



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Bioprospecção de Microrganismos do Bioma Cerrado Visando a
Desconstrução de Lignina para Produção de Bioprodutos**

Mateus Florentino Barbosa

Brasília, agosto de 2024.

MATEUS FLORENTINO BARBOSA

**Bioprospecção de Microrganismos do Bioma Cerrado Visando a
Desconstrução de Lignina para Produção de Bioprodutos**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília – UnB para fim de obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Betania Ferraz Quirino

Brasília, agosto de 2024.

RESUMO

A lignina, o polímero aromático mais abundante na natureza e subproduto da produção de celulose, é recalcitrante e, frequentemente, subutilizada, apesar de seu potencial para gerar produtos de alto valor agregado. Este trabalho visa explorar a capacidade de bactérias de degradar lignina. Amostras de solo do Cerrado brasileiro foram coletadas e inoculadas em meio mínimo M9 com lignina Kraft alcalina como única fonte de carbono e incubadas a 37 °C. Foram isoladas 81 bactérias após triagem, e 50 delas demonstraram capacidade de crescer em diferentes tipos de lignina industrial. A identificação taxonômica por sequenciamento do gene 16S, resultou na identificação de 35 bactérias. As curvas de crescimento revelaram que o desenvolvimento das bactérias foi lento em todas as estratégias adotadas. A bactéria *Stenotrophomonas* atingiu uma densidade óptica (OD) máxima de 0,83 em 7 dias e 0,81 em 14 dias, sem alcançar OD de 1. Análises por UPLC-PDA dos sobrenadantes indicaram variações na composição química da lignina, com picos em diferentes tempos de retenção. Após 7 dias de crescimento, houve aumento na concentração de lignina, possivelmente devido à solubilização pelas bactérias. Após 14 dias, a concentração de lignina diminuiu, mas sem a aparição de novos picos, sugerindo consumo completo dos produtos gerados. Análises por UHPLC-MS/MS destacaram a produção de metabólitos diferenciados, com *Pseudomonas putida* KT2440 e *Pseudomonas citronelollis* C12 sendo notáveis pela produção de compostos como epóxido de rutacridona. *Brucella intermedia* strain XG-2 e *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 também mostraram potencial na bioconversão de lignina, com a produção de compostos como ácidos retinóicos e epóxido de rutacridona. *Stenotrophomonas* sp. strain Y destacou-se na produção de ficinas. Os resultados indicam que as bactérias isoladas do Cerrado possuem significativo potencial biotecnológico para a bioconversão de lignina em possíveis produtos. A otimização desse processo pode transformar a lignina em uma matéria-prima valiosa para a indústria, promovendo uma economia mais sustentável.

Palavras-chave: bactérias, Cerrado, filogenia, bioprodutos, solo, lignina.

ABSTRACT

Lignin, the most abundant aromatic polymer in nature and a byproduct of cellulose production, is recalcitrant and often underutilized despite its potential to generate high-value products. This study aims to explore the capability of bacteria to degrade lignin. Soil samples from the Brazilian Cerrado were collected and inoculated in M9 minimal medium with alkaline Kraft lignin as the sole carbon source and incubated at 37°C. After screening, 81 bacteria were isolated, and 50 of them demonstrated the ability to grow on various types of industrial lignin. Taxonomic identification through 16S gene sequencing resulted in the identification of 35 bacteria. Growth curves revealed that bacterial development was slow across all strategies adopted. The bacterium *Stenotrophomonas* reached a maximum optical density (OD) of 0.83 at 7 days and 0.81 at 14 days, without reaching an OD of 1. UPLC-PDA analyses of the supernatants indicated variations in the chemical composition of lignin, with peaks at different retention times. After 7 days of growth, there was an increase in lignin concentration, possibly due to solubilization by the bacteria. After 14 days, the lignin concentration decreased, but without the appearance of new peaks, suggesting complete consumption of the generated products. UHPLC-MS/MS analyses highlighted the production of differentiated metabolites, with *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas citronellolis* C12 being notable to produce compounds such as rutacridone epoxide. *Brucella intermedia* strain XG-2 and *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 also showed potential in lignin bioconversion, producing compounds such as retinoic acids and rutacridone epoxide. *Stenotrophomonas* sp. strain Y stood out to produce ficins. The results indicate that bacteria isolated from the Cerrado possess significant biotechnological potential for the bioconversion of lignin into valuable products. Optimizing this process could transform lignin into a valuable raw material for industry, promoting a more sustainable economy.

Keywords: bacteria, Cerrado, phylogeny, bioproducts, soil, lignin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biomassa lignocelulósica.....	1
Figura 2 - Estrutura da celulose.....	2
Figura 3 - Estrutura da hemicelulose.....	3
Figura 4 - Estrutura da lignina.	3
Figura 5 - Estrutura dos precursores da lignina.....	4
Figura 6 – Ligações comuns encontradas na lignina na natureza.....	5
Figura 7 – Mapa do Brasil com o Cerrado destacado.....	9
Figura 8: Modelo esquemático da metodologia.....	16
Figura 9 – Número de isolados bacterianos nas duas culturas de enriquecimento em diferentes condições de cultivo.....	22
Figura 10 – Bactérias crescidas em diferentes tipos de lignina.....	23
Figura 11 – Diagrama de Venn da capacidade de crescimento em diferentes substratos.....	24
Figura 12 – Análise em Gel de Agarose 1 % do DNA Genômico das Bactérias.....	40
Figura 13 – Produtos de PCR das Bactérias.....	42
Figura 14 – Gêneros bacterianos encontrados.....	44
Figura 15 – Árvore Filogenética.....	46
Figura 16 – Lipídeo A de <i>Escherichia coli</i>	66
Figura 17 – Molécula de PHA.....	67
Figura 18 – Molécula de vanilina.	68
Figura 19 – Molécula do ácido cis, cis-mucônico.	67
Figura 20 – Curva de Crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	82
Figura 21 – Curva de Crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 a 0,1 % de lignina.....	83

Figura 22 – Curva de Crescimento da <i>Pseudomonas citronelollis</i> C12.....	84
Figura 23 – Curva de Crescimento da <i>Pseudomonas citronelollis</i> C12 a 0,1 % de lignina.....	85
Figura 24 – Curva de Crescimento da <i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786.....	86
Figura 25 – Curva de Crescimento da <i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 a 0,1 % de lignina.....	87
Figura 26 – Curva de Crescimento da <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y.....	88
Figura 27 – Curva de Crescimento da <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y a 0,1 % de lignina.....	89
Figura 28 – Curva de Crescimento da <i>Brucella intermedia</i> xg-2.....	90
Figura 29 – Curva de Crescimento da <i>Brucella intermedia</i> xg-2 a 0,1 % de lignina..	91
Figura 30 – Curva de Crescimento da <i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27.....	92
Figura 31 – Curva de Crescimento da <i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27 a 0,1 % de lignina.....	93
Figura 32 – Teste com amostra 210 nm.....	94
Figura 33 – Cromatogramas da <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	96
Figura 34 – Cromatogramas da <i>Pseudomonas citronelollis</i> C12.....	98
Figura 35 – Cromatogramas da <i>Brucella intermedia</i> strain XG-2.....	100
Figura 36 – Cromatogramas da <i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_785.....	102
Figura 37 – Cromatogramas da <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y.....	104
Figura 38 – Cromatogramas da <i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27.....	106
Figura 39 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 M9/M9 14 dias.....	107

Figura 40 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 0,1/M9 14 dias.....	108
Figura 41 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da <i>Pseudomonas citronelollis</i> C12 0,1/M9 7 dias.....	109
Figura 42 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da <i>Brucella intermedia</i> XG-2 M9/M9 7 dias.....	110
Figura 43 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da <i>Brucella intermedia</i> XG-2 LB/M9 7 dias.....	111
Figura 44 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da <i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 0,1/M9 7 dias.....	112
Figura 45 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da <i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 0,1/M9 14 dias.....	112
Figura 46 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y 0,1/M9 7 dias.....	113

ÍNDICE

Capítulo 1: Isolamento de bactérias do bioma Cerrado capazes de crescer em lignina	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biomassa Lignocelulósica	1
1.2 Celulose:	2
1.3 Hemicelulose:.....	2
1.4 Lignina:	3
1.4.1 Pré-tratamento da lignina.....	6
1.4.2 Processo Kraft.....	6
1.4.3 Processo Lignosulfonato	7
1.4.4 Processo Organosolv	8
1.4.5 Desconstrução Microbiana da Biomassa Lignocelulósica	8
1.5 Solo do Cerrado	9
2. Justificativa do trabalho:	11
3. Justificativa do capítulo 1:.....	13
4. Objetivos:.....	15
5. Material e Métodos:	16
5.1 Coleta e Cultura de enriquecimento.....	17
5.2 Isolamento dos microrganismos.....	19
5.3 Teste em Diferentes Ligninas.....	20
6. Resultados:.....	22
6.1 Biblioteca de Microrganismos da Primeira Cultura de Enriquecimento	22
6.2 Biblioteca de Microrganismos da Segunda Cultura de Enriquecimento	23
6.3 Crescimento dos Microrganismos em Diferentes Ligninas	23
7. Discussão:	26
7.1 Cultura de enriquecimento:	26
7.2 Crescimento em diferentes tipos de lignina:	26
8. Conclusão do capítulo:	28
Capítulo 2: Identificação taxonômica das bactérias da coleção	29

9.	INTRODUÇÃO:.....	29
9.1	Diversidade microbiana:.....	29
9.2	Degradação microbiana da lignina:.....	29
9.2.1	Dye-decolorizing peroxidases:.....	30
9.2.2	Lacases:	31
9.2.3	Peroxidases de lignina:	31
9.2.4	Manganês peroxidases:	32
9.3	Métodos de Identificação de Microrganismos:	33
9.3.1	Métodos Fenotípicos:	33
9.3.2	Métodos Proteotípicos:.....	33
9.3.3	Métodos Genotípicos:.....	34
10.	Justificativa do capítulo 2:.....	36
11.	Objetivos:.....	37
	Objetivo geral:	37
	Objetivos específicos do capítulo:	37
12.	Material e Métodos:	38
12.1	Extrações de DNA genômico bacteriano	38
12.2	Identificação taxonômica das bactérias	39
13.	Resultados:.....	41
13.1	Extrações de DNA.....	41
13.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	42
13.3	Sequenciamentos da região 16S rDNA	44
13.4	Identificação dos Microrganismos	44
13.5	Árvore Filogenética	44
14.	Discussão:	48
14.1	Revisão de literatura sobre as bactérias da coleção capazes de utilizar lignina 51	
	<i>Achromobacter</i> sp.:.....	51
	<i>Achromobacter denitrificans</i> :	51
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.:.....	52
	<i>Ochrobactrum</i> sp.:	52
	<i>Brucella</i> sp.:.....	53
	<i>Pseudomonas</i> sp.	54

<i>Pseudomonas citronellolis</i>	54
15. Conclusão do capítulo:	63
Capítulo 3: Avaliação do crescimento e dos produtos gerados pelas bactérias	64
16. INTRODUÇÃO:.....	64
16.1 Produtos da lignina	64
16.1.1 Lipídeos	64
16.1.2 Bioplásticos.....	66
16.1.3 Vanilina	67
16.1.4 Ácido cis, cis-mucônico.....	68
16.2 Métodos para detectar os produtos de lignina:	69
16.2.1 Métodos Cromatográficos	69
16.2.3 Métodos espectroscópicos:.....	71
16.2.4 Espectroscopia UV/Visível:	71
16.2.5 Espectroscopia Infravermelha:.....	72
16.2.6 Espectroscopia de Raman:	72
16.2.7 Ressonância Magnética Nuclear:	72
16.2.8 Espectrometria de Massas:.....	73
17. Justificativa do capítulo 3:.....	74
18. Objetivos:.....	75
19. Material e Métodos:	76
19.1 Estratégias de crescimento:	76
19.2 Liofilização:	78
19.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplado ao Detector de Arranjo de Fotodiodo (UPLC-PDA):.....	78
19.4 Espetrômetro de massas:	80
20. Resultados:.....	82
20.1 Curva de crescimento dos microrganismos nos diferentes métodos:	82
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	82
<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12:.....	84
<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786:.....	85
<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y.....	87
<i>Brucella intermedia</i> XG-2.....	89
<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27:.....	91

20.2	Análises por UPLC- PDA:	93
20.2.1	Definição das condições de preparo das amostras	93
20.3	Resultado das amostras do UPLC-PDA:	94
20.4	UHPLC-MS/MS:	106
	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440:.....	107
	<i>Pseudomonas citronelollis</i> C12:.....	108
	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2:	109
	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786:.....	111
	<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y:.....	113
21.	Discussão:	114
21.1	Curva de crescimento dos microrganismos nos diferentes métodos:	114
21.2	UPLC_PDA:.....	114
21.3	UHPLC-MS/MS:.....	116
22.	Conclusão do capítulo:	118
23.	Conclusão final:	119
24.	Referencias:	121
25.	Anexo 1: Tabela com as massas do sobrenadante dos cultivos de lignina após a etapa de liofilização	133

Capítulo 1: Isolamento de bactérias do bioma Cerrado capazes de crescer em lignina

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é um recurso renovável e barato que pode ser utilizado para a produção de biocombustíveis e bioprodutos (BHATIA *et al.*, 2020). Ela é composta por biopolímeros com uma organização estrutural hierárquica com bastante variabilidade de acordo com a espécie de origem (SINGHVI; GOKHALE, 2019).

A biomassa lignocelulósica é a fonte de carbono renovável mais abundante da natureza, formada principalmente por três componentes encontrados na parede celular das plantas: a celulose, a hemicelulose e a lignina, como mostrado na Figura 1 (DHARMARAJA *et al.*, 2023). As proporções de cada componente variam de acordo com a espécie vegetal. Em geral, o conteúdo de celulose varia de 30 – 60 %, o de hemicelulose de 20 – 40 % e o de lignina de 15 – 25 %. Outros componentes também fazem parte da constituição da parede celular, porém em quantidades menores como as proteínas, pectinas e cinzas (HOSSEINI KOUAIE *et al.*, 2019).

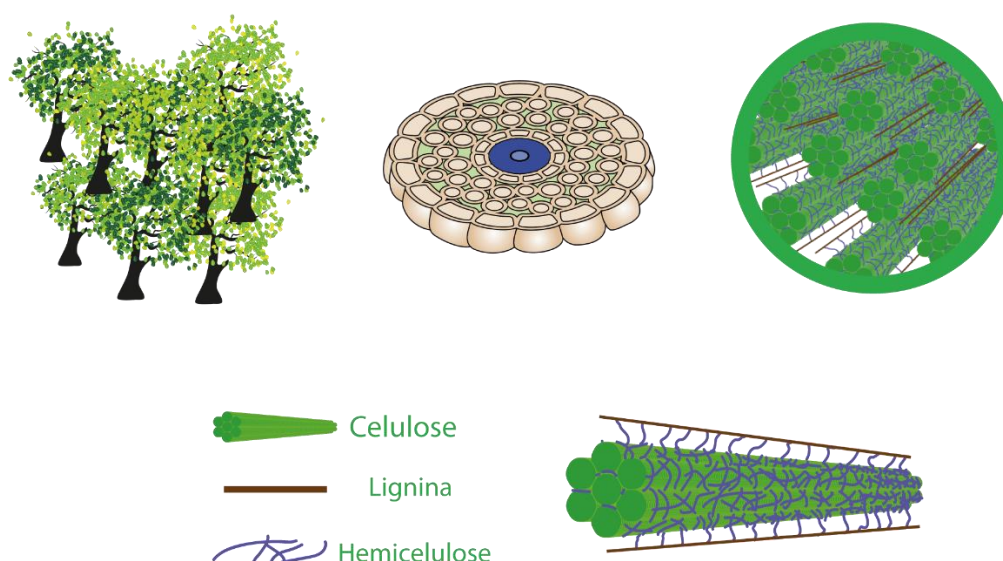


Figura 1 - Biomassa lignocelulósica. Representação da biomassa lignocelulósica de um exemplo de biomassa vegetal. No exemplo estão destacados os principais constituintes da parede celular, incluindo a celulose, a hemicelulose e a lignina (O autor, 2024).

1.2 Celulose:

A celulose é o polissacarídeo mais abundante presente na natureza. É um polímero linear de alta massa molecular composto por D-glicose. Não possui ramificações e é formado por centenas e até milhares de monômeros de glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, como mostrado na Figura 2 (BONECHI *et al.*, 2017; SINGHVI; GOKHALE, 2019).

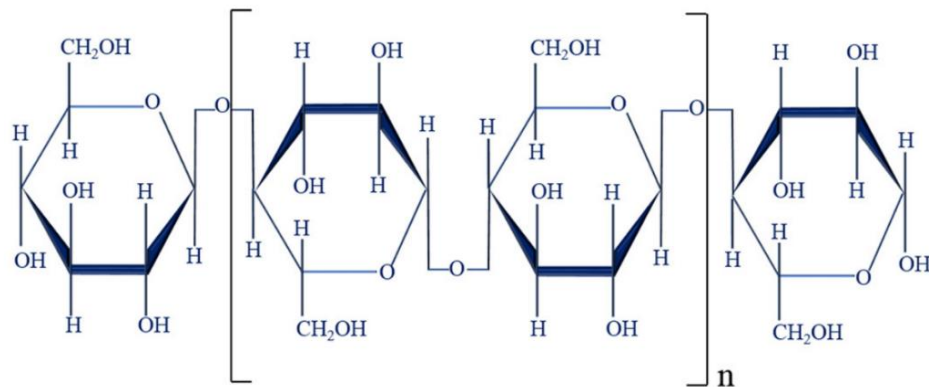


Figura 2 - Estrutura da celulose. Imagem representativa da celulose, com monômeros de glicose unidas de forma repetitiva unidas por ligações β -1,4 (BENAIMECHE *et al.*, 2020).

1.3 Hemicelulose:

A hemicelulose é um biopolímero com estrutura amorfa e diversa, formada por heteropolímeros curtos e muito ramificados, como mostrado na Figura 3. Constituído por uma mistura de polissacarídeos, em boa parte formados por pentoses, como a xilose e arabinose, e por hexoses, como a glicose e a galactose (BONECHI *et al.*, 2017; SINGHVI; GOKHALE, 2019).

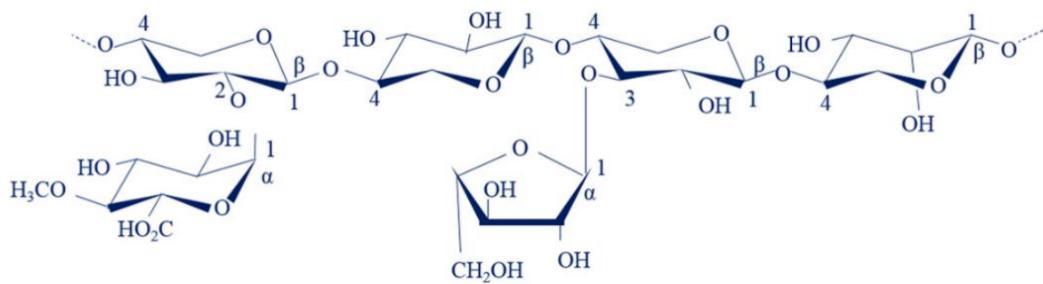


Figura 3 - Estrutura da hemicelulose. Imagem representativa da hemicelulose, com suas estruturas ramificadas e formadas por diferentes sacarídeos (BENAIMECHE et al., 2020)

1.4 Lignina:

A lignina é um dos componentes mais abundantes da parede celular vegetal. Sua composição e estrutura são complexas com grande quantidade de componentes fenólicos de alta massa molecular. (LIU; LUO; ZHENG, 2018). A lignina fica entrelaçada com as moléculas de celulose e hemicelulose, como mostrado na Figura 1, tornando-as resistentes a perturbações físicas e biológicas. Conferindo proteção e resistência à planta em relação a insetos e patógenos. A lignina é um heteropolímero tridimensional de fenilpropanóides como representada na Figura 4 (SINGHVI; GOKHALE, 2019).

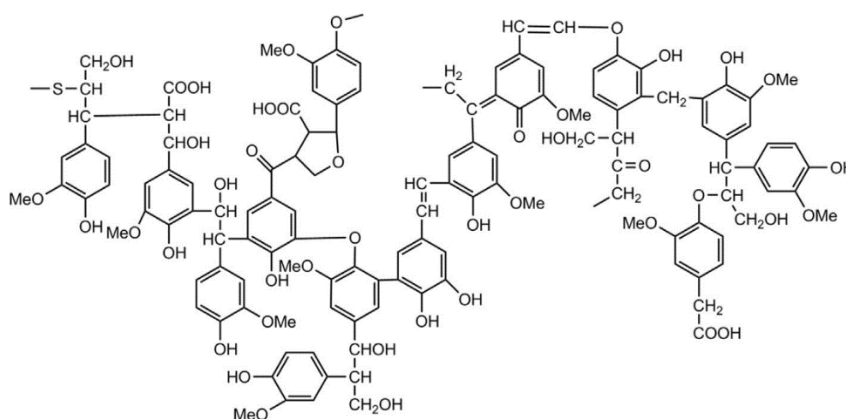


Figura 4 - Estrutura da lignina. Imagem representativa da lignina com sua estrutura amorfa e repleta de anéis aromáticos (HUANG; FU; GAN, 2019).

A lignina natural é formada por 3 moléculas precursoras o *p*-hidroxifenil (H), o guaiacil (G) e o siringil (S), moléculas derivadas dos monolignóis, álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, respectivamente, representadas na Figura 5. As proporções das moléculas na lignina diferem dependendo do tipo de matéria vegetal da qual ela é proveniente. Por sua vez, isso determina o tipo de produto que pode ser obtido da sua despolimerização. Na lignina, os derivados de hidroxifenil são encontrados em pequenas quantidades, os derivados do guaiacil podem ser encontrados tanto em plantas de madeira dura como macia, sendo encontrado em alta concentração na lignina e os derivados do sinapil são encontrados predominantemente em plantas de madeira dura (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2023).

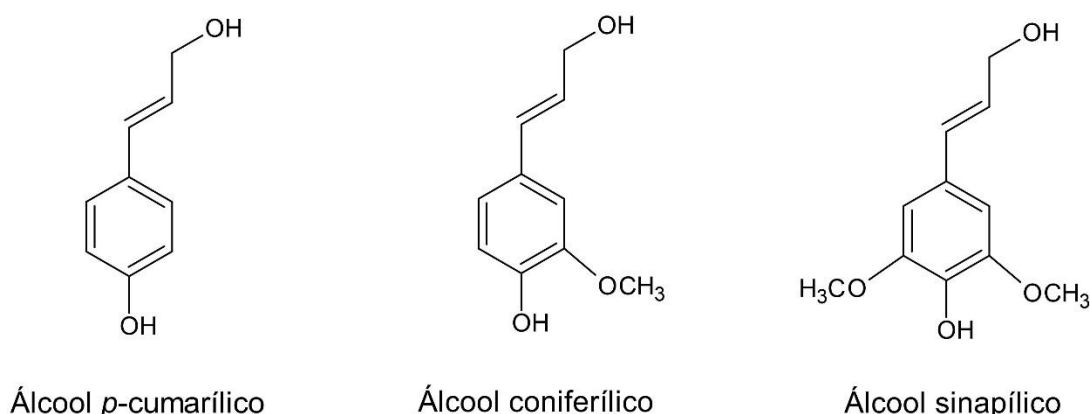


Figura 5 - Estrutura dos precursores da lignina. Imagem representativa dos 3 principais precursores da lignina: o álcool *p*-cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico (O autor, 2024)

Os grupos funcionais presentes na lignina incluem metoxila, carbonila, carboxila e hidroxila. Esses grupos se ligam a unidades estruturais aromáticas ou alifáticas, em diferentes quantidades e proporções. Essa diversidade de ligações e proporções resulta em uma variedade de composições e estruturas da lignina (POPESCU *et al.*, 2006).

Ligações comuns entre monômeros de lignina incluem as ligações β -O-4 (éteres alquil-aril), mostradas na Figura 6, sendo essas as ligações mais comuns encontradas nessa molécula, representando cerca de 50 % de suas ligações, consiste em um átomo de oxigênio ligado a um grupo alquil e a um grupo aril. Esse tipo de

ligação é considerada fácil de ser quebrada e por ser o tipo mais predominante encontrado na lignina é um alvo comum de processos de desconstrução de lignina (LU *et al.*, 2017).

As ligações 4-O-5 (éter diaril), mostradas na Figura 6, são ligações entre dois grupos aromáticos por um átomo de oxigênio. As β - β (resinol) mostradas na Figura 6, são ligações entre dois monômeros de lignina ligados através de suas posições beta, sendo esse um tipo de ligação bem resistente a degradação (HOUSTON; ABDLOUMINE, 2023). As β -1 (1,2-diaril-propano), mostradas na Figura 6, são ligações entre dois grupos aromáticos por uma cadeia de três átomos de carbono. Essa ligação ocorre nas posições beta e 1 dos monômeros, sendo esse tipo de ligação menos comum na lignina (FANG; MEIER, 2018).

As ligações β -5 (fenilcumarano) mostradas na Figura 6, são ligações que conectam um grupo aromático na posição beta de um monômero a um outro monômero, que está em um anel oxigenado de cinco membros. Esta é uma ligação complexa que contribui para a rigidez e estabilidade da lignina (AWAN *et al.*, 2019). As ligações 5-5, mostradas na Figura 6, são ligações onde dois grupos aromáticos se ligam na posição 5 de cada anel aromático, formando uma estrutura diaril. Essa é considerada uma das ligações mais fortes e estáveis na lignina, contribuindo significativamente para a sua resistência a desconstrução (SHENG *et al.*, 2017).

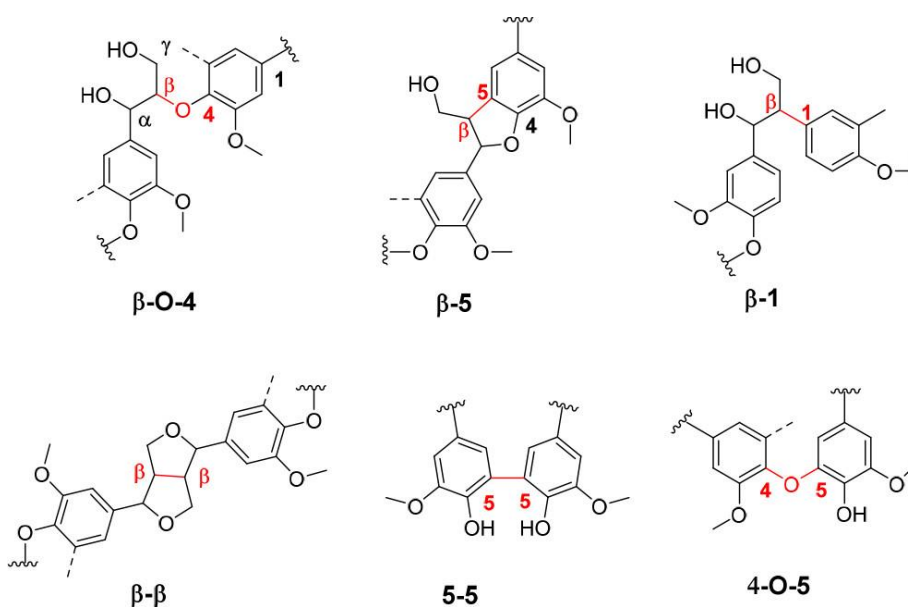


Figura 6 – Ligações comuns encontradas na lignina na natureza. Imagem representativa das principais ligações encontradas na lignina representadas em vermelho (SHENG *et al.*, 2017).

1.4.1 Pré-tratamento da lignina

Para utilizar a lignina industrialmente, é necessário separá-la dos outros componentes da biomassa através da realização do processo de pré-tratamento da lignocelulose. As ligninas geradas a partir do pré-tratamento são consideradas ligninas industriais. E são descartadas por serem um subproduto industrial. Os processos de pré-tratamento da lignocelulose são cruciais pois interferem na qualidade da lignina gerada para posterior uso. Nele há a separação dos principais componentes da biomassa, a degradação de polímeros alongados em compostos menores, causando também outras transformações químicas de acordo com o método utilizado (ZAKZESKI *et al.*, 2010). Os principais métodos utilizados atualmente na indústria para a geração de ligninas industriais estão descritos a seguir.

1.4.2 Processo Kraft

A lignina Kraft é a lignina proveniente do processo de polpação Kraft. Cerca de 85 % de toda a lignina produzida no mundo é lignina Kraft. Esse método é o mais utilizado para a obtenção de lignina da madeira proveniente de coníferas (CHEN, 2015).

Durante o processo Kraft, também conhecido como processo de polpação Kraft, fragmentos de madeira são colocados no chamado licor branco, um composto de hidróxido de sódio e hidrossulfeto de sódio a 160 °C. Esse processo despolimeriza parte da lignina e a separa da matriz de carboidratos por solubilização. Assim, é gerada uma parte crua de polpa chamada Kraft e o licor negro fraco. No licor negro fraco há lignina dissolvida, água, vários tipos de enxofre, sais e matéria orgânica diluída. Esse licor passa por um processo de evaporação para concentrar seus componentes, gerando o licor negro forte. Após este processo, o licor é colocado na

caldeira de recuperação, onde produtos químicos e a celulose são recuperados (ARGYROPOULOS *et al.*, 2023).

Os compostos químicos presentes na parte inferior da caldeira formam sulfeto de sódio e carbonato de sódio. Essa mistura é diluída em água no tanque inferior gerando assim o licor verde. Depois de filtrado, o licor verde é convertido em licor branco, com a reação química do carbonato de sódio com uma mistura de óxido e hidróxido de cálcio. Essa reação gera hidróxido de sódio como produto, sendo que este pode ser utilizado no início de um novo ciclo Kraft. O óxido de cálcio é regenerado em um forno de cal. O licor então é filtrado para a retirada da parte sólida do carbonato de cálcio, tornando assim o licor branco pronto para ser utilizado em um novo processo de polpação Kraft, fechando o ciclo do processo (ARGYROPOULOS *et al.*, 2023).

1.4.3 Processo Lignosulfonato

Os lignosulfonatos são provenientes do processo de polpação de sulfito. Sendo que ao fim deste processo, os lignosulfonatos provenientes dele são solúveis em água, característica interessante para as indústrias, tornando esse tipo de lignina muito utilizado (CHEN, 2015).

Os lignosulfonatos são um subproduto da produção de polpa de madeira. O pH típico desse processo vai de 1 a 5 e as bases mais utilizadas são constituídas por sódio e cálcio, porém magnésio ou amônia também podem ser utilizados. Nesse processo, as bases são adicionadas às frações de madeira e duas reações químicas principais ocorrem para solubilizar a lignina, a sulfonação e a hidrólise (ARO; FATEHI, 2017).

Na reação de hidrólise, ocorre a perda de um grupo hidroxil ou a clivagem das ligações α -éter gerando um intermediário de quinona-metídeo, com substratos fenólicos ou não fenólicos. Na sulfonação, os íons de sulfito presentes na solução, se ligam a essa estrutura intermediária formando unidades de ácido benzenossulfônico. Isso contribui para a solubilização dos lignosulfonatos. Depois desse processo, os lignosulfonatos são removidos por um processo de filtração, que ao fim resulta em um licor contendo os lignosulfonatos. Porém, nesse licor ainda estão presentes

hemicelulose e compostos químicos residuais do processo. Os lignosulfonatos podem então ser separados por processos de ultrafiltração (ARO; FATEHI, 2017).

1.4.4 Processo Organosolv

O processo organosolv faz a extração da lignina através de solventes orgânicos. Esse método começou a ser utilizado no século XIX, pois nele a lignina é removida da biomassa lignocelulósica podendo ser utilizada posteriormente no processo de polpação. Entretanto, a taxa de recuperação dos solventes orgânicos utilizados é baixa, o que torna o processo caro. Por essa razão, este é um processo pouco utilizado. Porém, este processo gera baixa poluição ambiental quando comparado com outros processos e produz uma lignina de alta pureza, motivo pelo qual é um tópico atualmente muito estudado (CHEN, 2015). A lignina organosolv é livre de enxofre, possuindo baixa quantidade de cinzas e sendo solúvel em solventes orgânicos (TANASE-OPEDAL; RUWOLDT, 2022).

No método organosolv, a biomassa lignocelulósica crua é tratada com misturas de solventes orgânicos com água, com ou sem a adição de um catalisador, e colocada em altas temperaturas e alta pressão. Assim, é feito o fracionamento dos componentes da biomassa, podendo separar a lignina das fibras de celulose. Vários tipos de solventes orgânicos podem ser utilizados no processo, como o etanol, metanol, ácido acético e também diferentes temperaturas, dependendo do tipo de biomassa utilizada (THORESEN *et al.*, 2020).

1.4.5 Desconstrução Microbiana da Biomassa Lignocelulósica

Sabe-se que microrganismos são capazes de desconstruir a biomassa e utilizar parte dos compostos liberados para gerar energia para seu metabolismo. A utilização de microrganismos, nativos ou geneticamente modificados, pode auxiliar nas etapas de pré-tratamento da biomassa. Atualmente, as duas formas de pré-tratamento mais comumente usadas são a química e a biológica, sendo que o pré-tratamento químico gera subprodutos tóxicos ao meio ambiente e a biológica atualmente ainda é um

processo muito caro. Cada uma delas possui suas vantagens e desvantagens. Entretanto, esses processos ainda precisam de otimização, mas quando concluídos podem mudar a forma como a indústria atual utiliza a biomassa (SINGHVI; GOKHALE, 2019).

1.5 Solo do Cerrado

O Brasil possui uma enorme diversidade microbiana. Porém, existe uma escassez de estudos sistemáticos sobre esses microrganismos nos diversos biomas brasileiros (DE CASTRO *et al.*, 2011). O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, ocupando grande parte do território nacional, como mostrado na Figura 7. Mesmo assim, existem poucos estudos sobre sua diversidade microbiana, havendo uma lacuna de conhecimento a ser preenchida (DE CASTRO *et al.*, 2016).

O solo do Cerrado tem suas peculiaridades, como o fato de que em grande parte é ácido, (pH entre 4,8 e 5,1), possuindo poucos nutrientes e diferentes tipos de vegetação (fitofisionomias). A matéria orgânica do Cerrado se decompõe rapidamente, um indicativo de que seu componente microbiano possui grande capacidade de degradação de matéria orgânica vegetal (CHADDAD, 2016).

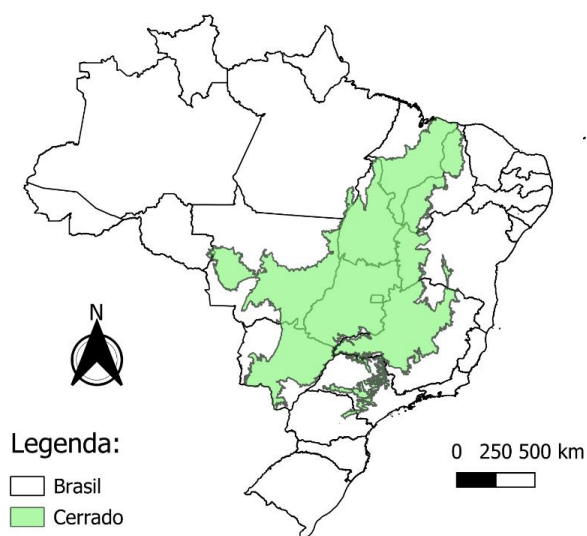


Figura 7 – Mapa do Brasil com o Cerrado destacado. A figura mostra o mapa do Brasil com o Cerrado brasileiro destacado de verde. Destaca-se o tamanho que esse bioma ocupa em relação ao território brasileiro (O autor, 2024).

2. Justificativa do trabalho:

Este trabalho busca explorar o potencial dos microrganismos isolados do bioma Cerrado e aplicá-los na degradação da lignina, uma macromolécula complexa e abundante na biomassa vegetal. A lignina é frequentemente considerada um subproduto de baixo valor e utilizada principalmente para geração de energia via pirólise. No entanto, a capacidade de certos microrganismos de metabolizar lignina e gerar produtos de alto valor pode transformar sua aplicação industrial.

A lignina, tanto em sua forma natural quanto pré-tratada, apresenta um desafio devido à sua complexidade estrutural. Entender a capacidade dos microrganismos de desconstruí-la e identificar os produtos resultantes desse processo é crucial. O estudo de bactérias capazes de metabolizar lignina pode abrir novas possibilidades industriais, fornecendo compostos com aplicações valiosas.

A abordagem de isolar microrganismos de ambientes onde a decomposição da lignina ocorre naturalmente, como o Cerrado, é estratégica. Este bioma, conhecido por sua rápida degradação de biomassa vegetal, oferece um nicho rico para descobrir microrganismos eficientes na degradação da lignina. Comparado a outras regiões, o Brasil possui uma biodiversidade única, proporcionando uma vantagem significativa na busca por novos microrganismos.

A utilização de culturas de enriquecimento, onde a lignina é a única fonte de carbono, permite a seleção de microrganismos com alta capacidade de utilizá-la. Essa metodologia direcionada melhora a eficiência na geração de coleções microbianas específicas para a degradação da lignina, contrastando com abordagens mais gerais que têm sucesso limitado.

A identificação precisa dos microrganismos é essencial para entender e otimizar suas capacidades biotecnológicas. O sequenciamento do gene 16S rDNA oferece uma ferramenta poderosa para essa identificação, permitindo a comparação com microrganismos geneticamente próximos e a inferência de características funcionais baseadas em dados literários.

Além disso, avaliar os produtos gerados por esses microrganismos a partir da lignina é fundamental. O uso de técnicas avançadas como UPLC-PDA e a espectrometria de massas de alta resolução possibilita acompanhar o processo de

desconstrução da lignina e realizar a caracterização detalhada dos compostos formados. Esses métodos são essenciais para entender as vias metabólicas envolvidas e os potenciais bioprodutos, contribuindo para a valorização da lignina como recurso industrial.

Portanto, este trabalho não contribui para o preenchimento de uma lacuna significativa no conhecimento sobre a desconstrução da lignina por microrganismos, mas também visa subsidiar a forma como a indústria aproveita esse recurso, promovendo a geração de produtos de alto valor e abrindo novas fronteiras na biotecnologia e na economia circular.

3. Justificativa do capítulo 1:

Diante do que foi apresentado, percebe-se a necessidade de entender melhor a macromolécula de lignina, tanto na sua forma natural quando na forma pré-tratada. Além do mais, há a necessidade de se entender a capacidade microbiana de desconstruí-la e os produtos que podem ser gerados. Tendo em vista que atualmente a lignina é frequentemente tratada como um subproduto de baixo valor e muitas vezes pirolisada para a geração de energia, descobrir produtos de alto valor gerados a partir da lignina por bactérias pode transformar sua aplicação industrial.

O estudo de bactérias capazes de metabolizar a lignina pode abrir novas possibilidades ainda não exploradas na indústria. A lignina na natureza é desconstruída por microrganismos que a utilizam em seu metabolismo, sendo assim encontrar esses microrganismos e entender como eles utilizam a lignina é de extrema importância. Entretanto, a quantidade de estudos utilizando microrganismos para desconstruir lignina ainda é considerada pequena, deixando uma lacuna de conhecimento que pode mudar a utilização atual de lignina.

Isolar microrganismos de ambientes onde a desconstrução da lignina ocorre de forma natural é uma estratégia interessante, pois assim os microrganismos isolados têm maior possibilidade de utilizar lignina e gerar produtos a partir dela. O Brasil possui uma vasta biodiversidade com diferentes biomas e diferentes microrganismos, destacando-se em comparação com outros países.

Dentre os biomas brasileiros, o Cerrado aparenta ser uma ótima opção para se encontrar esse tipo de microrganismos. Nele a biomassa vegetal é degradada de forma rápida, um indicativo de sua capacidade de degradar lignina.

