Produção diária de biogás (LN Biogás/Kg\*SV)

\*\**Talaromyces mycothecae* BR04; BR15; SG3,6; *Bacillus amyloliquefaciens* CPM2

Fonte: A autora, 2025.

Os resultados experimentais demonstraram que o pré-tratamento microbiano do bagaço de cana-de-açúcar apresentou efeitos diferenciados na produção de biogás, dependendo do tipo de consórcio microbiano utilizado. A análise dos dados de produção total (Tabela 16) revelou que o tratamento BCA+B (bagaço com bactérias) obteve o melhor desempenho, com produção de 66,95 LN/kg SV, representando um aumento de aproximadamente 26,7% em relação ao controle BCA ( $52,85 \pm 6,45$  LN/kg SV). O tratamento BCA+FB (bagaço com fungos e bactérias) apresentou produção intermediária, seguido do BCA+F (bagaço com fungos), que registrou valores inferiores, mas ainda acima do BCA sem pré-tratamento.

**Tabela 16** – Produção total de biogás

<b>Tratamentos</b>	<b>Produção Total de Biogás mL</b>		<b>Produção Total de Biogás LN/Kg*SV</b>	
<b>BCA+FB</b>	450,49	±72,36	59,73	±9,52
<b>BCA+F</b>	464,87	±51,07	53,35	±5,84
<b>BCA+B</b>	544,10	±47,14	66,95	±5,79
<b>BCA</b>	405,87	±50,16	52,85	±6,45
<b>Celulose</b>	627,11	±46,30	146,87	±10,84
<b>Inóculo</b>	13,40	±4,26	3,5	±1,48

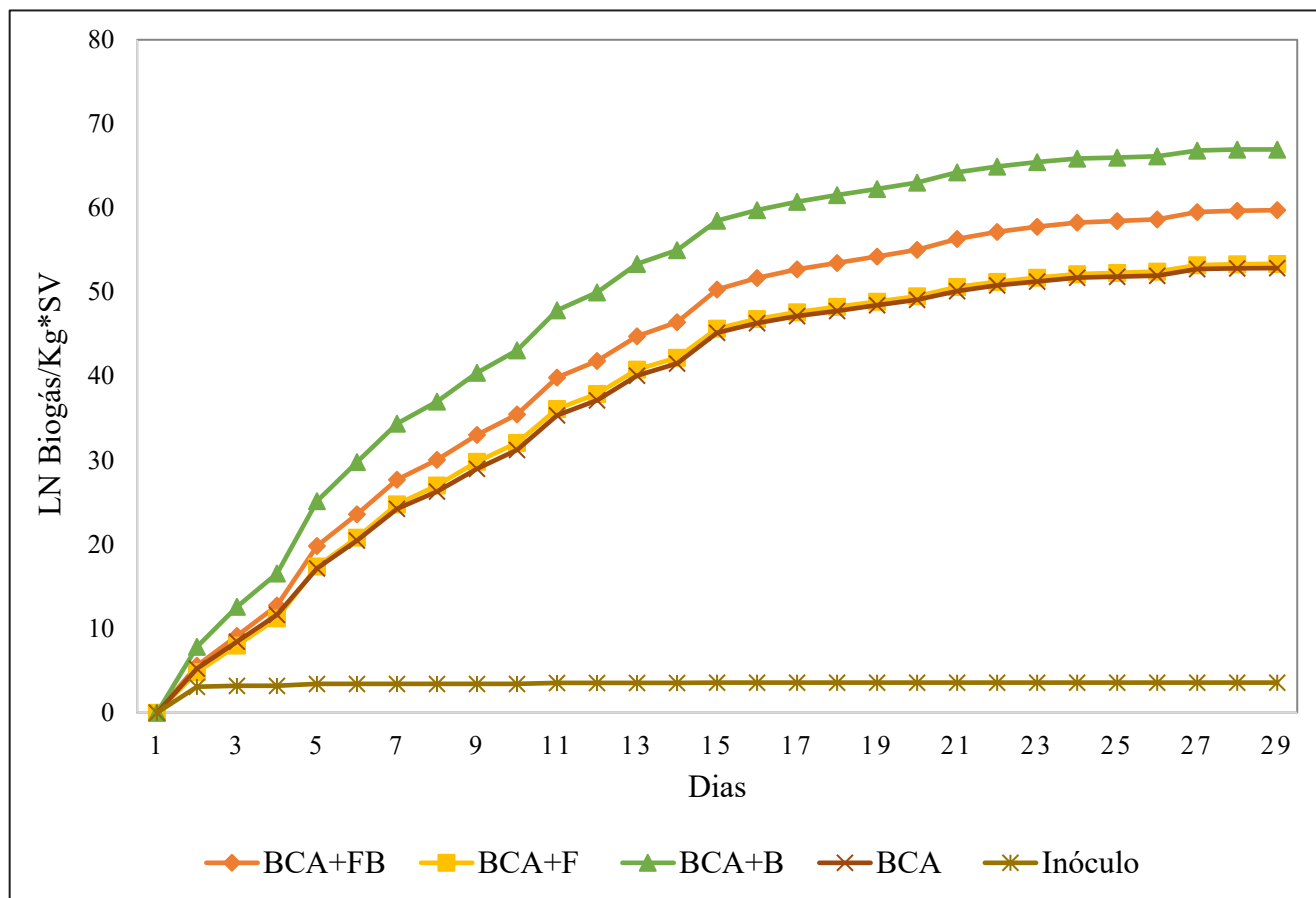
BCA: Bagaço de cana-de-açúcar; BCA+F: Bagaço de cana-de-açúcar e Fungos; BCA+B: Bagaço de cana-de-açúcar e Bactérias; BCA+FB: Bagaço de cana-de-açúcar, Fungos e Bactérias;

Fonte: A autora, 2025.

A análise estatística confirmou essas diferenças. A ANOVA indicou efeito significativo dos tratamentos sobre a produção de biogás ( $p < 0,0001$ ), e o teste de Tukey revelou que o BCA+B foi estatisticamente superior ao BCA e ao BCA+F. O BCA+FB apresentou desempenho intermediário, sem diferença significativa em relação a BCA+B e BCA+F, mas mantendo valores acima do controle. Já o BCA+F não diferiu do BCA, sugerindo que, nas condições experimentais empregadas, o pré-tratamento exclusivamente fúngico não promoveu aumento significativo da produção acumulada.

Esses resultados reforçam que as bactérias intestinais de cupins (*Rossellomorea marisflavi* CPM2, *Bacillus subtilis* CPM6 e *Priestia megaterium* CPM18) demonstraram maior eficiência na degradação da biomassa lignocelulósica em comparação com os fungos de serrapilheira (*Talaromyces mycothecae* BR04, *Trichoderma* sp. BC01 e *Aspergillus versicolor* BR14) ou à combinação de ambos. O gráfico de produção acumulada (Figura 35) confirma essa tendência, mostrando desempenho contínuo e superior do BCA+B até a estabilização na terceira semana, o que reforça o papel das bactérias celulolíticas e ligninolíticas do intestino de cupins no aumento da disponibilidade de açúcares fermentáveis (SERO *et al.*, 2025). Por outro lado, o inóculo isolado apresentou curva praticamente estável, com valores residuais próximos de zero, validando sua função como controle negativo e confirmando que a produção registrada decorreu da ação sobre a biomassa pré-tratada.

**Figura 36** – Produção acumulada de biogás (LN Biogás/Kg\*SV)



BCA: Bagaço de cana-de-açúcar; BCA+F: Bagaço de cana-de-açúcar e Fungos; BCA+B: Bagaço de cana-de-açúcar e Bactérias; BCA+FB: Bagaço de cana-de-açúcar, Fungos e Bactérias;

Fonte: A autora, 2025.

Os resultados deste estudo confirmam o potencial dos pré-tratamentos microbianos na digestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos, em concordância com a literatura recente. Trabalhos apontam que micro-organismos podem aumentar em até 360% a produção de biogás em determinados substratos (KANNAPPAN *et al.*, 2024). No presente caso, o ganho foi mais modesto, mas ainda relevante, com destaque para o consórcio bacteriano (BCA+B), que superou o bagaço sem pré-tratamento em 26,7%. Tal desempenho corrobora estudos que ressaltam a elevada eficiência das bactérias intestinais de cupins na degradação de celulose, capazes de hidrolisar até 99% desse polímero (BHUIBAL *et al.*, 2021; SHOW *et al.*, 2022). As espécies utilizadas explicam a maior acessibilidade da biomassa e a maior conversão obtida.

Os tratamentos envolvendo fungos de serrapilheira (BCA+F e BCA+FB), embora tenham mostrado desempenho intermediário, não superaram a eficiência do consórcio

bacteriano. Essa diferença pode estar associada a interações competitivas e à ausência de condições ideais de cultivo, como demonstrado por estudos que enfatizam a necessidade de compatibilidade microbiana e otimização de parâmetros (MISHRA *et al.*, 2018; NUNES *et al.*, 2024). Apesar disso, o uso de fungos saprotróficos tem respaldo científico, visto que produzem celulases, hemicelulases e enzimas ligninolíticas capazes de modificar significativamente a biomassa (VALÁŠKOVÁ *et al.*, 2007; STEFFEN *et al.*, 2007). Ressalta-se ainda a originalidade deste trabalho ao combinar micro-organismos provenientes de dois nichos distintos, intestino de cupins e solo de serrapilheira, abordagem pouco explorada na literatura (FERDEŞ *et al.*, 2020).

Contudo, limitações do estudo devem ser reconhecidas. A ausência de otimização de condições operacionais pode ter restringido os ganhos observados, já que ajustes de pH, temperatura e tempo de incubação podem aumentar a produção em até 300% (HARIRCHI *et al.*, 2022; TAMILSELVAN *et al.*, 2024). A produção máxima de biogás obtida neste trabalho (66,95 LN/kg SV no BCA+B) e o valor intermediário do BCA+F (53,35 LN/kg SV) estão abaixo dos reportados em estudos que empregaram pré-tratamentos físico-químicos ou combinações de substratos. Por exemplo, BRIDÍA *et al.* (2023) alcançaram 153,67 L/kg VS na codigestão de bagaço de cana com cinzas, praticamente o dobro do rendimento observado aqui. ANDRADE *et al.* (2021) relataram produções de 236 a 326 L CH<sub>4</sub>/kg VS, indicando potencial ainda maior em condições otimizadas. Ainda assim, dentro do escopo deste estudo, que não visou ao melhoramento das condições de processo, os resultados obtidos se mantêm consistentes com a literatura e demonstram o potencial dos pré-tratamentos biológicos como alternativa sustentável para o aumento da produção de biogás.

É importante ressaltar que a comparação direta dos resultados obtidos com dados da literatura apresenta limitações, uma vez que a produção de biogás depende fortemente das condições específicas de cada ensaio, como tipo de substrato, inóculo, tempo de retenção e método de medição. Essa variabilidade dificulta a padronização e, conseqüentemente, a comparação entre estudos (ABANADES *et al.*, 2021). Ainda assim, os ganhos observados neste trabalho, especialmente no tratamento BCA+B, demonstram avanços relevantes e consistentes com a aplicação de pré-tratamentos biológicos em resíduos lignocelulósicos.

## 5.5 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou uma proposta inovadora ao empregar micro-organismos de dois nichos ecológicos distintos, bactérias intestinais de cupins e fungos saprofitos de serrapilheira, no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar. Enquanto as bactérias se destacaram pela maior eficiência na degradação de carboidratos estruturais, os fungos, reconhecidos por suas enzimas ligninolíticas, não apresentaram ganhos expressivos quando aplicados isoladamente ou em consórcio. O melhor desempenho foi obtido com o tratamento bacteriano (BCA+B), confirmando o elevado potencial desses micro-organismos na despolimerização de biomassa lignocelulósica.

Embora os valores obtidos sejam inferiores aos reportados em processos físico-químicos ou em sistemas otimizados, o presente trabalho demonstra que pré-tratamentos microbianos podem gerar ganhos significativos mesmo em condições laboratoriais simples, reforçando sua viabilidade como alternativa de baixo custo e ambientalmente responsável. Além disso, a originalidade da abordagem, ao combinar organismos de habitats distintos, abre novas perspectivas para estudos futuros sobre interações microbianas e otimização de consórcios, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias alinhadas à bioeconomia e à valorização sustentável de resíduos agroindustriais.

Além de ressaltar o papel das bactérias intestinais de cupins na melhoria da digestão anaeróbia, este estudo também evidencia a importância de se avançar na padronização de metodologias para avaliação da produção de biogás, já que a comparação com dados da literatura permanece desafiadora devido à variabilidade experimental. Nesse contexto, os resultados aqui apresentados servem como referência inicial para futuros trabalhos que busquem explorar diferentes condições de cultivo, combinações microbianas e ajustes operacionais. Assim, a pesquisa contribui tanto para o entendimento científico das interações entre micro-organismos no pré-tratamento da biomassa quanto para o avanço de soluções biotecnológicas mais sustentáveis e aplicáveis à realidade agroindustrial.

## 6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABANADES, S.; POZZO, T.; SECO, A.; FERRER, J.; RICHTER, H. Standardizing biomethane potential tests: An interlaboratory experimental design to evaluate reproducibility and repeatability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 135, p. 110181, 2021. DOI: [10.1016/j.rser.2020.110181](https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110181).

ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; PARK, H.; CHOI, O.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122725, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122725>.

ADEGBOYE, M. F.; OLANREWaju, O. S.; MABHIZA, D.; COWAN, D. A. Bioprospecting thermophilic microbiome for lignocellulolytic enzymes: potential applications in bioenergy and biorefinery. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 1–14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03055-7>.

AFZAL, M.; ASLAM, M.; ASHRAF, M. F.; HUSSAIN, S.; AHMAD, R.; ASIF, M. Isolation and characterization of cellulase producing *Bacillus licheniformis* HI08 from termite gut. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180504, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180504>.

AGARWAL, N. K.; KUMAR, M.; GHOSH, P.; KUMAR, S. S.; SINGH, L.; VIJAY, V. K.; KUMAR, V. Anaerobic digestion of sugarcane bagasse for biogas production and digestate valorization. **Chemosphere**, v. 295, p. 133893, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133893>.

AGARWAL, R.; NAIK, R.; BANSAL, S. Biogas production from sugarcane bagasse using microbial consortia: A sustainable approach. **Energy Reports**, v. 8, p. 556–563, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2022.01.012>.

AGBOR, V. B.; CIOCCA, D. R.; TORGET, R.; WALTERS, D.; SEARS, J.; KLINGSHIRN, M. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>.

AGUIAR, M. I.; VALE, N. F. L.; OLIVEIRA, T. S.; CAMPANHA, M. M. Produção de serrapilhira e ciclagem de nutrientes em sistemas agroflorestais. In: CONGRESSO NORTE E

NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA - CONNEPI, 6., 2011, Natal. **Anais**. Natal: SETEC/MEC, 2011. p. 99-107.

AKHTAR, M.; BLANCHETE, R. A.; MYERS, G.; KIRK, T. K. In: YOUNG, R. R.; AKHTAR, M. (Ed.). **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998. p. 309–383.

ALBUQUERQUE, L. S.; ARAUJO, J. C. S. Produção de biogás por codigestão utilizando uma mistura de dejetos bovinos e casca de café conilon. **Brazilian Journal of Production Engineering – BJPE**, v. 2, n. 3, p. 44-54, 2016.

ALENCAR, L. C. **Potencial bioquímico da produção de metano da fração biodegradável dos resíduos sólidos urbanos de Campinas-SP**. 2017. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

ALI, S. S.; AL-TOHAMY, R.; KHALIL, M.; SUN, J.; KORNAROS, M.; EL-GENDY, N. Isolation and characterization of lignocellulose-degrading bacteria from termite gut. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 1–12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.001>.

ALOKIKA; ANU; KUMAR, A.; KUMAR, V.; SINGH, B. Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 564–582, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.175>.

AMARAL, A. C.; KUNZ, A. Potencial de produção de biogás em dejetos de bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 7, p. 528–534, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v23n7p528-534>.

AMARAL, A. C.; KUNZ, R. L. R. S. A. Capítulo 1 O Processo de Biodigestão. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**, p. 14–26, 2019. DOI: 10.21452/978-85-93823-01-5.2019.01\_1.

ANACLETO, B.; CAMPOS, V.; RABELO, S.; MORAES, F.; SANTOS, T. Meta-analysis of pretreatment methods for enhancing biogas production from lignocellulosic biomass. **Scientific Reports**, v. 14, p. 51603, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51603-9>.

ANDRADE, R. R.; AMARAL, F. M.; COSTA, S. S.; RIBEIRO, T. A.; FREITAS, C. A. Biogas and methane yield from sugarcane bagasse in anaerobic digestion. **BioResources**, v. 16, n. 1, p. 1621-1633, 2021.

ANUKAM, A. I.; BERGHEL, J. Biomass pretreatment methods: A review. **Bioengineering**, v. 8, n. 8, p. 119, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8080119>.

ANUKAM, A. I.; BERGHEL, J.; FRODESON, S.; FAMEWO, E. B.; NYAMUKAMBA, P. Characterization of pure and blended pellets made from Norway spruce and pea starch: A comparative study of bonding mechanism relevant to quality. **Energies**, v. 12, n. 23, p. 4415, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/en12234415>.

ANUKAM, A.; MAMPHWELI, S.; OKOH, O.; REDDY, P. Influence of torrefaction on the conversion efficiency of the gasification process of sugarcane bagasse. **Bioengineering**, v. 4, n. 1, p. 22, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering4010022>.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington, DC: APHA, 2005.

ARFAH, R. A.; NATSIR, H.; ATIFAH, N.; ZARKONI, T. R.; DJIDE, M. N. Isolation and characterization of Soil Termites (*Macrotermes gilvus*) cellulolytic bacteria and activity determination of cellulase enzyme on newsprint substrates. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1341, n. 3, p. 032037, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1341/3/032037>.

ARKATKAR, A.; ARUTCHELVAN, V.; KAPLEY, A.; SHOUCHE, Y. S.; RAO, A. S. Degradation of polyurethane by *Pseudomonas chlororaphis* strain isolated from soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 8, p. 2262–2272, 2012. DOI: 10.1007/s12010-012-9750-0.

ARNAOUTELI, S.; BAMFORD, N. C.; STANLEY-WALL, N. R.; KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 600–614, 2021. DOI: 10.1038/s41579-021-00540-9.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81–87, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/128.1.81>.