Atualmente muitos dos estudos focam em triar microrganismos de coleções existentes na tentativa de encontrar aqueles que podem desconstruir lignina. Nessa abordagem, a quantidade de microrganismos encontrados com essa capacidade é pequena, pois não é uma abordagem específica. Entretanto, existem métodos direcionados para se gerar uma coleção de microrganismos específicos para uma determinada característica, como as culturas de enriquecimento. Nessa abordagem, a lignina é utilizada como única fonte de carbono e aqueles microrganismos que possuem a capacidade de utilizar a lignina são selecionados por meio de passagens

consecutivas para meios frescos, diminuindo o número de microrganismos inespecíficos a cada passagem.

Diante do exposto, este trabalho se propõe a gerar uma coleção de bactérias capazes de degradar lignina, por meio de uma cultura de enriquecimento contendo lignina como única fonte de carbono. Isolar essas bactérias e testar a capacidade que elas têm de crescer em diferentes tipos de lignina.

4. Objetivos:

Objetivo geral:

- Isolar e identificar bactérias do bioma cerrado capazes de utilizar a lignina como substrato para produção de metabólitos com potencial econômico para aplicação industrial.

Objetivos específicos do capítulo:

- Coletar amostras de solo do Cerrado de locais onde há degradação de matéria orgânica vegetal;
- Fazer uma cultura de enriquecimento com lignina como única fonte de carbono;
- Isolar as bactérias da cultura de enriquecimento para estocá-las;
- Testar a capacidade dessas bactérias de crescer em ligninas industriais.

5. Material e Métodos:

A seguir são descritos os procedimentos utilizados como estratégia metodológica deste capítulo. Abaixo se encontra um modelo esquemático da estratégia utilizada (Figura 8).

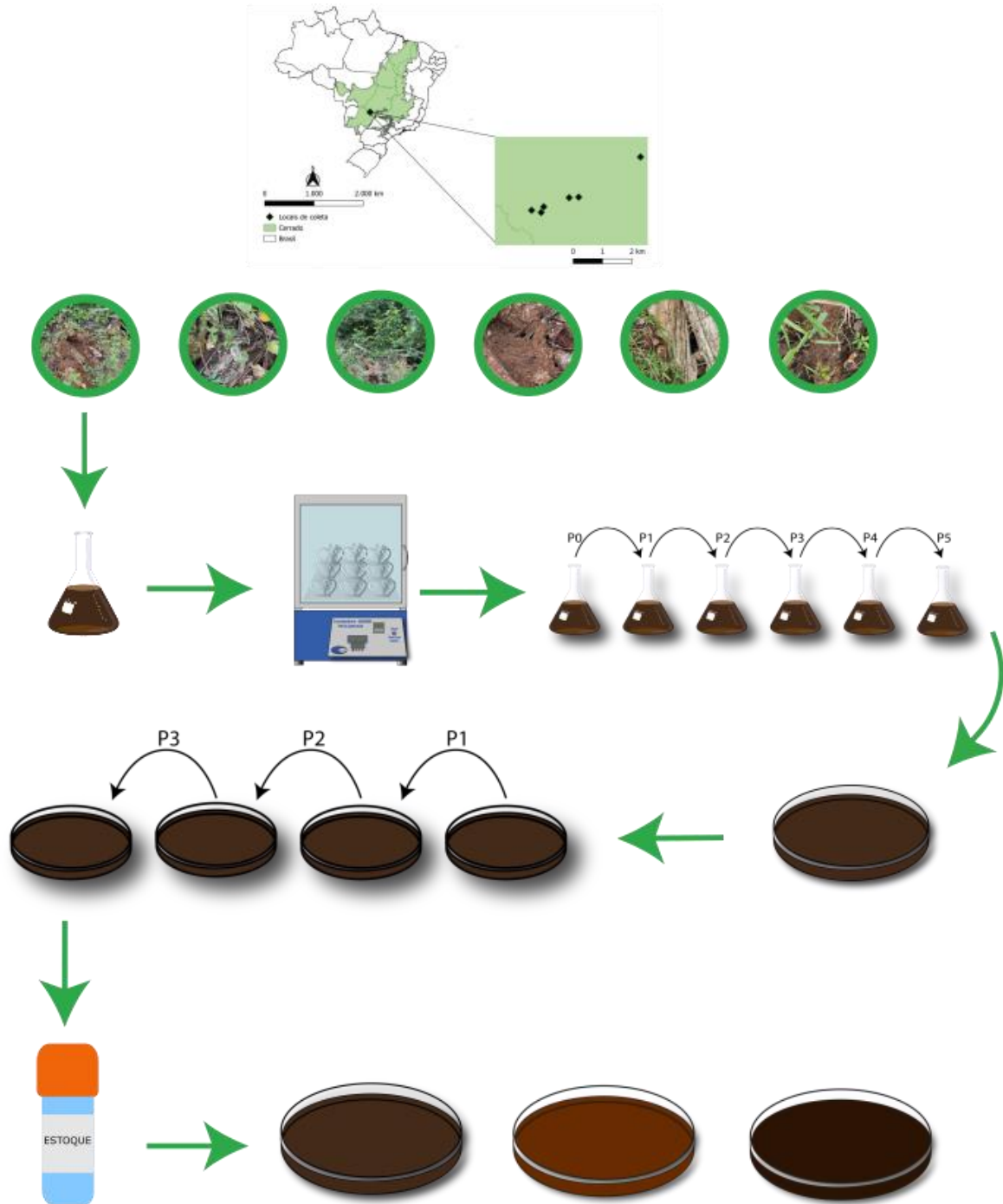


Figura 8 - Modelo esquemático da metodologia: A estratégia usada se iniciou pela coleta das amostras de solo, que foram inoculadas em meio líquido, sendo realizadas passagens da cultura de enriquecimento. Após a última passagem da cultura de enriquecimento, foi inoculada na versão sólida

do meio para a purificação das colônias por passagens consecutivas de *single colonies*. Assim as colônias purificadas foram estocadas e posteriormente utilizadas no teste de crescimento em ligninas industriais.

5.1 Coleta e Cultura de enriquecimento

Para o isolamento dos microrganismos, foram realizadas 2 coletas de solo em datas diferentes, nos dias 9 de janeiro e 24 de abril de 2022, a Tabela 1 apresenta os dados de latitude e longitude dos locais de coleta. A primeira com 3 amostras coletadas e a segunda com 6 amostras de solo, todas coletadas de uma fazenda localizada no bioma Cerrado no estado do Goiás (Figura 8). As amostras foram coletadas da superfície do solo com até 5 cm de profundidade abaixo da camada vegetal. Cada amostra foi colocada em um tubo do tipo Falcon de 50 mL estéril e guardadas em caixa térmica com gelo. Os inóculos foram realizados no dia seguinte as suas respectivas coletas. Para isso, pesou-se 2 gramas da amostra de cada solo coletado no mesmo dia. Essas porções foram unidas em um tubo estéril e misturadas em vórtex por aproximadamente 2 minutos, formando uma amostra de solo composto.

Tabela 1: Localização dos pontos de coleta do solo.

Amostras	Longitude	Latitude	Cultura Utilizada
Amostra 1	18.844.833	52.157.639	1 ^a e 2 ^a
Amostra 2	18.845.000	52.160.722	1 ^a e 2 ^a
Amostra 3	18.831.750	52.137.611	1 ^a e 2 ^a
Amostra 4	18.847.972	52.168.972	2 ^a
Amostra 5	18.849.806	52.169.806	2 ^a
Amostra 6	18.849.111	52.172.889	2 ^a

A tabela mostra as localizações dos pontos de coleta de solo utilizados nas culturas de enriquecimento. Sendo que a 1^a indica que a amostra de solo foi utilizada na primeira cultura de enriquecimento e a 2^a indica que a amostra foi utilizada na segunda cultura de enriquecimento.

O solo composto foi utilizado para os inóculos em meio mínimo M9 (Fig. 8). O preparo do meio M9 foi realizado utilizando-se 200 mL de Sais de M9 5 X, onde se pesou 56,4 g de sais de M9 para 1 L de água destilada e foi esterilizado por autoclavagem, 700 mL de água destilada estéril, 2 mL de $MgSO_4$ 1 M estéril, 100 μ L de $CaCl_2$ 1 M estéril, 6 mL da Solução de elementos traços 170 X. As partes do meio foram unidas em fluxo e completadas para 1000 mL (DEANGELIS *et al.*, 2010).

A Solução de Elementos Traços 170 X foi realizada com 15 g de ácido nitrilotriacético, 30 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4$), 5 g de sulfato de manganês monohidratado ($MnSO_4 \cdot 1H_2O$), 10 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,7 g de cloreto de ferro (III) ($FeCl_3$), 1 g de sulfato de cobalto ($CoSO_4$), 1 g de cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 1 g de sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,1 g de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 0,1 g de *aluminum potassium sulfate* dodecahidratado ($AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), 1 g de ácido bórico (H_3BO_3) e 0,1 g de molibdato de sódio monohidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 1H_2O$). O pH foi ajustado para 6,5 com KOH e completado para 1 litro, sendo a solução esterilizada por filtração em filtro de 22 μ m. O método original foi modificado, onde se usava cloreto de ferro (II) foi utilizado cloreto de ferro (III) 0,7 g (DEANGELIS *et al.*, 2010).

Com o meio de cultura M9 pronto, pesou-se 0,5 g que foi incorporado em 50 mL de meio líquido e colocado a 37 °C com agitação a 200 RPM, sendo que no meio M9 com elementos traços também foi colocado 0,5 g de lignina Kraft (Sigma-Aldrich número de referência 471003), adicionado diretamente ao Erlenmeyer. O inóculo foi realizado em duplicata (MENDES *et al.*, 2021).

Os inóculos foram deixados por 2 semanas no *shaker* e depois disso 2 mL de cada inóculo foi utilizado para que um novo inóculo fosse realizado em 50 mL de meio fresco e colocado novamente nas mesmas condições de temperatura e agitação. Esse processo foi chamado de passagem. A cada 2 semanas foi realizada uma nova passagem até que se completassem pelo menos 5 passagens, processo mostrado na Figura 8. Após a 5ª passagem da primeira cultura por duas semanas em *shaker*, ela foi usada para inocular seus respectivos meios, desta vez em versões sólidas, visando o isolamento dos microrganismos. Diferentes inibidores de crescimento sendo eles os antibióticos, canamicina, carbenicilina, estreptomicina ciclohexamida. Eles foram utilizados nesses meios para ampliar a variedade de microrganismos na coleção. A

segunda coleta foi submetida a 8 passagens em *shaker*, permitindo uma maior seleção dos microrganismos. Somente após essas oito passagens, a cultura foi inoculada em placas de meio sólido (MENDES *et al.*, 2021).

5.2 Isolamento dos microrganismos

Para se isolar os microrganismos do meio líquido, foram feitos inóculos da última passagem dos meios em suas versões sólidas. Na versão sólida do meio M9 com elementos traços, foi adicionado 40 g de ágar bacteriológico por litro ao protocolo previamente citado. Entretanto, nesse passo a lignina foi adicionada à água destilada antes da autoclavagem para que esta também fosse esterilizada.

Para os meios sólidos, quatro versões com diferentes antibióticos foram utilizadas, na tentativa de aumentar a diversidade das bactérias isoladas em cada meio. Uma versão com o antibiótico carbenicilina a 20 µg/mL, estreptomicina, 10 µg/mL, canamicina a 10 µg/mL e uma versão somente com ciclohexamida. Em todas as versões das placas foi utilizado ciclohexamida a 10 µg/mL.

Os inóculos em meio líquido da última passagem foram diluídos e essas diluições foram utilizadas para fazer os inóculos nos meios sólidos. Para isso foram utilizados 200 e 400 µL das diluições de 1/1.000 e 1/10.000 nas placas. No total foram inoculadas 20 placas de Meio M9 com Elementos traços. Para cada versão de antibiótico foram inoculadas 4 placas, 1 com 200 µL na diluição de 1/1.000, 1 com 200 µL na diluição de 1/10.000, 1 com 400 µL na diluição de 1/1.000 e 1 com 400 µL na diluição 1/10.000.

Após os inóculos, todas as placas para isolamento de bactérias foram colocadas em estufa a 37 °C. Após os inóculos iniciais, todas as colônias bacterianas que cresceram foram colocadas em placas de petri individuais com meios frescos, seguindo as mesmas condições das placas iniciais e incubadas nas mesmas temperaturas até que se conseguisse colônias isoladas.

Quando se conseguia uma colônia purificada das bactérias, essa colônia isolada era colocada em uma nova placa chamada de fase 1. Das placas da fase 1 foi

retirada uma colônia individual e passada para uma placa com meio fresco, chamada de fase 2 e da mesma forma feita com uma colônia da fase 2, para uma nova placa chamada de fase 3, onde se tinha conseguido três colônias individuais da mesma bactéria, como mostrado anteriormente na Figura 8. Somente colônias com aspectos diferentes como coloração, opacidade e formato de colônia, foram passadas para novas placas e purificadas, para assim aumentar a diversidade de microrganismos isolados.

Depois das passagens das bactérias, um inóculo na versão líquida do meio utilizado foi realizado. A bactéria foi inoculada em 10 mL de meio em um tubo do tipo Falcon de 50 mL. Esse inóculo foi colocado em *shaker* a 37 °C e agitação de 200 RPM. As bactérias do meio M9 com elementos traços foram mantidas em *shaker* por pelo menos 7 dias, pois em placa o seu crescimento foi demorado.

Após isso, os inóculos líquidos foram utilizados para fazer os estoques bacterianos. Os estoques foram feitos em criotubos onde se colocava 1 mL de inóculo e 1 mL de glicerol a 40 %, misturado e guardado a – 80 °C. Assim, 4 estoques de cada bactéria foram feitos.

5.3 Teste em Diferentes Ligninas

As bactérias estocadas foram utilizadas em um teste de crescimento para testar a capacidade de crescer e consumir diferentes tipos de lignina. Para isso foram investigadas duas ligninas de origem industrial: uma lignina Kraft, e uma lignina organosolv. Essas ligninas foram utilizadas na mesma concentração que a lignina Kraft original da Sigma a 1 % (m/v), ou seja, 10 g de lignina para cada litro de meio. As ligninas foram então adicionadas a 500 mL de água destilada, porém por conta da sua insolubilidade em água elas tiveram o seu pH ajustado.

Com a lignina já adicionada na água, o pH foi elevado para 11 com NaOH a 10 M até que toda a lignina se solubilizasse em um agitador magnético. Após a completa solubilização da lignina, o pH foi diminuído para 7 com HCl a 10 M e foram adicionados 40 g de ágar bacteriológico. Essa mistura foi autoclavada por 15 min a 121 °C na

pressão de 1 ATM. Dessa forma a lignina se manteve solubilizada após a autoclavagem. Depois disso o meio M9 + T.E. (*trace elements*) teve seu preparo completado em fluxo, se adicionando 200 mL de sais de M9 à mistura com água destilada estéril para 1 L e então foi adicionado 2 mL de $MgSO_4$ 1 M estéril, 100 μ L de $CaCl_2$ 1 M estéril, 6 mL da solução de elementos traços 170 X (DEANGELIS *et al.*, 2010).

Assim, o meio foi vertido em placas de petri e todas as bactérias estocadas foram inoculadas nos 3 tipos de meio de cultura. Um meio contendo a lignina Kraft Sigma, um contendo lignina Kraft industrial e um contendo a lignina organosolv industrial e foram incubados em estufa a 37 °C. O crescimento das bactérias foi avaliado por 14 dias para determinar a capacidade de crescimento delas nesses tipos diferentes de lignina.

6. Resultados:

6.1 Biblioteca de Microrganismos da Primeira Cultura de Enriquecimento

Da primeira cultura de enriquecimento, com as 3 amostras de solo, foram feitas 5 passagens e da última passagem foi realizado o isolamento das bactérias em meio sólido. Foram isolados um total de 44 colônias de bactérias; dos quais 11 cresceram na presença de apenas ciclohexamida, 11 na presença de ciclohexamida com carbenicilina, 12 na presença de ciclohexamida com estreptomicina e 10 na presença de ciclohexamida com canamicina (Figura 9).

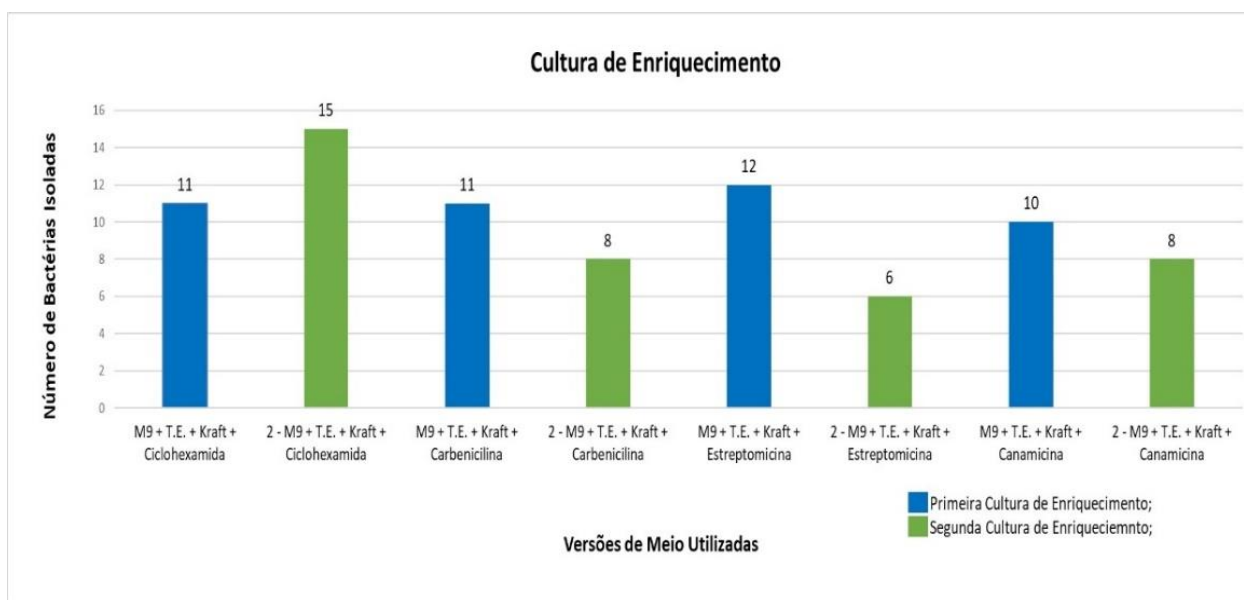


Figura 9 – Número de isolados bacterianos nas duas culturas de enriquecimento em diferentes condições de cultivo. M9 + T.E. + Kraft + ciclohexamida: bactérias isoladas da primeira cultura de enriquecimento em meio com ciclohexamida; 2 - M9 + T.E. + Kraft + ciclohexamida: bactérias isoladas da segunda cultura de enriquecimento em meio com ciclohexamida; M9 + T.E. + Kraft + carbenicilina: bactérias isoladas da primeira cultura de enriquecimento em meio com carbenicilina; 2 - M9 + T.E. + Kraft + carbenicilina: bactérias isoladas da segunda cultura de enriquecimento em meio com carbenicilina; M9 + T.E. + Kraft + estreptomicina: bactérias isoladas da primeira cultura de enriquecimento em meio com estreptomicina; 2 - M9 + T.E. + Kraft + estreptomicina: bactérias isoladas da segunda cultura de enriquecimento em meio com estreptomicina; M9 + T.E. + Kraft + canamicina: bactérias isoladas da primeira cultura de enriquecimento em meio com canamicina; 2 - M9 + T.E. + Kraft + canamicina: bactérias isoladas da segunda cultura de enriquecimento em meio com canamicina;

6.2 Biblioteca de Microrganismos da Segunda Cultura de Enriquecimento

Da segunda cultura de enriquecimento com as 6 amostras de solo, foram feitas 8 passagens e da última passagem o isolamento das bactérias meio sólido. Nele foram isoladas um total de 37 bactérias; das quais 15 cresceram na presença de apenas ciclohexamida, 8 na presença de ciclohexamida com carbenicilina, 6 na presença de ciclohexamida com estreptomicina e 8 na presença de ciclohexamida com canamicina (Figura 9).

Assim, o total de bactérias isoladas na coleção foi de 81, sendo 44 colônias da primeira cultura de enriquecimento e 37 da segunda. Sendo que do total 26 colônias cresceram na presença de ciclohexamida, 19 na presença de carbenicilina, 18 na presença de estreptomicina e 18 na presença de canamicina.

6.3 Crescimento dos Microrganismos em Diferentes Ligninas

Resultado do teste de crescimento em lignina Kraft e na lignina organosolv industrial (Figura 10).

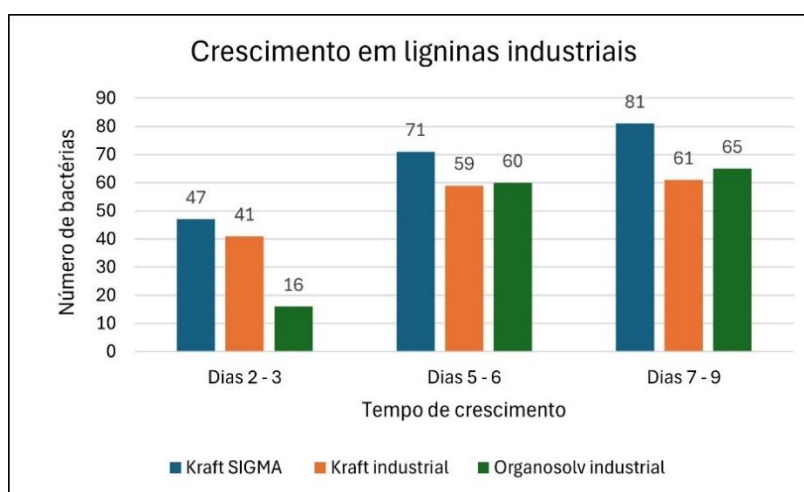


Figura 10 – Análise do crescimento dos isolados bacterianos isolados em diferentes tipos de lignina.

A Figura 10 mostra o tempo que as bactérias demoram para crescer nos diferentes tipos de lignina. Onde de 2 – 3 dias, 47 das bactérias haviam crescido em lignina Kraft Sigma, 41 haviam conseguido crescer em lignina Kraft industrial e 16 em lignina organosolv industrial.

Entre o dia 5 e 6 de crescimento, 71 das bactérias haviam crescido em lignina Kraft Sigma, 59 haviam conseguido crescer em lignina Kraft industrial e 60 em lignina organosolv industrial. Nos dias 7 – 9, 81 das bactérias já haviam crescido em lignina Kraft Sigma, 61 já haviam conseguido crescer em lignina Kraft industrial e 65 em lignina organosolv industrial.

A Figura 11 mostra que 76 bactérias, de um total de 81 da coleção, foram capazes de crescer em outro tipo de lignina além da lignina Kraft da Sigma e apenas 5 bactérias foram capazes de crescer somente na lignina Kraft da Sigma. Especificamente, 61 bactérias foram capazes de crescer em lignina Kraft industrial e 65 em lignina organosolv industrial, sendo que 50 delas capazes de crescer em ambos os tipos de lignina industrial.

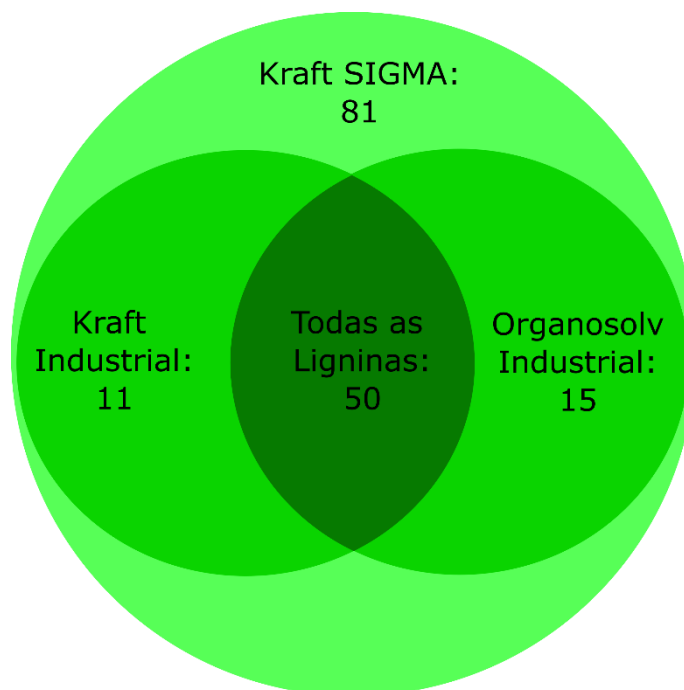


Figura 11 – Diagrama de Venn da capacidade de crescimento em diferentes substratos. A imagem apresenta o resultado do teste de crescimento das bactérias em diferentes tipos de lignina como sua

única fonte de carbono. Kraft Sigma: 81 bactérias que foram isoladas do meio com lignina Kraft da Sigma, ou seja, a coleção total de bactérias; Kraft industrial: 11 bactérias que foram capazes de crescer em lignina Kraft da Sigma e industrial; Organosolv Industrial: 15 bactérias que foram capazes de crescer em lignina Kraft da Sigma e lignina organosolv industrial; Todas as Ligninas: 50 bactérias que foram capazes de crescer nos 3 tipos de lignina.

7. Discussão:

7.1 Cultura de enriquecimento:

Com esse número de bactérias isoladas da primeira e da segunda cultura de enriquecimento, podemos notar a capacidade que as bactérias possuem na utilização de lignina como sua fonte de carbono. Na segunda cultura de enriquecimento o número de bactérias isolado foi menor (37 bactérias isoladas na segunda passagem e 44 na primeira), mesmo levando em consideração que o número de pontos de coleta foi o dobro, um indicativo de que com um número maior de passagens na cultura de enriquecimento, a seleção das bactérias que utilizam lignina como fonte de carbono é mais significativa. Ou seja, como o esperado do método, quanto maior o número de passagens mais significativa é a seleção de microrganismos aptos a desconstrução de lignina e a tolerância aos produtos tóxicos gerados.

As bactérias isoladas da cultura de enriquecimento demonstram o sucesso que foi a cultura, pois todas elas conseguiram após isoladas crescer novamente em meio sólido com apenas lignina como sua fonte de carbono. Portanto, as bactérias provenientes da cultura foram selecionadas, deixando somente aquelas que eram especializadas no consumo de lignina para manutenção do seu metabolismo.

7.2 Crescimento em diferentes tipos de lignina:

Esse resultado é interessante, pois na literatura encontrar bactérias capazes de crescer em ligninas industriais é incomum. Além disso, as bactérias demonstraram a capacidade de crescer em diferentes tipos de lignina, a Kraft industrial e a organosolv industrial, característica desejada pela indústria, pois assim as bactérias podem ser utilizadas em bioprocessos diferentes sem a necessidade de utilizar diferentes bactérias na desconstrução de diferentes ligninas.

Além disso, a lignina organosolv é um tipo de lignina com poucos casos relatados de crescimento bacteriano. Isso pode se dar ao fato de que o acesso a ligninas industriais não é comum. Entretanto, tendo em vista o potencial de aplicação industrial futura, esse experimento é de grande relevância trazendo resultados inovadores e a possibilidade de utilização de bactérias na desconstrução de lignina

industrial. Por fim, compreender como essas bactérias são capazes de utilizar os 3 tipos de lignina e quais são os produtos gerados, trará informações provavelmente inéditas sobre o assunto.

8. Conclusão do capítulo:

Como resultado desse estudo, 9 amostras de solo foram coletadas de uma fazenda do Cerrado, em 2 datas de coleta diferentes. A partir dessas amostras de solo de Cerrado foram feitas duas culturas de enriquecimento, onde na primeira foram inoculadas 3 amostras de solo e a segunda 6 amostras de solo. As culturas de enriquecimento possuíam lignina Kraft da Sigma como a sua única fonte de carbono para a seleção das bactérias, em busca de bactérias que possuíssem a capacidade de utilizar lignina em seu metabolismo.

As culturas de enriquecimento foram inoculadas em meios frescos a cada duas semanas para que a seleção de microrganismos fosse feita de forma adequada. Após 5 passagens a primeira cultura de enriquecimento e oito passagens da segunda cultura de enriquecimento elas foram inoculadas em meio sólido para o isolamento das bactérias.

Foram purificadas e isoladas 81 bactérias provenientes de passagens consecutivas de *single colonies* da mesma bactéria, para que se diminuísse as chances de estocar duas bactérias em um mesmo estoque, ou seja, um estoque contaminado. Além disso, para diminuir a repetição das bactérias isoladas, somente bactérias que apresentavam aspectos diferentes umas das outras, como coloração opacidade, tamanho e formato das colônias, eram estocadas.

As 81 bactérias estocadas foram testadas para a sua capacidade de crescimento em diferentes tipos de lignina para avaliar as suas aptidões no crescimento em ligninas industriais. Além disso, também foi avaliado o tempo necessário para que elas crescessem nos diferentes meios. Um total de 50 dessas bactérias demonstraram a capacidade de crescer nos 3 tipos de lignina, Kraft Sigma, Kraft industrial e organosolv indústria, 11 cresceram em lignina Kraft Sigma e industrial e 15 em lignina Kraft sigma e organosolv.

Capítulo 2: Identificação taxonômica das bactérias da coleção

9. INTRODUÇÃO:

9.1 Diversidade microbiana:

Microrganismos ambientais são cruciais para manter o equilíbrio ecológico local, os ciclos biogeoquímicos e de energia. Entretanto, ainda é desafiador entender as funções individuais de cada microrganismo nesses microbiomas, quais são as vias que eles utilizam para degradar as matérias presentes no ambiente e quais são os produtos gerados através dessas vias. Assim, identificar esses microrganismos facilita o estabelecimento de hipóteses sobre os possíveis produtos que cada microrganismo pode gerar. Pois, com as bases de dados atuais, as informações sobre os microrganismos ficaram mais acessíveis (CUI *et al.*, 2022).

O solo do Cerrado tem uma rica diversidade microbiana, em boa parte com potencial biotecnológico inexplorado. Estudos sistemáticos para identificação dos microrganismos presentes nesse bioma podem contribuir para desvendar seu potencial. Especificamente, a identificação taxonômica desses microrganismos pode gerar novas oportunidades de como utilizá-los em contextos específicos, possibilitando através disto gerar novos processos de interesse industrial (DE CASTRO *et al.*, 2016).

Dentre os microrganismos já encontrados no solo do Cerrado, algumas espécies são conhecidas por apresentarem atividade na degradação de lignina como o *Bacillus sp.* e *Burkholderia sp.* (OLIVEIRA *et al.*, 2009). O *Bacillus sp.* ITRC S8, por exemplo, já foi estudado pela capacidade de degradar a lignina Kraft (CHANDRA *et al.*, 2007). O gênero *Burkholderia sp.* também possui capacidade em clivagem de lignina alcalina (WOO *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2017), sendo que também consegue utilizar vanilina e ventraldeído como sua única fonte de carbono, compostos aromáticos derivados da lignina (HARAZONO *et al.*, 2003).

9.2 Degradação microbiana da lignina:

A degradação biológica de lignina ocorre por meio de enzimas que possuem a capacidade de clivar as ligações químicas existentes entre as moléculas desse heteropolímero (GRGAS *et al.*, 2023). Para que o oligômero de lignina seja desconstruído em moléculas menores como dímeros ou monômeros, é necessária a atuação de diferentes tipos de enzima (LIU *et al.*, 2022). Assim, as enzimas microbianas mais comuns na desconstrução da lignina e suas atuações serão explicadas abaixo.

9.2.1 Dye-decolorizing peroxidases:

As Dye-decolorizing peroxidase ou Dyp peroxidases são enzimas que fazem parte da família das peroxidases contendo um grupo heme. Seu nome vem da sua capacidade de clivar ligações presentes nos corantes de hidroquinona, sendo que esses corantes podem ser altamente recalcitrantes o que os torna difíceis de serem degradados (YOSHIDA; SUGANO, 2023).

Além dos corantes, essas enzimas também possuem a capacidade de desconstruir a lignina. Essas enzimas catalisam a redução do peróxido de hidrogênio para água e assim clivam as ligações presentes em diversos compostos fenólicos e não-fenólicos (SILVA *et al.*, 2023a). Essa família de enzimas pode ser dividida em subfamílias, sendo elas a A, B, C e D se baseando em estudos filogenéticos, sendo que os tipos A, B e C são muito encontrados em bactérias e o tipo D encontrado majoritariamente em fungos (LIU *et al.*, 2022).

As Dyp peroxidases de tipo A são enzimas extracelulares, elas possuem uma via de translocação de arginina dupla, que serve como um sinalizador para a secreção da enzima. As de tipo B e C são consideradas intracelulares por não possuírem nenhum tipo de sinalização para secreção, enquanto que enzimas do tipo D são encontradas em fungos e são naturalmente secretadas das células (CATUCCI *et al.*, 2020).

9.2.2 Lacases:

As lacases são enzimas pertencentes a família das multicobre oxidases, tendo ação oxidativa em diversos substratos como compostos fenólicos e compostos aromáticos poliméricos, o que torna essas enzimas diretamente relacionadas a desconstrução de lignina (AGUSTIN *et al.*, 2021).

As lacases catalisam a redução de dois átomos de oxigênio em duas moléculas de H₂O, com a oxidação simultânea de quatro elétrons provenientes de moléculas de substrato. Durante esse processo, quatro moléculas de substrato perdem um elétron cada uma, o que resulta na formação de duas moléculas de água. (ZHOU *et al.*, 2023).

Nos compostos fenólicos as lacases atuam clivando as ligações entre dois carbonos (C-C) e entre um carbono e um grupo aril (JANUSZ *et al.*, 2020). Esse tipo de enzima está recebendo grande interesse atualmente por ser considerada uma enzima que gera poucos resíduos tóxicos ao meio ambiente, pois como subproduto da reação é gerada H₂O a partir do O₂ (LIU *et al.*, 2020).

9.2.3 Peroxidases de lignina:

As peroxidases de lignina desempenham um papel importante na degradação da lignina da parede celular de plantas, fazendo a oxidação de compostos aromáticos (PIONTEK; SMITH; BLODIG, 2001). As peroxidases de lignina são enzimas contendo um grupo heme em sua conformação que é essencial para sua atividade catalítica, sendo dependentes de peróxido de hidrogênio para sua atividade de oxireductase. Essas enzimas podem atuar em diversos substratos, clivando tanto compostos fenólicos como não fenólicos presentes na lignina e uma grande variedade de compostos aromáticos (SINGH *et al.*, 2021).

A reação das peroxidases de lignina ocorre em dois passos, no primeiro o composto intermediário oxoferril (composto I) é formado pela oxidação do grupo heme da enzima, utilizando o peróxido de hidrogênio como o agente oxidante. O composto I é complexo reativo que pode aceitar elétrons do substrato. No segundo passo, o composto I oxida a lignina ou outros substratos, formando radicais livres. Esses radicais livres iniciam a quebra das ligações covalentes da estrutura da lignina,

resultando em fragmentos menores. Então o composto II volta ao seu estado inicial pelo ganho de elétrons do substrato (SELLAMI *et al.*, 2022).

9.2.4 Manganês peroxidases:

As manganês peroxidases são heme-proteínas que possuem em sua estrutura um íon de manganês (Mn^{2+}) (WENG; PENG; HAN, 2021). Esses tipos de enzima se mostram promissoras para utilização industrial por sua capacidade de converter matérias primas a base de lignina em produtos de alto valor agregado através da degradação da lignina (LIU *et al.*, 2023).

A degradação da lignina pelas manganês peroxidases incluem tanto passos de oxidação quanto de redução (WENG; PENG; HAN, 2021). O ciclo catalítico da manganês peroxidase se inicia com a ligação do peróxido de hidrogênio à enzima, formando um complexo ferro-peróxido. A clivagem da ligação O–O do peróxido requer uma transferência de dois elétrons do heme-porfirina resultando no intermediário instável Composto I da enzima. Este processo libera uma molécula de água. Um íon Mn^{2+} é oxidado a Mn^{3+} e doa um elétron à porfirina, formando o Composto II (KUMAR; CHANDRA, 2020)

A redução do Composto II gera outro Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} , retornando a enzima ao estado inicial e liberando uma segunda molécula de água. O Composto I é então reduzido a Composto II. Na ausência de substrato, o H_2O_2 pode reduzir o Composto I a Composto II. Adicionalmente, H_2O_2 extra pode transformar o Composto II em um intermediário instável, o Composto III (KUMAR; CHANDRA, 2020).

Identificar os microrganismos isolados na coleção pode facilitar o entendimento de como eles são capazes de desconstruir a lignina. Utilizando dados da literatura sobre o microrganismo identificado e sobre microrganismos próximos taxonomicamente, como aqueles do mesmo gênero, podemos nos basear em seus genomas sequenciados e nas enzimas relatadas que eles possuem. Dessa forma, é possível formular hipóteses sobre os possíveis produtos que esses microrganismos podem gerar.

9.3 Métodos de Identificação de Microrganismos:

Existem diferentes maneiras para se identificar microrganismos, baseando-se em diferentes métodos para essa identificação. Existem métodos fenotípicos, proteotípicos e genotípicos, sendo que para a identificação dos microrganismos é possível utilizar métodos individuais ou a união de diferentes métodos (FARRANCE, 2019).

9.3.1 Métodos Fenotípicos:

Os métodos fenotípicos empregam produtos de genes expressos, incluindo observações fisiológicas e bioquímicas, para diferenciar microrganismos. Esses sistemas envolvem análises tradicionais que examinam as características físicas e metabólicas dos microrganismos. Por exemplo, eles analisam a reação de coloração de Gram para identificar a estrutura da parede celular, avaliam a composição de ácidos graxos para determinar os tipos de lipídios presentes e observam a utilização de diferentes fontes de carbono para entender as vias metabólicas utilizadas pelos microrganismos (FARRANCE, 2019).

Um dos métodos fenotípicos mais utilizados é o crescimento do microrganismo na presença de um substrato específico, assim a capacidade do microrganismo de crescer na presença daquele substrato é avaliada e comparada com as informações existentes em bancos de dados sobre os microrganismos com capacidade de crescer naquele substrato. Assim se diminui o número de possibilidades e colocando o microrganismo para crescimento em outros substratos é possível afunilar a quantidade de possíveis microrganismos até se chegar a um alto nível taxonômico. Entretanto, esse tipo de identificação é laborioso e demanda muito tempo, pois nele é necessário que se espere o crescimento do microrganismo naquele substrato, o que pode levar de horas a dias (FRANCO-DUARTE *et al.*, 2019).

9.3.2 Métodos Proteotípicos:

Os métodos proteotípicos avaliam as características físicas das proteínas celulares utilizando a espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser assistida por matriz com detecção por tempo de voo (MALDI-TOF-MS) para identificar microrganismos. Esta tecnologia examina biomarcadores ou perfis proteicos específicos, permitindo uma identificação precisa com base nas assinaturas únicas das proteínas presentes nas células. O MALDI-TOF-MS é especialmente eficaz porque pode analisar rapidamente uma ampla variedade de proteínas, proporcionando uma visão detalhada do perfil proteico dos microrganismos (FARRANCE, 2019).

O MALDI-TOF-MS é uma técnica amplamente utilizado por ser considerado um método simples, rápido e confiável para se identificar as proteínas que compõem um microrganismo e utilizar o perfil de proteínas para se identificar o microrganismo. Nele a identificação se faz por meio de softwares que buscam em bancos de dados de espectros de perfis proteicos e peptídicos de outros microrganismos, tentando encontrar um que se encaixe com o espectro do microrganismo testado. Esse método permite a identificação dos microrganismos ao nível de espécie pela análise das proteínas totais presentes nas células analisadas (JANG; KIM, 2018).