ASHFAQ, M. Y.; DA'NA, D. A.; AL-GHOUTI, M. A. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 305, p. 114359, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114359>.

ASHFAQ, M. Y.; MURRAY, A. K.; LEESE, D. J.; MABOUM, R.; GORMAN, E. K.; PATERSON, S.; GORMAN, T. A. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-

Flight Mass Spectrometry for microbial identification in clinical practice. **Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2022. DOI: [10.3390/pathogens11070785](https://doi.org/10.3390/pathogens11070785).

AYERONFE, F.; KASSIM, A.; HUNG, P.; ISHAK, N.; SYARIFAH, S.; ARIPI, A. Production of ligninolytic enzymes by *Coptotermes curvignathus* gut bacteria. **Environmental and Climate Technologies**, v. 23, n. 1, p. 111–121, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2478/rtuct-2019-0008>.

AZIZI-SHOTORKHOFT, A. *et al.* Isolation and identification of termite gut symbiotic bacteria with lignocellulose-degrading potential. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 13, n. 2, p. 1145–1152, 2016. DOI: <https://doi.org/10.13005/bbra/2260>.

BABINSKAS, J.; MATIJOŠYTĖ, I. Laccase functional analysis: substrates, activity assays, challenges, and prospects. **ChemBioChem**, v. 26, n. 2, p. e202400939, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbic.202400939>.

BAJPAI, P. Structure of Lignocellulosic Biomass. In: \_\_\_\_ (ed.). **Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production**. SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability. Singapore: Springer, 2016. p. 7–12. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6_2).

BAK, J. S.; KO, J. K.; HAN, Y. H.; LEE, B. C.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1285–1290, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.010>.

BARBOSA, L. C. A.; MARQUES, D. A.; NUNES, D. S.; ALMEIDA, M. B.; GOUVEIA, A. F.; AMORIM, R. G.; FONSECA, A. R. Sugarcane Straw and Bagasse: Potential Feedstocks for Biorefinery and Value-Added Products. **BioEnergy Research**, v. 14, p. 973–987, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10261-7>.

BARBOSA, R. N.; BEZERRA, J. D. P.; SOUZA-MOTTA, C. M.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; OLIVEIRA, N. T. New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 10, p. 1883–1912, 2018. DOI: [10.1007/s10482-018-1081-1](https://doi.org/10.1007/s10482-018-1081-1).

BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BASTIDAS, D.; ISAAC, F. Mc. Reaching Brazil's Nationally Determined Contributions: An assessment of the key transitions in final demand and employment. **Energy Policy**, v. 135, p. 110983, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2019.110983>.

BECKER, P. T.; DE BEL, A.; NICHOLS, R. A.; DETANDT, M.; VANDERLEYDEN, J.; BOUCHARA, J. P.; SYBREN, D. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: performance evaluation of a newly developed database. **Medical Mycology**, v. 52, n. 8, p. 826–834, 2014. DOI: 10.1093/mmy/myu044.

BEKCHANOV, M.; MONDAL, M. A. H.; DE ALWIS, A.; MIRZABAEV, A. Why adoption is slow despite promising potential of biogas technology for improving energy security and mitigating climate change in Sri Lanka? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 378–390, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.010>.

BELGINI, D. R. B.; DIAS, R. S.; SIQUEIRA, V. M.; VALADARES, L. A. B.; ALBANESE, J. M.; SOUZA, R. S.; TORRES, A. P. R.; SOUSA, M. P.; SILVA, C. C.; DE PAULA, S. O.; OLIVEIRA, V. M. Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 2689–2700, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1693-1>.

BEMILLER, J. N. Carbohydrate analysis. In: NIELSEN, S. S. (org.). **Food Analysis Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Springer, 2010. p. 147–159.

BEN – **Balço Energético Nacional 2024: Relatório Síntese, ano base 2023**. Empresa de Pesquisa Energética – EPE, 2024.

BERGADI, F. El; LAACHARI, F.; ELABED, S.; MOHAMMED, I. H.; IBNSOUDA, S. K. Cellulolytic potential and filter paper activity of fungi isolated from ancient manuscripts from the Medina of Fez. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 815–822, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0718-6>.

BHATIA, S. K.; BHATIA, R. K.; CHOI, Y.; KAN, E.; KIM, G.; YANG, Y. Biotechnological potential of microbial consortia and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1209–1231, 2018. DOI: 10.1080/07388551.2018.1471445.

BHUJBAL, S. K.; KUMAR, M.; VIJAY, V. K.; KUMAR, V.; GHOSH, P. Potential of termite gut microbiota for biomethanation of lignocellulosic wastes: current status and future perspectives. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 419–438, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09576-y>.

BIEDENDIECK, R.; LAKOWITZ, A.; GODARD, T.; KRULL, R. Mini review: Recombinant production of tailored biopharmaceuticals in different *Bacillus* strains and future perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 126, p. 27–39, 2018. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.06.008.

BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LOPEZ-HERNANDEZ, D. **Biology of Termites: a Modern Synthesis**. Dordrecht: Springer, 2011.

BILAL, M.; WANG, Z.; CUI, J.; FERREIRA, L. F. R.; BHARAGAVA, R. N.; IQBAL, H. M. N. Environmental impact of lignocellulosic wastes and their effective exploitation as smart carriers – A drive towards greener and eco-friendlier biocatalytic systems. **Science of the Total Environment**, v. 722, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137903>.

BISOGNIN, R. L.; SANTOS, A. O.; SANTOS, J. C. Brazil's vulnerability to climate change: energy sector risks and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 109, p. 213–223, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.013>.

BISWAS, S.; ROLAIN, J. M. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. **Future Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 9–10, 2013. DOI: 10.2217/fmb.12.141.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; VASCONCELOS, M. R. S.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G. A. L.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; SANTOS, J. A.; DUARTE, L. A.; OTERO, I. V. R.; YOSHIDA, A. M. S.; FEITOSA, V. A.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00269>.

BORGES, C. P.; SOBCZAK, J. C.; SILBERG, T. R.; URIONA-MALDONADO, M.; VAZ, C. R. A systems modeling approach to estimate biogas potential from biomass sources in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 138, p. 110518, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110518>.

BRASIL. **Acordo de Paris**. Ministério do Meio Ambiente, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. Nações Unidas no Brasil. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)**. 2024.

BRASIL. **Paris Agreement: Nationally Determined Contribution (NDC). Intended Nationally Determined Contribution**, 2022.

BRIDÍA, F.; FERREIRA, L.; PEREIRA, A.; SANTOS, R.; LIMA, J. Anaerobic co-digestion of sugarcane bagasse with cane ash for enhanced biogas production. **Bioresource Technology Reports**, v. 23, p. 101678, 2023.

BRUKER. Instructions for Use IR Biotyper Kit Suspension Vials for safe and easy homogenization of microbial biomass and Infrared Test Standards (IRTS) to validate the performance of the IR Biotyper. Billerica: Bruker Daltonics, 2021.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81–87, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07504.x>.

CAI, F.; DOU, K.; WANG, P.; CHENTHAMARA, K.; CHEN, J.; DRUZHININA, I. S. The Current State of *Trichoderma* Taxonomy and Species Identification. In: AMARESAN, N.; SANKARANARAYANAN, A.; DWIVEDI, M. K.; DRUZHININA, I. S. (eds.) **Advances in Trichoderma Biology for Agricultural Applications**. Fungal Biology. Springer, Cham, 2022. p. 1–25. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-91650-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-91650-3_1).

CALDERARO, A.; CHEZZI, C. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for bacteria and fungi identification: Current trends and perspectives. **Journal of Clinical Microbiology**, 2024.

CANDELA, A.; RODRÍGUEZ-TEMPORAL, D.; LUMBRERAS, P.; GUIJARRO-SÁNCHEZ, P.; ARROYO, M. J.; VÁZQUEZ, F.; BECEIRO, A.; BOU, G.; MUÑOZ, P.; OVIAÑO, M.; FERNÁNDEZ, J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. Multicenter evaluation of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy as a first-line typing tool for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in clinical settings. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 63, n. 2, e01122-24, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01122-24>.

CARROLL, L. M.; CHENG, R. A.; WIEDMANN, M.; KOVAC, J. Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 28, p. 7677–7702, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916735>.

CARVALHO, N. B.; BERRÊDO VIANA, D.; MUYLAERT DE ARAÚJO, M. S.; LAMPREIA, J.; GOMES, M. S. P.; FREITAS, M. A. V. How likely is Brazil to achieve its NDC commitments in the energy sector? A review on Brazilian low-carbon energy perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 133, p. 110343, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110343>.

CASA-VILLEGAS, M.; POLAINA, J.; MARÍN-NAVARRO, J. Cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Comparative analysis of intra versus extracellular sugar hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 59–67, 2018. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.09.005.

CASSOL, I.; IBAÑEZ, M.; BUSTAMANTE, J. P. Key features and guidelines for the application of microbial alpha diversity metrics. **Scientific Reports**, v. 15, art. 622, 2025. DOI: 10.1038/s41598-024-77864-y.

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Biofuels**, v. 108, p. 67–93, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.025>.

CHEN, H.; LI, X.; LI, Z.; XIAO, W.; CHEN, G. A review on lignocellulosic biomass fractionation methods. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122759>.