Entretando, a utilização do MALDI-TOF possui algumas desvantagens. Ele é um método dependente de isolamento e crescimento do microrganismo, ou seja, microrganismos não cultiváveis não podem ser identificados. Uma outra limitação da técnica está ligada aos bancos de dados, pois muitas vezes os fabricantes utilizam diferentes bases de dados espectrais de referência, o que dificulta a comparação de dados de equipamentos diferentes. Sendo que com a descoberta de novos microrganismos os bancos de dados vão sendo atualizados, assim os bancos são incompletos por conta da falta de informações de microrganismos que ainda não foram adicionados aos bancos. Além disso, o equipamento possui um custo elevado o que muitas vezes o torna inacessível para muitos laboratórios (FERONE *et al.*, 2020).

9.3.3 Métodos Genotípicos:

Os métodos genotípicos utilizam características do DNA das células para identificação taxonômica. Essas análises incluem métodos simples, como avaliação do conteúdo de guanina e citosina, organização do genoma e padrões de fragmentos de DNA. Conforme aumenta a complexidade, incluem também técnicas como hibridização de DNA e análise filogenética baseada em sequências, permitindo uma discriminação mais precisa entre diferentes espécies microbianas com base em suas características genéticas (FARRANCE, 2019).

A biologia molecular tem permitido métodos para identificar microrganismos de maneira rápida e barata, especialmente aqueles difíceis de detectar por métodos tradicionais. Estes métodos podem confirmar a presença de microrganismos específicos e são fundamentais para pesquisa. Amplificação de produtos de PCR específicos, métodos baseados em PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA/16S DNA são os mais usados, sendo o sequenciamento considerado padrão-ouro na identificação microbiológica (BUSZEWSKI *et al.*, 2017).

10. Justificativa do capítulo 2:

Diante do que foi apresentado, há uma lacuna de conhecimento com relação ao estudo de microrganismos capazes de desconstruir lignina. Dessa forma, a identificação desses microrganismos pode auxiliar a descoberta de novas vias de degradação da lignina, facilitando a sua utilização industrial com o intuito de gerar produtos de alto valor.

Estabelecer a identificação do microrganismo estudado é de extrema importância para sua utilização. E para isso existem várias metodologias diferentes, entretanto a identificação através da análise do seu genoma pode trazer resultados mais específicos e mais informações sobre esse microrganismo. Pois assim se pode identificar outros microrganismos próximos ao trabalhado e buscar características do seu interesse que foram reportadas previamente na literatura sobre microrganismos geneticamente próximos ao estudado. Isso não significa que eles terão as mesmas capacidades uns dos outros, mas a probabilidade de eles compartilharem características semelhantes é maior quando comparados a microrganismos muito diferentes geneticamente.

Entretanto, para que esse conhecimento com relação aos microrganismos possa ser utilizado de forma satisfatória é necessária uma identificação de qualidade do microrganismo trabalhado. Dessa forma, pode se estudar as possíveis aplicabilidades desse microrganismo em diferentes bioprocessos de forma certa. Os estudos feitos sobre esse microrganismo podem preencher a lacuna de conhecimento sobre eles e facilitar o seu estudo por outros pesquisadores no mundo.

Assim este trabalho identifica, através do sequenciamento do gene 16S rDNA, as bactérias isoladas do Cerrado, capazes de desconstruir lignina. Juntamente com uma comparação da capacidade reportada em literatura que esses microrganismos ou microrganismos geneticamente próximos possuem na desconstrução de lignina.

11. Objetivos:

Objetivo geral:

- Isolar e identificar bactérias do bioma cerrado capazes de utilizar a lignina como substrato para produção de metabólitos com potencial econômico para aplicação industrial.

Objetivos específicos do capítulo:

- Extrair o DNA de todas as bactérias isoladas no presente estudo;
- Fazer PCRs do gene 16S rDNA DNA genômico extraído;
- Analisar o sequenciamento e identificar as bactérias através dele;
- Fazer arvores filogenéticas das bactérias identificadas comparando seus genes com os da literatura e avaliar sua proximidade evolutiva umas com as outras;

12. Material e Métodos:

12.1 Extrações de DNA genômico bacteriano

Para a extração do DNA das bactérias foi feito um inóculo do estoque em meio M9 + T.E. + lignina Kraft sólido. Os inóculos foram colocados em estufa a 37 °C por 7 dias. Depois disso foi feito um inóculo das bactérias crescidas nas placas em 10 mL de meio M9 + T.E. + Kraft líquido em tubo de tipo Falcon de 50 mL *overnight*. Os inóculos líquidos foram então centrifugados a 10.000 xg por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* com as bactérias foi utilizado para a extração de DNA.

Para a extração dos DNAs foi utilizado o método de fenol/clorofórmio (DE-SOUZA; BRIGIDO; MARANHÃO, 2016) modificado. Para isso, primeiramente as bactérias do estoque foram inoculadas em meio sólido M9 + T.E. + Kraft e incubadas a 37 °C até que houvesse crescimento visível. Então, um inóculo foi feito a partir das colônias do meio sólido em 10 mL de meio líquido M9 + T.E. + Kraft, em um tubo tipo Falcon de 50 mL. Esse inóculo foi então colocado a 37 °C e agitação de 200 RPM por 7 dias. Após isso, o Falcon foi centrifugado a 8.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* lavado com 400 µL de tampão STE (NaCl 10 mM, Tris/HCL 10 mM e EDTA 1 mM, pH final 8) por pelo menos 2 vezes (centrifugando a 8.000 xg por 10 minutos a cada lavagem).

Depois, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão TE (Tris/HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), foram então acrescentados 100 µL de fenol e o tubo foi agitado vigorosamente por 1 min. Então o tubo foi centrifugado a 13.000 xg por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo tubo estéril. Ao sobrenadante foi adicionado 40 µL de tampão TE e misturado com 100 µL de clorofórmio hidratado. Centrifugado a 13.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Esse passo foi repetido até não haver mais interface branca. Após isso, foi transferido 160 µL do sobrenadante para um novo tubo e acrescentado 40 µL de tampão TE e 5 µL de RNase (10 mg/mL). O tubo foi incubado a 37 °C por 10 minutos.

Após a incubação, 100 µL de clorofórmio foi adicionado e misturado ao tubo. A mistura foi centrifugada a 13.000 xg por 10 min. Então 120 µL do sobrenadante foi

transferido para um novo tubo. A partir desse ponto foi adicionada uma etapa de lavagem, pois com o protocolo original resquícios de fenol foram encontrados no DNA. A etapa de lavagem foi feita se adicionando 120 µL de isopropanol ao sobrenadante do passo anterior. Se adicionou então acetato de sódio (3 M) para uma concentração final de 0,3 M, ou seja 24 µL quando o volume for de 240 µL. O tubo foi então colocado no freezer a – 20 °C por pelo menos 30 minutos, essa etapa pode ter seu tempo modificado deixando no freezer por mais tempo ou *overnight*, isso aumenta o rendimento de DNA.

Então o tubo foi centrifugado a 14.000 xg por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então removido e a ele foram adicionados 200 µL de etanol 70 % gelado. O tubo foi então agitado devagar e centrifugado a 14.000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então removido e o restante do etanol residual evaporado, em bancada ou utilizando o *SpeedVac*. Depois de o etanol ter evaporado, o pellet foi ressuscitado em água MilliQ estéril e o tubo incubado *overnight* em temperatura ambiente para o pellet se dissolver.

Depois de extraído, a quantidade de DNA das amostras foi avaliada utilizando Nanodrop, usando 1 µL de água ultrapura como o branco e 1 µL de amostra para a quantificação de DNA. A qualidade das amostras foi avaliada em gel de agarose a 1 %, onde foi adicionado 1 µL da amostra de DNA. As amostras com DNA puro foram utilizadas para uma PCR e as amostras com DNA e impurezas visíveis no gel foram purificadas com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System e então foram utilizadas nas PCRs.

12.2 Identificação taxonômica das bactérias

Para a identificação taxonômica das bactérias, o DNA genômico extraído foi utilizado em diversas PCRs com os primers PO(27F) (5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') (FERREIRA *et al.*, 2008) e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (BIBI *et al.*, 2012), para a amplificação da região codificadora do gene 16S rRNA. Para a realização das PCRs foi utilizado o Kit KAPA Taq HotStart (Sigma-Aldrich), onde foi utilizado para cada reação 37,3 µL de H₂O DNase free, 5 µL de Tampão de

enzima, 1,5 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTP, 1 µL de primer *forward*, 1 µL de primer *reverse*, 0,2 µL de Taq polimerase e 1 µL de DNA genômico. O programa da PCR foi 95 °C por 3 minutos inicial, depois foram feitos 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos, 72 °C por 1,30 segundos, ao fim dos 35 ciclos um ciclo final de 72 °C por 10 minutos e 10 °C até a retirada da amostra. As PCRs que funcionaram foram enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger na empresa Eurofins (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

As amostras sequenciadas foram analisadas no programa *BioEdit* versão 5.0.9 onde todas as partes do sequenciamento que não se mostraram satisfatórias foram retiradas da sequência e as fitas *forward* e *reverse* foram utilizadas para gerar *contigs* que foram usadas para identificar as bactérias.

Para a identificação dos microrganismos, para isso se utilizou 2 ferramentas, o programa *Blast Nucleotides* (BLASTN) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) e o programa *EzBioCloud* (YOON *et al.*, 2017) (<https://www.ezbiocloud.net>). O BLASTN é um programa que pesquisa sequências semelhantes as inseridas nele em bancos de dados de microrganismos e analisa as sequencias mais próximas encontradas nos bancos de dados, dando os valores de similaridade da sua sequência comparada com as sequencias dos bancos de dados. O programa EzBioCloud é uma base de dados curada para as regiões do gene 16S, onde se analisa uma sequência com base em sua similaridade as sequencias presentes nos bancos de dados do programa.

13. Resultados:

13.1 Extrações de DNA

Das 81 bactérias isoladas, 60 tiveram o seu DNA extraído com sucesso até agora. Na Figura 12 é possível visualizar a qualidade da extração do DNA de algumas dessas bactérias em um gel de eletroforese a 1 % agarose (m/v). Nela é possível visualizar o DNA em um tamanho de banda acima do marcador, o que indica que o DNA ali presente é grande, característica esperada de DNA genômico.

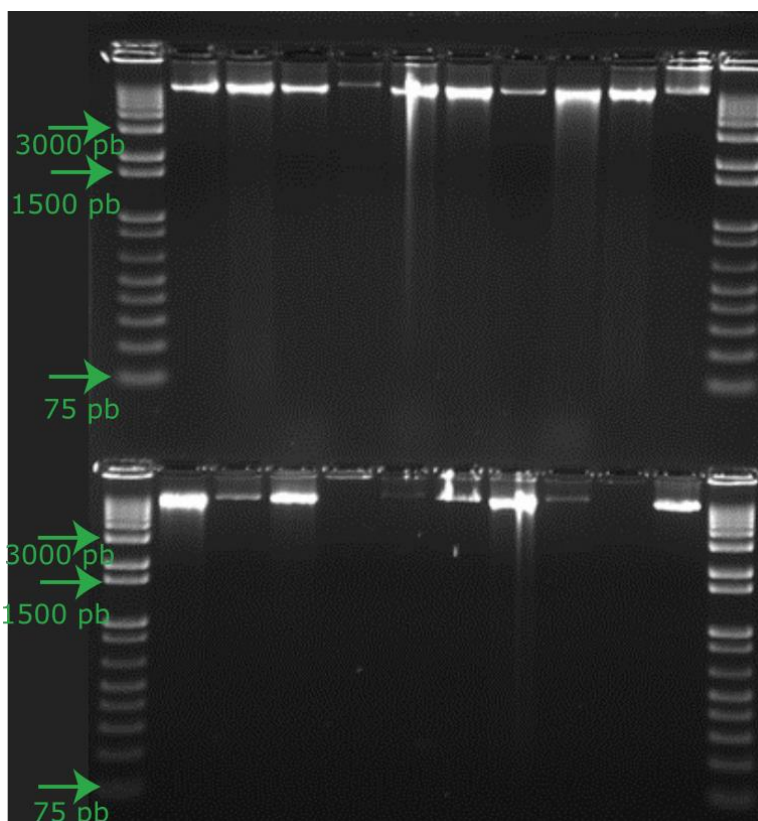


Figura 12 – Análise em gel de Agarose 1 % da preparação de DNA genômico das bactérias isoladas. A imagem apresenta em um gel de agarose a 1 % o DNA genômico das bactérias. Ladder utilizado foi o Thermo Fischer GeneRuller 1kb Plus Ladder sendo ele colocado nas extremidades do gel. As amostras no centro do gel são as amostras do DNA genômico extraído das bactérias.

As amostras em que o DNA se apresentava no gel com qualidade, ou seja, a visualização do DNA genômico das bactérias no gel foi possível, formando uma banda única, foram utilizadas para fazer as PCRs. As amostras em que o DNA não foi visível

em gel foram extraídos novamente até que se conseguisse uma extração de DNA com qualidade. No fim todas as 81 bactérias tiveram seu DNA extraído com sucesso e foram utilizadas em PCRs. Para isso foi feita a quantificação de todas as amostras de DNA em nanodrop, sendo que as amostras que tinham uma concentração alta de DNA foram diluídas para 100 µg/µL para se padronizar a concentração utilizada nas PCRs.

13.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de DNA extraídas e quantificadas foram utilizadas para se fazer uma PCR para amplificar o gene codificador do 16S rRNA para identificação taxonômica molecular. Os produtos de PCR foram então avaliados em gel de eletroforese contendo agarose 1 % (m/v), corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta para se verificar o sucesso ou insucesso da PCR. Os primers utilizados foram o PO(27F) e o 1492R, como citado anteriormente. Esses primers devem amplificar um fragmento com 1.465 pb.

Um exemplo de gel de eletroforese se encontra na Figura 13, onde se vê a presença de produtos de PCR onde ocorreu a amplificação do gene e outros onde não houve amplificação, ao menos visível em gel. Nele se vê a fração de DNA desejada da amplificação, próximo de 1.500 pb que é o tamanho esperado da banda amplificada da PCR. Isso demonstra que provavelmente o gene de interesse foi amplificado com sucesso ou um gene com o tamanho similar. No gel também é visível a presença de outras frações de DNA em alturas diferentes, essas frações provavelmente pertencem a fragmentos de DNA erroneamente amplificados. Nesse caso a fração do nosso gene ~~era~~ retirada do gel e purificada com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System seguindo orientações do fabricante (Promega) e outras PCRs foram realizadas até se obter a banda de DNA de interesse pura.

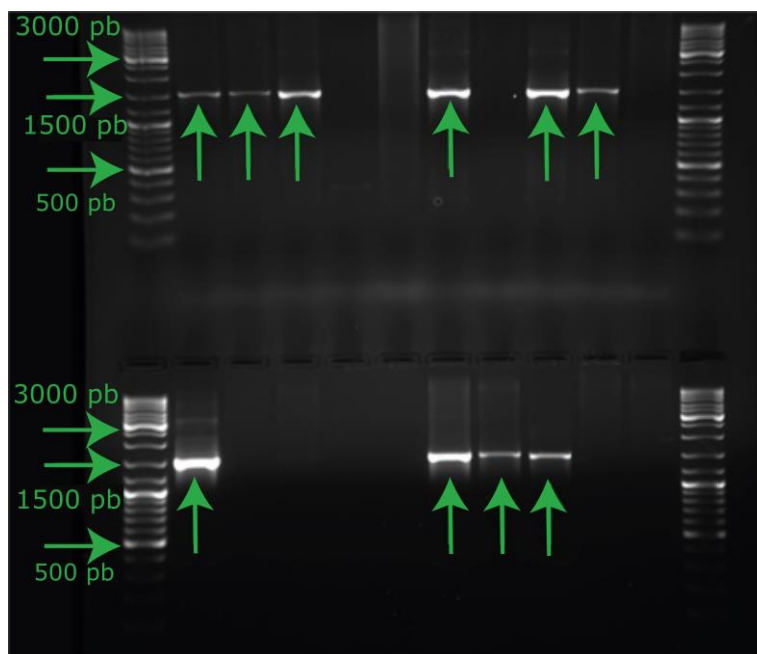


Figura 13 – Análise eletroforética da amplificação de produtos de PCR das bactérias em gel de agarose a 1 %. A imagem apresenta em um gel de agarose a 1 % com o Ladder GeneRuller DNA Ladder Mix 1 kb, onde é possível visualizar a presença de DNA na marcação próxima de 1.500 pb. Essa é a altura esperada para o gene codificador do 16S rRNA amplificado pela PCR, pois ele tem o tamanho de 1.465 pb, consistente com a sua amplificação.

As PCRs que tiveram seus produtos visualizados no gel com qualidade, ou seja, sem arraste ou amplificação de outras bandas inespecíficas foram purificadas com kit de purificação de PCR Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Um total de 46 amostras de DNA foram amplificadas com sucesso na PCR. Em seguida, todos os produtos de PCR foram quantificados em nanodrop para se adequar a concentração necessária para o envio para sequenciamento. Um total de 46 amostras tiveram a região 16S rDNA amplificada com sucesso e foram enviadas para sequenciamento. Os DNAs das bactérias que o 16S rDNA não foi amplificado foram utilizados em novas PCRs na tentativa de amplificação e aqueles em que a amplificação não ocorreu, foram feitas novas extrações de DNA genômico bacteriano para se utilizar em novas PCRs.

13.3 Sequenciamentos da região 16S rDNA

A qualidade dos sequenciamentos foi avaliada se baseando inicialmente nos eletroferogramas, onde se foi visualizada a sobreposição de picos e a altura dos picos. Esses picos representam as bases nitrogenadas do DNA sequenciado, quando mais de um pico se sobrepõe no mesmo lugar, não se pode afirmar qual das duas bases é a correta para aquele ponto. Por isso, locais onde haviam picos sobrepostos no eletroferograma foram descartados da análise. Com os sequenciamentos de qualidade, esses foram então editados utilizando o aplicativo *BioEdit* versão 5.0.9. Foram excluídas as partes do sequenciamento onde não havia qualidade, ou seja, onde os picos se sobrepunham e não era possível a diferenciação de nucleotídeo. Depois ele foi utilizado para a inversão das fitas consenso e para a geração da fita complementar (*contig*) com a união das duas fitas de DNA. Os contigs foram então utilizados para identificação taxonômica das bactérias. Das 46 bactérias enviadas para o sequenciamento, 35 foram sequenciadas com sucesso e identificadas.

13.4 Identificação dos Microrganismos

Os contigs da região 16S rDNA foram analisados nos programas citados para identificação de similaridade em comparação às sequências presentes em bancos de dados. Um total de 35 bactérias foram identificadas (Tabela 1). Destas 35 bactérias, 29 tiveram identificação a nível de espécie e 6 a nível de gênero. Isso ocorre por diversos fatores, podendo estar relacionada qualidade do sequenciamento, como o tamanho do gene que foi sequenciado e a visualização dos picos do eletroferograma de forma que os picos não se sobrepõem. Mas muito provavelmente está relacionado com a falta de dados mais específicos nos bancos de dados, assim as identificações ficam com os microrganismos mais próximos nos bancos de dados, pela falta de dados de identificação de um microrganismo mais próximo ao estudado. Para as identificações foram utilizados 2 programas, o BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

Tabela 2 – Identidade taxonômica de bactérias provenientes de solo de Cerrado capazes de utilizar lignina Kraft como fonte de carbono.

Nome	Blast:	Query Cover	Per. Ident.
M9 + TE + Kraft + Ciclo 1	<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12	98 %	100 %
M9 + TE + Kraft + Ciclo 2	<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain WXP-4	99 %	99 %
M9 + TE + Kraft + Ciclo 3	<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12	99 %	100 %
M9_TE_Kraft_Ciclo_5	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	100 %	100 %
M9_TE_Kraft_Ciclo_7	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	100 %	100 %
M9_TE_Kraft_Ciclo_11	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	100 %	100 %
M9_TE_Kraft_Ciclo_12	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	100 %	100 %
M9 + TE + Kraft + STREP 4	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2	100 %	100 %
M9 + TE + Kraft + STREP 10	<i>Brucella intermedia</i> strain CCI5	99 %	98 %
M9 + TE + Kraft + STREP 11	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786	98 %	98 %
M9 + TE + Kraft + CARB 3	<i>Pseudomonas</i> sp. JDC-14	100 %	100 %
M9_TE_Kraft_CARB_5	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	100 %	100 %
M9 + TE + Kraft + CARB 8	<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain A13	100 %	100 %
M9 + TE + Kraft + CARB 9	<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y	100 %	100 %
M9_TE_Kraft_KAN_1	<i>Brucella intermedia</i>	100 %	99 %
M9_TE_Kraft_KAN_2	<i>Brucella intermedia</i>	99 %	98 %
M9 + TE + Kraft + KAN 4	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2	100 %	100 %
M9 + TE + Kraft + KAN 5	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2	100 %	100 %
M9 + TE + Kraft + KAN 6	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2	100 %	100 %
M9_TE_Kraft_KAN_8	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> strain ED357	100 %	98 %
2 - M9 + TE + Kraft + CICLO 1	<i>Brucella melitensis</i> strain IMHT4	100 %	98 %
2_M9_TE_Kraft_CICLO_3	<i>Brucella intermedia</i>	100 %	97 %
2_M9_TE_Kraft_CICLO_4	<i>Rhodococcus</i> sp.	100 %	100 %
2_M9_TE_Kraft_CICLO_5	<i>Brucella intermedia</i>	99 %	94 %
2_M9_TE_Kraft_CICLO_7	<i>Rhodococcus</i> sp.	100 %	100 %

2 - M9 + TE + Kraft + CICLO 13	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27	99 %	100 %
2_M9_TE_Kraft_KAN_1	<i>Brucella intermedia</i>	99 %	96 %
2_M9_TE_Kraft_KAN_4	<i>Cupriavidus gilardii</i>	100 %	97 %
2 - M9 + TE + Kraft + KAN 5	<i>Brucella intermedia</i> strain CCI5	100 %	100 %
2 - M9 + TE + Kraft + KAN 6	<i>Brucella anthropi</i> strain DP5	100 %	100 %
2_M9_TE_Kraft_KAN_8	<i>Brucella anthropi</i>	100 %	97 %
2_M9_TE_Kraft_CARB_1	<i>Brucella intermedia</i>	100 %	99 %
2_M9_TE_Kraft_CARB_4	<i>Azospirillum</i> sp.	100 %	98 %
2_M9_TE_Kraft_STREP_4	<i>Mycolicibacterium porcinum</i> strain Y17	100 %	100 %
M9_TE_Kraft_STREP_12	<i>Brucella intermedia</i>	100 %	100 %

A tabela apresenta os dados das bactérias identificadas, com seus respectivos *query covers* que indica a porcentagem de sobreposição que o gene da bactéria isolada do Cerrado tem com o gene presente nos bancos de dados. Nela também se encontra o Porcentual de Identidade, que diz o quão idêntico é o gene da bactéria do Cerrado com o gene sobreposto da bactéria dos bancos de dados. Os nomes das cepas são os nomes que elas receberam na coleção de acordo com o seu cultivo. Nomes que começam em M9 são os nomes das bactérias que são provenientes da primeira cultura de enriquecimento e as que começam com o número 2 são as provenientes da segunda cultura de enriquecimento. M9_TE_Kraft indicam o meio em que as bactérias cresceram, sendo ele o meio mínimo M9 + T.E. + lignina Kraft, como mencionado na metodologia. Após isso, vem o nome do antibiótico em qual a cepa foi capaz de crescer e foi isolada, sendo CICLO: ciclohexamida apenas; STREP: estreptomicina com ciclohexamida; CARB: carbenicilina com ciclohexamida e KAN: canamicina com ciclohexamida. Após o antibiótico, se encontra o número dado a bactéria na coleção.

Conforme apresentado na Figura 14, os isolados bacterianos foram identificados como de 11 gêneros bacterianos diferentes: *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Brucella*, *Citricoccus*, *Cupriavidus*, *Microbacterium*, *Mycolicibacterium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Stenotrophomonas*. Destes, 1 bactéria do gênero *Achromobacter*, 1 do *Azospirillum*, 16 do *Brucella*, 5 do *Citricoccus*, 1 do *Cupriavidus*, 1 do *Microbacterium*, 1 do *Mycolicibacterium*, 1 do *Ochrobactrum*, 5 do *Pseudomonas*, 1 do *Rhodococcus* e 1 do *Stenotrophomonas*.

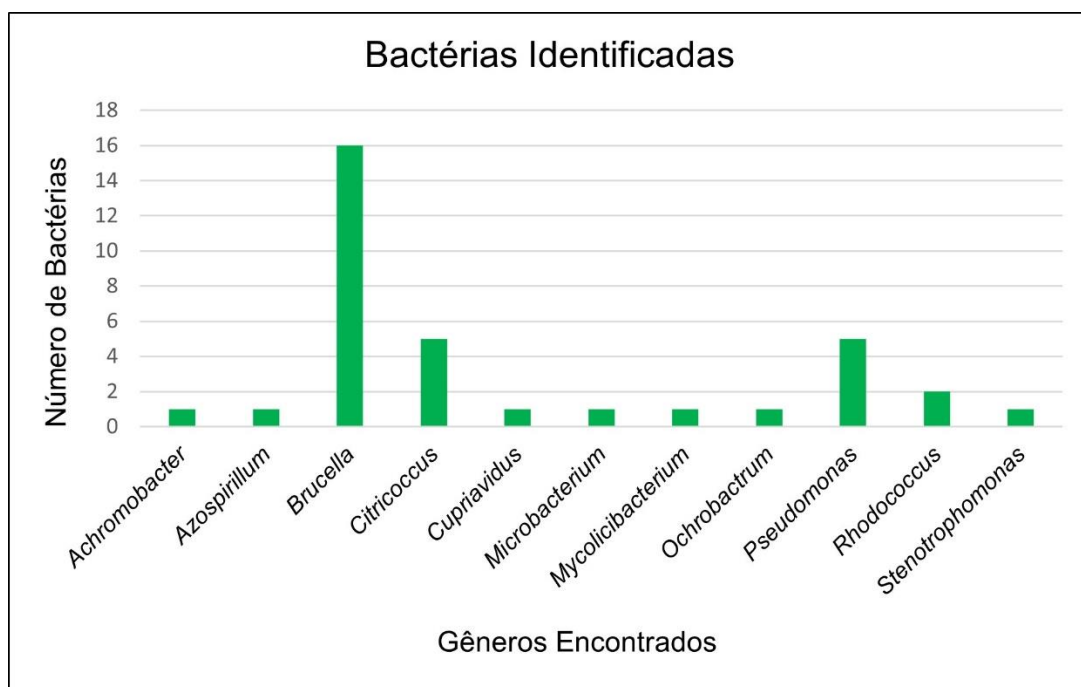


Figura 14 – Gêneros bacterianos encontrados. Gêneros das bactérias identificadas, assim como o número de bactérias presente em cada um dos gêneros. As bactérias foram isoladas no meio M9 + T.E. + lignina Kraft a 1 %.

13.5 Árvore Filogenética

Os *contigs* das bactérias foram utilizados para construção de árvores filogenéticas. Para isso, foi utilizado o programa MEGA versão 11.0.13 (KUMAR *et al.*,

2018). A árvore filogenética obtida se encontra na Figura 15. Para isso as sequências foram alinhadas por *Muscle Alignment* em UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic mean*) com alinhamento de sequência de DNA não codificadora de proteínas. Esse alinhamento foi utilizado para obter a árvore filogenética, sendo essa uma *Neighbor joining tree* com um *Bootstrap* de 1.000 vezes.

Na árvore filogenética (Figura 15), o DNA sequenciado das 35 bactérias foi comparado com o DNA de bactérias da literatura dos mesmos gêneros que as bactérias identificadas. Ao todo 56 bactérias da literatura foram comparadas com as bactérias identificadas da coleção lignina. Os gêneros *Brucella* e *Ochrobactrum* ficaram no mesmo clado. Logo abaixo as bactérias do gênero *Azospirillum*, depois do gênero *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Cupriavidus*, *Rhodococcus*, *Mycolicibacterium*, *Microbacterium*, *Citrococcus* e por último o *outgroup*, a arqueia *Pyrococcus furiosus*.

Figura 15 – Árvore Filogenética. A imagem mostra a árvore filogenética das bactérias de solo de Cerrado capazes de utilizar lignina como fonte de carbono identificadas. O *outgroup* utilizado foi a *Pyrococcus furiosus*. As bactérias identificadas da coleção apresentam um círculo preto antes de seu nome. As bactérias sem marcação são bactérias da literatura. A escala de distância da árvore representa o número de diferenças de nucleotídeos entre as sequências de DNA. Os números antes dos galhos das árvores representam os valores de *Bootstrap*. As diferentes cores dos clados representam os diferentes gêneros encontrados.

14. Discussão:

O DNA de todas as 81 bactérias da coleção de solo de Cerrado capazes de utilizar lignina como fonte de carbono foi extraído com sucesso, mostrando que o método escolhido foi eficiente, mesmo com bactérias diferentes, como gram-positivas e gram-negativas. Além disso, na identificação taxonômica foi possível chegar a nível de espécie para a maioria das bactérias, mostrando que o método de identificação por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA possui alta especificidade para comparação com bactérias já descritas na literatura.

Esse resultado mostra também que as bactérias com a capacidade de utilização de lignina não se restringem a um gênero específico, mas que é uma característica que pode ser encontrada em diferentes classes, ordens, famílias e gêneros bacterianos. Ressalta-se que muitas das bactérias reportadas na literatura como tendo capacidade de degradar lignina fazem parte do grupo de bactérias gram-negativas e as bactérias identificadas neste trabalho são tanto gram-negativas como gram-positivas, como mostrado na Tabela 3. Assim, através desse trabalho aumentou-se o conhecimento atual sobre bactérias desconstrutoras de lignina.

Tabela 3: Bactérias identificadas nesse estudo e sua classificação pela coloração de gram.

Bactérias Identificadas	Gram
<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786	Gram-negativa
<i>Azospirillum</i> sp.	Gram-negativa
<i>Brucella anthropi</i>	Gram-negativa
<i>Brucella anthropi</i> strain DP5	Gram-negativa
<i>Brucella intermedia</i> strain CCI5	Gram-negativa
<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2	Gram-negativa
<i>Brucella melitensis</i> strain IMHT4	Gram-negativa
<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	Gram-positiva
<i>Cupriavidus gilardii</i>	Gram-negativa
<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> strain ED357	Gram-positiva
<i>Mycolicibacterium porcinum</i> strain Y17	Gram-positiva
<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27	Gram-negativa
<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12	Gram-negativa
<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain A13	Gram-negativa
<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain WXP-4	Gram-negativa
<i>Pseudomonas</i> sp. JDC-14	Gram-negativa
<i>Rhodococcus</i> sp.	Gram-positiva

Na literatura vários gêneros de bactérias gram-negativas foram reportados como tendo capacidade de desconstruir moléculas relacionadas a lignina, como mostrado na Tabela 4. Onde é possível ver que o número de estudos com bactérias gram-negativas é maior do que o com bactérias gram-positivas.

Tabela 4: Bactérias da literatura e sua classificação pela coloração de gram.

Gênero:	Gram:	Referências:
<i>Achromobacter</i> sp.	Gram-negativa	(BENJAMIN <i>et al.</i> , 2016)
<i>Cupriavidus</i> sp.	Gram-negativa	(HUGHES; BAYLY, 1983; PÉREZ-PANTOJA <i>et al.</i> , 2008; SATO <i>et al.</i> , 2006; SHI <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ochrobactrum</i> sp.	Gram-negativa	(HIROSE <i>et al.</i> , 2013; KUHNIGK; KÖNIG, 1997; TAYLOR <i>et al.</i> , 2012; TSEGAYE; BALOMAJUMDER; ROY, 2018; XU <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gram-negativa	(CHAPMAN; RIBBONS, 1976; CHOWDHURY <i>et al.</i> , 2004; CRONIN <i>et al.</i> , 1999; HIROSE <i>et al.</i> , 2013, 2018; IWABUCHI <i>et al.</i> , 2015; JIMÉNEZ <i>et al.</i> , 2002; JURKOVÁ; WURST, 1993; KUHNIGK; KÖNIG, 1997; MAHIUDDIN; FAKHRUDDIN; ABDULLAH-AL-MAHIN, 2012; MURRAY <i>et al.</i> , 1972; NARBAD; GASSON, 1998; NIKODEM <i>et al.</i> , 2003; OVERHAGE; PRIEFERT; STEINBÜCHEL, 1999; PERESTELO <i>et al.</i> , 1996; RAVI <i>et al.</i> , 2018; SALVACHÚA <i>et al.</i> , 2015; SHETTIGAR <i>et al.</i> , 2018; TIAN; POURCHER; PEU, 2016; XU <i>et al.</i> , 2018)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Gram-negativa	(TIAN; POURCHER; PEU, 2016)
<i>Acinetobacter</i> sp.	Gram-negativa	(DELNERI <i>et al.</i> , 1995; FISCHER; BLEICHRODT; GERISCHER, 2008; GONZALEZ <i>et al.</i> , 1993; KUHNIGK; KÖNIG, 1997; MAZZOLI <i>et al.</i> , 2007; VAN DEXTER; BOOPATHY, 2019; VASUDEVAN; MAHADEVAN, 1992)
<i>Burkholderia</i> sp.	Gram-negativa	(HARAZONO <i>et al.</i> , 2003; KATO; KOZAKI; SAKURANAGA, 1998; KUHNIGK; KÖNIG, 1997; WOO <i>et al.</i> ,

		2014; XUE; YU; SONG, 2009; YANG <i>et al.</i> , 2017)
<i>Enterobacter sp.</i>	Gram-negativa	(DEANGELIS <i>et al.</i> , 2011, 2013; DESCHAMPS; MAHOUDEAU; LEBEAULT, 1980; GRBIC-GALIC, 1985; MANTER; HUNTER; VIVANCO, 2011; YOSHIDA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Microbacterium sp.</i>	Gram-positiva	(SONG, 2009; TAYLOR <i>et al.</i> , 2012)
<i>Rhodococcus sp.</i>	Gram-positiva	(AHMAD <i>et al.</i> , 2010; CHONG <i>et al.</i> , 2018; CHUNG <i>et al.</i> , 1994; HE <i>et al.</i> , 2017; HENSON <i>et al.</i> , 2018; KARLSON <i>et al.</i> , 1993; KOSA; RAGAUSKAS, 2012, 2013; SONG, 2009; TAYLOR <i>et al.</i> , 2012)
<i>Streptomyces sp.</i>	Gram-positiva	(ANTAI; CRAWFORD, 1981; AOYAMA <i>et al.</i> , 2014; CHOW; POPE; DAVIES, 1999; DAVIS; SELLO, 2010; GIROUX <i>et al.</i> , 1988; ISHIYAMA; VUJAKLIJA; DAVIES, 2004; KUHNIGK; KÖNIG, 1997; WATANABE; SHINZATO; FUKATSU, 2003; YANG <i>et al.</i> , 2012; ZENG <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bacillus sp.</i>	Gram-positiva	(CHANDRA <i>et al.</i> , 2007; HUANG <i>et al.</i> , 2013; KUHNIGK; KÖNIG, 1997; PERESTELO <i>et al.</i> , 1989; ZHU <i>et al.</i> , 2017)

Na árvore filogenética (Figura 19) é possível ver que os gêneros ficaram separados por seus clados, mostrando que as espécies dentro daquele gênero são evolutivamente próximas. Como esperado, os gêneros *Brucella sp.* e *Ochrobactrum sp.* se encontram no mesmo clado, o que indica semelhança genética entre os mesmos. Isso pode ser explicado, pois há alguns anos as bactérias do gênero *Ochrobactrum sp.* foram incluídas as bactérias do gênero *Brucella sp.* por conta da sua similaridade genética. Entretanto, atualmente existem vários taxonomistas que são contra a união dos dois gêneros, por conta das suas diferenças de patogenicidade e metabolismo (MORENO *et al.*, 2023).

A seguir será apresentada uma revisão de literatura de cada um dos gêneros de bactérias identificados, assim como de espécies específicas que possuem a capacidade relatada de desconstruir compostos relacionados à lignina.

14.1 Revisão de literatura sobre as bactérias da coleção capazes de utilizar lignina

***Achromobacter* sp.:**

O gênero de bactérias *Achromobacter* é um grupo de bactérias Gram-negativas não fermentadoras, patógenos oportunistas de humanos e resistentes a grande variedade de antibióticos (ISLER *et al.*, 2020). Esse gênero é conhecido pela sua capacidade de fixação de nitrogênio, tanto aeróbica quanto anaerobicamente, (PROCTOR; WILSON, 1959), assim como pela sua capacidade de biodegradar o antibiótico sulfametoxazol, que se tornou um poluente emergente de águas residuais (LIANG; HU, 2019).

***Achromobacter denitrificans*:**

Bactéria capaz de realizar biodegradação de antibióticos da classe das sulfonamidas, molécula que contém um anel aromático em sua estrutura molecular (REIS *et al.*, 2014). Esta bactéria também é capaz de fazer a biorremediação de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) plastificante muito usado na indústria, que também possui um anel aromático. Ela pode utilizar o DEHP como sua fonte única de carbono em meio basal de sais (PRADEEP *et al.*, 2015). Essa bactéria possui a capacidade de utilizar fontes de carbono de moléculas com similaridades estruturais à lignina, como por exemplo o DEHP, o ácido ftálico e o ácido protocatecuico, moléculas que possuem em sua estrutura química anéis aromáticos semelhantes aos encontrados na lignina (BENJAMIN *et al.*, 2016).

O gênero *Achromobacter* possui poucos estudos o relacionando à lignina. Possui uma via já elucidada de degradação de lignina elucidada, a via de fissão do

beta-cetoadipato. Essa via é a responsável pela clivagem do ácido protocatecuico, um composto fenólico derivado da lignina (BENJAMIN *et al.*, 2016), porém ainda há muito espaço para descobertas. Ainda há vias teóricas que não foram testadas e ainda há a possibilidade de novas vias para a degradação da lignina. Sendo que nenhuma bactéria desse gênero já foi documentada com a capacidade de utilizar lignina Kraft como sua fonte de carbono.

Stenotrophomonas sp.:

Há estudos que mostram a capacidade de bactérias do gênero *Stenotrophomonas* de utilizar moléculas encontradas na lignina, como 4-hidroxibenzaldeído, a vanilina e o siringaldeído como única fonte de carbono. Ela consegue produzir ácidos fenólicos a partir do 4-hidroxibenzaldeído e da vanilina com apenas 24 horas de incubação e do siringaldeído em 7 dias de incubação. Isso demonstra a capacidade desse gênero de utilizar diferentes compostos fenólicos como fonte de carbono (KAMARDAN *et al.*, 2022). E o estudo de OLAJUJYIGBE; FATOKUN e OYELERE, 2018 onde a bactéria *Stenotrophomonas* sp. CFB-09 foi capaz de crescer em diferentes concentrações de lignina Kraft que iam de 0,1 a 1,1 g/L. Entretanto, a quantidade de artigos publicados relacionando esse gênero a lignina ainda é baixo.

Ochrobactrum sp.:

Grupo de bactérias Gram-negativas relacionadas com o gênero *Brucella* (RYAN; TONY PEMBROKE, 2020). Esse gênero já foi descrito como capaz de realizar a biodegradação do inseticida malation (VERMA; SINGH; CHATTERJEE, 2021) e do composto aromático heterocíclico recalcitrante quinolina (ZHAO *et al.*, 2022). Além disso, já foram encontradas bactérias desse gênero capazes de utilizar ácido vinílico e vanilina, compostos relacionados à molécula de lignina. Entretanto os produtos gerados não foram identificados (HIROSE *et al.*, 2013).

Além disso, algumas espécies de *Ochrobactrum* possuem a capacidade de utilizar fontes de carbono relacionadas à lignina. Por exemplo, a *Ochrobactrum*

pseudogrignonense é capaz de utilizar m-cresol, ácido vanílico e álcool veratrílico. O *Ochrobactrum rhizosphaerae* é capaz de utilizar bifenilo e ácido vanílico (TAYLOR *et al.*, 2012). Já a espécie *Ochrobactrum tritici* é capaz de utilizar lignina Kraft como fonte de carbono (XU *et al.*, 2018). Esses dados mostram a capacidade que esse gênero possui na desconstrução de lignina. A Tabela 3 mostra um resumo da literatura de bactérias desse gênero que foram reportadas possuindo a capacidade de degradação de compostos relacionados a lignina.

Tabela 3 - Bactérias do gênero *Ochrobactrum* relatadas na literatura com capacidade de utilizar compostos relacionados à lignina.

Espécie	Substrato utilizado:	Produto:	Referências:
<i>Ochrobactrum</i> sp.	Vanilina e ácido vanílico;	Não estudado	(HIROSE <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ochrobactrum anthropi</i> KD16	Anisaldeído; anisoína; benzilvanillina; 2,2'-dihidroxibifenil;	Não estudado	(KUHNIGK; KÖNIG, 1997)
<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	m-cresol; ácido vanílico; álcool veratrílico.	Não estudado	(TAYLOR <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ochrobactrum oryzae</i> BMP03	Lignina alcalina;	Não estudado	(TSEGAYE; BALOMAJUMDER; ROY, 2018)
<i>Ochrobactrum tritici</i> NX-1	Lignina Kraft;	Não estudado	(XU <i>et al.</i> , 2018)

***Brucella* sp.:**

Grupo de bactérias Gram-negativas, intracelulares facultativas, sendo *alpha-proteobactérias*. Existem 12 espécies de bactérias nesse gênero, cada uma tendo preferência na infecção de determinados hospedeiros, porém não se limitando a eles. São elas *B. melitensis* (cabras e ovelhas), *B. abortus* (gado), *B. suis* (porcos), *B. ovis* (ovelhas), *B. canis* (cachorros), *B. neotomae* (ratos da floresta), *B. ceti* (cetáceos), *B. pinnipedialis* (pinípedes), *B. microti* (ratazanas), *B. papionis* (babuínos) e *B. vulpis* (raposas). A infecção em humanos pode ser causada por *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* (RAJENDHRAN, 2021).

Algumas espécies do gênero *Brucella* possuem a presença de genes das vias do beta-cetoadipato e do homoproteocatecuato. Essas duas vias são muito encontradas em microrganismos de solo e estão relacionadas a via de degradação de compostos aromáticos de plantas, assim como a degradação de produtos da lignina. A presença desses genes indica a sua capacidade de utilização de lignina, porém não significa que a bactéria possui essa capacidade, pois diversas espécies de *Brucella* não possuem esses genes (PAULSEN *et al.*, 2002).

A presença de bactérias do gênero *Brucella* na coleção foi algo inesperado, pois esse gênero bacteriano possui pouquíssimos estudos relacionando-o a lignina. Dessa forma, a presença de novos produtos pode ser algo plausível, já que há uma lacuna de conhecimento sobre esses microrganismos utilizando compostos aromáticos. Assim grande parte dos resultados adquiridos com essas bactérias podem ser inéditos. Entretanto, a espécie *Brucella melitensis* é uma espécie patogênica para humanos, por isso ela não foi utilizada para os testes, tendo em vista a segurança do grupo de pesquisa.

Pseudomonas sp.

O gênero *Pseudomonas* é formado por bactérias gram-negativas, sendo considerado um gênero que atualmente possui 144 espécies diferentes (GOMILA *et al.*, 2015). Dentro desse conjunto de espécies, é possível encontrar inclusive bactérias que utilizam fenol como fonte de carbono como a *Pseudomonas fluorescens* PU1 (MAHIUDDIN; FAKHRUDDIN; ABDULLAH-AL-MAHIN, 2012). Esse gênero possui diversas espécies relacionadas à lignina e a sua degradação.

Pseudomonas citronellolis

A espécie *P. citronellolis* foi descrita como capaz de degradar policloreto de vinila (PVC) (GIACOMUCCI *et al.*, 2019). Ela possui também a capacidade de utilizar moléculas relacionadas à lignina como o ácido gálico e ácido tânico (CHOWDHURY *et al.*, 2004). Essa espécie também já foi descrita como capaz de utilizar 2,2'-bifenol,

ácido 4-hidroxibenzoico, benzaldeído, benzilvanilina e vanilina (KUHNIK; KÖNIG, 1997).

Encontrar bactérias do gênero *Pseudomonas* era esperado, pois elas são bem conhecidas com relação à utilização de lignina como mostrado na Tabela 4. Isso corrobora os resultados obtidos nesse trabalho, pois mostra que bactérias conhecidas por utilizar lignina também foram identificadas na cultura de enriquecimento. Isso é interessante, pois por ser bastante estudada, a literatura possui muitas informações sobre as vias metabólicas que elas utilizam na despolimerização da lignina e dos produtos gerados a partir dela.

Os dados apresentados sobre cada uma das bactérias mostram que todas elas possuem a capacidade de utilizar compostos relacionados à lignina. Esse resultado suporta a ideia de que a cultura de enriquecimento teve êxito, sendo capaz de selecionar microrganismos capazes de degradar lignina como fonte de carbono.

Tabela 4 - Bactérias do gênero *Pseudomonas* relatadas na literatura com capacidade de utilizar compostos relacionados à lignina.

Espécie	Substrato utilizado:	Referências:
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Kh4D3)	Anisaldeído, anisoína, azure B, benzaldeído, benzilvanilina, 2,2'-di-hidroxibifenil, vanilina, ácido 4-hidroxibenzoico.	(KUHNIK; KÖNIG, 1997)
<i>Pseudomonas arvilla</i> mt- 2	Benzoato, <i>m</i> -toluato e <i>p</i> -toluato	(MURRAY <i>et al.</i> , 1972)
<i>Pseudomonas cepacia</i> (KF12)	Anisaldeído, anisoína, azure B, benzaldeído, benzilvanilina, 2,2'-di-hidroxibifenil, vanilina, ácido 4-hidroxibenzoico.	(KUHNIK; KÖNIG, 1997)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PT02	Azure B, Azul de metileno, remazol azul brilhante R, siringaldeído, ácido siríngico, vanilina, ácido vanílico, álcool vanílico, guaiacol, álcool veratrílico, bifenil, 4-metil-2,6-dimetoxifenol	(TIAN; POURCHER; PEU, 2016)
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Ácido tânico e ácido gálico	(CHOWDHURY <i>et al.</i> , 2004)
<i>Pseudomonas citronellolis</i> (KMA4)	Anisoína, azure B, benzaldeído, benzilvanilina, 2,2'-di-hidroxibifenil, vanilina, ácido 4-hidroxibenzoico.	(KUHNIK; KÖNIG, 1997)
<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	Ferulato, <i>p</i> -cumarato, benzoato, vanilina	(RAVI <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Licor alcalino pré-tratado	(SALVACHÚA <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PU1	Fenol	(MAHIUDDIN; FAKHRUDDIN; ABDULLAH-AL-MAHIN, 2012)
<i>Pseudomonas mira</i>	Ácido ferúlico, ácido vanílico e ácido sinapínico	(JURKOVÁ; WURST, 1993)
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Ácido tânico e ácido gálico	(CHOWDHURY <i>et al.</i> , 2004)
<i>Pseudomonas putida</i>	Vanilina, ácido vanílico	(HIROSE <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudomonas putida</i>	Vanilina e ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido benzóico, ácido ferúlico, ácido 4-cumárico e ácido 4-hidroxibenzóico	(PERESTELO <i>et al.</i> , 1996)

<i>Pseudomonas putida</i> 010C	Resorcinol	(CHAPMAN; RIBBONS, 1976)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Benzoato, <i>p</i> -hidroxibenzoato, benzilamina, fenilacetato, fenilalanina, tirosina, feniletilamina, fenilhexanoato, fenilheptanoato, feniloctanoato, álcool coniferílico, <i>p</i> -cumarato, ferulato, cafeato, vanilato, nicotinato e quinato	(JIMÉNEZ <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440,	licor alcalino pré-tratado	(SALVACHÚA <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	licor alcalino pré-tratado	(SALVACHÚA <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas putida</i> NCIMB 9866	<i>p</i> -cresol	(CRONIN <i>et al.</i> , 1999)
<i>Pseudomonas putida</i> NCIMB 9869	<i>p</i> -cresol	(CRONIN <i>et al.</i> , 1999)
<i>Pseudomonas putida</i> NX-1	Lignina Kraft	(XU <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas putida</i> ORC	Resorcinol	(CHAPMAN; RIBBONS, 1976)
<i>Pseudomonas</i> sp. ITH-SA-1	Siringaldeído	(IWABUCHI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas</i> sp. Strain HR199	Ácido ferúlico	(OVERHAGE; PRIEFERT; STEINBÜCHEL, 1999)
<i>Pseudomonas</i> sp. strain LLC-1	Vanilina, ácido vanílico, siringaldeído, o-vanilina e isovanilina	(HIROSE <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas</i> sp. Strain MT1	4- e 5-cloro salicilatos	(NIKODEM <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pseudomonas</i> sp. Strain SG-MS2	Pinoresinol	(SHETTIGAR <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AN1 03	Ácido ferúlico, vanilina, ácido vanílico e ácido protocatecuico	(NARBAD; GASSON, 1998)

***Citricoccus* sp.:**

O gênero *Citricoccus* é composto por cocos Gram-positivos não esporulantes aeróbicos. Esse gênero pertence à família *Micrococcaceae* dentro da ordem dos *Actinomycetes* sendo esse um gênero com poucas espécies descritas na literatura (GOODFELLOW *et al.*, 2012). A bactéria *Citricoccus nitrophenolicus* strain PNP1^T se demonstrou capaz de degradar *p*-nitrofenol, 4-clorofenol e fenol que são compostos fenólicos relacionados a lignina (NIELSEN; INGVORSEN, 2013). Além disso a espécie *Citricoccus yambaruensis* já foi reportada sendo capaz de degradar os compostos aromáticos fenantreno, pireno e fluoreno (AHMAD *et al.*, 2021).

***Microbacterium* sp.:**

O gênero *Microbacterium* pertence à família *Microbacteriaceae*, dentro da ordem *Actinomycetales*. Este gênero é composto por bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos, sendo em sua maioria aeróbicos estritos, com algumas espécies sendo anaeróbicos facultativos (GOODFELLOW *et al.*, 2012). Na literatura já foram reportados casos de bactérias desse gênero sendo capazes de crescer em compostos relacionados a lignina como em fenilbenzeno, ácido vanílico e álcool veratrílico (TAYLOR *et al.*, 2012). Além disso, a espécie *Microbacterium esteraromaticum* se mostrou capaz de crescer em ácido protocatecuico, catecol, acetato de fenila, ácido *p*-aminobenzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico e benzoato de fenila, sendo essas moléculas compostos aromáticos derivados da lignina (SONG, 2009).

***Mycolicibacterium* sp.:**

O gênero *Mycolicibacterium* é composto por bactérias gram-positivas em formato de bacilos. Podem ser encontradas em diversos ambientes como solo, água e ambientes hospitalares (GUPTA; LO; SON, 2018). Bactérias desse gênero já foram

reportadas na literatura como capazes de degradar pireno (SILVA *et al.*, 2023b), bis(2-etilhexil) ftalato (BHATTACHARYYA *et al.*, 2023) e oxitetraciclina (XIA *et al.*, 2023).

Rhodococcus sp.:

Gênero de bactérias aeróbicas, gram-positivas não móveis. Conhecidas por sua capacidade de utilizar diversas fontes diferentes de carbono, fazendo parte do filo das actinobactérias (NAZARI *et al.*, 2022). Esse gênero possui diversas bactérias capazes de utilizar compostos relacionados a lignina como sua fonte de carbono, como a própria lignina alcalina que pode ser biodegradada pelo *Rhodococcus pyridinivorans* CCZU-B16 (CHONG *et al.*, 2018), fenilbenzeno, *m*-cresol, *p*-cresol, ácido vanílico e álcool veratrílico (TAYLOR *et al.*, 2012). Mais bactérias do gênero com essa capacidade são apresentadas na Tabela 5. Isso mostra a capacidade das bactérias desse gênero na degradação de compostos aromáticos.

Tabela 5 - Bactérias do gênero *Rhodococcus* relatadas na literatura com capacidade de utilizar compostos relacionados à lignina.

Espécie	Substrato Utilizado	Referências
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> CCZU-B16	Lignina alcalina	(CHONG <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Strain TA421	Bifenil policlorado	(CHUNG <i>et al.</i> , 1994)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Strain TA431	Bifenil policlorado	(CHUNG <i>et al.</i> , 1994)
<i>Rhodococcus opacus</i>	Fenol, guaiacol, 4-hidroxibenzoato, vanilato e benzoato	(HENSON <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain 116	Fenol, 2-clorofenol, metilfenol, 2-Metoxifenol, 2-Etoxifenol, 2-etoxifenol, 4-metoxifenol, 4-etoxifenol, 4-propoxifenol, 4-butoxifenol, anisol, 2-metilanisol, <i>p</i> -anisidina, <i>m</i> -anisidina, benzoato, hidroxibenzoato, 4-metoxibenzoato, 4-etoxibenzoato, 4-Butoxibenzoato	(KARLSON <i>et al.</i> , 1993)
<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 1069	Ácido 4-hidroxibenzóico e ácido vanílico	(KOSA; RAGAUSKAS, 2012)
<i>Rhodococcus opacus</i> DSM PD631	Ácido 4-hidroxibenzóico e ácido vanílico	(KOSA; RAGAUSKAS, 2012)

<i>Rhodococcus fascians</i>	Protocatecuato, catecol, acetato de fenila, salicilato, vanilinato, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, benzoato de fenila.	(SONG, 2009)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Bifenilo, <i>m</i> -cresol, <i>p</i> -cresol, ácido vanílico e álcool veratrílico	(TAYLOR <i>et al.</i> , 2012)
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	Lignina de madeira moída	(AHMAD <i>et al.</i> , 2010)
<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 1069	Lignina organosolv de etanol e Lignina organosolv de etanol ultrafiltrada	(KOSA; RAGAUSKAS, 2013)
<i>Rhodococcus opacus</i> DSM PD630	Lignina organosolv de etanol e Lignina organosolv de etanol ultrafiltrada	(KOSA; RAGAUSKAS, 2013)
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	Lignina alcalina	(HE <i>et al.</i> , 2017)
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 VanA-	Lignina alcalina	(HE <i>et al.</i> , 2017)

Cupriavidus sp.

O gênero *Cupriavidus* é composto por bactérias gram-negativas em forma de bacilos. São bactérias aeróbicas e móveis possuindo flagelos que as auxiliam em sua mobilidade, sendo esse gênero um predador de bactérias e fungos de solo (VANDAMME; COENYE, 2004). Bactérias desse gênero já foram reportadas na literatura com capacidade de degradar fenol, *p*-cresol (HUGHES; BAYLY, 1983) e lignina Kraft (SHI *et al.*, 2013). Sendo que o *Cupriavidus necator* JMP134 foi capaz de utilizar 60 compostos aromáticos como sua única fonte de carbono e energia (PÉREZ-PANTOJA *et al.*, 2008).

Azospirillum sp.

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem à classe das alfa-proteobactérias, sendo esse um gênero muito conhecido pela sua capacidade de promover o crescimento de plantas. O gênero de bactérias *Azospirillum* é composto por bactérias gram-negativas de vida livre fixadoras de nitrogênio (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

15. Conclusão do capítulo:

Como resultado deste trabalho, o DNA genômico de todas as 81 bactérias de solo de Cerrado capazes de utilizar lignina como fonte de carbono isoladas foi extraído com sucesso pelo método de fenol/clorofórmio. Das bactérias com o DNA extraído, 46 tiveram o seu gene 16S rDNA amplificado pela reação em cadeia da polimerase. Todas foram enviadas para sequenciamento e 35 delas foram identificadas com sucesso, por meio da análise de seus sequenciamentos e comparação de seus genes codificadores do 16S rRNA com o de bactérias presentes em bancos de dados de nucleotídeos.

As bactérias identificadas taxonomicamente foram utilizadas para se fazer uma árvore filogenética comparando seus genes com genes de bactérias da literatura, para avaliar a relação evolutiva entre elas. Com as bactérias identificadas também foi feita uma revisão da literatura em busca de informações sobre cada gênero e espécie. Durante essas buscas foi percebida a falta de material sobre alguns desses gêneros com a lignina, como o crescimento de bactérias do gênero *Bruceella* em lignina Kraft, que até o momento ainda não foi reportado na literatura

Este trabalho destaca a variedade de gêneros e espécies de bactérias com capacidade de desconstrução de lignina, característica interessante, pois atualmente muitos dos estudos relacionados à desconstrução de lignina focaram em fungos. Assim, esses resultados trazem informações importante sobre os diversos gêneros capazes de desconstruir a lignina.

Capítulo 3: Avaliação do crescimento e dos produtos gerados pelas bactérias

16. INTRODUÇÃO:

A utilização de microrganismos em processos industriais exige algumas características importantes pois podem diminuir o custo do processo. Uma dessas características é um rápido crescimento do microrganismo. Um rápido crescimento dos microrganismos diminui o tempo necessário dos bioprocessos, diminuindo o custo final. Existem diversas maneiras de se aumentar a taxa de crescimento de microrganismos, como a otimização de meios de cultivo para que facilitem o crescimento daquele microrganismo específico e alterações de genes relacionados à taxa de replicação do microrganismo. Entretanto, crescimento rápido não necessariamente aumenta a produção do produto desejado no processo, mas é um indicativo de que isso pode ocorrer (PEI; SCHMIDT, 2018).

Portanto, entender como o crescimento de um microrganismo está relacionado com a geração de um produto é de extrema importância. Os produtos gerados por esses microrganismos são provenientes de suas reações metabólicas individuais, assim os produtos gerados por eles se diferenciam de acordo com a capacidade de cada microrganismo. Entretanto, algumas dessas reações são dependentes de nutrientes específicos, e a presença deles no meio pode ser imprescindível para a geração de um produto específico (PAPAGIANNI, 2017).

16.1 Produtos da lignina

Já há exemplos de transformação da lignina em produtos de interesse industrial. A seguir serão exemplificados alguns dos produtos gerados por rotas microbianas a partir da lignina.

16.1.1 Lipídeos

Os lipídeos são produtos atrativos pois podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis. Os lipídeos, por sua vez, são uma matéria prima que pode ser gerada a partir dos compostos aromáticos presentes na lignina. Alguns microrganismos possuem a capacidade de acumular lipídeos como parte de seu metabolismo, sendo conhecidos como microrganismos oleaginosos. Esse acúmulo de lipídeos pode chegar a quase 20 % do peso celular seco. A Figura 16 mostra um exemplo de lipídeo bacteriano (RESHMY *et al.*, 2022).

Atualmente existem microrganismos geneticamente modificados capazes de gerar biocombustíveis, entretanto, a sua capacidade de produção não se compara à produção química gerada pela reação de transesterificação. Biocombustíveis gerados por microrganismos possuem maior densidade energética, sendo mais compatíveis com a infraestrutura industrial já existente. Essa característica facilita e agiliza a sua implantação no mercado como um produto utilizável. Além disso, a síntese microbiana de biodiesel possui alguns benefícios quando comparada à síntese química. Bactérias e leveduras de crescimento rápido têm alto potencial para a indústria, pois a sua utilização em fermentação de larga escala é algo factível, aumentando assim a geração de produtos. Sendo assim, utilizar os lipídeos gerados por microrganismos oleaginosos como o substrato para microrganismos geneticamente modificados produzirem biodiesel podem gerar um processo de produção completamente biológico. Isso poderia modificar a forma como a indústria atual produz biocombustíveis (WANG *et al.*, 2022).

Atualmente o gênero *Rhodococcus sp.* é o mais estudado para a geração de lipídeos por precursores aromáticos da lignina. Essa capacidade já foi descrita nas espécies *R. opaccus* (HE *et al.*, 2017; KOSA; RAGAUSKAS, 2013; WEI *et al.*, 2015), *R. jostii* (HE *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019) e em *R. pyridinivorans* (CHONG *et al.*, 2018). Porém, esse gênero bacteriano não é o único com essa capacidade. Bactérias do gênero *Citricoccus sp.* (WANG; LUO; LI, 2023) também possuem essa capacidade, bem como leveduras *Lipomyces starkeyi* (PUTRA *et al.*, 2023).

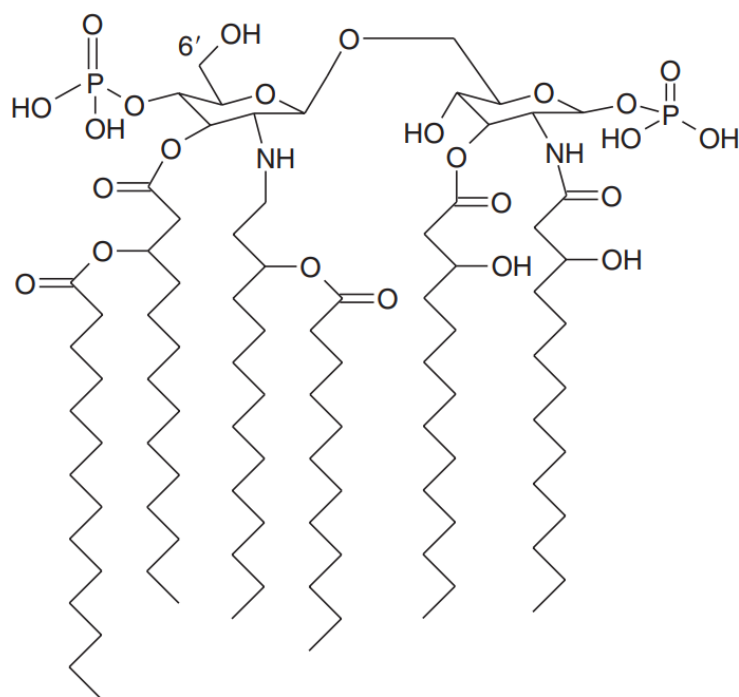


Figura 16 – Lipídeo A de *Escherichia coli*. Exemplo de uma molécula de lipídeo produzido por uma bactéria Gram-negativa (PARLESÁK, 2005).

16.1.2 Bioplásticos

A lignina também pode ser utilizada para a produção de poliidroxicanoatos (PHA), também conhecidos como bioplásticos (Figura 17). Esse produto é uma das alternativas atuais para a redução da produção de plástico no mundo. O PHA ajuda a diminuir a poluição gerada após seu descarte, pois os plásticos gerados a partir de petróleo tem biodegradação mais lenta. Assim, a utilização de bioplásticos é mais amigável ao meio ambiente por se degradarem de forma mais rápida, diminuindo assim o acúmulo de plástico no planeta. Entretanto isso não diminui a quantidade de microplásticos gerados, pois a utilização de bioplásticos faz com que o plástico se degrade mais rapidamente, porém ao fim ele também se torna microplástico. A utilização de lignina para a geração de bioplásticos é uma ótima solução para a valorização da lignina e também para diminuir o impacto ambiental gerado pelo plástico no planeta (XU *et al.*, 2022).

A lignina Kraft já foi utilizada como fonte de carbono da bactéria *Cupriavidus brasiliensis* B-8 gerando como produto o PHA, sendo que a lignina utilizada não passou por nenhum pré-tratamento, característica interessante para diminuir o preço do produto final (SHI *et al.*, 2017). Outras espécies de bactérias também já provaram ser capazes de produzir PHA a partir de precursores da lignina. Entre elas estão a *Pseudomonas putida* e *Burkholderia cepacia*, que produzem e acumulam o PHA em suas células (XU *et al.*, 2022).

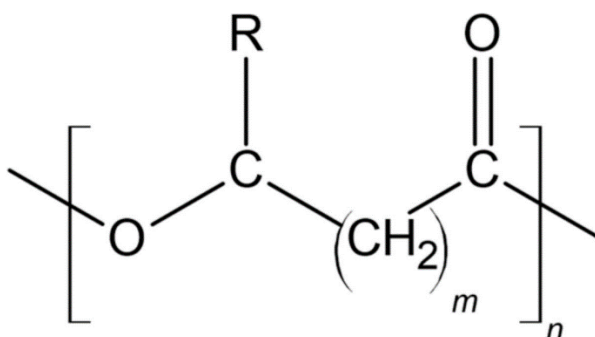


Figura 17 – Molécula de PHA. Imagem representativa de uma molécula de PHA onde m fica na faixa de 1 a 3, n representa o grau de polimerização com variações de 1 a 30.000 e o R é um grupo alquil variável (GRADÍSSIMO; XAVIER; SANTOS, 2020).

16.1.3 Vanilina

A vanilina (Figura 18) é um produto proveniente da bioconversão de ácido ferúlico, sendo este um produto derivado da lignina. Ela é um produto de alto valor agregado muito utilizado na indústria alimentícia, na indústria farmacêutica e na indústria de fragrâncias (VYRIDES *et al.*, 2015). A conversão de ácido ferúlico em vanilina é um processo mediado por microrganismos, sendo o *Bacillus subtilis* um dos microrganismos capazes de realizar essa conversão (CHEN *et al.*, 2017).

Microrganismos geneticamente modificados também já demonstraram a capacidade de realizar a produção de vanilina como uma cepa de *R. jostii* com o gene vhd (vanilina desidrogenase) silenciado, que foi capaz de produzir vanilina (SAINSBURY *et al.*, 2013), e também a *P. putida* com alterações genéticas tendo alto

rendimento na produção de vanilina a partir de ácido ferúlico (GRAF; ALTENBUCHNER, 2014).

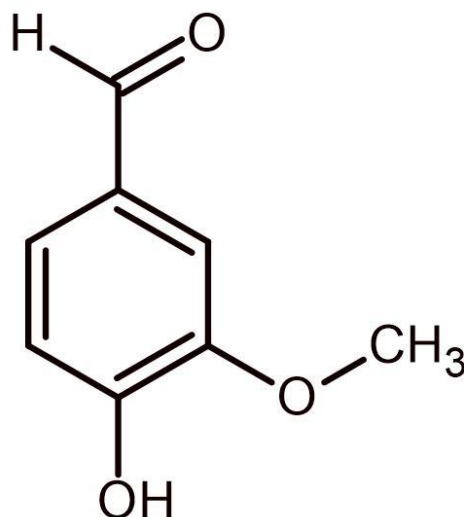


Figura 18 – Molécula de vanilina. Imagem representativa de uma molécula de vanilina. Nela é possível notar a presença de um anel aromático, composto muito comum na lignina (O autor, 2023).

16.1.4 Ácido cis, cis-mucônico

O ácido cis, cis-mucônico (Figura 19) é considerado um produto de alto valor, com aplicações em diferentes indústrias. Pode ser utilizado como um material precursor da síntese de diversos polímeros como o ácido adípico um precursor utilizado para a produção de nylon 6,6, ácido tereftálico e poliuretanos. Também pode ser utilizado na indústria farmacêutica para a síntese de alguns medicamentos. O ácido cis, cis-mucônico é produzido tradicionalmente por processos químicos, porém a produção microbiana a partir da biomassa é uma alternativa que vem sendo o foco de vários estudos atualmente. Microrganismos como *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas putida*, e *Saccharomyces cerevisiae*, possuem as vias necessárias em seu genoma para a produção do ácido cis, cis-mucônico. Porém, possuir as vias não significa que eles geram esse produto (CHOI *et al.*, 2020).

A produção do ácido cis, cis-mucônico naturalmente a partir de compostos relacionados à lignina nos microrganismos ainda não foi muito estudada. Porém, alguns microrganismos geneticamente modificados possuem essa capacidade, como a bactéria *Amycolatopsis sp* (BARTON *et al.*, 2018), e a *Corynebacterium glutamicum* que foi capaz de produzir o composto com alta eficiência (WEILAND *et al.*, 2023).

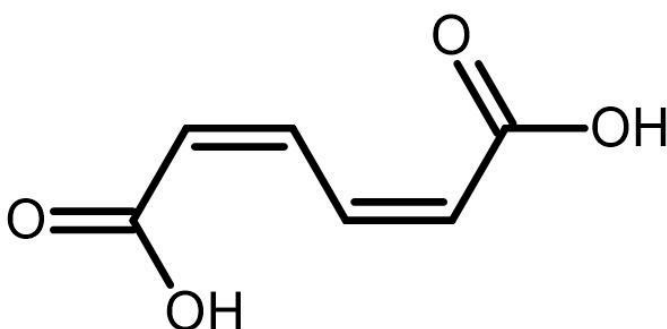


Figura 19 – Molécula do ácido cis, cis-mucônico. Imagem representativa de uma molécula de ácido cis, cis-mucônico (O autor, 2023).

16.2 Métodos para detectar os produtos de lignina:

Atualmente existem diversas técnicas que buscam caracterizar as moléculas de lignina e seus metabólitos. Entre eles podemos citar métodos cromatográficos, espectrofotométricos e espectroscópicos. Por conta de sua heterogeneidade, a lignina pode ser encontrada em diferentes formas na natureza, assim, conseguir identificar a conformação da lignina trabalhada pode ser vantajoso na predição dos produtos que serão gerados a partir dela. Por isso, é importante entender bem os diversos métodos para caracterização de lignina e seus produtos, buscando qual método se adequa melhor ao tipo de produto que está sendo produzido (STARK; YELLE; AGARWAL, 2016).

16.2.1 Métodos Cromatográficos

Os métodos cromatográficos são técnicas de separação de componentes que permitem a análise, identificação e purificação de compostos de uma solução. Essa separação se dá pelas diferenças de cada uma das moléculas, como sua afinidade por outras moléculas e seu tamanho. Essas características fazem com que diferentes moléculas avancem em velocidades diferentes pelo sistema de cromatografia. Essa diferença nas velocidades faz com que os componentes de uma solução se separem (COSKUN, 2016).

Em geral, a cromatografia se divide em duas fases, uma fase estacionária, ou imóvel, pela qual a solução irá passar, podendo ser uma coluna com poros de tamanho definido, ou um líquido adsorvido em um sólido com afinidade a um composto específico. E uma fase móvel, podendo ser líquida ou gasosa, que irá passar pela fase estacionária separando os compostos daquela solução (C.F.POOLE, 2000). Sendo que uma das técnicas de cromatografia bastante utilizada para separar e detectar compostos fenólicos é a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) (SANCHES *et al.*, 2022).

16.2.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica desenvolvida a partir da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Porém a técnica de UPLC traz vantagens quando comparada ao HPLC. Ela é considerada uma técnica que permite separações mais rápidas e eficientes de compostos, podendo operar em pressões mais altas e utilizando partículas menores na fase estacionária, o que melhora a separação dos compostos (ASHOK *et al.*, 2012).

Esse método de cromatografia pode ser utilizado para análise de compostos fenólicos de diferentes tamanhos, sendo que acoplado ao detector de arranjo de fotodiodo (PDA) se torna uma técnica bastante sensível mantendo um custo relativamente baixo. Com a utilização do PDA, o equipamento detecta moléculas no espectro do ultravioleta e da luz visível, porém para se obter resultados mais precisos uma técnica bastante utilizada é a de UPLC acoplado à espectrometria de massa (SANCHES *et al.*, 2022).

16.2.3 Métodos espectroscópicos:

Os métodos espectroscópicos são técnicas analíticas que envolvem a interação de luz com a matéria, para identificar e quantificar substâncias. Essas técnicas podem fornecer dados de características estruturais como grupos funcionais, tipos de ligações químicas e o estado dos átomos. Essas técnicas se baseiam nas propriedades da luz, comprimento de onda e frequência, e nas características da matéria trabalhada como sua estrutura e estado iônico (LU *et al.*, 2017).

Os princípios básicos das técnicas espectroscópicas estão relacionados com a capacidade de absorção, emissão e dispersão de luz da matéria. Na absorção, um espectro de luz é incidido na substância, essa absorve frequências específicas de luz, o que eleva o estado de energia dos elétrons e como resultado temos um espectro das frequências de luz que foram absorvidas pela substância. Na emissão, os elétrons após serem excitados com certas frequências de luz, retornam a seus estados de energia mais baixos emitindo luz em frequências específicas, e essas frequências são analisadas no espectro de emissão. Na dispersão, a luz incidida na matéria pode se dispersar para diferentes direções dependendo do material analisado, essa dispersão de luz é analisada para entender a conformação do material (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2014).

Algumas das técnicas de espectroscopia mais utilizadas para análise de compostos orgânicos são a espectroscopia UV/visível, a espectroscopia infravermelha, a espectroscopia de Raman, a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas. Sendo que todas elas compartilham o princípio de analisar como um composto reage a incidência de uma radiação eletromagnética, como luz visível, ultravioleta, infravermelho, raios-x entre outras (YADAV, 2005).

16.2.4 Espectroscopia UV/Visível:

Essa técnica mede a absorção de luz ultravioleta e visível de uma amostra, para determinar suas propriedades e concentrações. Nela a radiação eletromagnética

na faixa do ultravioleta (100 – 400 nm) e visível (400 – 700 nm) é incidida na amostra. Quando as moléculas absorvem essa luz, os elétrons são promovidos a um estado de energia mais alto. A absorbância é medida pela comparação entre a intensidade de radiação transmitida e a de radiação incidente, gerando o valor de absorbância da amostra (YADAV, 2005). Esse tipo de espectroscopia pode ser utilizado para a quantificação de lignina solúvel e de compostos fenólicos (LEE *et al.*, 2013).

16.2.5 Espectroscopia Infravermelha:

Esse método utiliza luz no espectro do infravermelho, entretanto, o que está sendo analisado nela é a mudança nos níveis de energia de vibração e rotação das moléculas. Quando uma molécula absorve radiação no infravermelho, ela modifica suas vibrações, sendo que as vibrações são únicas para cada tipo de molécula e ligações moleculares. Essa técnica é utilizada amplamente para identificar grupos funcionais em moléculas orgânicas (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2014).

16.2.6 Espectroscopia de Raman:

A espectroscopia de Raman se baseia no fenômeno chamado efeito de Raman ou dispersão inelástica da luz. Ele ocorre quando uma luz incidente interage com as vibrações moleculares da amostra, o que resulta em um deslocamento na frequência da luz dispersa. Essa técnica é utilizada para estudar vibrações, rotações e outras transições de baixa frequência em moléculas. Sendo que nela os modos vibracionais resultantes do efeito de Raman são característicos das ligações químicas e estrutura molecular da amostra, sendo que cada modo vibracional tem uma frequência específica que aparece como um pico no espectro Raman (STARK; YELLE; AGARWAL, 2016).

16.2.7 Ressonância Magnética Nuclear:

A espectroscopia por ressonância magnética é uma técnica aplica um campo magnético a núcleos atômicos, como ^1H , ^{13}C , e ^{15}N , com pulsos de radiofrequência. O intuito disso é caracterizar a frequência ressonante desses núcleos conforme seu ambiente químico. Após excitados, os núcleos retornam ao equilíbrio emitindo um sinal de decaimento característico que mapeia a estrutura química das moléculas. Esse processo envolve a circulação de elétrons, criando campos magnéticos opostos que variam conforme a densidade eletrônica. Essa variação é crucial para identificar a estrutura molecular (YADAV, 2005)

16.2.8 Espectrometria de Massas:

A espectrometria de massas é uma técnica que envolve a ionização de moléculas para formar íons carregados, a separação desses íons com base em sua relação massa/carga (m/z) e a detecção dos íons para gerar um espectro de massas. É considerada uma técnica de alta sensibilidade, pois consegue detectar compostos em concentrações baixas, além de ser muito preciso na determinação das massas das moléculas. É comum utilizar o espectrômetro de massas acoplado a alguma técnica de cromatografia, como a cromatografia líquida ou a gasosa (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2005).

Ao se utilizar um método cromatográfico, como o HPLC, acoplado ao espectrômetro de massa, as substâncias eluídas pela coluna cromatográfica são detectadas pelo espectrômetro de massas. Sendo essa uma técnica atualmente utilizada para identificar compostos fenólicos e compostos relacionados a lignina, permitindo a análise de estruturas e subunidades maiores de lignina intactas (LETOURNEAU; VOLMER, 2023).

17. Justificativa do capítulo 3:

Diante do que foi apresentado, fica clara a necessidade de entender quais os produtos podem ser gerados por microrganismos a partir da lignina. Isso pode auxiliar na forma como a indústria atual trata a lignina, deixando de tratá-la como um subproduto e podendo utilizá-la como recurso para geração de produtos de alto valor.

Avaliar esses produtos é de extrema importância, pois atualmente ainda não se tem pleno conhecimento das possibilidades de desconstrução da lignina, deixando uma lacuna de conhecimento com potencial sendo desperdiçado. Para isso entender os produtos gerados e a relação da capacidade de geração desses produtos com a taxa de crescimento é muito importante. Alto crescimento do microrganismo não significa que ele será capaz de gerar uma alta quantidade do produto desejado. Por isso, entender essa relação pode facilitar a otimização de processos para a geração de bioprodutos levando em conta as especificidades de cada uma das bactérias.

Além disso, a análise dos produtos gerados por essas bactérias a partir da lignina, utilizando técnicas avançadas como a UPLC-PDA e a espectrometria de massas, permite uma caracterização detalhada dos compostos formados. Essas técnicas são cruciais para identificar e quantificar os produtos de degradação, contribuindo para a compreensão dos mecanismos de catabolismo da lignina e das suas vias metabólicas.

18. Objetivos:

Objetivo geral:

- Isolar e identificar bactérias do bioma cerrado capazes de utilizar a lignina como substrato para produção de metabólitos com potencial econômico para aplicação industrial.

Objetivos específicos do capítulo:

- Testar o melhor método de crescimento para as bactérias de acordo com a sua capacidade de desconstruir lignina;
- Avaliar o crescimento das bactérias nos meios até o último dia de inóculo;
- Testar os melhores parâmetros para avaliar os produtos no UPLC-PDA;
- Avaliar o deslocamento dos picos cromatográficos do UPLC-PDA em busca de produtos gerados e diminuição do pico de lignina;
- Identificar os produtos gerados por bactérias selecionadas pela espectrometria de massas.

19. Material e Métodos:

Antes de avaliar os produtos gerados pelos microrganismos a partir de lignina, foi necessário decidir qual seria a melhor estratégia de crescimento e o melhor tempo para se visualizar os resultados de forma mais clara. Para isso um grupo de 6 bactérias foi utilizado para essa triagem inicial, foram elas *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas citronelollis* C12, *Brucella intermedia* xg-2, *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786, *Stenotrophomonas* sp. e *Ochrobactrum* sp. sendo a cepa comercial de *pseudomonas putida* KT2440 o controle positivo por sua capacidade de utilizar lignina já reportada na literatura. Essas bactérias foram escolhidas, pois a maioria delas já haviam sido reportadas na literatura com a capacidade de desconstruir lignina ou compostos fenólicos. Apenas a *Brucella intermedia* xg-2 não havia sido reportada na literatura como tendo essa capacidade.

19.1 Estratégias de crescimento:

Para avaliar o melhor método de crescimento três estratégias foram idealizadas. Na primeira, as bactérias estariam crescendo da mesma forma que anteriormente. Assim as bactérias estariam crescendo em lignina desde o primeiro meio, assim se a expressão gênica dos genes relacionados a desconstrução da lignina fosse induzida pela presença da lignina no meio, esses microrganismos já estariam expressando as enzimas desde o seu inóculo inicial em meio sólido. Entretanto dessa forma o tempo de crescimento das bactérias era grande e a massa final de bactérias no meio era pequeno.