CHEN, J.; ADJALLÉ, K.; LAI, T. T.; BARNABÉ, S.; PERRIER, M.; PARIS, J. Effect of Mechanical Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Woody Residues, Corn Stover and Alfalfa. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 11, p. 5847–5856, 2020. DOI: 10.1007/s12649-019-00856-x.

CHENG, Y. *et al.* Cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Reticulitermes chinensis*: Isolation, characterization, and application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, p. 673–690, 2018.

CHIARELLO, M.; MCCAULEY, M.; VILLÉGER, S.; JACKSON, C. R. Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. **PLoS ONE**, v. 17, n. 2, p. 1–19, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0264443.

COSTA, L. F. S. **Resíduos do setor sucroenergético de Goiás e seu potencial metanogênico e como biofertilizante**. 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

COY, M. R. *et al.* Phenol-oxidizing laccases from the termite gut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 10, p. 723-732, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.07.004>.

CRIQUET, S.; TAGGER, S.; VOGT, G.; IACAZIO, G.; LE PETIT, J. Laccase activity of forest litter. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 9, p. 1239-1244, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00044-5).

CROWTHER, T. W.; VAN DEN HOOGEN, J.; WAN, J.; MAYES, M. A.; KEISER, A. D.; MO, L.; AVERILL, C.; MAYNARD, D. S. The global soil community and its influence on biogeochemistry. **Science**, v. 365, n. 6455, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aav0550>.

DAGENAIS, T. R. T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 447–465, 2009. DOI: 10.1128/CMR.00055-08.

DAR, M. A. *et al.* Diversity and functions of symbiotic bacteria in the gut system of wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus*, toward the degradation of cellulose, hemicellulose, and organic pollutants. **Insect Science**, v. 29, n. 4, p. 1051-1068, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12939>.

DENG, L.; YI, L.; WANG, W. **Biogas Technology**. Singapore: Springer, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-15-9364-4>.

DESHAVATH, N. N.; MUKHERJEE, G.; GOUD, V. V.; VEERANKI, V. D.; SASTRI, C. V. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 180–185, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>.

DHEERAN, P.; DESHMUKH, S.; ANAND, A.; GHOSH, A. Thermostable xylanase from *Paenibacillus macerans* IIPSP3 isolated from termite gut: characterization and application. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, p. 851–860, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1086-3>.

DRIEMEIER, C.; OLIVEIRA, M. M.; MENDES, F. M.; GÓMEZ, E. O. Characterization of sugarcane bagasse powders. **Powder Technology**, v. 214, n. 1, p. 111–116, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.07.043>.

DUSABE, S.; LIMITED, S. B.; JULIASTUTI, S. R.; DARMAWAN, R. Production of reducing sugar from food waste using hydrolytic microorganisms. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0115414>.

DZUREDOVÁ, S.; HOLKOVÁ, L.; ŠKULTÉTY, L.; MARAČEK, M.; ŠKOLNÍKOVÁ, E.; KROGMANNOVÁ, M.; TURŇOVÁ, E.; DUDOVÁ, Z.; BELÁKOVÁ, L.; KOVÁČOVÁ, J.; BÁTOROVÁ, A.; MAREKOVÁ, M. Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics as a rapid tool for identification of environmental bacterial isolates. **Applied Sciences**, v. 11, n. 17, p. 8080, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/app11178080>.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; ŽIFČÁKOVÁ, L.; LISÁ, L.; DOBIÁŠOVÁ, P.; BALDRIAN, P. Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. **Fungal Ecology**, v. 13, p. 10–22, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.002>.

ELAWADY, A.; ALI, A.; EZZAT, S. M.; EL-DEK, S.; YOUSSEF, F. S. Bioactive metabolites from *Aspergillus versicolor*: antioxidative, anti-inflammatory and neuroprotective potentials. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 1215678, 2023. DOI: 10.3389/fphar.2023.1215678.

ELLEUCH, J.; TOUNSI, S.; BELGUITH BEN HASSEN, N.; LACOIX, M. N.; CHANDRE, F.; JAOUA, S.; ZRIBI ZGHAL, R. Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 124, p. 90–97, 2015. DOI 10.1016/j.jip.2014.11.005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.11.005>.

ENAGBONMA, B. J.; BABALOLA, O. O. Potentials of termite mound soil bacteria in ecosystem engineering for sustainable agriculture. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 211–219, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-019-1439-2>.

ENERDATA. **World Energy & Climate Statistics – Yearbook 2024**.

ENERGY INSTITUTE. **Statistical Review of World Energy – 2023 Regional Overview**. London: Energy Institute, 2024.

EREN, A. M.; BORISY, G. G.; HUSE, S. M.; WELCH, J. L. M. Oligotyping analysis of the human oral microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 28, p. 2014–2022, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1409644111.

ERRINGTON, J.; VAN DER AART, L. T. Microbe profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. **Microbiology**, v. 166, n. 5, p. 425–427, 2020. DOI: [10.1099/mic.0.000922](https://doi.org/10.1099/mic.0.000922).

ESCORIÇA, M. F.; FIGUEIRA, F. D. S.; SANTOS, M. S. M.; SILVA, G. A. Seleção de fungos produtores de celulase pelo teste do vermelho congo. **Revista de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 45-58, 2021.

ESHORE, S.; MONDAL, C.; DAS, A. Production of Biogas from Treated Sugarcane Bagasse. **International Journal of Scientific Engineering and Technology**, v. 6, n. 7, p. 224, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5958/2277-1581.2017.00025.0>.

FAN, Y.; YANG, Q.; WANG, L.; WU, C.; LI, J. Modest functional diversity decline and environmental selection maintain functionality under reduced taxonomic  $\alpha$ -diversity. **Microbiome**, v. 13, art. 85, 2025. DOI: [10.1186/s40168-025-02105-x](https://doi.org/10.1186/s40168-025-02105-x).

FERDEȘ, M.; DINCĂ, M. N.; MOICEANU, G.; ZĂBAVĂ, B. Ș.; PARASCHIV, G. Microorganisms and enzymes used in the biological pretreatment of the substrate to enhance biogas production: A review. **Sustainability**, v. 12, n. 17, p. 7205, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/su12177205>.

FERDES, M.; RADU, E.; IONITA, V.; MARUTOIU, C.; ROTARU, A. Advances in biological pretreatment methods for lignocellulosic biomass. **Applied Sciences**, v. 10, n. 21, p. 7602, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/app10217602>.

FINN, D. R. A metagenomic alpha-diversity index for microbial functional biodiversity. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 100, n. 3, fiae019, 2024. DOI: [10.1093/femsec/fiae019](https://doi.org/10.1093/femsec/fiae019).

FISSEL, W. H.; ROBERTS, K. A.; DUGGAN, J. M.; KLINE, S.; KESSLER, H. A. Evaluation of MALDI-TOF for identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 60, n. 2, p. e01573-21, 2022. DOI: [10.1128/jcm.01573-21](https://doi.org/10.1128/jcm.01573-21).

FORSAN, C. F.; DE FREITAS, C.; MASARIN, F.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharide production from sugarcane bagasse and leaf using *Aspergillus versicolor* endoxylanase and diluted acid. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 4, p. 3375–3390, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01403-2>.

FORTUNA, J. L. **Protocolos de coletas, análises, identificação e armazenamento de fungos ambientais**. 2020.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. Diversidade de Trichocomaceae isolada de solo e serrapilheira de Floresta Atlântica. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 4, p. 1-10, 2012. DOI: 10.4322/floram.2012.045.

FRANCO-DUARTE, R. *et al.* Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 130, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7050130.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; HOUBRACKEN, J.; HUBKA, V.; VARGA, J.; ANDERSEN, B.; *et al.* Taxonomy of Talaromyces and related genera. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 1–173, 2013. DOI: 10.3114/sim0023.

FUKE, P.; T, M. M.; KUMAR, M.; SAWARKAR, A. D.; PANDEY, A.; SINGH, L. Role of microbial diversity to influence the growth and environmental remediation capacity of bamboo: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 167, p. 113567, 2021. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.113567.

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YU, Q.; YUAN, Z.; LIU, Y. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396–400, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.036>.

GENG, A.; WU, J.; XIE, R. R.; LI, X.; CHANG, F. X.; SUN, J. Z. Characterization of a laccase from a wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus*. **Insect Science**, v. 25, n. 6, p. 1011-1021, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12492>.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GIBBONS, S. M.; GILBERT, J. A. Microbial diversity—exploration of natural ecosystems and microbiomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 35, p. 66–72, 2015. DOI: 10.1016/j.gde.2015.10.003.

GIL, A. Current insights into lignocellulose related waste valorization. **Chemical Engineering Journal Advances**, v. 8, p. 100186, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.100186>.

GILL, G. S.; BHARDWAJ, N.; KHANNA, S.; KAUR, R.; SHARMA, N.; YADAV, S.; SHARMA, A.; KAUR, N.; SINGH, S. Whole genome sequencing and the lignocellulose degradation potential of *Bacillus subtilis* RLI2019 isolated from the intestine of termites. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2023. DOI: [10.1186/s13068-023-02375-3](https://doi.org/10.1186/s13068-023-02375-3).

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets for PCR amplification of conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323–1330, 1995.

GONÇALVES, C.; GOMES, N.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. A. Adaptation of the dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 2046–2048, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1039/C0AY00525H>.

GOORUEE, N.; KASSEM, A.; ABBAS, L.; COUTINHO, O.; OPARA, S.; NAJAF, H.; KASPEREK, D.; POKHREL, K.; LI, X.; TIQUIA-ARASHIRO, S. Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1304081, 2024. DOI: [10.3389/fmicb.2023.1304081](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1304081).

GOPINATH, L. R.; CHRISTY, P. M.; MAHESH, K.; DIVYA, R. B. D. Identification and evaluation of effective bacterial consortia for efficient biogas production. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 8, n. 3, p. 80–86, 2014.

GOYARI, S.; DEVI, S. H.; BENGYELLA, L.; KHAN, M.; SHARMA, C. K.; KALITA, M. C.; TALUKDAR, N. C. Unveiling the optimal parameters for cellulolytic characteristics of *Talaromyces verruculosus* SGMNPf3 and its secretory enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 88–98, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12816>.

GRAMSS, G.; GÜNTHER, T. H.; FRITSCH, W. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. **Mycological Research**, v. 102, n. 1, p. 67–72, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0953756297004549>.

GROTTO, C. G. L.; COSTA, A. M. F.; COLARES, C. J. G.; PEREIRA, D. H. Caracterização da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar com vistas energéticas. **ForScience**, v. 9, n. 1, p. e00928, 2021. DOI: <https://doi.org/10.29069/forscience.2021v9n1.e928>.

GUAN, W. J.; YUAN, J. J.; LI, H. M.; GAO, Y. H.; HUANG, Y.; CHEN, C. L.; CHEN, R. C.; ZHONG, N. S. Proteobacteria community compositions correlate with bronchiectasis severity. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 22, n. 9, p. 1095–1105, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0037>.

GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753–5798, 2020. DOI: [10.1099/ijsem.0.004475](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475).

GURGEL, A. C.; PALTSEV, S.; REILLY, J. M. Potential land use and economic impacts of bioenergy expansion in Brazil. **Energy for Sustainable Development**, v. 49, p. 100–110, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.esd.2019.01.001>.

HANSEN, J. E.; SATO, M.; SIMONS, L.; NAZARENKO, L. S.; SANGHA, I.; KHARECHA, P.; ZACHOS, J. C.; VON SCHUCKMANN, K.; LOEB, N. G.; OSMAN, M. B.; JIN, Q.; TSELIODIS, G.; JEONG, E.; LACIS, A.; RUEDY, R.; RUSSELL, G.; CAO, J.; LI, J. Global warming in the pipeline. **Oxford Open Climate Change**, v. 3, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfclm/kgad008>.

HAQ, I. U.; QAISAR, K.; NAWAZ, A.; AKRAM, F.; MUKHTAR, H.; ZOHU, X.; XU, Y.; MUMTAZ, M. W.; RASHID, U.; GHANI, W. A. W. A. K.; CHOONG, T. S. Y. Lignocellulosic biomass: Energy consumption. **Catalysts**, v. 11, n. 3, p. 1–26, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal11030309>.

HARIRCHI, S.; SAR, T.; RAMEZANI, M.; ALIYU, H.; ETEMADIFAR, Z.; NOJOURI, S. A.; YAZDIAN, F.; AWASTHI, M. K.; TAHERZADEH, M. J. Bacillales: From taxonomy to biotechnological and industrial perspectives. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 1–46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122355>.

HARIRCHI, S.; WAINAINA, S.; SAR, T.; NOJOURI, S. A.; PARCHAMI, M.; PARCHAMI, M.; VARJANI, S.; KHANAL, S. K.; WONG, J.; AWASTHI, M. K. Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. **Bioengineered**, v. 13, n. 3, p. 6521–6557, 2022.

HASSIBA, R. J.; ABDELKAREEM, M. A. Application of nanofluids for enhanced waste heat recovery: A review. **Nano Energy**, v. 84, p. 105871, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2021.105871>.

HEIDARI NONAKARAN, Z.; *et al.* Characterization of novel cellulase-producing bacteria isolated from rotting wood samples. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, p. 1186–1198, 2015. DOI: [10.1007/s12010-015-1806-9](https://doi.org/10.1007/s12010-015-1806-9).

HEINZE, T. Cellulose: Structure and properties. **Advances in Polymer Science**, v. 271, p. 1–52, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1007/12\\_2015\\_319](https://doi.org/10.1007/12_2015_319).

HEINZE, T.; LIEBERT, T. Celluloses and Polyoses/Hemicelluloses. In: MATTHEWS, J. (ed.). **Polymer Science: A Comprehensive Reference**. v. 10. Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 83–152. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00255-7>.

HOLECHEK, J. L.; GOMES, H. L.; MOLINA, L. J.; GENG, Y.; PEACOCK, A. D. Global renewable energy transition: Benefits, challenges, and prospects. **Sustainability**, v. 14, n. 7, p. 4216, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/su14074216>.

HOLLIGER, C.; ALVES, M.; ANDRADE, D.; ANGELIDAKI, I.; ASTALS, S.; BAIER, U.; DE WILDE, V.; EBELING, P.; FONTEIN, M.; LU, J.; MAAKE, T.; MATA-ALVAREZ, J.; NIELSEN, H. B.; NIESTEN, E.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; PEYRAUD, M.; PLANTIKOW, S.; POKORNY, E.; TOLLEFSEN, M.; VAN LIER, J. B. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515-2522, 2016. DOI: 10.2166/wst.2016.336

HONG, J. S.; KIM, D.; JEONG, S. H. Performance Evaluation of the IR Biotyper® System for Clinical Microbiology: Application for Detection of Staphylococcus aureus Sequence Type 8 Strains. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 909, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070909>.

HUANG, C.; FENG, Y.; PATEL, G.; XU, X. Q.; QIAN, J.; LIU, Q.; KAI, G. Y. Production, immobilization and characterization of beta-glucosidase for application in cellulose degradation from a novel *Aspergillus versicolor*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 437–446, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.154.

IQUEBAL, M. A.; JAISWAL, S.; MISHRA, V. K.; JASROTIA, R. S.; ANGADI, U. B.; SINGH, B. P.; PASSARI, A. K.; DEKA, P.; PRABHA, R.; SINGH, D. P.; GUPTA, V. K.; TOMAR, R. S.; OBEROI, H. S.; RAI, A.; KUMAR, D. Fungal genomic resources for strain identification and diversity analysis of 1900 fungal species. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 1–15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7040288>.

JANEK, T.; ŁUKASZEWICZ, M.; CIEŚLARSKA, A.; DŁUGOLECKA, A. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Bacillus subtilis* strains from natural environments. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 1–14, 2021. DOI: 10.1186/s12934-021-01550-2.

JANKE, L.; LEITE, A.; NIKOLAUSZ, M.; SCHMIDT, T.; LIEBETRAU, J.; NELLES, M.; STINNER, W. Biogas Production from Sugarcane Waste: Assessment on Kinetic Challenges for Process Designing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20685–20703, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms160920685>.

JIAO, J.-Y.; HU, Y.; WANG, L.; XU, J. Advancements in prokaryotic systematics and the role of Bergey's International Society for Microbial Systematics in addressing challenges in the meta-data era. **National Science Review**, v. 11, n. 7, nwae168, 2024. DOI: 10.1093/nsr/nwae168.

JIN, X.; SONG, J.; LIU, G. Q. Bioethanol production from rice straw through an enzymatic route mediated by enzymes developed in-house from *Aspergillus fumigatus*. **Energy**, v. 190, p. 116395, 2020. DOI: 10.1016/j.energy.2019.116395.

JOSHI, S. S.; MEHETA, J. R.; ISHI, B. D.; SHIRSATH, H. S.; PATIL, R. E.; WAGH, D. S.; MAHALE, S. H. Isolation, screening and production of fungal laccases. **International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)**, v. 10, n. 6, p. 2371-2377, 2022. DOI: <https://doi.org/10.22214/ijraset.2022.44289>.

JUN, S.; *et al.* Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion. **Energies**, v. 13, n. 21, p. 5555, 2020. DOI: 10.3390/en13215555.

KANNAPPAN KARTHIKEYAN, P.; CHAMINDA HEMAKA BANDULASENAA, H.; RADU, T. A comparative analysis of pre-treatment technologies for enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic waste. **Industrial Crops and Products**, v. 213, p. 118591, 2024.

KAO, K. N.; MICHAYLUK, M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. **Planta**, v. 126, p. 1095–1100, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00393945>.

KHALAF, A. M.; SHABAA, R. A. H. Genotyping of dermatophyte fungal species by AP-PCR technique. **International Journal of Health Sciences**, v. 6, p. 9619–9624, 2022. DOI: <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6ns4.12028>.

KIRTIL, H. E.; CEBI, N.; YILDIRIM, R. M.; METIN, B.; ARICI, M. A rapid spectroscopic method for the identification of the filamentous fungi isolated from Turkish traditional mold-ripened cheeses. **Journal of Microbiological Methods**, v. 217, p. 106884, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106884>.

KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724–725, 2019. DOI: 10.1016/j.tim.2019.03.008.

KUMAR, C.; SAINI, N.; GHOSH, A.; TYAGI, A.; DEVI, R.; LATA, P.; KUMAR, S. Genome description of a potentially novel species of *Rosellomorea* sp. strain H39\_3 isolated from Hindon River, India. **Access Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 001042, 2025.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. **Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves**, p. 209, 2019.