Para a primeira estratégia de crescimento, as bactérias estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram inoculadas em meio mínimo M9 + T.E. + lignina Kraft a 1 % (Sigma) sólido e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias, pois o crescimento das bactérias era lento. Após o crescimento em meio sólido, todas as bactérias foram diluídas em 3 mL de solução salina a 0,9 % (m/v). As bactérias foram raspadas da placa com uma alça de drigalski e o líquido de solução salina com as bactérias foi coletado com uma pipeta. O líquido contendo as bactérias foi então utilizado para medição da densidade ótica (OD) das

bactérias presentes a 600 nm, para se saber a quantidade de bactérias presentes no líquido que seria inoculado nos meios líquidos.

A solução salina com as bactérias das placas diluídas foi utilizada para um inóculo em 50 mL de meio mínimo M9 + T.E. com lignina Kraft a 1 % (m/v) líquido em um Erlenmeyer de 250 mL, foi colocado 1 mL da solução de bactérias no inóculo. Após isso, 1 mL do inóculo líquido foi utilizado para a medição da densidade ótica sendo esse valor considerado o ponto 0 da curva de crescimento. Os inóculos foram então colocados a 180 RPM a 37 °C, por dois períodos de tempo diferente, um ficando no *shaker* por 7 e o outro por 14 dias. Desse inóculo líquido, uma alíquota de 1 mL era retirada em diferentes períodos para a medição da densidade ótica a 600 nm, e avaliar a taxa de crescimento das bactérias.

Na segunda estratégia foi priorizada uma alta massa de microrganismos inicialmente e um tempo menor de crescimento, para isso os estoques das bactérias foram utilizados para um inóculo em meio LB sólido, depois do inóculo as placas foram colocadas em estufa a 37 °C por 1 dia. Então as bactérias crescidas em placa foram diluídas com 3 ml solução salina a 0,9 % e raspadas com uma alça de drigalski, o líquido foi então coletado com uma pipeta. Esse líquido com as bactérias foi utilizado para um inóculo em 10 ml de meio LB líquido em um tubo tipo *Falcon* de 50 mL. O inóculo foi então colocado em *shaker* a 37 °C e 180 RPM por 1 dia.

Após isso, o inóculo líquido teve sua densidade ótica medida e então foi centrifugado a 10000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o pellet lavado com solução salina por 3 vezes. Após as lavagens, o *pellet* com as bactérias foi diluído em 5 mL de solução salina a 0,9 % e usado no inóculo em 50 mL de meio M9 + T.E. e lignina Kraft a 1 %, em um Erlenmeyer de 250 mL. Os inóculos tiveram suas ODs medidas sendo este o ponto zero da sua curva de crescimento. Os inóculos foram então incubados em *shaker* a 180 RPM a 37 °C, por 7 e 14 dias.

Na terceira estratégia, o foco principal era que as bactérias tivessem contato com a lignina desde o inóculo inicial para se avaliar o crescimento delas em um meio contendo uma concentração menor de lignina, pois com a alta concentração do meio utilizado normalmente a visualização do crescimento pela densidade ótica talvez não fosse possível. E para utilizar essas células com uma maior massa de crescimento para os inóculos em lignina a 1 %.

Assim os estoques foram utilizados para se fazer um inóculo em meio M9 + T.E. com lignina Kraft a 0,1 % e um a 1 % de lignina (m/v), para assim se avaliar a diferença do crescimento das bactérias em duas concentrações diferentes de lignina. Foram utilizados 5 µL do estoque no inóculo em 50 mL de meio. Os inóculos foram então colocados em *shaker* a 180 RPM a 37 °C, sendo que os inóculos a 0,1 % de lignina ficaram por 14 dias e os a 1 % ficaram por 7 e 14 dias. Nesse período foram mediadas as ODs dos inóculos para se avaliar o crescimento bacteriano.

Os inóculos a 0,1 % (m/v) de lignina depois dos 14 dias, foram centrifugados a 10000 xg por 10 minutos e seus pellets lavados 3 vezes com solução salina a 0,9 %. Eles foram então ressuspensos em 5 mL de solução salina que foi utilizado para um inóculo em 50 mL de meio M9 + T.E. com lignina Kraft a 1 %, que foram colocados em *shaker* por 7 e 14 dias a 180 RPM a 37 °C. Esse inóculo a 1 % (m/v) de lignina feito com as bactérias que cresceram no meio com 0,1 % (m/v) de lignina foi o utilizado nos próximos passos.

19.2 Liofilização:

Após os tempos de inóculos das 3 estratégias acabarem, 7 e 14 dias, eles foram centrifugados a 10000 xg por 10 minutos para se separar as bactérias. O sobrenadante foi separado em um frasco para ser liofilizado. O sobrenadante foi então colocado em liofilizador por em média 3 dias, até que toda a água da amostra tivesse sido retirada, sobrando apenas um pó marrom concentrado. Esse liofilizado foi então pesado para se saber quanto de amostra se tem de cada bactéria, a relação das massas se encontra no Anexo 1.

19.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplado ao Detector de Arranjo de Fotodiodo (UPLC-PDA):

Das amostras liofilizadas, foi necessário testar as condições da corrida em relação a alguns parâmetros: 1) qual seria o melhor solvente solubilizar as amostras (H₂O com acetonitrila (ACN) a 10 % ou H₂O com metanol (MeOH) a 10 %), 2) qual

seria o melhor volume para ser injetado no UPLC-PDA (1 e 0,5 μ L) e 3) qual seria o melhor tempo de análise (25 e 35 min).

Para isso, uma amostra de um controle negativo contendo apenas o meio com lignina sem um inóculo e uma amostra de um inóculo foram utilizadas em um teste inicial. Foi então pesado 30 mg da amostra e do controle, isso foi então diluído em 1 mL em solventes diferentes. Um dos solventes era H₂O com acetonitrila (ACN) a 10 % e o outro H₂O com metanol (MeOH) a 10 %. Essas amostras diluídas foram então homogeneizadas em agitador orbital por cerca de 10 segundos e levadas ao banho ultrassônico por 10 min para melhorar sua diluição. Após isso cada amostra foi centrifugada a 12000 xg por 5 minutos em uma microcentrífuga de bancada. Do centrifugado foi então retirado 750 μ L e colocado em um *vial* de injeção, que foi utilizado no UPLC-PDA.

Condições de análise no equipamento UPLC-PDA. O equipamento utilizado para análise das amostras foi o UPLC-PDA marca Waters, modelo UPLC *Acquity* PDA série C15UPL180A. A fase móvel foi composta por 2 solventes: o solvente A: água Milli-Q com 0,05 % de ácido trifluoroacético (TFA) e o solvente B: acetonitrila com 0,05 % de TFA. A vazão da fase móvel foi de 0,4 mL/min, com a temperatura do forno da coluna a 40 °C. Coluna *Acquity Premier HSST3 1.8 μ m VanGuard FIT 2.1 X 100 mm* (Waters). A detecção foi feita na faixa de absorvância de 200 a 400 nm, sendo selecionados os comprimentos de onda de 210, 254 e 280 nm para os cromatogramas construídos. O gradiente de eluição do tempo de 35 minutos que foi o escolhido para se utilizar nas futuras análises se encontra na Tabela 6. Para esse teste inicial, 2 volumes de injeção foram testados com 1 e 0,5 μ L, com 2 tempos de corrida 25 e 35 minutos. Com isso era esperado se observar qual era o melhor método para a separação dos compostos.

Tabela 6 - Gradiente de eluição utilizado para separação dos compostos da amostra.

Tempo	Fluxo (mL/min)	%A	%B	Curva
Inicial	0.4	100	0	6
1.00	0.4	100	0	6
5.00	0.4	92	8	6
10.00	0.4	75	25	6
15.00	0.4	50	50	6
25.00	0.4	0	100	6
28.00	0.4	0	100	6

35.00	0.4	100	0	1
-------	-----	-----	---	---

Após esse teste, o método selecionado para se analisar todas as amostras foi utilizando o solvente de H₂O com metanol (MeOH) a 10 %, com um volume de injeção de 1 µL e com um tempo de corrida de 35 min. A partir desse teste todas as amostras foram passadas no UPLC-PDA seguido essas modificações para melhor visualização dos resultados.

19.4 Espetrômetro de massas:

Para se avaliar os possíveis compostos gerados pelas bactérias a partir da lignina foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC) Nexera X2, da Shimadzu Corporation, Japão. Este sistema é composto por uma bomba quaternária, um amostrador automático e um forno de coluna. O UHPLC foi acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, o MaXis 4G da Bruker, que utiliza ionização por electrospray (ESI) e o detector de quadrupolo-tempo de voo (qTOF). A UHPLC separa os compostos presentes nas amostras, enquanto o espectrômetro de massas identifica esses compostos com alta resolução, fornecendo um perfil detalhado dos compostos presentes em cada amostra de sobrenadante bacteriano.

Durante a análise no equipamento foi utilizada a mesma amostra empregada na análise no UPLC-PDA, onde havia se diluído 30 mg de liofilizado em 1 mL de metanol a 10 %. Entretanto para o UHPLC-MS/MS apenas 0,2 µL da amostra foi injetado no equipamento. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna *Acquity* UPLC HSS-T3 (150 x 2.1 mm, 1.8 µm).

O processo seguiu um gradiente de eluição ao longo de 35 minutos, com diferentes proporções de dois solventes: solvente A, que era ácido fórmico a 0,1 % em água (v/v), e solvente B, que era ácido fórmico a 0,1 % em acetonitrila (v/v). O gradiente de eluição se encontra na Tabela 6 apresentada anteriormente. Este protocolo de eluição permitiu uma separação eficaz dos componentes da amostra ao longo do tempo, garantindo precisão e repetibilidade dos resultados.

Os resultados foram analisados no programa MetFrag, onde os compostos que foram fragmentados foram comparados com o banco de dados e os possíveis candidatos dos compostos foram identificados.

20. Resultados:

20.1 Curva de crescimento dos microrganismos nos diferentes métodos:

Pseudomonas putida KT2440

A Figura 20 mostra a curva de crescimento da *Pseudomonas putida* KT2440 durante o seu crescimento, seguindo a primeira e a segunda estratégias de crescimento. Onde na primeira estratégia a bactéria cresce inicialmente em meio sólido M9 +T.E. + lignina Kraft Sigma a 1 % e depois é inoculada na versão líquida do mesmo meio. E a segunda estratégia de crescimento onde a bactéria inicialmente cresce em meio sólido LB, depois é inoculada em meio líquido LB e depois inoculadas no meio M9 + T.E. + lignina Kraft a 1 %.

Na Figura 20 é possível avaliar o crescimento da bactéria por até 14 dias. As bactérias que cresceram seguindo a primeira estratégia de crescimento atingiram uma OD de 0,24 no inóculo de 7 dias e 0,37 no inóculo por 14 dias. As que cresceram seguindo a segunda estratégia de crescimento atingiram uma OD de 0,34 no inóculo por 7 dias e 0,43 no inóculo por 14 dias.

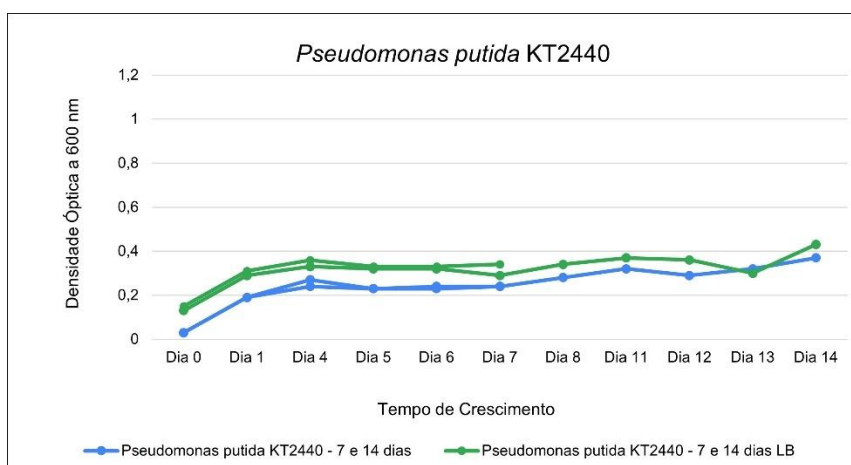


Figura 20 – Curva de Crescimento da *Pseudomonas putida* KT2440. A imagem mostra uma curva de crescimento do controle positivo *Pseudomonas putida* KT2440 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes. *Pseudomonas putida* KT2440 – 7 e 14 dias (linha Azul): Bactéria que cresceu seguindo a primeira estratégia de crescimento, passando 7 dias em meio sólido de M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma e depois inoculada no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; *Pseudomonas putida* KT2440 – 7 e 14 dias LB (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a segunda estratégia de crescimento, crescendo por 1 dia em meio LB sólido, depois

inoculada em meio LB líquido por mais 1 dia, as células foram centrifugadas e lavadas e então inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

A Figura 21 mostra a curva de crescimento da *Pseudomonas putida* KT2440 durante o seu crescimento seguindo terceira estratégia de crescimento. Onde a bactéria foi inoculada inicialmente em meio M9 + T.E. + lignina Kraft a 0,1 % por 14 dias e depois foi inoculada no mesmo meio, porém a 1 % de lignina Kraft. Além disso também foi feito um inóculo diretamente em meio com lignina a 1 % para se comparar o crescimento.

Os inóculos a 0,1 % de lignina tiveram uma OD final de 0,16 e 0,11, sendo que a inoculada diretamente em meio a 1 % de lignina teve uma OD final de 0,01 no crescimento por 7 dias e de 0,03 no crescimento por 14 dias.

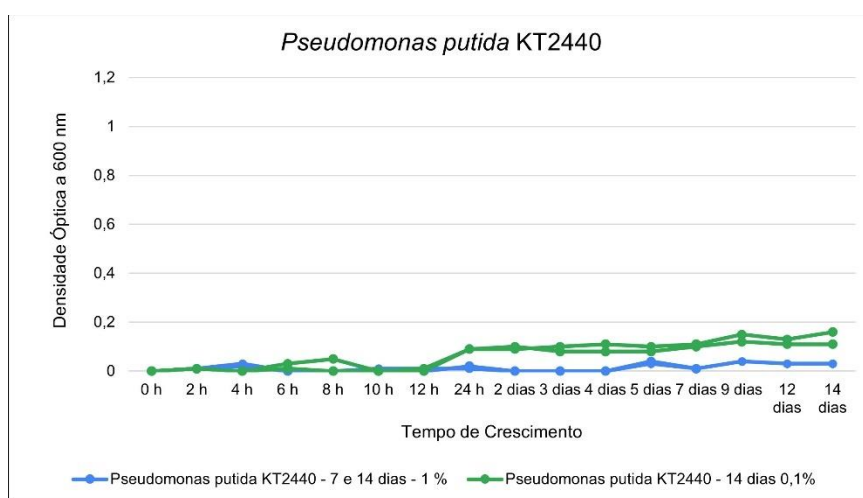


Figura 21 – Curva de Crescimento da *Pseudomonas putida* KT2440 a 0,1 % de lignina. A imagem mostra uma curva de crescimento do controle positivo *Pseudomonas putida* KT2440 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes. *Pseudomonas putida* KT2440 – 7 e 14 dias – 1 % (linha Azul) : Bactéria que cresceu do estoque sendo inoculada diretamente no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; *Pseudomonas putida* KT2440 – 7 e 14 dias 0,1 % (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a terceira estratégia de crescimento, crescendo diretamente do estoque por 14 dias em meio líquido M9 + T.E. com 0,1 % de lignina Kraft Sigma, depois os inóculos foram centrifugados as células lavadas e inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft

Sigma. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

***Pseudomonas citronelollis* C12:**

A Figura 22 mostra a curva de crescimento da *Pseudomonas citronelollis* C12 durante o seu crescimento seguindo a primeira e a segunda estratégia de crescimento. As bactérias que cresceram pela primeira estratégia tiveram uma OD de 0,42 em 7 dias e de 0,55 no crescimento por 14 dias. As bactérias que cresceram pela segunda estratégia atingiram uma OD de 0,24 em 7 dias e 0,33 em 14 dias.

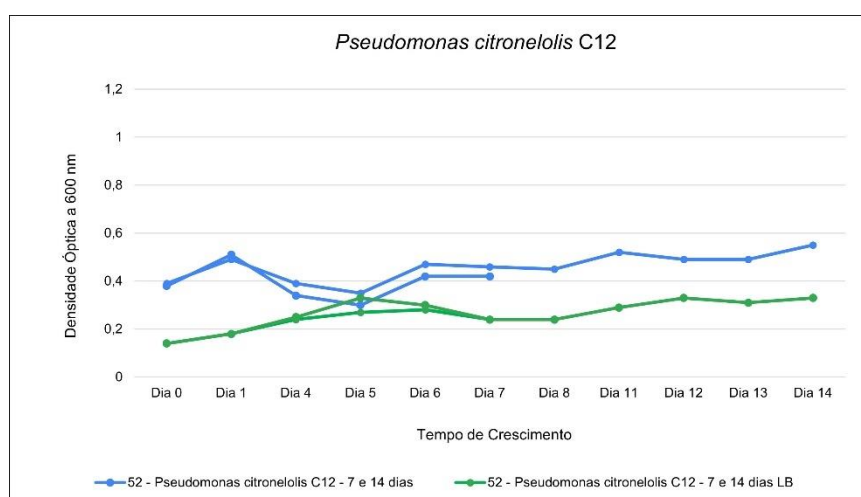


Figura 22 – Curva de Crescimento da *Pseudomonas citronelollis* C12. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Pseudomonas citronelollis* C12 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes. 52 - *Pseudomonas citronelollis* C12 – 7 e 14 dias (linha Azul): Bactéria que cresceu seguindo a primeira estratégia de crescimento, passando 7 dias em meio sólido de M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma e depois inoculada no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; *Pseudomonas citronelollis* C12 – 7 e 14 dias LB (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a segunda estratégia de crescimento, crescendo por 1 dia em meio LB sólido, depois inoculada em meio LB líquido por mais 1 dia, as células foram centrifugadas e lavadas e então inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

A Figura 23 mostra a curva de crescimento da *Pseudomonas citronelollis* C12 durante o seu crescimento seguindo a terceira estratégia de crescimento. Atingindo

uma OD de 0,15 no crescimento por 7 dias e 0,27 por 14 dias em lignina a 1 %. As inoculadas em lignina a 0,1 % atingiram a OD de 0,13 e 0,06 ambas em 14 dias.

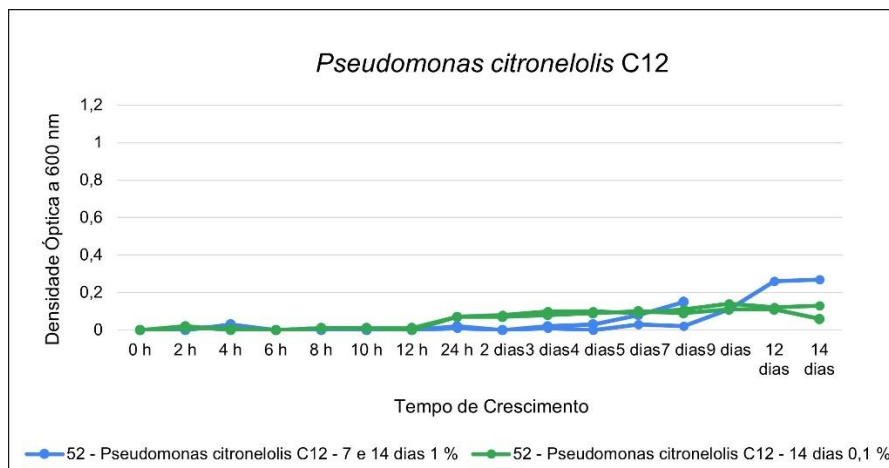


Figura 23 – Curva de Crescimento da *Pseudomonas citronelolis* C12 a 0,1 % de lignina. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Pseudomonas citronelolis* C12 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes. 52 - *Pseudomonas citronelolis* C12 – 7 e 14 dias – 1 % (linha Azul): Bactéria que cresceu do estoque sendo inoculada diretamente no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 52 - *Pseudomonas citronelolis* C12 – 7 e 14 dias 0,1 % (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a terceira estratégia de crescimento, crescendo diretamente do estoque por 14 dias em meio líquido M9 + T.E. com 0,1 % de lignina Kraft Sigma, depois os inóculos foram centrifugados as células lavadas e inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

***Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786:**

A Figura 24 mostra a curva de crescimento da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 durante o seu crescimento seguindo a primeira e a segunda estratégia de crescimento. A bactéria seguindo a primeira estratégia atingiu uma OD de 0,55 em 7 dias e de 0,64 em 14 dias de crescimento. Na segunda estratégia elas alcançaram a OD de 0,55 em 7 dias e 0,64 no crescimento por 14 dias. Um crescimento igual nas duas metodologias.

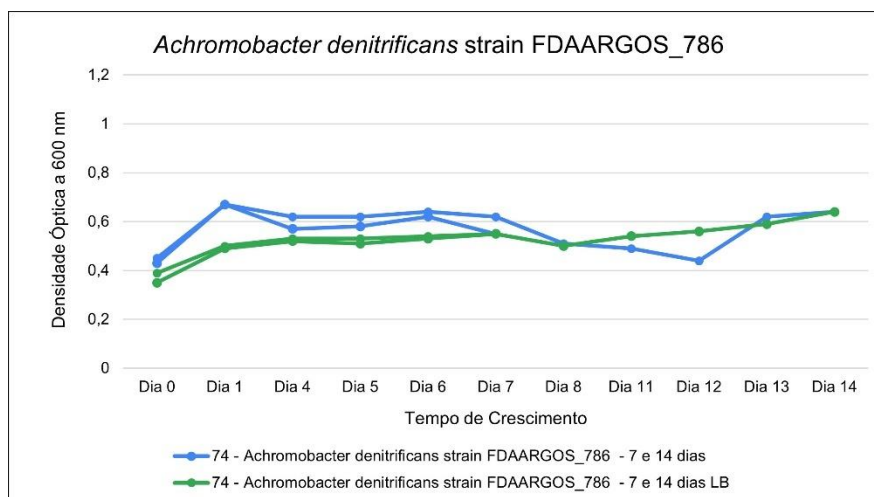


Figura 24 – Curva de Crescimento da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes: 74 - *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 – 7 e 14 dias (linha Azul): Bactéria que cresceu seguindo a primeira estratégia de crescimento, passando 7 dias em meio sólido de M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma e depois inoculada no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 74 - *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 – 7 e 14 dias LB (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a segunda estratégia de crescimento, crescendo por 1 dia em meio LB sólido, depois inoculada em meio LB líquido por mais 1 dia, as células foram centrifugadas e lavadas e então inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

A Figura 25 mostra a curva de crescimento da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 durante o seu crescimento seguindo terceira estratégia de crescimento. A bactéria inoculada a 1 % de lignina atingiu uma OD de 0,24 em 7 dias e 0,33 em 14 dias de crescimento. As inoculadas seguindo o terceiro método atingiram uma OD de 0,12 e 0,29 ambas em 14 dias de crescimento.

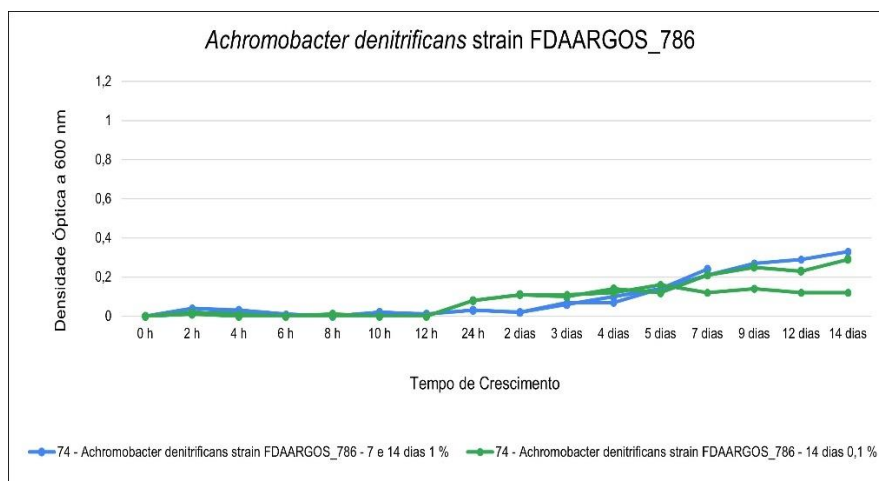


Figura 25 – Curva de Crescimento da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 a 0,1 % de lignina. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Pseudomonas citronelolis* C12 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes. 74 - *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 – 7 e 14 dias – 1 % (linha Azul): Bactéria que cresceu do estoque sendo inoculada diretamente no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 74 - *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 – 7 e 14 dias 0,1 % (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a terceira estratégia de crescimento, crescendo diretamente do estoque por 14 dias em meio líquido M9 + T.E. com 0,1 % de lignina Kraft Sigma, depois os inóculos foram centrifugados as células lavadas e inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

***Stenotrophomonas* sp. strain Y:**

A Figura 26 mostra a curva de crescimento da *Stenotrophomonas* sp. strain Y durante o seu crescimento seguindo a primeira e a segunda estratégia de crescimento. Na primeira estratégia de crescimento a bactéria atingiu uma OD de 0,83 em 7 dias e 0,81 em 14 dias de crescimento. Na segunda estratégia ela atingiu uma OD de 0,25 em 7 dias e 0,3 em 14 dias de crescimento.

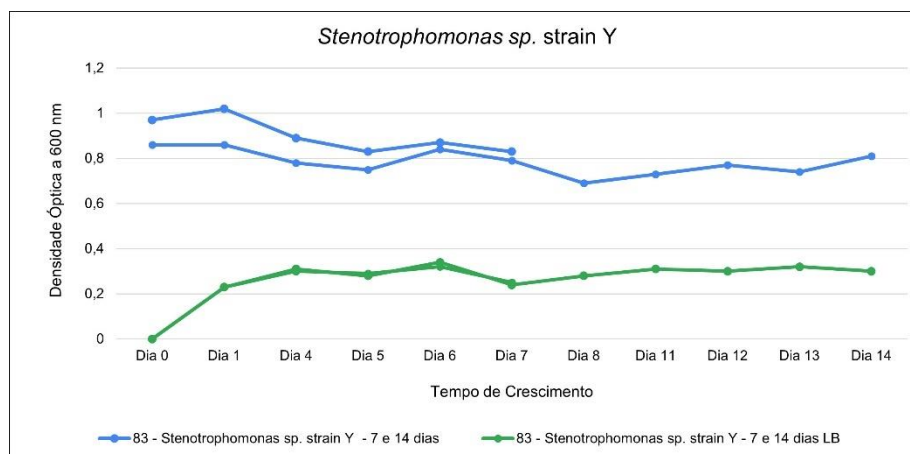


Figura 26 – Curva de Crescimento da *Stenotrophomonas sp. strain Y*. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Stenotrophomonas sp. strain Y* seguindo duas estratégias de crescimento diferentes: 83 - *Stenotrophomonas sp. strain Y* – 7 e 14 dias (linha Azul): Bactéria que cresceu seguindo a primeira estratégia de crescimento, passando 7 dias em meio sólido de M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma e depois inoculada no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 83 - *Stenotrophomonas sp. strain Y* – 7 e 14 dias LB (linha Verde): Bactéria que cresce seguindo a segunda estratégia de crescimento, crescendo por 1 dia em meio LB sólido, depois inoculada em meio LB líquido por mais 1 dia, as células foram centrifugadas e lavadas e então inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

A Figura 27 mostra a curva de crescimento da *Stenotrophomonas sp. strain Y* durante o seu crescimento seguindo terceira estratégia de crescimento. A bactéria inoculada a 1 % de lignina atingiu uma OD de 0,28 em 7 dias e 0,49 em 14 dias de crescimento. As inoculadas seguindo o terceiro método atingiram uma OD de 0,13 e 0,19 ambas em 14 dias de crescimento.

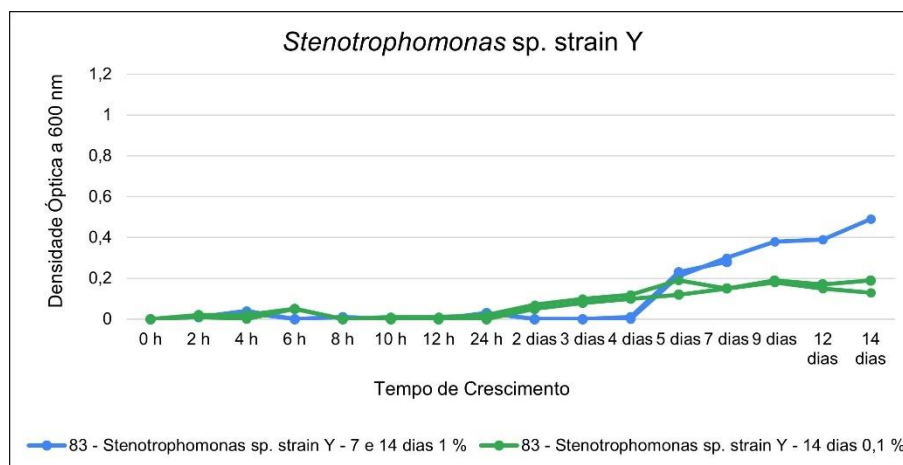


Figura 27 – Curva de Crescimento da *Stenotrophomonas sp. strain Y* a 0,1 % de lignina. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Stenotrophomonas sp. strain Y* seguindo duas estratégias de crescimento diferentes. 83 - *Stenotrophomonas sp. strain Y* – 7 e 14 dias – 1 % (linha Azul): Bactéria que cresceu do estoque sendo inoculada diretamente no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 83 - *Stenotrophomonas sp. strain Y* – 7 e 14 dias 0,1 % (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a terceira estratégia de crescimento, crescendo diretamente do estoque por 14 dias em meio líquido M9 + T.E. com 0,1 % de lignina Kraft Sigma, depois os inóculos foram centrifugados as células lavadas e inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

***Brucella intermedia* XG-2:**

A Figura 28 mostra a curva de crescimento da *Brucella intermedia* XG-2 durante o seu crescimento seguindo a primeira e a segunda estratégia de crescimento. Na primeira estratégia de crescimento a bactéria atingiu uma OD de 0,4 em 7 dias e 0,58 em 14 dias de crescimento. Na segunda estratégia ela atingiu uma OD de 0,29 em 7 dias e 0,41 em 14 dias de crescimento.

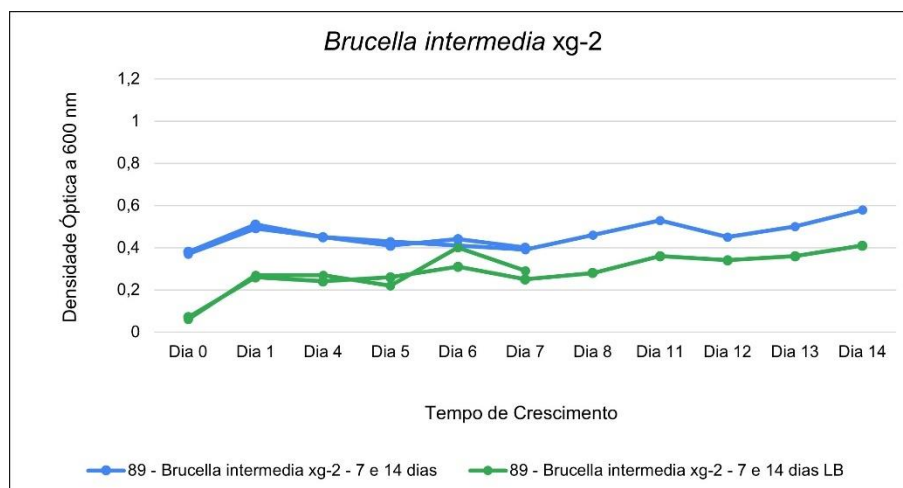


Figura 28 – Curva de Crescimento da *Brucella intermedia* xg-2. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Brucella intermedia* xg-2 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes: 89 - *Brucella intermedia* xg-2 – 7 e 14 dias (linha Azul): Bactéria que cresceu seguindo a primeira estratégia de crescimento, passando 7 dias em meio sólido de M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma e depois inoculada no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 89 - *Brucella intermedia* xg-2 – 7 e 14 dias LB (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a segunda estratégia de crescimento, crescendo por 1 dia em meio LB sólido, depois inoculada em meio LB líquido por mais 1 dia, as células foram centrifugadas e lavadas e então inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

A Figura 29 mostra a curva de crescimento da *Brucella intermedia* XG-2 durante o seu crescimento seguindo terceira estratégia de crescimento. A bactéria inoculada a 1 % de lignina atingiu uma OD de 0,19 em 7 dias e 0,26 em 14 dias de crescimento. As inoculadas seguindo o terceiro método atingiram uma OD de 0,22 e 0,1 ambas em 14 dias de crescimento.

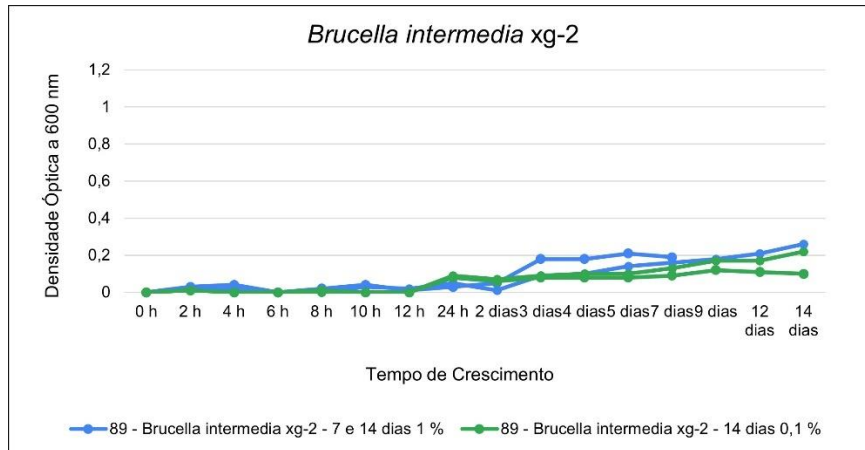


Figura 29 – Curva de Crescimento da *Brucella intermedia* xg-2 a 0,1 % de lignina. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Brucella intermedia* xg-2 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes. 89 - *Brucella intermedia* xg-2 – 7 e 14 dias – 1 % (linha Azul): Bactéria que cresceu do estoque sendo inoculada diretamente no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 89 - *Brucella intermedia* xg-2 – 7 e 14 dias 0,1 % (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a terceira estratégia de crescimento, crescendo diretamente do estoque por 14 dias em meio líquido M9 + T.E. com 0,1 % de lignina Kraft Sigma, depois os inóculos foram centrifugados as células lavadas e inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

***Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27:**

A Figura 30 mostra a curva de crescimento da *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 durante o seu crescimento seguindo a primeira e a segunda estratégia de crescimento. Na primeira estratégia de crescimento a bactéria atingiu uma OD de 0,26 em 7 dias e 0,35 em 14 dias de crescimento. Na segunda estratégia ela atingiu uma OD de 0,26 em 7 dias e 0,33 em 14 dias de crescimento.

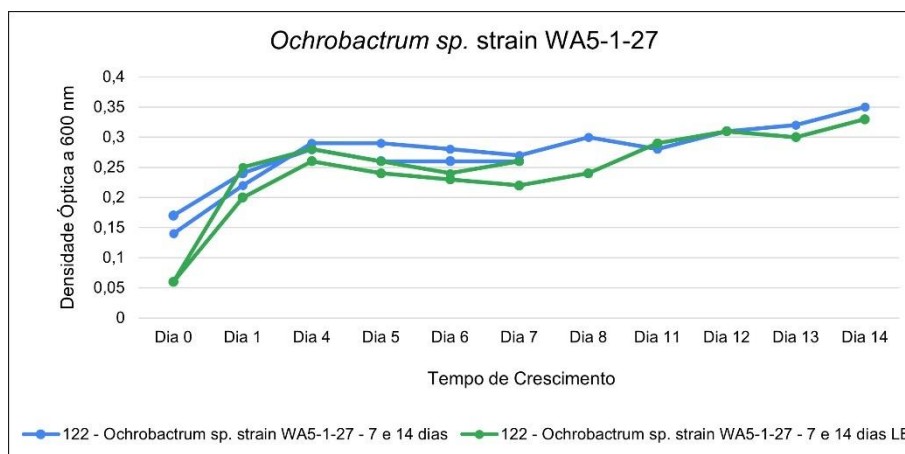


Figura 30 – Curva de Crescimento da *Ochrobactrum sp. strain WA5-1-27*. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Ochrobactrum sp. strain WA5-1-27* seguindo duas estratégias de crescimento diferentes: 122 - *Ochrobactrum sp. strain WA5-1-27* – 7 e 14 dias (linha Azul): Bactéria que cresceu seguindo a primeira estratégia de crescimento, passando 7 dias em meio sólido de M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma e depois inoculada no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 122 - *Ochrobactrum sp. strain WA5-1-27* – 7 e 14 dias LB (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a segunda estratégia de crescimento, crescendo por 1 dia em meio LB sólido, depois inoculada em meio LB líquido por mais 1 dia, as células foram centrifugadas e lavadas e então inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

A Figura 31 mostra a curva de crescimento da *Ochrobactrum sp. strain WA5-1-27* durante o seu crescimento seguindo terceira estratégia de crescimento. A bactéria inoculada a 1 % de lignina atingiu uma OD de 0,07 em 7 dias e 0,11 em 14 dias de crescimento. As inoculadas seguindo o terceiro método atingiram uma OD de 0 e 0,03 ambas em 14 dias de crescimento.

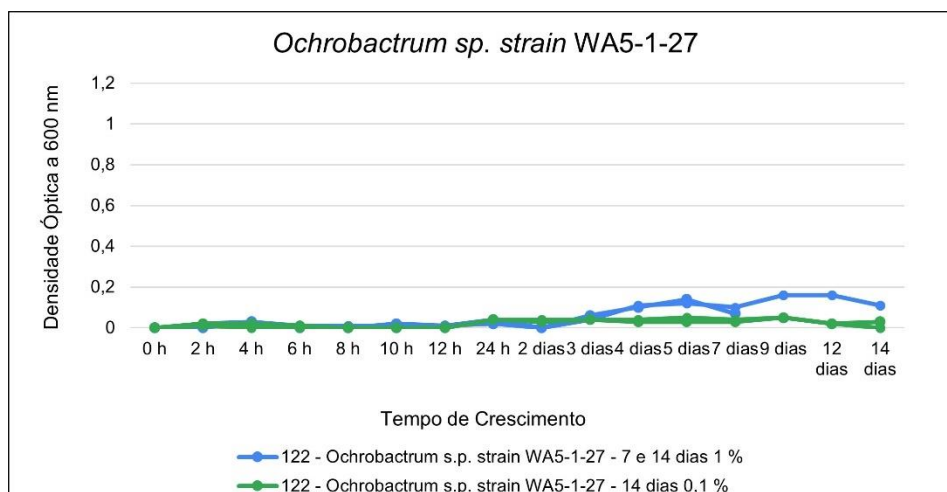


Figura 31 – Curva de Crescimento da *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 a 0,1 % de lignina. A imagem mostra uma curva de crescimento da bactéria da coleção *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 seguindo duas estratégias de crescimento diferentes. 122 - *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 – 7 e 14 dias – 1 % (linha Azul): Bactéria que cresceu do estoque sendo inoculada diretamente no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma por mais 7 ou 14 dias; 122 - *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 – 7 e 14 dias 0,1 % (linha Verde): Bactéria que cresceu seguindo a terceira estratégia de crescimento, crescendo diretamente do estoque por 14 dias em meio líquido M9 + T.E. com 0,1 % de lignina Kraft Sigma, depois os inóculos foram centrifugados as células lavadas e inoculadas no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma. O crescimento das bactérias foi mensurado nos dois casos a partir do momento do inóculo no meio líquido M9 + T.E. com 1 % de lignina Kraft Sigma.

20.2 Análises por UPLC- PDA:

20.2.1 Definição das condições de preparo das amostras

A Figura 32 mostra o resultado dos cromatogramas a 210 nm do sobrenadante da amostra utilizando metanol para solubilizar as amostras. Nas 4 imagens presentes na figura, é notável a semelhança entre os cromatogramas, onde as linhas do controle (preto) e da amostra (azul) ficam praticamente sobrepostos com uma pequena diferença entre eles. Nos cromatogramas 1 e 2 as amostras foram injetadas por 25 minutos e no 3 e 4 as amostras foram injetadas por 35 minutos, entretanto, nos cromatogramas 1 e 3 foi injetado 0,5 µL e no 2 e 4 foi injetado 1 µL de amostra. Por isso, nos cromatogramas 1 e 2 não é visível o pico que aparece por volta de 30 minutos nos cromatogramas 3 e 4. Por conta dos diferentes volumes utilizados o eixo y dos cromatogramas tem valores diferentes. Com o resultado do teste o solvente escolhido

para se utilizar nas próximas amostras foi o metanol a 10 %, não houve diferença em relação aos dois solventes, pois ambos solubilizaram bem as amostras, porém o metanol foi escolhido por ser menos tóxico que a acetonitrila. O tempo escolhido como o melhor para a passagem das amostras foi o de 35 min, pois nele há uma separação melhor dos picos facilitando a visualização. O volume escolhido foi o de 1 μL , pois com esse volume os picos ficam com uma altura maior, facilitando a visualização de picos menores.

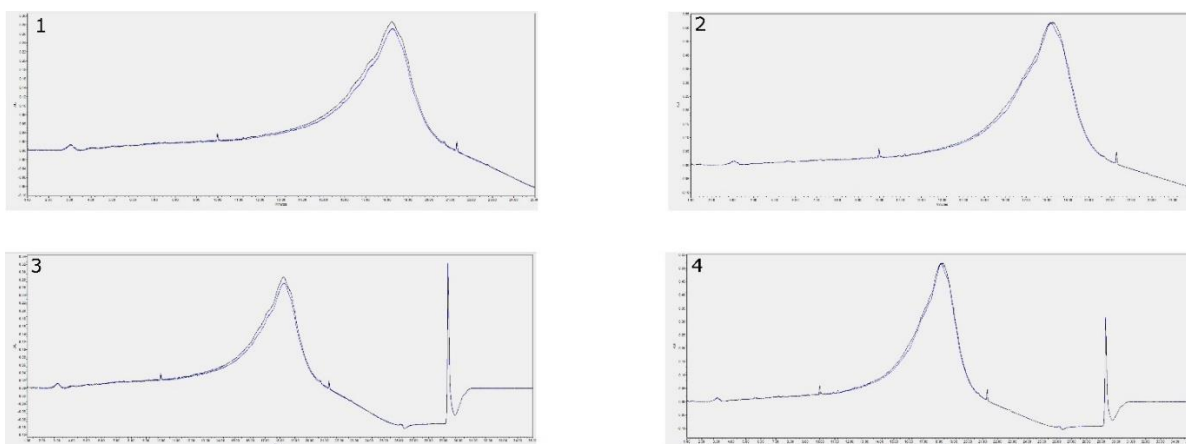


Figura 32 – Teste com amostra 210 nm. A imagem mostra 4 cromatogramas. 1: 0,5 μL da amostra 9 numa corrida por 25 min; 2: 1 μL da amostra 9 numa corrida por 25 min; 3: 0,5 μL da amostra 9 numa corrida por 35 min; 4: 1 μL da amostra 9 numa corrida por 35 min. A linha preta é o cromatograma da amostra solubilizada com acetonitrila a 10 % e a linha azul é o cromatograma da amostra solubilizada com metanol a 10 %. Todos os cromatogramas mostrados são da leitura a 210 nm.

20.3 Resultado das amostras do UPLC-PDA:

A partir dos resultados do teste de solubilização, tempo de eluição e volume de amostra injetado, foi decidido que para as demais amostras seria utilizado o metanol a 10 % como o solubilizador pois os resultados foram semelhantes para ambos os solventes testados, mas o metanol é menos tóxico, a injeção de amostra seria de 1 μL e o tempo de injeção seria de 35 minutos. Assim, todas as amostras de sobrenadante bacteriano foram preparadas para serem avaliadas em UPLC-PDA seguindo esses parâmetros.

***Pseudomonas putida* KT2440:**

A Figura 33 mostra os cromatogramas da *P. putida* KT2440 nas três diferentes metodologias de crescimento seguidas.

No cromatograma *P. putida* KT2440 M9/M9 – 7 dias em que a amostra cresceu seguindo a primeira estratégia de crescimento é possível visualizar um pico com os oligômeros de lignina indicado pela seta verde, nota-se que a diferença de tamanho entre o controle e a amostra é pequena e nos dois primeiros picos mostrados com setas vermelhas existe apenas o pico do controle, sendo que os picos da amostra do sobrenadante da bactéria não existem. A terceira e quarta setas vermelhas mostram outros 2 picos que se mantem praticamente iguais no controle e na amostra das bactérias.

No cromatograma *P. putida* KT2440 M9/M9 – 14 dias o pico indicado com a seta verde do controle e da amostra apresentam tamanhos diferentes. O pico da amostra se encontra abaixo do pico do controle e os picos indicados em vermelho seguem o mesmo aspecto da amostra com crescimento por 7 dias, os dois primeiros desaparecem na amostra e se mantem no controle e os dois últimos se mantem tanto na amostra quanto no controle.

No cromatograma *P. putida* KT2440 LB/M9 – 7 dias em que a amostra cresceu seguindo a segunda estratégia com o crescimento, no pico indicado em verde percebe-se que a amostra apresenta um pico maior que o pico do controle e os picos em vermelho seguem o mesmo padrão dos picos da primeira metodologia de crescimento. No cromatograma *P. putida* KT2440 LB/M9 – 14 dias o pico indicado pela seta verde com linha azul da amostra diminui quando comparado ao do controle e os picos indicados em vermelho seguem o mesmo padrão do crescimento com 7 dias.

No cromatograma *P. putida* KT2440 0,1/M9 – 7 dias em que a bactéria teve seu crescimento seguindo o terceiro método, percebe-se um aumento no pico da amostra em relação ao do controle indicado pela seta verde, e os picos indicados em vermelho são iguais no controle e na amostra, ou seja, as concentrações se mantiveram iguais. No cromatograma *P. putida* KT2440 0,1/M9 – 14 dias o pico indicado em verde da amostra diminui em comparação ao controle seguindo o que ocorre com todas as metodologias de crescimento, entretanto os picos indicados pelas setas vermelhas se

mantem praticamente iguais no controle e na amostra, mostrando que não houve diferença de concentração entre eles.

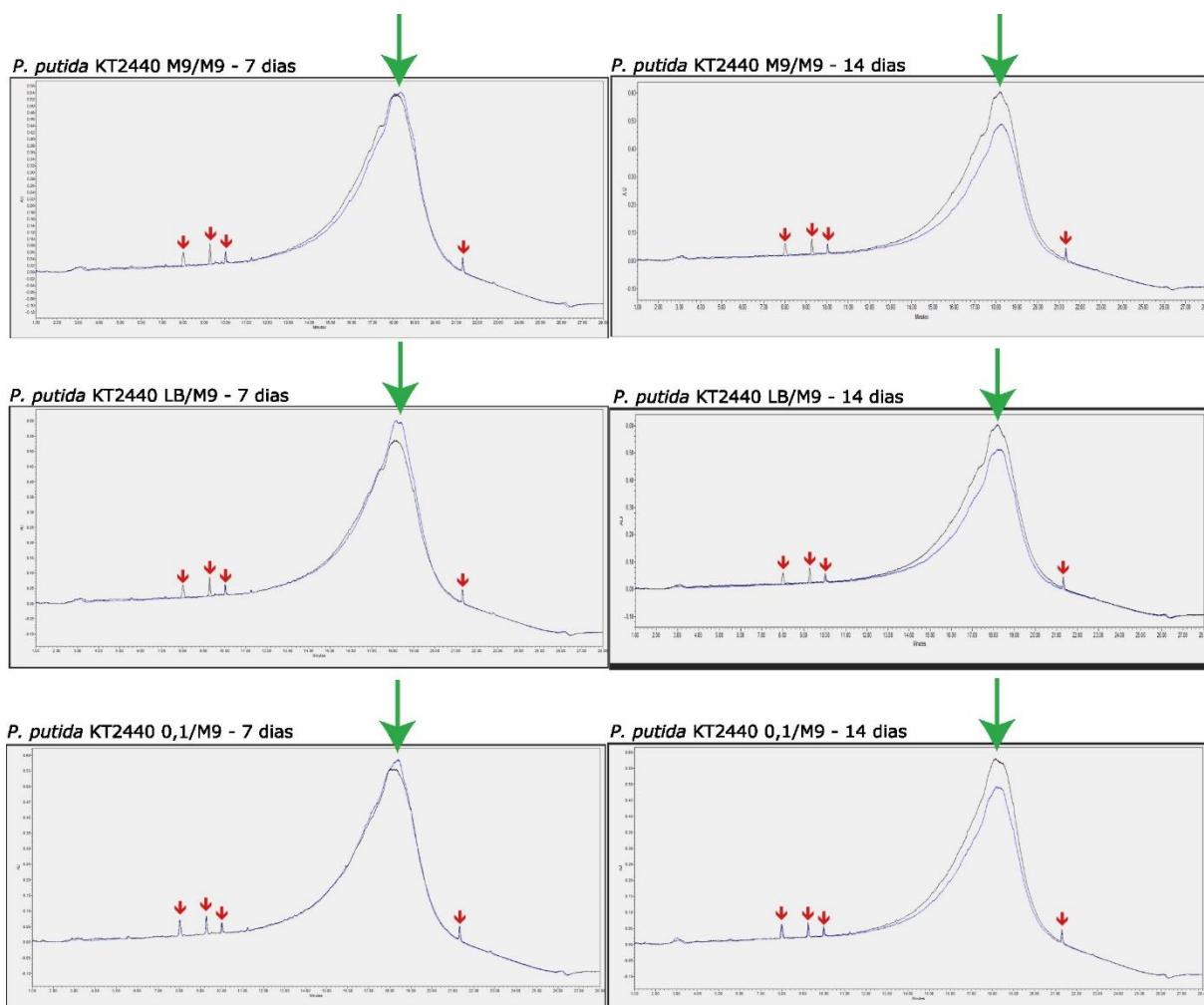


Figura 33 – Cromatogramas da *Pseudomonas putida* KT2440. A imagem mostra 6 cromatogramas do resultado da análise por UPLC-PDA dos três métodos de crescimento diferentes da bactéria a 210 nm: *P. putida* KT2440 M9/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a primeira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *P. putida* KT2440 LB/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a segunda metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *P. putida* KT2440 0,1/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a terceira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias. A seta verde indica o pico dos oligômeros de lignina e as setas vermelhas indicam picos de outras moléculas. A linha preta indica o controle negativo, meio sem inóculo e a linha azul indica a amostra com a bactéria inoculada.

***Pseudomonas citronelollis* C12:**

A Figura 34 mostra o resultado dos cromatogramas de UPLC-PDA da bactéria *Pseudomonas citronelollis* C12 crescendo nas 3 estratégias de crescimento.

No cromatograma *P. citroneolollis* C12 M9/M9 – 7 dias o pico indicado em verde da amostra aumenta em comparação ao controle, nos picos indicados em vermelho os dois primeiros e o quarto há uma diminuição do tamanho em comparação ao controle indicando uma diminuição da concentração daquela molécula representada pelo pico. No terceiro pico representado pela seta vermelha o tamanho se mantém igual entre o controle e a amostra. Além disso, 2 picos pequenos indicados pelas setas azuis aparecem entre o segundo e o terceiro pico indicados em vermelho. Esses dois picos em azul não se encontram no controle aparecendo somente na amostra do sobrenadante bacteriano.

No cromatograma *P. citroneolollis* C12 M9/M9 – 14 dias o pico representado pela seta verde tem uma diferença de tamanho entre o controle e a amostra do sobrenadante, a amostra diminui em comparação ao controle. Os picos sinalizados pelas setas vermelhas se mantem como no crescimento por 7 dias, os dois primeiros e o quarto com uma diminuição de tamanho em comparação ao controle e o terceiro se mantem praticamente inalterado. Entretanto, os dois picos que apareceram no crescimento de 7 dias indicados pelas setas azuis não aparecem mais no crescimento por 14 dias.

No cromatograma *P. citroneolollis* C12 LB/M9 – 14 dias há um aumento do pico representado pela seta verde da amostra comparada com a do controle sendo que os picos indicados pelas setas vermelhas se mantem iguais a da amostra *P. citroneolollis* C12 M9/M9 – 14 dias.

No cromatograma *P. citroneolollis* C12 0,1/M9 – 7 dias há um aumento do pico indicado em verde da amostra em comparação ao controle e os picos indicados em vermelho, os 2 primeiros diminuem na amostra e os 2 últimos se mantem iguais ao controle diferente da amostra de 7 dias seguindo a primeira metodologia de crescimento, onde o último pico vermelho diminui em relação ao controle. Aparecendo também dois novos picos indicados em azul que não existem no controle. Na mesma forma de crescimento, mas por 14 dias o pico indicado em verde da amostra diminui em comparação ao controle e os 3 primeiros picos vermelhos desaparecem, o que é interessante, pois nas outras formas de crescimento o terceiro pico em vermelho se mantinha do mesmo tamanho. O último pico em vermelho se mantem igual ao controle

e os dois picos em azul que haviam aparecido no crescimento por 7 dias desapareceram no crescimento por 14 dias.

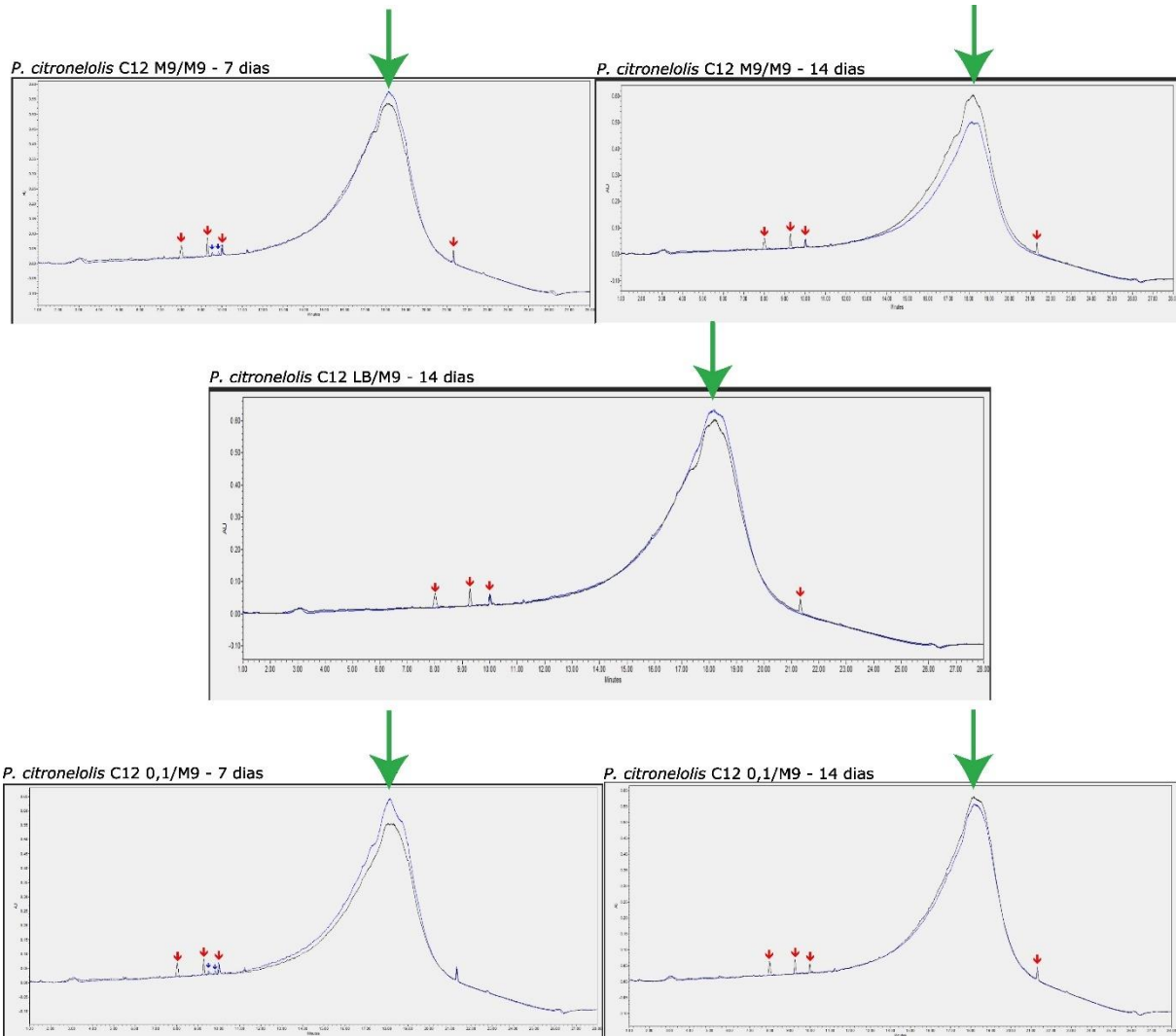


Figura 34 – Cromatogramas da *Pseudomonas citroneololis* C12. A imagem mostra 6 cromatogramas do resultado da análise por UPLC-PDA dos três métodos de crescimento diferentes da bactéria a 210 nm: *P. citroneololis* C12 M9/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a primeira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *P. citroneololis* C12 LB/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a segunda metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *P. citroneololis* C12 0,1/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a terceira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias. A seta verde indica o pico dos oligômeros de lignina, as setas vermelhas indicam picos de outras moléculas e as setas azuis indicam picos que não foram encontrados no controle, apenas na amostra. A linha preta indica o controle negativo, meio sem inóculo e a linha azul indica a amostra com a bactéria inoculada.

***Brucella intermedia* strain XG-2:**

A Figura 35 mostra os cromatogramas resultantes do crescimento da bactéria *Brucella intermedia* strain XG-2 seguindo as três diferentes metodologias de crescimento.

No cromatograma *B. intermedia* strain XG-2 M9/M9 - 7 dias há uma diminuição do pico indicado pela seta verde da amostra em comparação com o controle. O primeiro, segundo e quarto picos indicados em vermelho diminuíram de tamanho em relação ao controle sendo que o terceiro pico vermelho se mantém da mesma altura que o controle. Na amostra da mesma metodologia de crescimento, mas com 14 dias há um aumento do pico em verde em comparação ao mesmo pico do crescimento de 7 dias, porém o pico do crescimento de 14 dias ainda se mantém menor que o do controle. Os picos em vermelho se mantem iguais aos do crescimento em 7 dias.

No cromatograma *B. intermedia* strain XG-2 LB/M9 - 7 dias o pico indicado em verde da amostra diminui em relação ao controle, porém, com 14 dias de crescimento esse mesmo pico aumenta de tamanho ficando acima do pico do controle. Os 2 primeiros picos em vermelho do crescimento por 7 dias desaparecem com relação ao controle e os 2 últimos de mantem iguais aos do controle. No crescimento por 14 dias apenas o terceiro pico vermelho se mantem igual ao controle, o primeiro o segundo e o quarto desaparecem.

No cromatograma *B. intermedia* strain XG-2 0,1/M9 - 7 dias e 14 dias os picos seguem o mesmo padrão, os picos indicados em verde da amostra ficam maiores do que o do controle. Há um pico em azul que se sobrepõe ao controle ficando maior que ele nos 2 tempos de crescimento. Os picos indicados pela primeira seta vermelha desaparecem na amostra e o segundo e o terceiro pico em vermelho se mantem iguais ao controle nos dois tempos de crescimento. Entretanto, no crescimento por 7 dias entre o primeiro e o segundo pico em vermelho, 2 picos muito pequenos começam a aparecer, entretanto com 14 dias de crescimento eles não são mais visíveis.

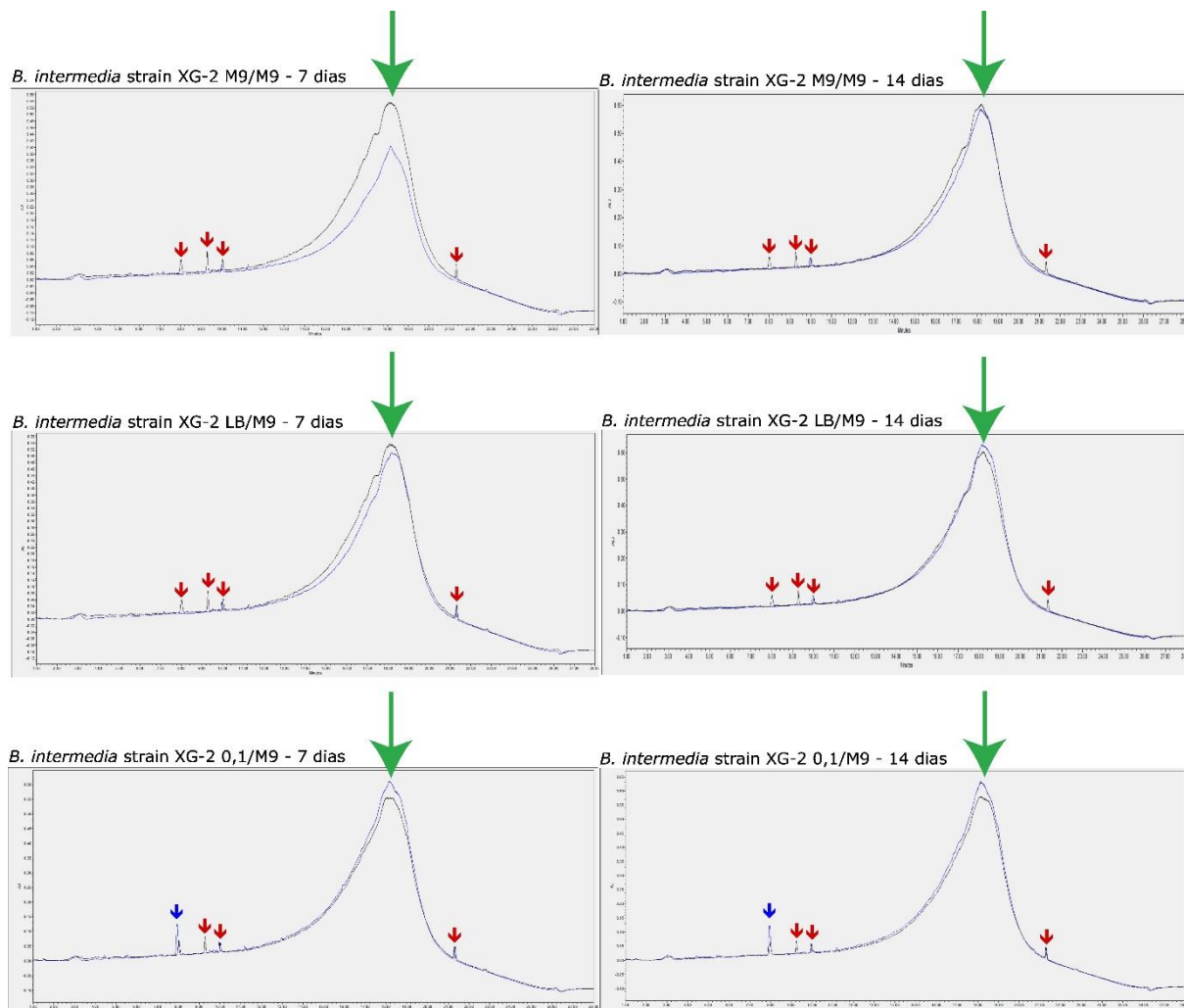


Figura 35 – Cromatogramas da *Brucella intermedia* strain XG-2. A imagem mostra 6 cromatogramas do resultado da análise por UPLC-PDA dos três métodos de crescimento diferentes da bactéria a 210 nm: *B. intermedia* strain XG-2 M9/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a primeira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *B. intermedia* strain XG-2 LB/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a segunda metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *B. intermedia* strain XG-2 0,1/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a terceira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias. A seta verde indica o pico dos oligômeros de lignina, as setas vermelhas indicam picos de outras moléculas e as setas azuis indicam picos que não foram encontrados no controle, apenas na amostra. A linha preta indica o controle negativo, meio sem inóculo e a linha azul indica a amostra com a bactéria inoculada.

***Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786:**

A Figura 36 mostra os cromatogramas resultantes do crescimento da bactéria *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 seguindo as três diferentes metodologias de crescimento.

No cromatograma *A. denitrificans* strain FDAARGOS_786 M9/M9 - 7 dias há um aumento do pico indicado em verde da amostra em comparação ao controle,

entretanto, com 14 dias de crescimento esse pico diminui de tamanho ficando menor que o pico do controle. Nos picos indicados em vermelho dos 2 períodos de crescimento ocorre a mesma coisa, os picos da amostra desaparecem em comparação com os do controle.

No cromatograma *A. denitrificans* strain FDAARGOS_786 LB/M9 - 7 dias e 14 dias, que cresceram seguindo a segunda estratégia de crescimento, o que ocorre é igual ao que ocorre nos cromatogramas que seguiram a primeira estratégia. O pico indicado em verde fica maior que o controle em 7 dias e diminui com 14 dias ficando abaixo do controle. Todos os picos indicados em vermelho das amostras desaparecem ficando apenas os do controle.

No cromatograma *A. denitrificans* strain FDAARGOS_786 0,1/M9 - 7 dias e 14 dias, o que ocorre com o pico em verde é igual ao que ocorre nas amostras anteriores. Entretanto há uma diferença nos outros picos. Nos crescimentos por 7 e dias o primeiro pico em azul fica maior que o mesmo pico do controle, sendo que no crescimento por 7 dias dois picos novos aparecem representados pela segunda e terceira setas azuis sendo que esses dois picos não aparecem no crescimento a 14 dias. Nos picos em vermelho ocorre a mesma coisa nos dois tempos de crescimento, o primeiro e o terceiro desaparecem do cromatograma e o segundo pico se mantém similar ao do controle.

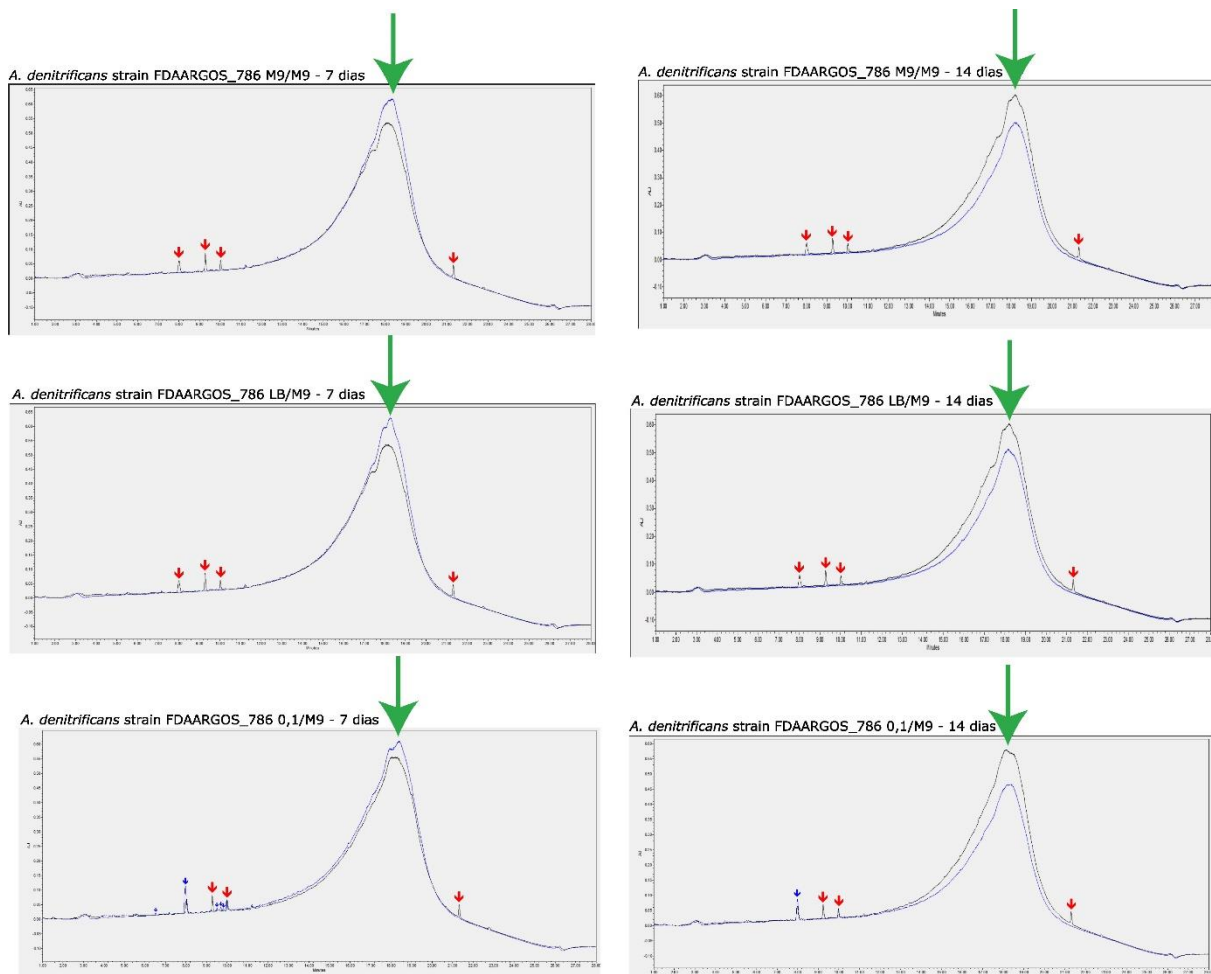


Figura 36 – Cromatogramas da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_785. A imagem mostra 6 cromatogramas do resultado da análise por UPLC-PDA dos três métodos de crescimento diferentes da bactéria a 210 nm: *A. denitrificans* strain FDAARGOS_785 M9/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a primeira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *A. denitrificans* strain FDAARGOS_785 LB/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a segunda metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *A. denitrificans* strain FDAARGOS_785 0,1/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a terceira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias. A seta verde indica o pico dos oligômeros de lignina, as setas vermelhas indicam picos de outras moléculas e as setas azuis indicam picos que não foram encontrados no controle, apenas na amostra. A linha preta indica o controle negativo, meio sem inóculo e a linha azul indica a amostra com a bactéria inoculada.

***Stenotrophomonas* sp. strain Y:**

A Figura 37 mostra os cromatogramas resultantes do crescimento da bactéria *Stenotrophomonas* sp. strain Y seguindo as três diferentes metodologias de crescimento.

Nas três diferentes metodologias de crescimento o que ocorrem nos cromatogramas é praticamente o mesmo. No crescimento por 7 dias o pico em verde

aumenta, ficando maior que o do controle, com uma diminuição desse pico com o crescimento em 14 dias, sendo que apenas a amostra crescendo por 14 dias com a segunda estratégia de crescimento manteve seu pico com um tamanho muito similar ou do controle, as outras com 14 dias tinham esse pico menor que o do controle.

O que ocorre com os picos indicados em vermelho também é muito similar entre a primeira e a segunda metodologia de crescimento. Os dois primeiros e o quarto pico indicados em vermelho desaparecem em relação ao controle, mantendo somente o terceiro similar ao controle.

Entretanto, na terceira estratégia de crescimento algo diferente ocorre, no crescimento por 7 dias um novo pico aparece indicado em azul, porém com 14 dias de crescimento esse pico não é mais visível. Somente o segundo e o quarto pico indicados em vermelho não são visíveis na amostra em relação ao controle, sendo que o primeiro e o terceiro se mantem similares ao controle. Algo diferente do que ocorreu com as outras formas de crescimento onde apenas o segundo pico vermelho se mantinha e os outros não eram visíveis.

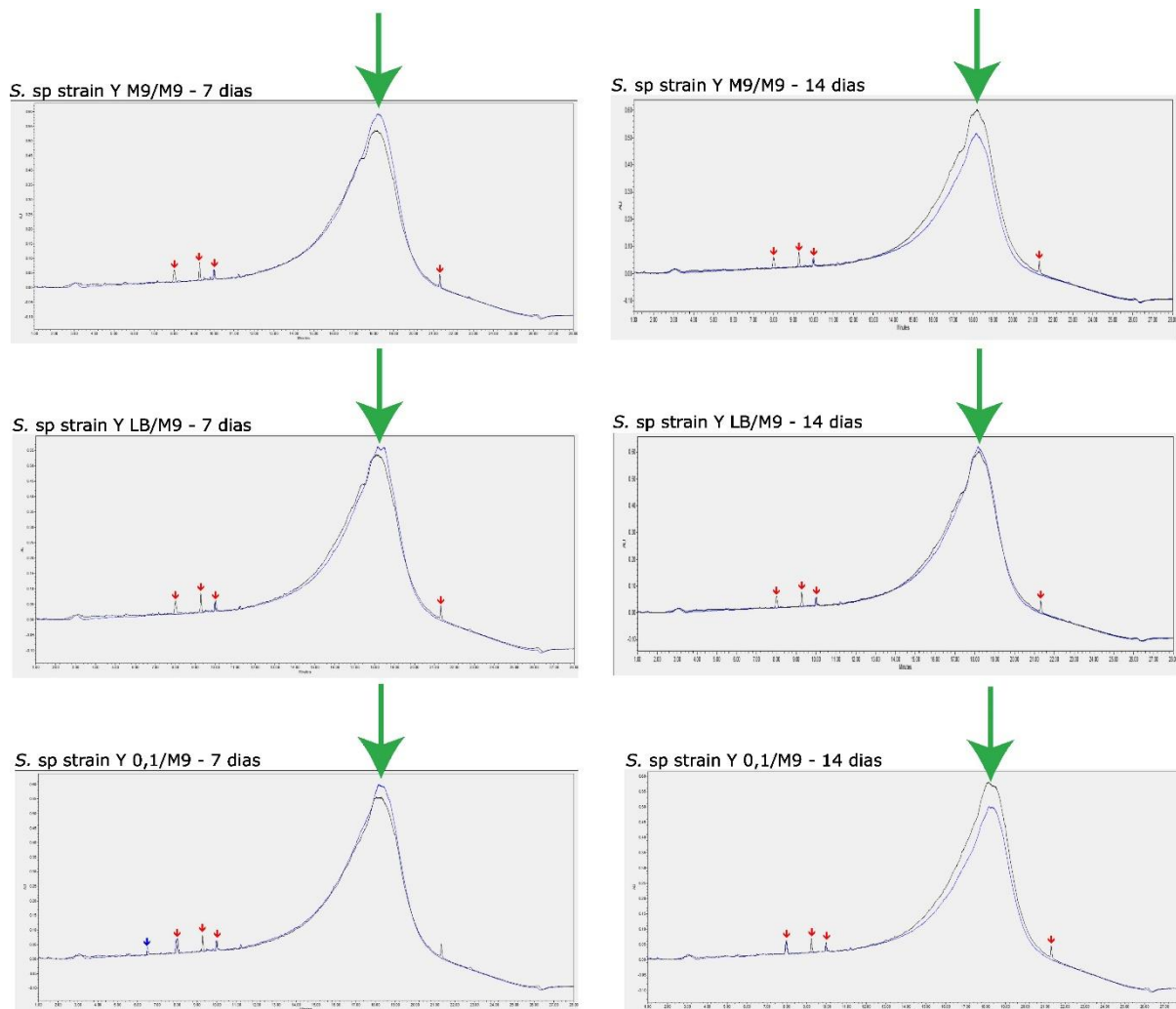


Figura 37 – Cromatogramas da *Stenotrophomonas* sp. strain Y. A imagem mostra 6 cromatogramas do resultado da análise por UPLC-PDA dos três métodos de crescimento diferentes da bactéria a 210 nm: *Stenotrophomonas* sp. strain Y M9/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a primeira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *Stenotrophomonas* sp. strain Y LB/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a segunda metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *Stenotrophomonas* sp. strain Y 0,1/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a terceira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias. A seta verde indica o pico dos oligômeros de lignina, as setas vermelhas indicam picos de outras moléculas e as setas azuis indicam picos que não foram encontrados no controle, apenas na amostra. A linha preta indica o controle negativo, meio sem inóculo e a linha azul indica a amostra com a bactéria inoculada.

***Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27:**

A Figura 38 mostra os cromatogramas resultantes do crescimento da bactéria *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 seguindo as três diferentes metodologias de crescimento.

No cromatograma *O.* sp. strain WA5-1-27 M9/M9 - 7 dias há um aumento no pico em verde em comparação com o controle. Dos quatro picos indicados em

vermelho os dois primeiros não são visíveis na amostra, apenas no controle, indicando o consumo da molécula que se encontrava naquele local do espectro. O terceiro e quarto picos indicados em vermelho ficam iguais ao da amostra controle. Dois picos aparecem indicados em azul, que não se encontravam na amostra controle. Entretanto esses dois picos em azul não são mais visíveis no crescimento por 14 dias, sendo que os picos indicados em vermelho continuam iguais aos do crescimento por 7 dias e o pico indicado em verde diminui de tamanho em comparação ao de 7 dias, porém fica de um tamanho muito similar ao do controle.

No cromatograma *O. sp.* strain WA5-1-27 LB/M9 - 7 dias o pico indicado em verde fica maior que o do controle com uma diminuição no crescimento por 14 dias se mantendo em um tamanho similar ao controle. Nos picos indicados em vermelho no crescimento por 7 dias os dois primeiros não são visíveis na amostra apenas no controle e aos dois últimos se mantem em tamanho similar ao controle. Diferente do que ocorre no crescimento por 14 dias em que o último pico vermelho também se torna visível apenas no controle e não na amostra. No crescimento por 7 dias dois picos azuis são visualizados na amostra e não existem no controle, entretanto esses dois picos somem com 14 dias de crescimento.

No cromatograma *O. sp.* strain WA5-1-27 0,1/M9 - 7 dias o pico indicado em verde também aumenta em relação ao controle, diminuindo em 14 dias de crescimento ficando em um tamanho similar ao do controle. Entretanto há o aumento de um pico indicado em azul em comparação ao controle, esse pico fica maior que o controle nos dois tempos de crescimento, sendo que esse aumento não acontece nas outras metodologias utilizadas. Dos picos indicados em vermelho o primeiro não é visível na amostra, apenas no controle e os outros dois se mantem em tamanhos similares aos do controle.