LEE, S. J.; JANG, Y. S.; LEE, Y. M.; LEE, J. J.; LEE, H. B.; KIM, G. H.; KIM, J. J. Rice straw-decomposing fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1322-1329, 2011.

LEGODI, L. M.; LA GRANGE, D.; VAN RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. Isolation of Cellulose Degrading Fungi from Decaying Banana Pseudostem and *Strelitzia alba*. **Enzyme Research**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/1390890>.

LIMA, M. A.; MENDES, L. F. R.; MOTHÉ, G. A.; LINHARES, F. G.; DE CASTRO, M. P. P.; DA SILVA, M. G.; STHEL, M. S. Renewable energy in reducing greenhouse gas emissions: reaching the goals of the Paris Agreement in Brazil. **Environmental Development**, v. 33, p. 100504, 2020. DOI: 10.1016/j.envdev.2020.100504.

LINS, L. P. **Produção de biogás a partir de resíduos de bovinocultura leiteira por meio da codigestão com macrófitas da espécie *Salvinia***. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2017.

LIU, G.; HE, C.; ZHANG, H. Identification and characterization of dermatophyte species and strains with PCR amplification. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 8, n. 2, p. 545–550, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1785>.

LIU, G.; ZHANG, K.; GONG, H.; YANG, K.; WANG, X.; ZHOU, G.; CUI, W.; CHEN, Y.; YANG, Y. Whole genome sequencing and the lignocellulose degradation potential of *Bacillus subtilis* RLI2019 isolated from the intestine of termites. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 130, 2023.

LONG, R. A.; EVEILLARD, D.; FRANCO, S. L. M.; REEVES, E.; PINCKNEY, J. L. Antagonistic interactions between heterotrophic bacteria as a potential regulator of community structure of hypersaline microbial mats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 1, p. 74–81, 2013. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01457.

LUIZ, F. N.; PASSARINI, M. R. Z.; MAGRINI, F. E.; GAIO, J.; SOMER, J. G.; MEYER, R. F.; PAESI, S. Metataxonomic characterization of the microbial community involved in the production of biogas with microcrystalline cellulose in pilot and laboratory scale. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 39, art. 184, 2023. DOI: 10.1007/s11274-023-03573-9.

LYNG, M.; KOVÁCS, Á. T. Frenemies of the soil: Bacillus and Pseudomonas interspecies interactions. **Trends in Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 845–857, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.02.003>.

MA, Q.; CONG, Y.; FENG, L.; LIU, C.; YANG, W.; XIN, Y.; CHEN, K. Effects of mixed culture fermentation of Bacillus amyloliquefaciens and Trichoderma longibrachiatum on its constituent strains and the biocontrol of tomato Fusarium wilt. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 1, p. 532–546, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15208>.

MA, X.; GUO, X.; LIANG, X.; LIU, Y.; YU, Q.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; WU, X.; GUO, Y. Screening, identification, and optimization of enzyme production by Bacillus subtilis using one-factor and response surface methodology. **Water**, v. 16, n. 23, p. 3508, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/w16233508>.

MALLEK-FAKHFAKH, H.; BELGHITH, H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular  $\beta$ -glucosidase from Talaromyces thermophilus and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 434, p. 51-58, 2016.

MASARIN, F.; FERRAZ, A. AKHTAR. **Holzforschung**, v. 62, n. 1, p. 1–7, 2008. DOI: 10.1515/HF.2008.001.

MEGAZYME. **Assay of endo-1,4- $\beta$ -Glucanase (Cellulase) using AZO-CMCELLULOSE 09/12**. Bray (Irlanda): Megazyme International, 2011.

MELO, M.; ARAUJO, A. C. V.; CHOIGI, M. A. N.; PANIAGO, A. G. L.; SILVA, I. R.; QUEIROZ, P. R. Cellulolytic and lipolytic fungi isolated from soil and leaf litter samples from the Cerrado (Brazilian Savanna). **Revista de Biología Tropical**, v. 66, n. 1, p. 237-250, 2018. DOI: <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i1.33100>.

MENEZES, R. A. C. *et al.* Production of ligninolytic enzymes by filamentous fungi isolated from composting. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 4, p. 906–913, 2017.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MISHRA, P.; KRISHNAN, S.; RANA, S.; SINGH, L.; SAKINAH, M.; WAHID, Z. A. Outlook of fermented rice straw for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1247-1252, 2018.

MOHAMMAD, N.; ALAM, M. Z.; KABASHI, N. A. Optimization of effective composting process of oil palm industrial waste by lignocellulolytic fungi. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 17, n. 1, p. 91–98, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10163-013-0229-3>.

MOLINA-ROMERO, D.; BAEZ, A.; CASTAÑEDA-LUCIO, M.; BUSTILLOS-CRISTALES, L. E.; RODRÍGUEZ-ANDRADE, R.; MUÑOZ-ROJAS, J. Antagonism assays to identify bacterial strains producing antimicrobial compounds. **Protocols.io**, p. 8–10, 2017.

MOORE, R. M. Statistical analysis in life sciences: one-way ANOVA and Tukey's HSD using Python/statmodels. **Python for Life Scientists**, 2025.

MOUSANIA, Z.; RAFIEE, R.; MOEINADDINI, M.; ATKINSON, J. D. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste in a simulated bioreactor to improve predictive modeling of landfill systems. **Journal of Hazardous Materials Advances**, v. 13, p. 100396, 2024. DOI: 10.1016/j.hazadv.2023.100396.

NARESH, S.; SINGH, P.; BHARDWAJ, N.; KUMAR, P. Isolation and partial characterisation of thermophilic cellulolytic bacteria from mangrove soil. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/8143196>.

NASRABADI, R. G.; MAHMOUDI, H.; SAIDI, A.; AKBARI, M. Termite gut microbiota for biomethanation of lignocellulosic wastes: current status and future perspectives. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 419–438, 2023. DOI: 10.1007/s11157-021-09576-y.

NATH, S. Biotechnology and biofuels: paving the way towards a sustainable and equitable energy for the future. **Discover Energy**, v. 4, n. 1, 2024. DOI: 10.1007/s43937-024-00032-w.

NAVARRO, D.; ROSSO, M.-N.; HAON, M.; OLIVÉ, C.; BONNIN, E.; LESAGE-MEESSEN, L.; CHEVRET, D.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; BERRIN, J.-G. Fast solubilization of recalcitrant cellulosic biomass by the basidiomycete fungus *Laetisaria*

*arvalis* involves successive secretion of oxidative and hydrolytic enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 143, 2014. DOI: 10.1186/s13068-014-0143-5.

NEWMAN, L.; DUFFUS, A. L. J.; LEE, C. Using the free program MEGA to build phylogenetic trees from molecular data. **American Biology Teacher**, v. 78, n. 7, p. 608–612, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1525/abt.2016.78.7.608>.

NOUIOUI, I.; BUSARDO, C.; PUKALL, R.; GOODFELLOW, M. Polyphasic taxonomic description of *Streptomyces okerenensis* sp. nov. and *Streptomyces stoeckheimensis* sp. nov. and their biotechnological potential. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 75, 006716, 2025. DOI: 10.1099/ijsem.0.006716.

NUNES, C. S.; SANTOS, V. E. P.; SILVA, M. E. R.; OLIVEIRA, T. P. Microbial consortiums for enhanced biogas production: compatibility assessment and optimization strategies. **Renewable Energy Focus**, v. 48, p. 156-167, 2024.

NUNES, P. S. O.; LACERDA-JUNIOR, G. V.; MASCARIN, G. M.; GUIMAR, R. A.; MEDEIROS, F. H. V.; ARTHURS, S.; BETTIOL, W. Microbial consortia of biological products: Do they have a future? **Biological Control**, v. 188, 105439, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105439>.

OLIVEIRA, K. M.; BOAS, E. V.; BONETT, L. P.; JÚNIOR, E. L. C.; BERNARDI-WENZEL, J. Isolamento e atividade antibacteriana de fungos endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 1, p. 3–9, 2015.

PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P. Xylose production from sugarcane bagasse by surface response methodology. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 75–80, 2009.

PASCALÉ, M. R.; BISOGNIN, F.; MAZZOTTA, M.; GIROLAMINI, L.; MARINO, F.; DAL MONTE, P.; CORDOVANA, M.; SCATURRO, M.; RICCI, M. L.; CRISTINO, S. Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy With IR Biotyper® System for *Legionella pneumophila* Serogroups Identification. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1–13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866426>.

PEREYRE, S.; TARDY, F.; RENAUDIN, H.; CAUVIN, E.; DEL PRÁ NETTO MACHADO, L.; TRICOT, A.; BENOIT, F.; TREILLES, M.; BÉBÉAR, C. Identification and subtyping of clinically relevant human and ruminant mycoplasmas by use of MALDI-TOF MS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3314–3323, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01573-13>.

PLOCEK, G.; RUEDA KUNZ, D.; SIMPSON, C. Impacts of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma* spp. on Pac Choi (*Brassica rapa* var. *chinensis*) grown in different hydroponic systems. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1–12, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1438038>.