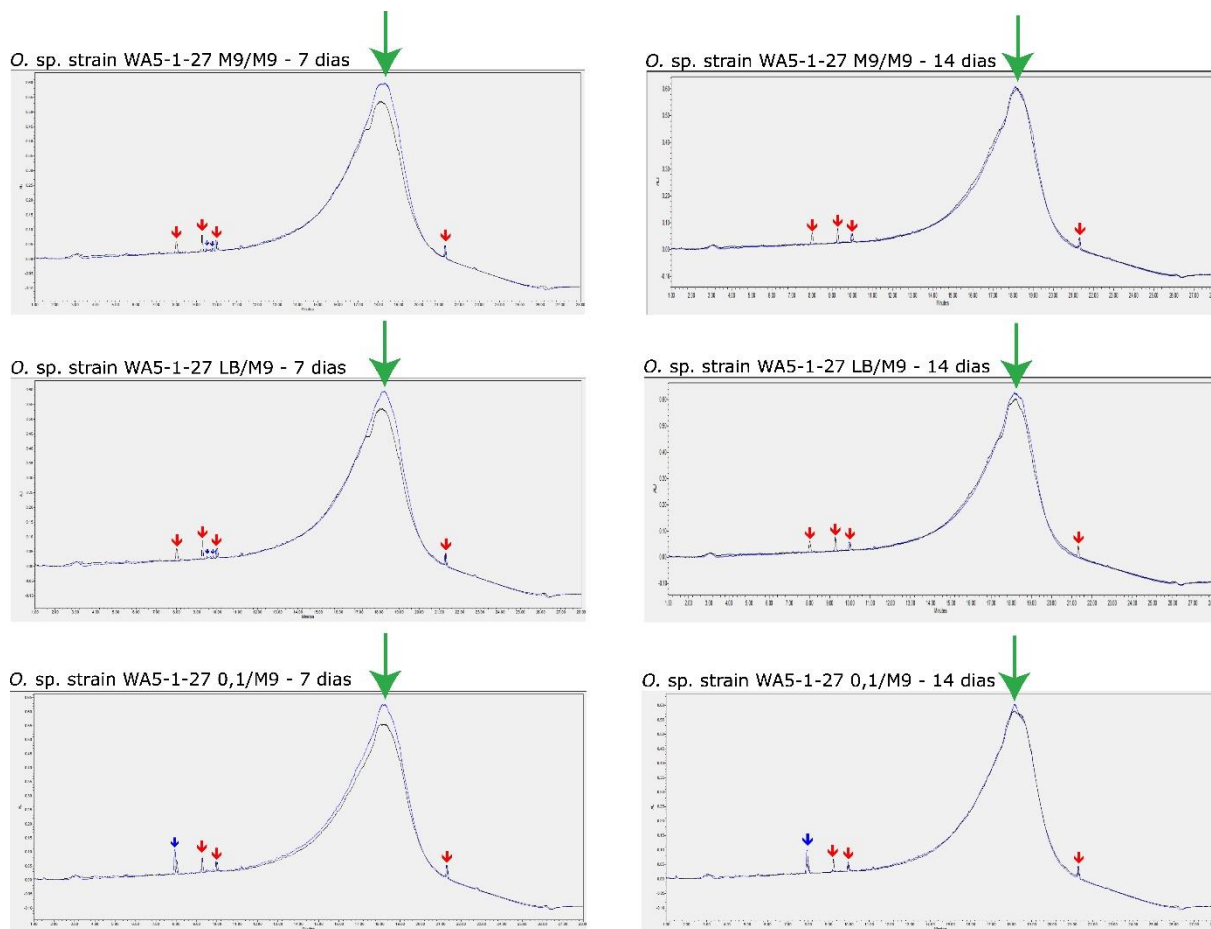


Figura 38 – Cromatogramas da *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27. A imagem mostra 6 cromatogramas do resultado da análise por UPLC-PDA dos três métodos de crescimento diferentes da bactéria a 210 nm: *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 M9/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a primeira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 LB/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a segunda metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias; *Ochrobactrum* sp. strain WA5-1-27 0,1/M9 – 7 e 14 dias: Sobrenadante da bactéria que cresceu seguindo a terceira metodologia de crescimento, por 7 e 14 dias. A seta verde indica o pico dos oligômeros de lignina, as setas vermelhas indicam picos de outras moléculas e as setas azuis indicam picos que não foram encontrados no controle, apenas na amostra. A linha preta indica o controle negativo, meio sem inóculo e a linha azul indica a amostra com a bactéria inoculada.

20.4 UHPLC-MS/MS:

Para a avaliação no UHPLC-MS/MS algumas das amostras foram selecionadas para a identificação de produtos sendo gerados. Isso foi feito, pois por conta do tempo hábil de pesquisa não seria possível analisar todas as amostras. Para isso utilizando os cromatogramas gerados como resultado da análise, os picos novos ou que ficaram maiores em relação ao controle foram selecionados para identificação.

***Pseudomonas putida* KT2440:**

A Figura 39 ilustra os dados gerados por UHPLC-MS/MS com geração do *Base Peak Chromatogram* (BPC) em modo positivo da amostra do sobrenadante da *Pseudomonas putida* KT2440 cultivada seguindo a primeira estratégia de crescimento por 14 dias. Nela é possível ver os picos de componentes encontrados na amostra. O cromatograma foi reconstruído a partir de 5 minutos para melhor visualização dos picos, pois os picos iniciais eram inespecíficos e suprimam a informação dos demais metabólitos gerados.

Na Figura 39 foram enumerados 59 picos mostrados a partir do pico 7. Após comparação com o controle da amostra, 9 picos demonstraram maior intensidade na resposta, indicando maior produção daquele composto na amostra do sobrenadante da bactéria do que no controle. Além disso, 4 picos novos apareceram na amostra que não haviam sido visualizados no controle, entretanto todos eles não foram fragmentados pelo equipamento, gerando um perfil de fragmentação para identificação dos componentes, por isso eles não foram identificados. Dos picos onde houve aumento do componente na amostra apenas 1 foi fragmentado e identificado. Esse composto foi o epóxido de rutacridona representado pelo pico de número 10.

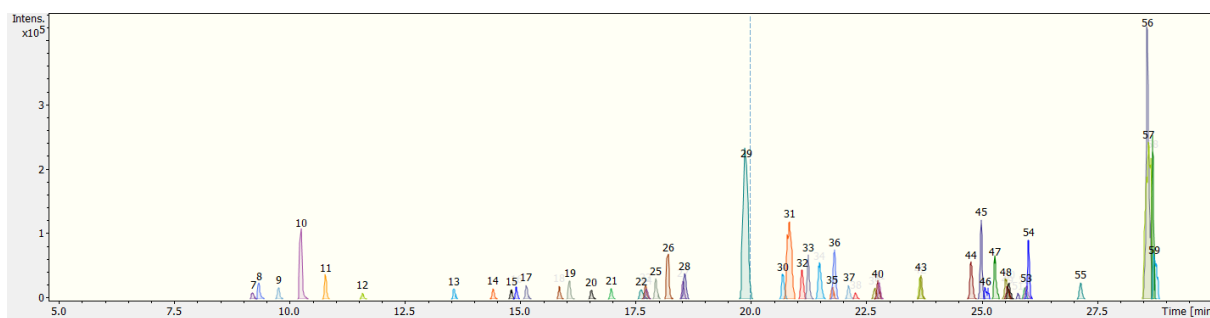


Figura 39 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da *Pseudomonas putida* KT2440 M9/M9 14 dias. A imagem mostra os picos de compostos encontrados pela análise no espectrômetro de massas, sendo cada pico representado por um número diferente, a bactéria foi cultivada seguindo a primeira estratégia de crescimento.

A Figura 40 ilustra os dados gerados por UHPLC-MS/MS com geração do BPC em modo positivo da amostra do sobrenadante da *Pseudomonas putida* KT2440 proveniente da terceira estratégia de crescimento por 14 dias. Nela é possível ver os picos de componentes encontrados na amostra. O cromatograma foi colocado a partir

de 5 minutos para melhor visualização dos picos, pois os picos iniciais eram inespecíficos e alteravam o espectro de visualização.

Na Figura 40 são enumerados 70 picos mostrados a partir do pico 11. Após comparação com o controle da amostra, 5 picos tiveram um aumento de tamanho, ou seja, havia mais daquele composto na amostra do sobrenadante da bactéria do que no controle. Além disso 2 picos novos apareceram, entretanto todos eles não foram fragmentados pelo equipamento me gerando um perfil de fragmentação para identificação dos componentes, por isso eles não foram identificados.

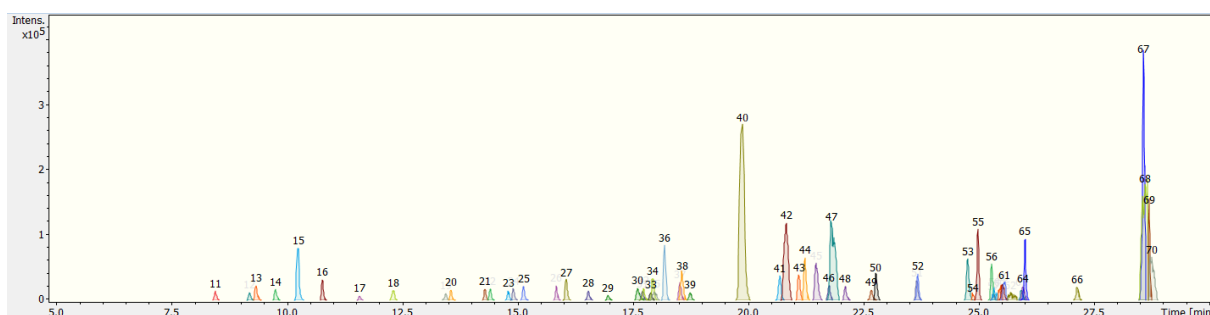


Figura 40 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da *Pseudomonas putida* KT2440 0,1/M9 14 dias. A imagem mostra os picos de compostos encontrados pela análise no espectrômetro de massas, sendo cada pico representado por um número diferente, a bactéria foi cultivada seguindo a terceira estratégia de crescimento.

***Pseudomonas citronelollis* C12:**

A Figura 41 ilustra os dados gerados por UHPLC-MS/MS com geração do BPC em modo positivo da amostra do sobrenadante da *Pseudomonas citronelollis* C12 proveniente da terceira estratégia de crescimento por 7 dias. Nela é possível ver os picos de componentes encontrados na amostra. O cromatograma foi colocado a partir de 5 minutos para melhor visualização dos picos, pois os picos iniciais eram inespecíficos e alteravam o espectro de visualização.

Na Figura 41 são enumerados 67 picos mostrados a partir do pico 10. Após comparação com o controle da amostra 21 picos tiveram um aumento de tamanho, ou seja, havia mais daquele composto na amostra do sobrenadante da bactéria do que no controle. Além disso 7 picos novos apareceram na amostra que não haviam sido visualizados no controle, entretanto todos eles não foram fragmentados pelo

equipamento gerando um perfil de fragmentação para identificação dos componentes, por isso eles não foram identificados. Dos picos 14, 18, 28, 31, 35, 36 e 41 onde houve aumento do componente na amostra 7 foram fragmentados e identificados. Dos picos fragmentados 13 possíveis compostos foram identificados são eles, o número de candidatos é maior que o número de picos, pois quando dois compostos são identificados para um mesmo pico com uma alta probabilidade de ser um deles, os dois são selecionados como possíveis candidatos dos picos, pois não se sabe qual dos dois é o candidato certo para o composto identificado. A ficina ou a isoficina são os dois possíveis compostos correspondentes ao pico 14; o epóxido de rutacridona correspondente ao pico 18; o 3-Methoxy-D-homoestra-1,3,5(10),8-tetraen-17abeta-ol ou o noretinodrel sendo os dois possíveis compostos correspondentes ao pico 28; o ácido 4-hidroxitretinoico ou o ácido 18-hidroxitretinoico ambos sendo possíveis compostos do pico 31. O 3-Hidroxi-19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ona ou o 2,6-Dimetilhexestrol ambos sendo possíveis compostos do pico 35; o ácido desidroabiético ou o ácido 9-cis-retinóico como possíveis compostos do pico 36; e o ácido 4-oxoretinoico como possível composto do pico 41.

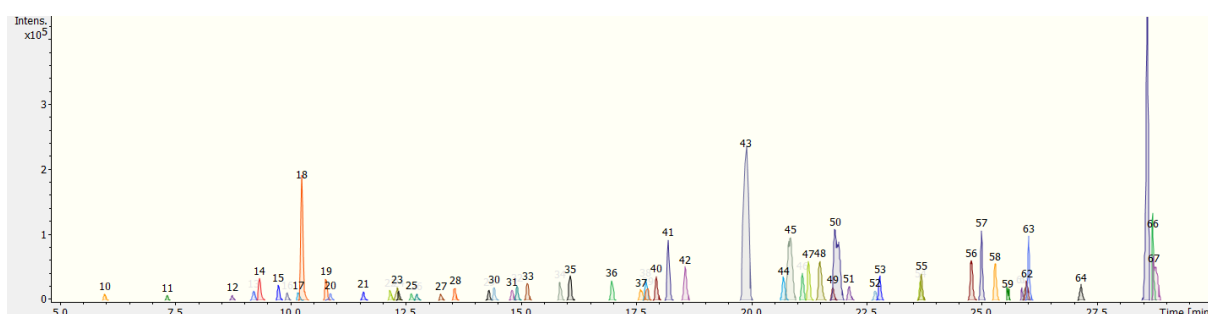


Figura 41 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da *Pseudomonas citronelollis* C12 0,1/M9 7 dias. A imagem mostra os picos de compostos encontrados pela análise no espectrômetro de massas, sendo cada pico representado por um número diferente.

***Brucella intermedia* strain XG-2:**

A Figura 42 ilustra os dados gerados por UHPLC-MS/MS com geração do BPC em modo positivo da amostra do sobrenadante da *Brucella intermedia* strain XG-2 proveniente da primeira estratégia de crescimento por 7 dias. Nela é possível ver os picos de componentes encontrados na amostra. O cromatograma foi colocado a partir

de 5 minutos para melhor visualização dos picos, pois os picos iniciais eram inespecíficos e alteravam o espectro de visualização.

Na Figura 42 são enumerados 49 picos mostrados a partir do pico 7. Após comparação com o controle da amostra 5 picos tiveram um aumento de tamanho, ou seja, havia mais daquele composto na amostra do sobrenadante da bactéria do que no controle. Além disso 3 picos novos apareceram na amostra que não haviam sido visualizados no controle, entretanto nenhum dos picos foi fragmentado pelo equipamento me gerando um perfil de fragmentação para identificação dos componentes, por isso eles não foram identificados.

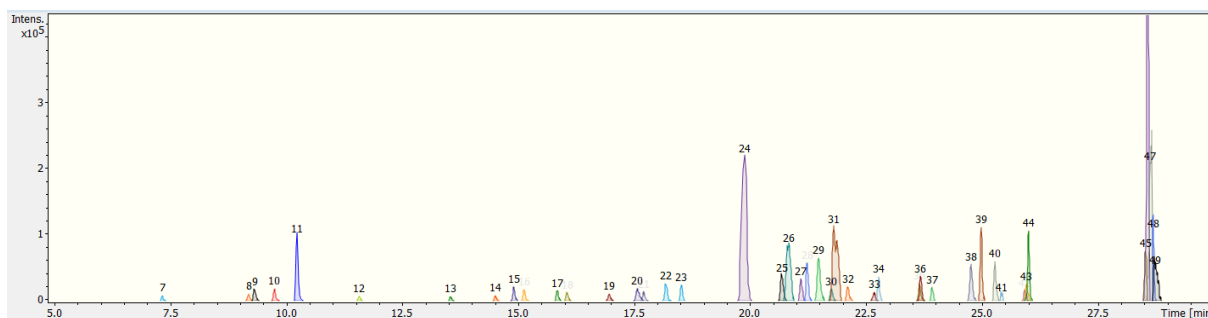


Figura 42 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da *Brucella intermedia* XG-2 M9/M9 7 dias. A imagem mostra os picos de compostos encontrados pela análise no espectrômetro de massas, sendo cada pico representado por um número diferente.

A Figura 43 ilustra os dados gerados por UHPLC-MS/MS com geração do BPC em modo positivo da amostra do sobrenadante da *Brucella intermedia* strain XG-2 proveniente da segunda estratégia de crescimento por 7 dias. Nela é possível ver os picos de componentes encontrados na amostra. O cromatograma foi colocado a partir de 5 minutos para melhor visualização dos picos, pois os picos iniciais eram inespecíficos e alteravam o espectro de visualização.

Na Figura 43 são enumerados 59 picos mostrados a partir do pico 7. Após comparação com o controle da amostra 8 picos tiveram um aumento de tamanho, ou seja, havia mais daquele composto na amostra do sobrenadante da bactéria do que no controle. Além disso 1 pico novo apareceu na amostra que não havia sido visualizado no controle, entretanto esse pico não foi fragmentado pelo equipamento me gerando um perfil de fragmentação para identificação do componente, por isso ele não foi identificado. Dos picos em que houve um aumento na concentração do

composto em comparação com o controle 2 foram fragmentados e identificados. O epóxido de rutacridona como o possível composto correspondente ao pico 12 e o ácido 9-cis-retinóico como possível composto correspondente ao pico 17.

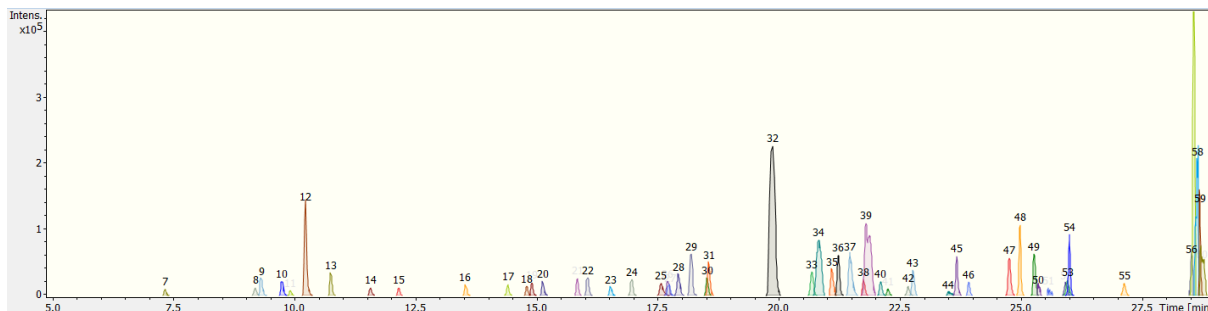


Figura 43 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da *Brucella intermedia* XG-2 LB/M9 7 dias. A imagem mostra os picos de compostos encontrados pela análise no espectrômetro de massas, sendo cada pico representado por um número diferente.

***Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786:**

A Figura 44 ilustra os dados gerados por UHPLC-MS/MS com geração do BPC em modo positivo da amostra do sobrenadante da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 proveniente da terceira estratégia de crescimento por 7 dias. Nela é possível ver os picos de componentes encontrados na amostra. O cromatograma foi colocado a partir de 5 minutos para melhor visualização dos picos, pois os picos iniciais eram inespecíficos e alteravam o espectro de visualização.

Na Figura 44 são enumerados 73 picos mostrados a partir do pico 11. Após comparação com o controle da amostra 5 picos tiveram um aumento de tamanho, ou seja, havia mais daquele composto na amostra do sobrenadante da bactéria do que no controle. Além disso 9 picos novos apareceram na amostra que não haviam sido visualizados no controle, entretanto esses picos não foram fragmentados pelo equipamento me gerando um perfil de fragmentação para identificação dos componentes, por isso eles não foram identificados. Dos picos em que houve um aumento na concentração do composto em comparação com o controle 3 foram fragmentados e identificados. O epóxido de rutacridona como o possível composto correspondente ao pico 19; O ácido desidroabietico ou o ácido 9-cis-retinóico como possíveis compostos do pico 36; e 3-Methoxy-D-homoestra-1,3,5(10),8-tetraen-17beta-ol como o possível composto do pico 44.

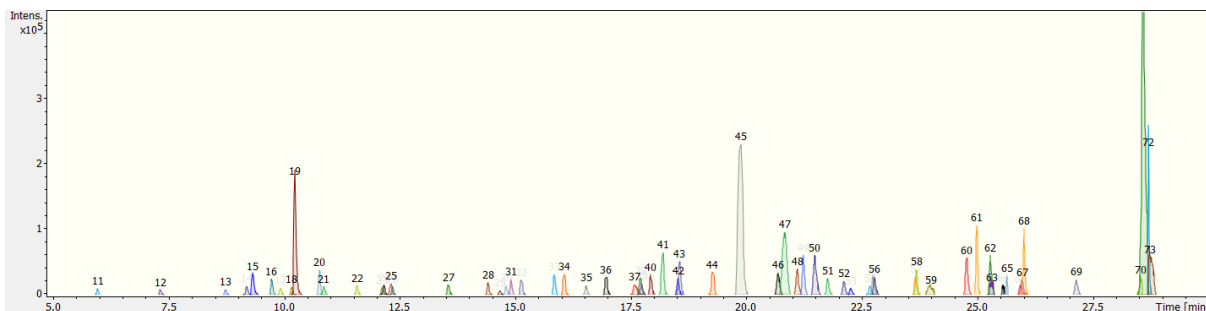


Figura 44 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 0,1/M9 7 dias. A imagem mostra os picos de compostos encontrados pela análise no espectrômetro de massas, sendo cada pico representado por um número diferente.

A Figura 45 ilustra os dados gerados por UHPLC-MS/MS com geração do BPC em modo positivo da amostra do sobrenadante da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 proveniente da terceira estratégia de crescimento por 14 dias. Nela é possível ver os picos de componentes encontrados na amostra. O cromatograma foi colocado a partir de 5 minutos para melhor visualização dos picos, pois os picos iniciais eram inespecíficos e alteravam o espectro de visualização.

Na Figura 45 são enumerados 55 picos mostrados a partir do pico 9. Após comparação com o controle da amostra 4 picos tiveram um aumento de tamanho, ou seja, havia mais daquele composto na amostra do sobrenadante da bactéria do que no controle. Além disso 7 picos novos apareceram na amostra que não haviam sido visualizados no controle. Entretanto, esses picos não foram fragmentados pelo equipamento gerando um perfil de fragmentação para identificação dos componentes, por isso eles não foram identificados.

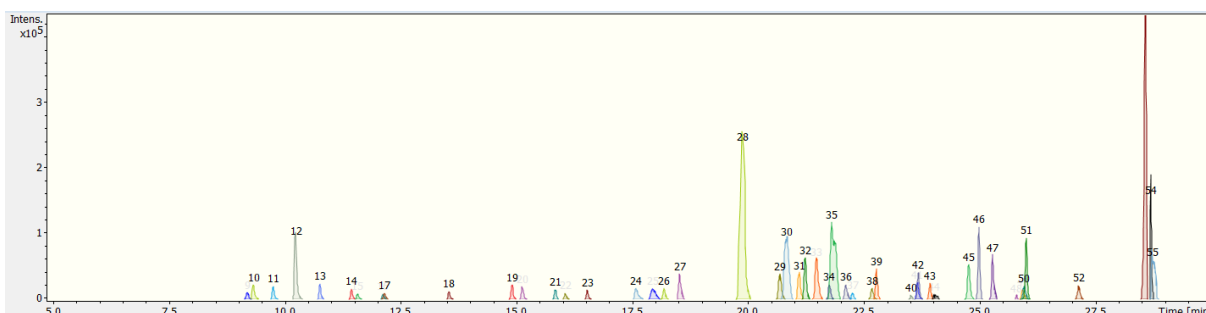


Figura 45 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 0,1/M9 14 dias. A imagem mostra os picos de compostos encontrados pela análise no espectrômetro de massas, sendo cada pico representado por um número diferente.

***Stenotrophomonas* sp. strain Y:**

A Figura 46 ilustra os dados gerados por UHPLC-MS/MS com geração do BPC em modo positivo da amostra do sobrenadante da *Stenotrophomonas* sp. strain Y proveniente da terceira estratégia de crescimento por 7 dias. Nela é possível ver os picos de componentes encontrados na amostra. O cromatograma foi colocado a partir de 5 minutos para melhor visualização dos picos, pois os picos iniciais eram inespecíficos e alteravam o espectro de visualização.

Na Figura 46 são enumerados 64 picos mostrados a partir do pico 11. Após comparação com o controle da amostra 8 picos tiveram um aumento de tamanho, ou seja, havia mais daquele composto na amostra do sobrenadante da bactéria do que no controle. Além disso 9 picos novos apareceram na amostra que não haviam sido visualizados no controle, entretanto esses picos não foram fragmentados pelo equipamento gerando um perfil de fragmentação para identificação dos componentes, por isso eles não foram identificados. Dos picos em que houve um aumento na concentração do composto em comparação com o controle apenas 1 foi fragmentado e identificado. Sendo ele o pico 14 com a ficina e a isoficina como possíveis compostos desse pico.

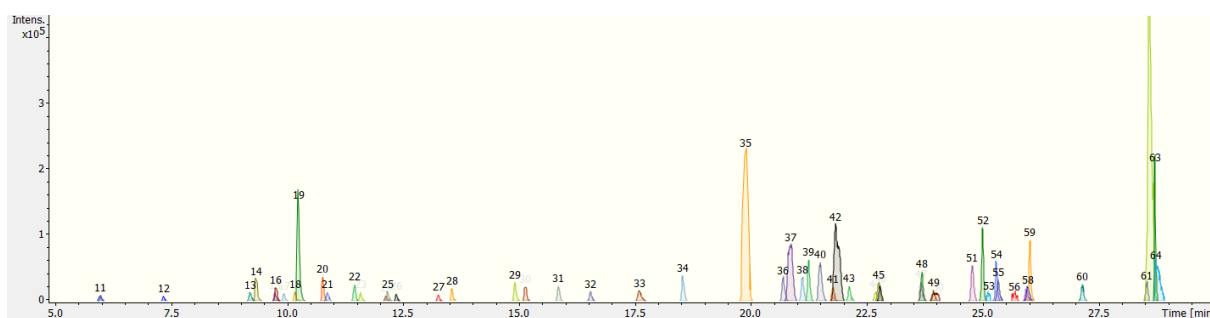


Figura 46 – Cromatogramas do UHPLC-MS/MS da *Stenotrophomonas* sp. strain Y 0,1/M9 7 dias. A imagem mostra os picos de compostos encontrados pela análise no espectrômetro de massas, sendo cada pico representado por um número diferente.

21. Discussão:

21.1 Curva de crescimento dos microrganismos nos diferentes métodos:

Com os resultados das curvas de crescimento foi possível visualizar o tempo necessário para que as bactérias cresçam, mostrando que mesmo nas 3 estratégias de crescimento houve um crescimento lento das bactérias. Entretanto pelos gráficos de crescimento, ao fim dos dias mensurados, a curva apresenta uma tendência de crescimento, indicando que as bactérias continuariam a crescer após o último dia de inóculo. Isso mostra que talvez aumentar o tempo de crescimento das bactérias pode aumentar o crescimento dos microrganismos e possivelmente melhorar a visualização de produtos. As ODs máximas atingidas foram com a bactéria *Stenotrophomonas*, seguindo a primeira estratégia de crescimento, sendo que ela atingiu a OD de 0,83 em 7 dias e 0,81 em 14 dias, ou seja, ela não conseguiu atingir a OD de 1 mesmo com 14 dias de crescimento.

Assim para aumentar a taxa de crescimento das bactérias pode se adotar a estratégia de suplementação do meio com glicose em uma baixa concentração para servir como uma fonte de carbono simples para as bactérias utilizarem e a peptona como uma fonte de nitrogênio. Isso para que o crescimento inicial das bactérias no meio aumente, o que pode melhorar a degradação de lignina total.

21.2 UPLC_PDA:

Com a análise dos sobrenadantes dos inóculos em UPLC-PDA foi possível visualizar um cromatograma com picos em diferentes tempos de retenção. Com o resultado dos cromatogramas é possível identificar que há uma diferença entre os dois tempos de crescimento e das três metodologias diferentes de crescimento.

Na Figura 33, observa-se que, após 7 dias de incubação, houve um aumento na concentração de lignina nas três condições experimentais em comparação ao controle. Esse fenômeno pode ser explicado por duas hipóteses. A primeira é a concentração das amostras, conforme apresentado no Anexo 1. A alta sensibilidade

do equipamento utilizado pode detectar pequenas variações de peso, que embora pareçam insignificantes, são perceptíveis e mensuráveis nesse contexto. A segunda hipótese é que as bactérias possuem a capacidade de solubilizar lignina. No controle, ainda restavam traços de lignina insolúvel que foram removidos apenas após a centrifugação, antes da análise no equipamento. Esses traços, presentes nas amostras com bactérias, podem ter sido solubilizados no sobrenadante. Ao final do experimento, durante a centrifugação, apenas os pellets bacterianos foram formados, sugerindo que a lignina insolúvel presente no meio foi efetivamente solubilizada.

Além disso na Figura 33 nos crescimentos por 14 dias, o pico que se supõe ser a lignina diminuía bastante comparado ao controle. Isso mostra que essas bactérias possuem a capacidade de desconstruir essa lignina. Entretanto, nenhum pico novo apareceu, o que indica que se a bactéria está gerando produtos a partir da lignina ela pode estar usando todos os produtos em seu metabolismo ou mantendo esses produtos no seu citoplasma sem secretá-los para o meio externo. Para se avaliar essa hipótese algo que pode ser feito é a lise das células bacterianas para então analisar os compostos que se encontram no citoplasma das células. E pode ser feita as análises em mais períodos de tempo para que assim se aumente a chance de encontrar os compostos que foram produzidos antes que eles sejam metabolizados pelas bactérias, para assim avaliar se os produtos gerados estão sendo consumidos pelas bactérias.

Algo semelhante acontece com as outras bactérias mostradas nas Figuras 34, 35, 36, 37 e 38, onde na maioria delas há um aumento da concentração de lignina no crescimento por 7 dias. Apenas com a *Brucella* algo diferente ocorre, Figura 35, onde há uma diminuição da concentração de lignina nos inóculos seguindo o primeiro e segundo métodos de crescimento, somente no terceiro método há um aumento na concentração de lignina, como ocorre com as outras bactérias.

Entretanto, a geração de picos novos ocorre quase exclusivamente nas amostras com 7 dias de crescimento, sendo que com 14 dias de crescimento esses picos não são mais visíveis no cromatograma. Isso é um indicativo de que os compostos representados pelos picos gerados estão sendo consumidos pelas bactérias, ou seja, elas geram esses novos compostos a partir da lignina, entretanto por eles serem menores são mais fáceis de serem utilizados pelas bactérias em seus

metabolismos. Para se evitar esse comportamento o silenciamento de genes relacionados a enzimas que clivam ligações de compostos menores provenientes da lignina pode ser feito. Assim, caso a bactéria esteja utilizando os compostos menores, com o silenciamento dos genes, esses compostos menores podem ser encontrados no sobrenadante dos inóculos. Entretanto o silenciamento dos genes é um processo que pode ser demorado e laborioso, sendo necessário conhecer o genoma completo dos microrganismos e os genes responsáveis pela desconstrução da lignina e de compostos aromáticos. Por isso os compostos não aparecem no crescimento por 14 dias.

21.3 UHPLC-MS/MS:

Os resultados obtidos a partir das análises cromatográficas de diferentes bactérias cultivadas em meio contendo lignina revelaram algumas diferenças na produção de metabólitos. Essas diferenças mostram o potencial biotecnológico dessas bactérias na bioconversão de lignina em produtos de valor agregado com possíveis aplicações industriais.

As diferentes bactérias estudadas mostraram capacidades variáveis de metabolizar lignina e produzir compostos diferenciados. Pois, mesmo alguns componentes sendo encontrados em diferentes microrganismos, alguns deles são diferentes, o que é um indicativo de que a desconstrução da lignina pode estar ocorrendo de formas diferentes em cada bactérias. A *Pseudomonas putida* KT2440 e a *Pseudomonas citronelollis* C12 foram especialmente destacadas pela produção de compostos específicos, como o epóxido de rutacridona. *Pseudomonas citronelollis* C12 demonstrou uma diversidade significativa de metabólitos identificados, o que a torna uma candidata promissora para aplicações industriais variadas, como a produção de compostos farmacêuticos e químicos.

Brucella intermedia strain XG-2 e *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 também mostraram potencial na bioconversão de lignina, com a produção de compostos como o epóxido de rutacridona e ácidos retinóicos. *Stenotrophomonas* sp. strain Y foi capaz de produzir ficinas.

Sendo os ácidos retinóicos moléculas derivadas da vitamina A e desempenham um papel na regulação do crescimento celular, diferenciação e desenvolvimento embrionário. Na indústria cosmética, são amplamente utilizados em produtos antienvhecimento e tratamentos de acne devido à sua capacidade de promover a renovação celular e melhorar a textura da pele. Sua aplicação também se estende à indústria farmacêutica, onde são estudados para o desenvolvimento de novos medicamentos devido às suas propriedades moduladoras do crescimento celular (ZASADA; BUDZISZ, 2019).

Os resultados obtidos até agora são promissores e indicam um caminho claro para a utilização de lignina como uma matéria-prima valiosa na biotecnologia industrial. A identificação e otimização da produção de metabólitos específicos podem transformar a forma como a lignina é utilizada, promovendo uma economia mais sustentável e de alto valor agregado.

22. Conclusão do capítulo:

Como conclusão deste capítulo o crescimento de 6 diferentes bactérias foi avaliado em lignina por 3 diferentes métodos de crescimento para avaliar em qual método as bactérias tiveram maior crescimento. Foram testados quais os melhores tempos de injeção, volumes de injeção e solventes para se utilizar com os liofilizados das bactérias para a passagem no UPLC-PDA. A partir disso foi definido que o melhor tempo de injeção é de 35 minutos, o melhor volume é de 1 μ L e o melhor solvente é o metanol a 10 %.

Além disso, foram avaliados em UPLC-PDA o consumo de lignina das bactérias pelos diferentes métodos de crescimento, onde foi visualizada a diminuição do pico correspondente de lignina nas bactérias que conseguiram desconstruir esse polímero. Todas as bactérias testadas conseguiram desconstruir parte da lignina em pelo menos uma das estratégias de crescimento, se destacando a bactéria *Achromobacter denitrificans* que houve certo consumo de lignina nas três estratégias de crescimento com 14 dias.

Ainda foram avaliados a presença de novos picos na análise de UHPLC-MS-MS que não se encontravam presentes nos controles o que é um indicativo de que essas bactérias estão gerando produtos a partir da lignina. Entretanto a estratégia que mais se destacou na degradação de lignina foi a primeira estratégia de cultivo onde os produtos gerados a partir da lignina foram identificados por UHPLC-MS/MS, aonde os compostos que foram devidamente fragmentados foram identificados por meio da comparação do composto intacto e dos fragmentos gerados a partir desse composto. Sendo que a cepa que se mostrou mais promissora foi a de *Pseudomonas citronelollis*, onde houve um número maior de compostos identificados quando comparados as outras bactérias testadas.

23. Conclusão final:

Este estudo explorou a capacidade das bactérias de degradar lignina a partir de amostras de solo do Cerrado brasileiro. Foram isoladas 81 bactérias após triagem, das quais 50 demonstraram capacidade de crescer em diferentes tipos de lignina, incluindo lignina Kraft industrial e organosolv industrial. A identificação taxonômica foi realizada através da extração de DNA pelo método fenol/clorofórmio e amplificação por PCR das regiões 16S, resultando no sequenciamento e identificação de 35 bactérias.

As curvas de crescimento revelaram um desenvolvimento lento das bactérias em todas as estratégias adotadas. A bactéria *Stenotrophomonas*, por exemplo, atingiu uma densidade óptica (OD) máxima de 0,83 em 7 dias e 0,81 em 14 dias, sem alcançar OD de 1. A suplementação do meio com glicose e peptona é sugerida para melhorar a taxa de crescimento, fornecendo fontes adicionais de carbono e nitrogênio, o que pode melhorar a degradação total da lignina.

A análise UPLC-PDA dos sobrenadantes indicou variações moleculares sutis, com picos em diferentes tempos de retenção. Após 7 dias de crescimento, houve um aumento na concentração de lignina, possivelmente devido à solubilização pelas bactérias. Após 14 dias, a concentração de lignina diminuiu, mas sem a aparição de novos picos, sugerindo consumo completo dos produtos gerados. A solubilização da lignina foi observada, e os compostos novos gerados pelas bactérias foram rapidamente metabolizados, especialmente entre 7 e 14 dias.

A análise UHPLC-MS/MS destacou a produção de metabólitos diferenciados, com *Pseudomonas putida* KT2440 e *Pseudomonas citronelollis* C12 sendo notáveis pela produção de compostos como epóxido de rutacridona. *Brucella intermedia* strain XG-2 e *Achromobacter denitrificans* strain FDAARGOS_786 também mostraram potencial na bioconversão de lignina, produzindo compostos como ácidos retinóicos e epóxido de rutacridona. *Stenotrophomonas* sp. strain Y destacou-se na produção de ficinas.

Os resultados indicam que as bactérias isoladas do Cerrado possuem potencial biotecnológico para a bioconversão de lignina em produtos de valor agregado.

Compreender e otimizar a produção de metabólitos específicos por essas bactérias pode transformar a utilização da lignina, promovendo uma economia mais sustentável e de valor agregado.

Como perspectiva futura do trabalho, serão testados outros métodos de crescimento das bactérias com a suplementação do meio com glicose e peptona para auxiliar no crescimento inicial das bactérias, para que assim quando elas atingirem uma densidade ótica mais alta (entre 0,8 e 1) provavelmente o consumo de lignina será maior o que pode facilitar a visualização de novos picos de compostos sendo gerados.

Além disso, as bactérias da coleção terão suas atividades enzimáticas testadas para lacase, manganês peroxidase e peroxidase de lignina. Para assim de entender melhor a atuação de cada uma das bactérias na clivagem do heteropolímero de lignina. As bactérias serão ainda testadas em suas capacidades de crescimento em monolignóis de lignina, como ácido vanílico, vanilina entre outros, para assim se avaliar a capacidade das bactérias de utilizarem os compostos relacionados a lignina em seu metabolismo e não apenas os oligômeros de lignina.

24. Referencias:

- AGUSTIN, M. B.; DE CARVALHO, D. M.; LAHTINEN, M. H.; HILDEN, K.; LUNDELL, T.; MIKKONEN, K. S. Laccase as a Tool in Building Advanced Lignin-Based Materials. **ChemSusChem**, v. 14, n. 21, p. 4615–4635, 2021.
- AHMAD, M.; LING, J.; YANG, Q.; SAJJAD, W.; ZHOU, W.; YIN, J.; DONG, J. Insight into Bacterial Community Responses to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and the Degradation Potentials of Three Bacterial Isolates in Seagrass *Halophila ovalis* Sediments. **Current Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4084–4097, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02670-y>>.
- AHMAD, M.; TAYLOR, C. R.; PINK, D.; BURTON, K.; EASTWOOD, D.; BENDING, G. D.; BUGG, T. D. H. Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 5, p. 815–821, 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ANTAI, S. P.; CRAWFORD, D. L. Degradation of Softwood, Hardwood, and Grass Lignocelluloses by Two *Streptomyces* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 378–380, 1981.
- AOYAMA, A.; YAMADA, K.; SUZUKI, Y.; KATO, Y.; NAGAI, K.; KURANE, R. Newly-Isolated Laccase High Productivity *Streptomyces* Sp. Grown In Cedar Powder as the Sole Carbon Source. v. 04, n. 2, 2014.
- ARGYROPOULOS, D. D. S.; CRESTINI, C.; DAHLSTRAND, C.; FURUSJÖ, E.; GIOIA, C.; JEDVERT, K.; HENRIKSSON, G.; HULTEBERG, C.; LAWOKO, M.; PIERROU, C.; SAMEC, J. S. M.; SUBBOTINA, E.; WALLMO, H.; WIMBY, M. Kraft Lignin: A Valuable, Sustainable Resource, Opportunities and Challenges. **ChemSusChem**, v. 202300492, 2023.
- ARO, T.; FATEHI, P. Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. **ChemSusChem**, v. 10, n. 9, p. 1861–1877, 2017.
- ASHOK, K.; GAUTAM, S.; ANROOP, N.; RISHBHA, S. UPLC a preeminent technique in pharmaceutical analysis. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 69, n. 3, p. 371–380, 2012.
- AWAN, I. Z.; TANCHOUX, N.; QUIGNARD, F.; ALBONETTI, S.; CAVANI, F.; DI RENZO, F. Heterogeneous Catalysis as a Tool for Production of Aromatic Compounds from Lignin. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 178, n. March, p. 257–275, 2019.
- BARTON, N.; HORBAL, L.; STARCK, S.; KOHLSTEDT, M.; LUZHETSKYY, A.; WITTMANN, C. Enabling the valorization of guaiacol-based lignin: Integrated chemical and biochemical production of cis,cis-muconic acid using metabolically engineered *Amycolatopsis* sp ATCC 39116. **Metabolic Engineering**, v. 45, n. October 2017, p. 200–210, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.12.001>>.
- BENAIMECHE, O.; SEGHIR, N. T.; SADOWSKI, Ł.; MELLAS, M. **The Utilization of Vegetable Fibers in Cementitious Materials**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2020. v. 1–5649–662 p.
- BENJAMIN, S.; KAMIMURA, N.; TAKAHASHI, K.; MASAI, E. *Achromobacter denitrificans* SP1 efficiently utilizes 16 phthalate diesters and their downstream products through protocatechuate 3,4-cleavage pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 172–178, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.028>>.
- BHATIA, S. K.; JAGTAP, S. S.; BEDEKAR, A. A.; BHATIA, R. K.; PATEL, A. K.; PANT, D.; RAJESH BANU, J.; RAO, C. V.; KIM, Y. G.; YANG, Y. H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 300, n. December 2019, p. 122724, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>>.
- BHATTACHARYYA, M.; DHAR, R.; BASU, S.; DAS, A.; REYNOLDS, D. M.; DUTTA, T. K. Molecular

evaluation of the metabolism of estrogenic di(2-ethylhexyl) phthalate in *Mycolicibacterium* sp. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2023.