POURMOHSENIN, B.; WIESE, A.; ZIEMERT, N. AutoMLST2: a web server for phylogeny and microbial taxonomy. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. W1, p. W45–W54, 2025. DOI: 10.1093/nar/gkaf397.

PRIEUR, B.; MEUB, M.; WITTEMANN, M.; KLEIN, R.; BELLAYER, S.; FONTAINE, G.; BOURBIGOT, S. Phosphorylation of lignin: characterization and investigation of the thermal decomposition. **RSC Advances**, vol. 7, no. 27, p. 16866–16877, 2017. DOI 10.1039/c7ra00295e. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA00295E>.

RANI, P.; BANSAL, M.; PATHAK, V. V.; AHMAD, S. Experimental and kinetic studies on co-digestion of agrifood and sewage sludge for biogas production. **Journal of Taibah University for Science**, v. 16, n. 1, p. 147–154, 2022. DOI: 10.1080/16583655.2022.2035928.

RAVIKRISHNAN, A.; BLANK, L. M.; SRIVASTAVA, S.; RAMAN, K. Investigating metabolic interactions in a microbial co-culture through integrated modelling and experiments. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 1249–1258, 2020. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.03.019.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 187–193, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.023>.

SALEM-BANGO, Z.; PRICE, T. K.; CHAN, J. L.; CHANDRASEKARAN, S.; GARNER, O. B.; YANG, S. Fungal whole-genome sequencing for species identification: from test development to clinical utilization. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 183, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof9020183>.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: plating methods. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. e3064, 2012.

SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S. A. MALDI-TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 32, n. 3, p. 188–217, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/mas.21355>.

SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 98–101, 2006. DOI: 10.1128/JCM.44.1.98-101.2006.

SERO, E. T.; AMOBONYE, A.; BHAGWAT, P.; SINGH, N. K.; CARVALHO, J. C.; PERMAUL, K.; PILLAI, S. Exploring the termite gut as a hub of industrially important microbes and enzymes for biofuel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 199, p. 107899, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.107899>.

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELENA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 22, no. 11, p. 1185–1195, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9160-2>.

SHOW, B. K.; BANERJEE, S.; BANERJEE, A.; GHOSH, P. Insect gut bacteria: a promising tool for enhanced biogas production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 21, n. 1, p. 147-169, 2022.

SHU, W.; HUANG, J. Microbial diversity and ecosystem functioning: from fundamentals to applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.987654.

STEFFEN, K. T.; CAJTHAML, T.; ŠNAJDR, J.; BALDRIAN, P. Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litter-decomposing basidiomycetes. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 5, p. 447-455, 2007.

SURÁNYI, B. B.; TACZMAN-BRÜCKNER, A.; MOHÁCSI-FARKAS, C.; ENGELHARDT, T. Rapid identification of bacteria from agricultural environment using MALDI-TOF MS. **Acta Alimentaria**, v. 52, p. 113–120, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1556/066.2022.00202>.

TAMILSELVAN, R.; SELWYNRAJ, A. I. Enhancing biogas generation from lignocellulosic biomass through biological pretreatment: Exploring the role of ruminant microbes and anaerobic fungi. **Anaerobe**, v. 85, p. 102782, 2024.

TEKPINAR, A. D.; KALMER, A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. **Nova Hedwigia**, v. 109, n. 1, p. 187–224, 2019. DOI: [https://doi.org/10.1127/nova\\_hedwigia/2019/0528](https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0528).

TENG, A. S. J.; HABERMEHL, P. E.; VAN HOUTD, R.; DE JONG, M. D.; VAN MANSFELD, R.; MATAMOROS, S. P. F.; SPIJKERMAN, I. J. B.; VAN MEER, M. P. A.; VISSER, C. E. Comparison of fast Fourier transform infrared spectroscopy biotyping with whole genome sequencing-based genotyping in common nosocomial pathogens. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 24, p. 7179–7189, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04270-6>.

TORRES-SANGIAO, E.; LEAL RODRIGUEZ, C.; GARCÍA-RIESTRA, C. Application and perspectives of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1539, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071539>.

URIBE, G.; SALIPANTE, S. J.; CURTIS, L.; LIEBERMAN, J. A.; KUROSAWA, K.; COOKSON, B. T.; HOOGESTRAAT, D.; STEWART, M. K.; OLMSTEAD, T.; BOURASSA, L. Evaluation of Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) as a control measure for nosocomial outbreak investigations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 61, n. 3, e00347-23, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.00347-23>.

VALÁŠKOVÁ, V.; ŠNAJDR, J.; BITTNER, B.; CAJTHAML, T.; MERHAUTOVÁ, V.; HOFRICHTER, M.; BALDRIAN, P. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2651-2660, 2007.

VATER, J.; TAM, L. T. T.; JÄHNE, J.; HERFORT, S.; BLUMENSCHNEIT, C.; SCHNEIDER, A.; LUONG, P. T.; THAO, L. T. P.; BLOM, J.; KLEE, S. R.; SCHWEDER, T.; LASCH, P.; BORRIS, R. Plant-Associated Representatives of the *Bacillus cereus* Group Are a Rich Source of Antimicrobial Compounds. **Microorganisms**, v. 11, n. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112677>.

VDI 4630. **Fermentation of organic materials: characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests**. Düsseldorf: Verein Deutscher Ingenieure, 2006.

VIKRAM, S.; ARNEODO, J. D.; CALCAGNO, J.; ORTIZ, M.; MON, M. L.; ETCHEVERRY, C.; COWAN, D. A.; TALIA, P. Diversity structure of the microbial communities in the guts of four neotropical termite species. **PeerJ**, v. 9, p. e10959, 2021. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.10959>.

VIVIAN, M. A.; DOS SANTOS, J. R. S.; SEGURA, T. E. S.; DA SILVA, F. G.; BRITO, J. O. Characterization of sugarcane bagasse and its potential for energy generation and cellulosic pulp. **Madera y Bosques**, v. 28, n. 1, p. 1–11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2022.2812376>.

WANG-WANG, J. H.; BORDOY, A. E.; MARTRÓ, E.; QUESADA, M. D.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M.; GUERRERO-MURILLO, M.; TIBURCIO, A.; NAVARRO, M.; CASTELLÀ, L.; SOPENA, N.; CASAS, I.; SALUDES, V.; GIMÉNEZ, M.; CARDONA, P. J. Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreaks in the Hospital Setting. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 897161, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.897161>.

WEBER, K. P.; GAGNON, V. Microbiology in Treatment Wetlands. **Sustainable Sanitation**, n. 18, p. 25–30, 2014.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (ed.). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WU, L.; JIN, T.; CHEN, H.; SHEN, Z.; ZHOU, Y. Conductive materials as fantastic toolkits to stimulate direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: new insights into methanogenesis contribution, characterization technology, and downstream treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 326, 116732, 2023. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.116732.

YANG, H.; SHI, H.; FENG, B.; WANG, L.; CHEN, L.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; ZHANG, L.; SHEN, H.; ZHU, J.; YANG, S.; DING, C.; PRIETO, D. M.; YANG, F.; YU, S. Protocol for bacterial typing using Fourier transform infrared spectroscopy. **STAR Protocols**, v. 4, n. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102223>.

YAVINI, T. D.; CHIA, A. I.; JOHN, A. Evaluation of the effect of total solids concentration on biogas yields of agricultural wastes. *International Research Journal of Environmental Sciences*, v. 3, n. 2, p. 70-75, 2014. Disponível em: <https://www.isca.me/IJENS/Archive/v3/i2/10.ISCA-IRJEvS-2014-010.pdf>

YOSHIMI, A.; MIYAZAWA, K.; KAWAUCHI, M.; ABE, K. Cell wall integrity and its industrial applications in filamentous fungi. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof8050435>.

# APÊNDICES

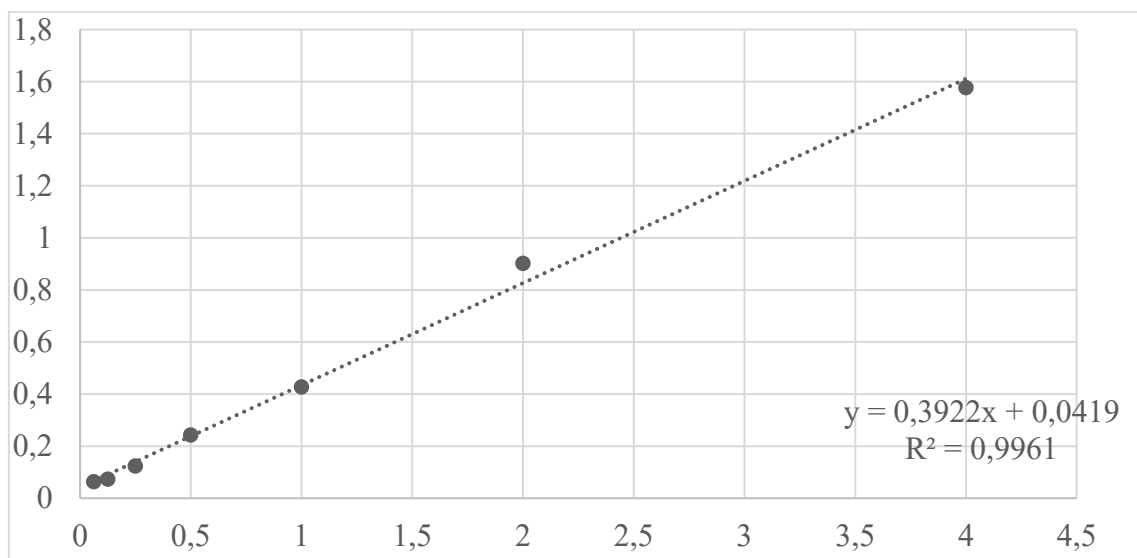
## APÊNDICE A – Preparo da curva analítica para o teste DNS

**Tabela 17** – Valores para construção da curva de calibração de glicose

Volume da solução 4 g/L (mL <sup>-1</sup> )	Volume de água destilada (mL <sup>-1</sup> )	Concentração final Glicose (mL <sup>-1</sup> )	ABS (540nm)
4	0	4	1,576
1	1	2	0,901
1	3	1	0,427
0,5	3,5	0,5	0,243
0,25	3,75	0,25	0,123
0,125	3,875	0,125	0,073
0,062	3,938	0,062	0,063

Fonte: A autora, 2025.

**Figura 37** – Curva de calibração da glicose

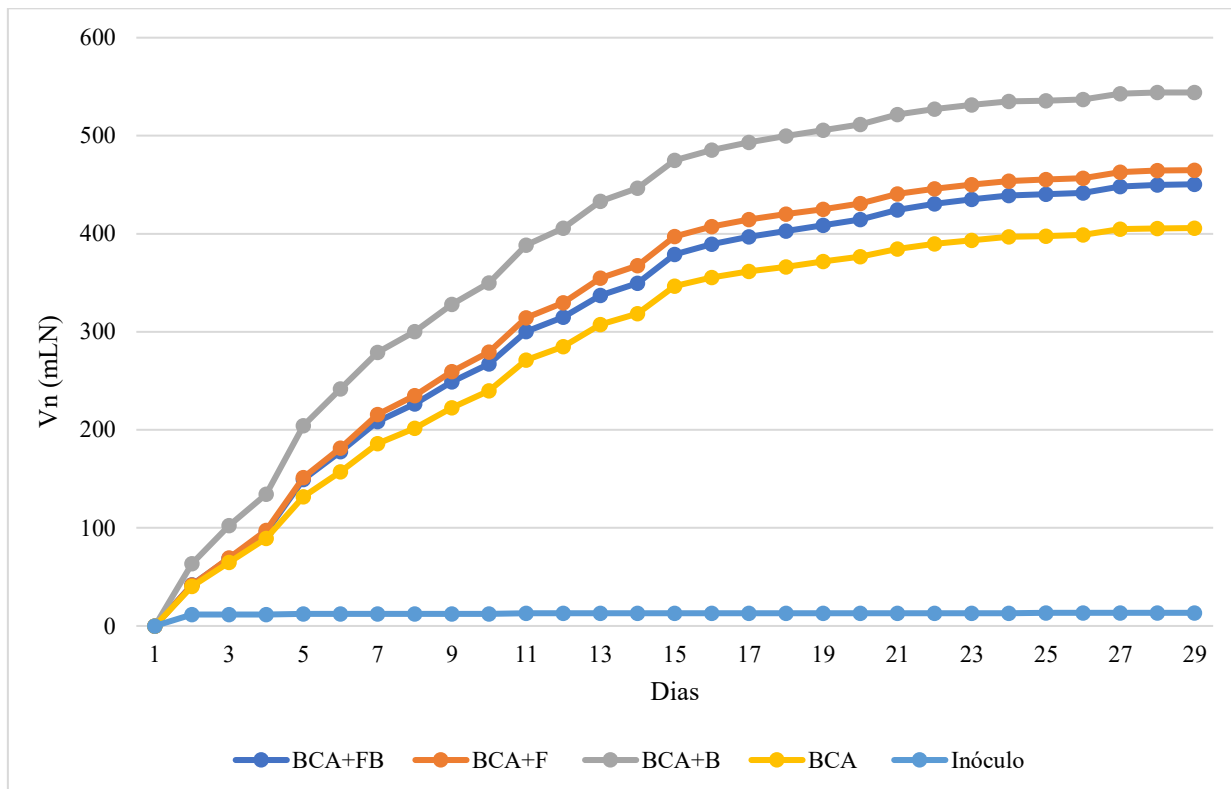


Fonte: A autora, 2025.

Através da criação da curva foi determinada a equação da reta, na forma:  $y=aX+b$ ; onde  $y$  representa a absorbância,  $X$  a concentração de açúcares redutores (mg/mL<sup>-1</sup>), e  $a$  e  $b$  são os coeficientes obtidos por regressão linear.

## APÊNDICE B – Gráfico da produção de biogás

**Figura 38** – Produção acumulada de gás seco Vn (mLN)



Fonte: A autora, 2025.

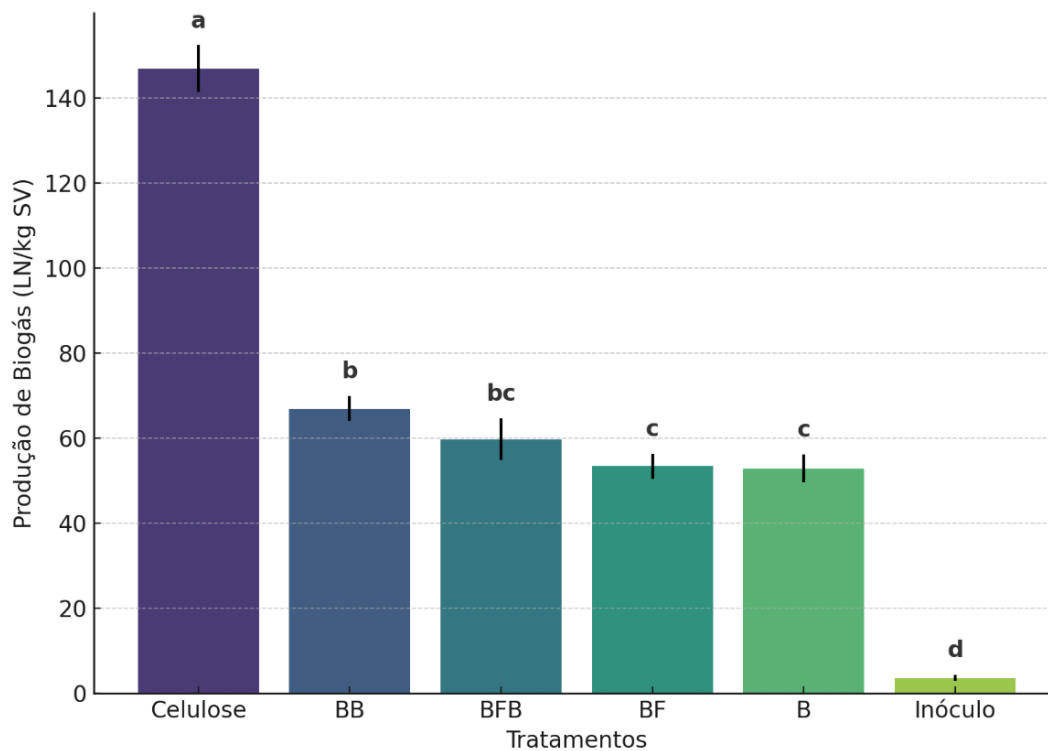
## APÊNDICE C – Testes estatísticos aplicados

**Tabela 18** – Teste de Tukey (HSD,  $\alpha = 0,05$ )

<b>Comparação</b>	<b>Diferença média</b>	<b>p-adj</b>	<b>Significativo</b>	<b>Grupo melhor</b>
<b>BFB – BF</b>	6,5	0,1466	Não	—
<b>BFB – BB</b>	-6,87	0,1204	Não	—
<b>BFB – B</b>	7,13	0,1079	Não	—
<b>BFB – Celulose</b>	-85,47	0,001	Sim	Celulose
<b>BFB – Inóculo</b>	57,93	0,001	Sim	BFB
<b>BF – BB</b>	-13,37	0,0022	Sim	BB
<b>BF – B</b>	0,63	0,9	Não	—
<b>BF – Celulose</b>	-91,97	0,001	Sim	Celulose
<b>BF – Inóculo</b>	51,43	0,001	Sim	BF
<b>BB – B</b>	14,0	0,0018	Sim	BB
<b>BB – Celulose</b>	-78,6	0,001	Sim	Celulose
<b>BB – Inóculo</b>	64,8	0,001	Sim	BB
<b>B – Celulose</b>	-92,6	0,001	Sim	Celulose
<b>B – Inóculo</b>	50,8	0,001	Sim	B
<b>Celulose – Inóculo</b>	143,4	0,001	Sim	Celulose

BB (Bagaço + Bactérias); BFB (Bagaço + Fungos + Bactérias); BF (Bagaço + Fungos) e B (Bagaço sem pré-tratamento).

Fonte: A autora, 2025.

**Figura 39** – Produção acumulada de biogás com comparação estatística (Tukey,  $p < 0,05$ )

- a) Celulose (significativamente maior que todos os outros)
- b) BB (Bagaço + Bactérias)
- c) BFB (Bagaço + Fungos + Bactérias)
- d) BF (Bagaço + Fungos) e B (Bagaço sem pré-tratamento)
- e) Inóculo (significativamente inferior a todos)

Fonte: A autora, 2025.