BIBI, F.; YASIR, M.; SONG, G. C.; LEE, S. Y.; CHUNG, Y. R. Diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on oomycetous plant pathogens. **Plant Pathology Journal**, v. 28, n. 1, p. 20–31, 2012.

BONECHI, C.; CONSUMI, M.; DONATI, A.; LEONE, G.; MAGNANI, A.; TAMASI, G.; ROSSI, C. **Biomass: An overview**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. 3–42 p.

BUSZEWSKI, B.; ROGOWSKA, A.; POMASTOWSKI, P.; ZŁOCH, M.; RAILEAN-PLUGARU, V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 6, p. 1607–1623, 2017.

C.F.POOLE. The Family of Chromatographic Techniques. **Techniques**, p. 40–64, 2000.

CATUCCI, G.; VALETTI, F.; SADEGHI, S. J.; GILARDI, G. Biochemical features of dye-decolorizing peroxidases: Current impact on lignin degradation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 5, p. 751–759, 2020.

CHADDAD, F. **The Economics and Organization of Brazilian Agriculture**. [s.l.: s.n.]19–44 p.

CHANDRA, R.; RAJ, A.; PUROHIT, H. J.; KAPLEY, A. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste. **Chemosphere**, v. 67, n. 4, p. 839–846, 2007.

CHAPMAN, P. J.; RIBBONS, D. W. Metabolism of resorcinylic compounds by bacteria: alternative pathways for resorcinol catabolism in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 3, p. 985–998, 1976.

CHEN, H. **Lignocellulose biorefinery feedstock engineering**. [s.l.: s.n.]37–86 p.

CHEN, P.; YAN, L.; ZHANG, S.; WU, Z.; LI, S.; YAN, X.; WANG, N.; LIANG, N.; LI, H. Optimizing bioconversion of ferulic acid to vanillin by *Bacillus subtilis* in the stirred packed reactor using Box-Behnken design and desirability function. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 143–152, 2017.

CHOI, S.; LEE, H. N.; PARK, E.; LEE, S. J.; KIM, E. S. Recent advances in microbial production of cis,cis-muconic acid. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1–14, 2020.

CHONG, G. G.; HUANG, X. J.; DI, J. H.; XU, D. Z.; HE, Y. C.; PEI, Y. N.; TANG, Y. J.; MA, C. L. Biodegradation of alkali lignin by a newly isolated *Rhodococcus pyridinivorans* CCZU-B16. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 4, p. 501–510, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00449-017-1884-x>>.

CHOW, K. T.; POPE, M. K.; DAVIES, J. Characterization of a vanillic acid non-oxidative decarboxylation gene cluster from *Streptomyces* sp. D7 The GenBank accession number for the sequence reported in this paper is AF134589. **Microbiology**, v. 145, n. 9, p. 2393–2403, 1999.

CHOWDHURY, S. P.; KHANNA, S.; VERMA, S. C.; TRIPATHI, A. K. Molecular diversity of tannic acid degrading bacteria isolated from tannery soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1210–1219, 2004.

CHUNG, S. Y.; MAEDA, M.; SONG, E.; HORIKOSHI, K.; KUDO, T. A Gram-positive Polychlorinated Biphenyl-degrading Bacterium, *Rhodococcus erythropolis* Strain TA421, Isolated from a Termite Ecosystem. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 2111–2113, 1994.

COSKUN, O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.

CRONIN, C. N.; KIM, J.; FULLER, J. H.; ZHANG, X.; MCINTIRE, W. S. Organization and sequences of p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase and other plasmid-encoded genes for early enzymes of the p-cresol degradative pathway in *Pseudomonas Putida* NCIMB 9866 and 9869. **Mitochondrial DNA**, v. 10, n. 1, p. 7–17, 1999.

CUI, D.; KONG, L.; WANG, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, C. In situ identification of environmental

microorganisms with Raman spectroscopy. **Environmental Science and Ecotechnology**, v. 11, p. 100187, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ese.2022.100187>>.

DAVIS, J. R.; SELLO, J. K. Regulation of genes in *Streptomyces* bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 921–929, 2010.

DE-SOUZA, M. T.; BRIGIDO, M. de M.; MARANHÃO, A. Q. **TECNICAS BASICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR ED. 2**. 2nd. ed. [s.l.] Universidade de Brasília, 2016. 69–72 p.

DE CASTRO, A. P.; DA SILVA, M. R. S. S.; QUIRINO, B. F.; DA CUNHA BUSTAMANTE, M. M.; KRÜGER, R. H. Microbial diversity in cerrado biome (neotropical savanna) soils. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

DE CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; ALLEN, H.; WILLIAMSON, L. L.; HANDELSMAN, J.; KRÜGER, R. H. Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 11, p. 2169–2175, 2011.

DEANGELIS, K. M.; D'HAESELEER, P.; CHIVIAN, D.; FORTNEY, J. L.; KHUDYAKOV, J.; SIMMONS, B.; WOO, H.; ARKIN, A. P.; DAVENPORT, K. W.; GOODWIN, L.; CHEN, A.; IVANOVA, N.; KYRPIDES, N. C.; MAVROMATIS, K.; WOYKE, T.; HAZEN, T. C. Complete genome sequence of “*enterobacter lignolyticus*” SCF1. **Standards in Genomic Sciences**, v. 5, n. 1, p. 69–85, 2011.

DEANGELIS, K. M.; GLADDEN, J. M.; ALLGAIER, M.; D'HAESELEER, P.; FORTNEY, J. L.; REDDY, A.; HUGENHOLTZ, P.; SINGER, S. W.; VANDER GHEYNST, J. S.; SILVER, W. L.; SIMMONS, B. A.; HAZEN, T. C. Strategies for enhancing the effectiveness of metagenomic-based enzyme discovery in lignocellulolytic microbial communities. **Bioenergy Research**, v. 3, n. 2, p. 146–158, 2010.

DEANGELIS, K. M.; SHARMA, D.; VARNEY, R.; SIMMONS, B.; ISERN, N. G.; MARKILLIE, L. M.; NICORA, C.; NORBECK, A. D.; TAYLOR, R. C.; ALDRICH, J. T.; ROBINSON, E. W. Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in *Enterobacter lignolyticus* SCF1. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. SEP, p. 1–14, 2013.

DELNERI, D.; DEGRASSI, G.; RIZZO, R.; BRUSCHI, C. V. Degradation of trans-ferulic and p-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586. **BBA - General Subjects**, v. 1244, n. 2–3, p. 363–367, 1995.

DESCHAMPS, A. M.; MAHOUDEAU, G.; LEBEAULT, J. M. Fast degradation of kraft lignin by bacteria. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 45–51, 1980.

DHARMARAJA, J.; SHOBANA, S.; ARVINDNARAYAN, S.; FRANCIS, R. R.; JEYAKUMAR, R. B.; SARATALE, R. G.; ASHOKKUMAR, V.; BHATIA, S. K.; KUMAR, V.; KUMAR, G. Lignocellulosic biomass conversion via greener pretreatment methods towards biorefinery applications. **Bioresource Technology**, v. 369, p. 128328, 2023.

FANG, Z.; MEIER, M. S. Toward the oxidative deconstruction of lignin: Oxidation of β -1 and β -5 linkages. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 2330–2341, 2018.

FARRANCE, C. E. Identification of micro-organisms. **Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control: Practical Guide for Non-Sterile Manufacturing, First Edition**, p. 265–328, 2019.

FERONE, M.; GOWEN, A.; FANNING, S.; SCANNELL, A. G. M. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3106–3129, 2020.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVAL, P. T.; ODA, S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea* agglomerans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, n. 1, p. 8–14, 2008.

FISCHER, R.; BLEICHRODT, F. S.; GERISCHER, U. C. Aromatic degradative pathways in *Acinetobacter baylyi* underlie carbon catabolite repression. **Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 3095–3103, 2008.

FRANCO-DUARTE, R.; ČERNÁKOVÁ, L.; KADAM, S.; KAUSHIK, K. S.; SALEHI, B.; BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; ANTOLAK, H.; DYBKA-STĘPIEŃ, K.; LESZCZEWICZ, M.; TINTINO, S. R.; DE SOUZA, V. C. A.; SHARIFI-RAD, J.; COUTINHO, H. D. M.; MARTINS, N.; RODRIGUES, C. F. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, 2019.

GIACOMUCCI, L.; RADDADI, N.; SOCCIO, M.; LOTTI, N.; FAVA, F. Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. **New Biotechnology**, v. 52, n. April, p. 35–41, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.04.005>>.

GIROUX, H.; VIDAL, P.; BOUCHARD, J.; LAMY, F. Degradation of Kraft Indulin Lignin by *Streptomyces viridosporus* and *Streptomyces badius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 3064–3070, 1988.

GOMILA, M.; PEÑA, A.; MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–13, 2015.

GONZALEZ, B.; ACEVEDO, C.; BREZNY, R.; JOYCE, T. Metabolism of chlorinated guaiacols by a guaiacol-degrading *Acinetobacter junii* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3424–3429, 1993.

GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H.-J.; TRUJILLO, M. E. .; SUZUKI, K.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology_ Volume Five The Actinobacteria**. Heidelberg London: Springer New York Dordrecht, 2012.

GRADÍSSIMO, D. G.; XAVIER, L. P.; SANTOS, A. V. Cyanobacterial polyhydroxyalkanoates: A sustainable alternative in circular economy. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 1–23, 2020.

GRAF, N.; ALTENBUCHNER, J. Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 137–149, 2014.

GRBIC-GALIC, D. Fermentative and oxidative transformation of ferulate by a facultatively anaerobic bacterium isolated from sewage sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1052–1057, 1985.

GRGAS, D.; RUKAVINA, M.; BEŠLO, D.; ŠTEFANAC, T.; CRNEK, V.; ŠIKIĆ, T.; HABUDA-STANIĆ, M.; LANDEKA DRAGIČEVIĆ, T. The Bacterial Degradation of Lignin—A Review. **Water**, v. 15, n. 7, p. 1272, 23 mar. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4441/15/7/1272>>.

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–41, 2018.

HARAZONO, K.; YAMASHITA, N.; SHINZATO, N.; WATANABE, Y.; FUKATSU, T.; KURANE, R. Isolation and Characterization of Aromatics-degrading Microorganisms from the Gut of the Lower Termite *Coptotermes*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 889–892, 2003.

HE, Y.; LI, X.; BEN, H.; XUE, X.; YANG, B. Lipid Production from Dilute Alkali Corn Stover Lignin by *Rhodococcus* Strains. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 3, p. 2302–2311, 2017.

HENSON, W. R.; CAMPBELL, T.; DELORENZO, D. M.; GAO, Y.; BERLA, B.; KIM, S. J.; FOSTON, M.; MOON, T. S.; DANTAS, G. Multi-omic elucidation of aromatic catabolism in adaptively evolved *Rhodococcus opacus*. **Metabolic Engineering**, v. 49, n. March, p. 69–83, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.06.009>>.

HIROSE, J.; NAGAYOSHI, A.; YAMANAKA, N.; ARAKI, Y.; YOKOI, H. Isolation and characterization of bacteria capable of metabolizing lignin-derived low molecular weight compounds. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 4, p. 736–741, 2013.

HIROSE, J.; TSUDA, N.; MIYATAKE, M.; YOKOI, H.; SHIMODAIRAB, J. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain LLC-1 (NBRC 111237), Capable of Metabolizing Lignin-Derived Low-Molecular-Weight Compounds. v. 1, n. Nbrc 111237, p. 1–2, 2018.

- HOSSEINI KOUPAIE, E.; DAHADHA, S.; BAZYAR LAKEH, A. A.; AZIZI, A.; ELBESHISHY, E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. **Journal of Environmental Management**, v. 233, n. September, p. 774–784, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.106>>.
- HOUSTON, R. W.; ABDOULMOUMINE, N. H. Investigation of the thermal deconstruction of β - β' and 4-O-5 linkages in lignin model oligomers by density functional theory (DFT). **RSC Advances**, v. 13, n. 9, p. 6181–6190, 2023.
- HUANG, J.; FU, S.; GAN, L. **Lignin Chemistry and Applications**; [s.l.] Elsevier, 2019. 25–60 p.
- HUANG, X. F.; SANTHANAM, N.; BADRI, D. V.; HUNTER, W. J.; MANTER, D. K.; DECKER, S. R.; VIVANCO, J. M.; REARDON, K. F. Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 1616–1626, 2013.
- HUGHES, E. J. L.; BAYLY, R. C. Control of catechol meta-cleavage pathway in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 3, p. 1363–1370, 1983.
- ISHIYAMA, D.; VUJAKLIJA, D.; DAVIES, J. Novel Pathway of Salicylate Degradation by *Streptomyces* sp. Strain WA46. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1297–1306, 2004.
- ISLER, B.; KIDD, T. J.; STEWART, A. G.; HARRIS, P.; PATERSON, D. L. *Achromobacter* infections and treatment options. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 11, p. 1–16, 2020.
- IWABUCHI, N.; TAKIGUCHI, H.; HAMAGUCHI, T.; TAKIHARA, H.; SUNAIRI, M.; MATSUFUJI, H. Transformation of Lignin-Derived Aromatics into Nonaromatic Polymeric Substances with Fluorescent Activities (NAPSFA) by *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 3, n. 11, p. 2678–2685, 2015.
- JANG, K. S.; KIM, Y. H. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 209–216, 2018.
- JANUSZ, G.; PAWLIK, A.; ŚWIDERSKA-BUREK, U.; POLAK, J.; SULEJ, J.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; PASZCZYŃSKI, A. Laccase properties, physiological functions, and evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 2020.
- JIMÉNEZ, J. I.; MIÑAMBRES, B.; GARCÍA, J. L.; DÍAZ, E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 824–841, 19 dez. 2002. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-2920.2002.00370.x>>.
- JURKOVÁ, M.; WURST, M. Biodegradation of aromatic carboxylic acids by *Pseudomonas mira*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 111, n. 2–3, p. 245–250, 1993.
- KAMARDAN, M. I. F.; MARSID, E. A. B.; AKHIR, F. N. M.; YUZIR, M. A. M.; OTHMAN, N.; HARA, H. **Isolation and characterization of Lignin-derived monomer degraders under acidic conditions from tropical peatland** *Journal of General and Applied Microbiology* 2022.
- KARLSON, U.; DWYER, D. F.; HOOPER, S. W.; MOORE, E. R. B.; TIMMIS, K. N.; ELTIS, L. D. Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 5, p. 1467–1474, 1993.
- KATO, K.; KOZAKI, S.; SAKURANAGA, M. Degradation of Lignin Compounds by Bacteria from Termite Guts. v. 20, p. 459–462, 1998. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1005432027603>>.
- KOSA, M.; RAGAUSKAS, A. J. Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous *Rhodococci*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 891–900, 2012.
- KOSA, M.; RAGAUSKAS, A. J. Lignin to lipid bioconversion by oleaginous *Rhodococci*. **Green Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 2070–2074, 2013.
- KUHNIGK, T.; KÖNIG, H. Degradation of dimeric lignin model compounds by aerobic bacteria isolated from the hindgut of xylophagous termites. **Journal of Basic Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 205–211, 1997.

KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03170, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LEE, R. A.; BÉDARD, C.; BERBERI, V.; BEAUCHET, R.; LAVOIE, J. M. UV-Vis as quantification tool for solubilized lignin following a single-shot steam process. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 658–663, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.045>>.

LETOURNEAU, D. R.; VOLMER, D. A. Mass spectrometry-based methods for the advanced characterization and structural analysis of lignin: A review. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 42, n. 1, p. 144–188, 2023.

LI, X.; HE, Y.; ZHANG, L.; XU, Z.; BEN, H.; GAFFREY, M. J.; YANG, Y.; YANG, S.; YUAN, J. S.; QIAN, W. J.; YANG, B. Discovery of potential pathways for biological conversion of poplar wood into lipids by co-fermentation of Rhodococci strains. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1395-x>>.

LIANG, D. hui; HU, Y. Simultaneous sulfamethoxazole biodegradation and nitrogen conversion by *Achromobacter* sp. JL9 using with different carbon and nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 293, n. August, p. 122061, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122061>>.

LIU, H.; LIU, Z. H.; ZHANG, R. K.; YUAN, J. S.; LI, B. Z.; YUAN, Y. J. Bacterial conversion routes for lignin valorization. **Biotechnology Advances**, v. 60, n. May, p. 108000, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108000>>.

LIU, Q.; LUO, L.; ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

LIU, X.; DING, S.; GAO, F.; WANG, Y.; TAHERZADEH, M. J.; WANG, Y.; QIN, X.; WANG, X.; LUO, H.; YAO, B.; HUANG, H.; TU, T. Exploring the cellulolytic and hemicellulolytic activities of manganese peroxidase for lignocellulose deconstruction. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-023-02386-0>>.

LIU, Y.; LUO, G.; NGO, H. H.; GUO, W.; ZHANG, S. Advances in thermostable laccase and its current application in lignin-first biorefinery: A review. **Bioresource Technology**, v. 298, n. November 2019, 2020.

LU, Y.; LU, Y. C.; HU, H. Q.; XIE, F. J.; WEI, X. Y.; FAN, X. Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. **Journal of Spectroscopy**, v. 2017, 2017.

MAHIUDDIN, M.; FAKHRUDDIN, A. N. M.; ABDULLAH-AL-MAHIN. Degradation of Phenol via Meta Cleavage Pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1 . **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

MANTER, D. K.; HUNTER, W. J.; VIVANCO, J. M. *Enterobacter soli* sp. nov.: A lignin-degrading γ -Proteobacteria isolated from soil. **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1044–1049, 2011.

MARTÍNKOVÁ, L.; GRULICH, M.; PÁTEK, M.; KŘÍSTKOVÁ, B.; WINKLER, M. Bio-Based Valorization of Lignin-Derived Phenolic Compounds: A Review. **Biomolecules**, v. 13, n. 5, 2023.

MAZZOLI, R.; PESSIONE, E.; GIUFFRIDA, M. G.; FATTORI, P.; BARELLO, C.; GIUNTA, C.; LINDLEY, N. D. Degradation of aromatic compounds by *Acinetobacter radioresistens* S13: Growth characteristics on single substrates and mixtures. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 1, p. 55–68, 2007.

MENDES, I. V.; GARCIA, M. B.; BITENCOURT, A. C. A.; SANTANA, R. H.; DE CASTRO LINS, P.; SILVEIRA, R.; SIMMONS, B. A.; GLADDEN, J. M.; KRUGER, R. H.; QUIRINO, B. F. Bacterial diversity dynamics in microbial consortia selected for lignin utilization. **PLoS ONE**, v. 16, n. 9 September, p. 1–20, 2021.

MORENO, E.; MIDDLEBROOK, E. A.; ALTAMIRANO-SILVA, P.; AL DAHOUK, S.; ARAJ, G. F.; ARCE-GORVEL, V.; ARENAS-GAMBOA, Á.; ARIZA, J.; BARQUERO-CALVO, E.; BATTELLI, G.;

BERTU, W. J.; MARÍA BLASCO, J.; BOSILKOVSKI, M.; CADMUS, S.; CASWELL, C. C.; CELLI, J.; CHACÓN-DÍAZ, C.; CHAVES-OLARTE, E.; COMERCI, D. J.; CONDE-ÁLVAREZ, R.; COOK, E.; CRAVERO, S.; DADAR, M.; DE BOELLE, X.; DE MASSIS, F.; DÍAZ, R.; ESCOBAR, G. I.; FERNÁNDEZ-LAGO, L.; FICHT, T. A.; FOSTER, J. T.; GARIN-BASTUJI, B.; GODFROID, J.; GORVEL, J. P.; GÜLER, L.; ERDENLİĞ-GÜRBİLEK, S.; GUSI, A. M.; GUZMÁN-VERRI, C.; HAI, J.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; IRIARTE, M.; JACOB, N. R.; KERIEL, A.; KHAMES, M.; KÖHLER, S.; LETESSON, J. J.; LOPERENA-BARBER, M.; LÓPEZ-GOÑI, I.; MCGIVEN, J.; MELZER, F.; MORACARTIN, R.; MORAN-GILAD, J.; MUÑOZ, P. M.; NEUBAUER, H.; O'CALLAGHAN, D.; OCHOLI, R.; OÑATE, Á.; PANDEY, P.; PAPPAS, G.; PEMBROKE, J. T.; ROOP, M.; RUIZ-VILLALONOS, N.; RYAN, M. P.; SALCEDO, S. P.; SALVADOR-BESCÓS, M.; SANGARI, F. J.; DE LIMA SANTOS, R.; SEIMENIS, A.; SPLITTER, G.; SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; TABBAA, D.; TRANGONI, M. D.; TSOLIS, R. M.; VIZCAÍNO, N.; WARETH, G.; WELBURN, S. C.; WHATMORE, A.; ZÚÑIGA-RIPA, A.; MORIYÓN, I. If You're Not Confused, You're Not Paying Attention: Ochrobactrum Is Not Brucella. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 1–8, 2023.

MURRAY, K.; DUGGLEBY, C. J.; WILLIAMS, P. A.; SALA-TREPAT, J. M. The Metabolism of Benzoate and Methylbenzoates via the meta-Cleavage Pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2. **European Journal of Biochemistry**, v. 28, n. 3, p. 301–310, 1972.

NARBAD, A.; GASSON, M. J. Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiology**, v. 144, n. 5, p. 1397–1405, 1998.

NAZARI, M. T.; SIMON, V.; MACHADO, B. S.; CRESTANI, L.; MARCHEZI, G.; CONCOLATO, G.; FERRARI, V.; COLLA, L. M.; PICCIN, J. S. Rhodococcus: A promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants. **Journal of Environmental Management**, v. 323, n. September, p. 116220, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116220>>.

NIELSEN, M. B.; INGVORSEN, K. Biodegradation of para-nitrophenol by *Citricoccus nitrophenolicus* strain PNP1T at high pH. **Biodegradation**, v. 24, n. 1, p. 79–87, 2013.

NIKODEM, P.; HECHT, V.; SCHLÖMANN, M.; PIEPER, D. H. New Bacterial Pathway for 4- and 5-Chlorosalicylate Degradation via 4-Chlorocatechol and Maleylacetate in *Pseudomonas* sp. Strain MT1. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 23, p. 6790–6800, 2003.

OLAJUYIGBE, F. M.; FATOKUN, C. O.; OYELERE, O. M. Biodelignification of some agro-residues by *Stenotrophomonas* sp. CFB-09 and enhanced production of ligninolytic enzymes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, n. March, p. 120–130, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.016>>.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782–1787, 2009.

OVERHAGE, J.; PRIEFERT, H.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4837–4847, 1999.

PAPAGIANNI, M. **Microbial Bioprocesses**. [s.l.] Elsevier B.V., 2017. 45–72 p.

PARLESÁK, A. **Alcohol, Altered Gut Permeability, and Endotoxins**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2005. v. 2–3965–977 p.

PAULSEN, I. T.; SESHADRI, R.; NELSON, K. E.; EISEN, J. A.; HEIDELBERG, J. F.; READ, T. D.; DODSON, R. J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L. M.; BEANAN, M. J.; DAUGHERTY, S. C.; DEBOY, R. T.; DURKIN, A. S.; KOLONAY, J. F.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; VAN AKEN, S. E.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S. R.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; HOOVER, D. L.; LINDLER, L. E.; HALLING, S. M.; BOYLE, S. M.; FRASER, C. M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 13148–13153, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy fifth edition**. [s.l.: s.n.]690 p.

PEI, L.; SCHMIDT, M. Fast-Growing Engineered Microbes: New Concerns for Gain-of-Function Research? **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. June, p. 1–7, 2018.

PERESTELO, F.; FALCÓN, M. A.; PÉREZ, M. L.; COROMINAS ROIG, E.; DE LA FUENTE MARTIN, G. Bioalteration of kraft pine lignin by *Bacillus megaterium* isolated from compost piles. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 2, p. 151–153, 1989.

PERESTELO, F.; RODRÍGUEZ, A.; PÉREZ, R.; CARNICERO, A.; DE LA FUENTE, G.; FALCÓN, M. A. Short Communication: Isolation of a bacterium capable of limited degradation of industrial and labelled, natural and synthetic lignins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 111–112, 1996.

PÉREZ-PANTOJA, D.; DE LA IGLESIA, R.; PIEPER, D. H.; GONZÁLEZ, B. **Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134**. [s.l.: s.n.]v. 32736–794 p.

PIONTEK, K.; SMITH, A. T.; BLODIG, W. Lignin peroxidase structure and function. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 2, p. 111–116, 2001.

POPESCU, C. M.; VASILE, C.; POPESCU, M. C.; SINGUREL, G.; POPA, V. I.; MUNTEANU, B. S. Analytical methods for lignin characterization. II. Spectroscopic studies. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 40, n. 8, p. 597–621, 2006.

PRADEEP, S.; SARATH JOSH, M. K.; BINOD, P.; SUDHA DEVI, R.; BALACHANDRAN, S.; ANDERSON, R. C.; BENJAMIN, S. *Achromobacter denitrificans* strain SP1 efficiently remediates di(2-ethylhexyl)phthalate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 114–121, 2015.

PROCTOR, M. H.; WILSON, P. W. Nitrogen fixation by *Achromobacter* spp. With 1 Figure in the Text. v. 32, p. 254–260, 1959.

PUTRA, F. J. N.; KAHAR, P.; KONDO, A.; OGINO, C. The bioconversion of lignin derivative aldehydes into high-value aromatic alcohols and lipids via *Lipomyces starkeyi*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 200, n. June, p. 109065, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109065>>.

RAJENDHRAN, J. Genomic insights into *Brucella*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 87, p. 104635, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104635>>.

RAVI, K.; GARCÍA-HIDALGO, J.; NÖBEL, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G. Biological conversion of aromatic monolignol compounds by a *Pseudomonas* isolate from sediments of the Baltic Sea. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0563-x>>.

REIS, P. J. M.; REIS, A. C.; RICKEN, B.; KOLVENBACH, B. A.; MANAIA, C. M.; CORVINI, P. F. X.; NUNES, O. C. Biodegradation of sulfamethoxazole and other sulfonamides by *Achromobacter denitrificans* PR1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p. 741–749, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.039>>.

RESHMY, R.; ATHIYAMAN BALAKUMARAN, P.; DIVAKAR, K.; PHILIP, E.; MADHAVAN, A.; PUGAZHENDHI, A.; SIROHI, R.; BINOD, P.; KUMAR AWASTHI, M.; SINDHU, R. Microbial valorization of lignin: Prospects and challenges. **Bioresource Technology**, v. 344, n. PA, p. 126240, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126240>>.

RYAN, M. P.; TONY PEMBROKE, J. The genus *ochrobactrum* as major opportunistic pathogens. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1–30, 2020.

SAINSBURY, P. D.; HARDIMAN, E. M.; AHMAD, M.; OTANI, H.; SEGHEZZI, N.; ELTIS, L. D.; BUGG, T. D. H. Breaking down lignin to high-value chemicals: The conversion of lignocellulose to vanillin in a gene deletion mutant of *rhodococcus jostii* RHA1. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 10, p. 2151–2156, 2013.

SALVACHÚA, D.; KARP, E. M.; NIMLOS, C. T.; VARDON, D. R.; BECKHAM, G. T. Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria.

Green Chemistry, v. 17, n. 11, p. 4951–4967, 2015.

SANCHES, V. L.; CUNHA, T. A.; VIGANÓ, J.; DE SOUZA MESQUITA, L. M.; FACCIOLI, L. H.; BREITKREITZ, M. C.; ROSTAGNO, M. A. Comprehensive analysis of phenolics compounds in citrus fruits peels by UPLC-PDA and UPLC-Q/TOF MS using a fused-core column. **Food Chemistry: X**, v. 14, n. December 2021, 2022.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. v. 74, n. 12, p. 59S-76S, 1977.

SATO, Y.; NISHIHARA, H.; YOSHIDA, M.; WATANABE, M.; RONDAL, J. D.; CONCEPCION, R. N.; OHTA, H. *Cupriavidus pinatubonensis* sp. nov. and *Cupriavidus laharis* sp. nov., novel hydrogen-oxidizing, facultatively chemolithotrophic bacteria isolated from volcanic mudflow deposits from Mt. Pinatubo in the Philippines. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 973–978, 2006.

SELLAMI, K.; COUVERT, A.; NASRALLAH, N.; MAACHI, R.; ABOUSEOUD, M.; AMRANE, A. Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 150500, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150500>>.

SHENG, H.; TANG, W.; GAO, J.; RIEDEMAN, J. S.; LI, G.; JARRELL, T. M.; HURT, M. R.; YANG, L.; MURRIA, P.; MA, X.; NASH, J. J.; KENTTÄMAA, H. I. (-)ESI/CAD MSn Procedure for Sequencing Lignin Oligomers Based on a Study of Synthetic Model Compounds with β -O-4 and 5-5 Linkages. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 24, p. 13089–13096, 2017.

SHETTIGAR, M.; BALOTRA, S.; CAHILL, D.; WARDEN, A. C.; LACEY, M. J.; KOHLER, H. E.; RENTSCH, D.; OAKESHOTT, J. G. Isolation of the (+)-Pinoresinol-Mineralizing *Pseudomonas* sp. Strain SG-MS2 and Elucidation of Its Catabolic Pathway. v. 84, n. 4, p. 1–14, 2018.

SHI, Y.; CHAI, L.; TANG, C.; YANG, Z.; ZHANG, H.; CHEN, R.; CHEN, Y.; ZHENG, Y. Characterization and genomic analysis of kraft lignin biodegradation by the beta-proteobacterium *Cupriavidus basilensis* B-8. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Biotechnology for Biofuels>.

SHI, Y.; YAN, X.; LI, Q.; WANG, X.; LIU, M.; XIE, S.; CHAI, L.; YUAN, J. Directed bioconversion of Kraft lignin to polyhydroxyalkanoate by *Cupriavidus basilensis* B-8 without any pretreatment. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 238–242, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.004>>.

SILVA, D.; RODRIGUES, C. F.; LORENA, C.; BORGES, P. T.; MARTINS, L. O. Biocatalysis for biorefineries: The case of dye-decolorizing peroxidases. **Biotechnology Advances**, v. 65, n. April, p. 108153, 2023a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108153>>.

SILVA, N. M.; ROMAGNOLI, C. L.; SANTIAGO, C. R. do N.; DE LACERDA, J. P. A.; LEÃO, S. C.; DIGIAMPIETRI, L. A.; VIANA-NIERO, C. Multi-Approach Characterization of Novel Pyrene-Degrading Mycolicibacterium austroafricanum Isolates Lacking nid Genes. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, 2023b.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.; MORRIL, C. **SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS**. [s.l.: s.n.]353 p.

SINGH, A. K.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; RAJ, A. Lignin peroxidase in focus for catalytic elimination of contaminants — A critical review on recent progress and perspectives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 58–82, 2021.

SINGHVI, M. S.; GOKHALE, D. V. Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23–24, p. 9305–9320, 2019.

SONG, Y. J. Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from pine litter. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 333–339, 2009.

STARK, N. M.; YELLE, D. J.; AGARWAL, U. P. Techniques for Characterizing Lignin. **Lignin in Polymer Composites**, n. October, p. 49–66, 2016.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely

associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000.

TANASE-OPEDAL, M.; RUWOLDT, J. Organosolv Lignin as a Green Sizing Agent for Thermoformed Pulp Products. **ACS Omega**, v. 7, n. 50, p. 46583–46593, 2022.

TAYLOR, C. R.; HARDIMAN, E. M.; AHMAD, M.; SAINSBURY, P. D.; NORRIS, P. R.; BUGG, T. D. H. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 521–530, 2012.

THORESEN, P. P.; MATSAKAS, L.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. Recent advances in organosolv fractionation: Towards biomass fractionation technology of the future. **Bioresource Technology**, v. 306, n. January, p. 123189, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123189>>.

TIAN, J. H.; POURCHER, A. M.; PEU, P. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin and lignin-related compounds. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 30–37, 2016.

TSEGAYE, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Biodelignification and hydrolysis of rice straw by novel bacteria isolated from wood feeding termite. **3 Biotech**, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1471-0>>.

VAN DEXTER, S.; BOOPATHY, R. Biodegradation of phenol by *Acinetobacter tandoii* isolated from the gut of the termite. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 33, p. 34067–34072, 2019.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285–2289, 2004.

VASUDEVAN, N.; MAHADEVAN, A. Utilization of complex phenolic compounds by *Acinetobacter* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 404–407, 1992.

VERMA, S.; SINGH, D.; CHATTERJEE, S. Malathion biodegradation by a psychrotolerant bacteria *Ochrobactrum* sp. M1D and metabolic pathway analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 326–335, 2021.

VYRIDES, I.; AGATHANGELOU, M.; DIMITRIOU, R.; SOUROULLAS, K.; SALAMEX, A.; IOANNOU, A.; KOUTINAS, M. Novel *Halomonas* sp. B15 isolated from Larnaca Salt Lake in Cyprus that generates vanillin and vanillic acid from ferulic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 1291–1296, 2015.

WANG, J.; SINGER, S. D.; SOUTO, B. A.; ASOMANING, J.; ULLAH, A.; BRESSLER, D. C.; CHEN, G. Current progress in lipid-based biofuels: Feedstocks and production technologies. **Bioresource Technology**, v. 351, n. January, p. 0–1, 2022.

WANG, Y.; LUO, C. B.; LI, Y. Q. Biofuneling lignin-derived compounds into lipids using a newly isolated *Citricoccus* sp. P2. **Bioresource Technology**, v. 387, n. July, p. 129669, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129669>>.

WATANABE, Y.; SHINZATO, N.; FUKATSU, T. Isolation of actinomycetes from termites' guts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 8, p. 1797–1801, 2003.

WEI, Z.; ZENG, G.; HUANG, F.; KOSA, M.; HUANG, D.; RAGAUSKAS, A. J. Bioconversion of oxygen-pretreated Kraft lignin to microbial lipid with oleaginous *Rhodococcus opacus* DSM 1069. **Green Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2784–2789, 2015.

WEILAND, F.; BARTON, N.; KOHLSTEDT, M.; BECKER, J.; WITTMANN, C. Systems metabolic engineering upgrades *Corynebacterium glutamicum* to high-efficiency *cis*, *cis*-muconic acid production from lignin-based aromatics. **Metabolic Engineering**, v. 75, n. October 2022, p. 153–169, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.12.005>>.

WENG, C.; PENG, X.; HAN, Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1–22, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-021-01934-w>>.

WOO, H. L.; UTTURKAR, S.; KLINGEMAN, D.; SIMMONS, B. A.; DEANGELIS, K. M.; BROWN, S. D.; HAZEN, T. C. Draft genome sequence of the lignin-degrading Burkholderia sp. strain LIG30, isolated from wet tropical forest soil. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. 2013–2014, 2014.

XIA, M.; NIU, Q.; QU, X.; ZHANG, C.; QU, X.; LI, H.; YANG, C. Simultaneous adsorption and biodegradation of oxytetracycline in wastewater by Mycolicibacterium sp. immobilized on magnetic biochar. **Environmental Pollution**, v. 339, n. October, p. 122728, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122728>>.

XU, T.; ZONG, Q. J.; LIU, H.; WANG, L.; LIU, Z. H.; LI, B. Z.; YUAN, Y. J. Identifying ligninolytic bacteria for lignin valorization to bioplastics. **Bioresource Technology**, v. 358, n. May, p. 127383, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127383>>.

XU, Z.; QIN, L.; CAI, M.; HUA, W.; JIN, M. Biodegradation of kraft lignin by newly isolated Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas putida, and Ochrobactrum tritici strains. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 14171–14181, 2018.

XUE, Y.; YU, J.; SONG, X. Hydrolysis of soy isoflavone glycosides by recombinant β -glucosidase from hyperthermophile Thermotoga maritima. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1401–1408, 2009.

YADAV, L. D. S. **Organic Spectroscopy**. [s.l.] Springer-Science+Business Media, •• B.V., 2005. 324 p.

YANG, C.-X.; WANG, T.; GAO, L.-N.; YIN, H.-J.; LÜ, X. Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 123, n. 6, p. 1447–1460, 2017.

YANG, Y. S.; ZHOU, J. T.; LU, H.; YUAN, Y. L.; ZHAO, L. H. Isolation and characterization of Streptomyces spp. strains F-6 and F-7 capable of decomposing alkali lignin. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 33, n. 23, p. 2603–2609, 2012.

YOON, S. H.; HA, S. M.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, 2017.

YOSHIDA, T.; INAMI, Y.; MATSUI, T.; NAGASAWA, T. Regioselective carboxylation of catechol by 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase of Enterobacter cloacae P. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 5, p. 701–705, 2010.

YOSHIDA, T.; SUGANO, Y. Unexpected diversity of dye-decolorizing peroxidases. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 33, n. October 2022, p. 101401, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101401>>.

ZAKZESKI, J.; BRUIJNINCX, P. C. A.; JONGERIUS, A. L.; WECKHUYSEN, B. M. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552–3599, 2010.

ZASADA, M.; BUDZISZ, E. Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. **Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 36, n. 4, p. 392–397, 2019.

ZENG, J.; SINGH, D.; LASKAR, D. D.; CHEN, S. Degradation of native wheat straw lignin by Streptomyces viridosporus T7A. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 165–174, 2013.

ZHAO, Q.; HU, Q.; QIU, Z.; YU, C. Biodegradation characteristics and mechanism of quinoline by Ochrobactrum sp. strain C2. **Water Science and Technology**, v. 86, n. 5, p. 1284–1298, 2022.

ZHOU, M.; FAKAYODE, O. A.; REN, M.; LI, H.; LIANG, J.; YAGOUB, A. E. G. A.; FAN, Z.; ZHOU, C. Laccase-catalyzed lignin depolymerization in deep eutectic solvents: challenges and prospects. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 10, n. 1, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40643-023-00640-9>>.

ZHU, D.; ZHANG, P.; XIE, C.; ZHANG, W.; SUN, J.; QIAN, W. J.; YANG, B. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2017.

25. Anexo 1: Tabela com as massas do sobrenadante dos cultivos de lignina após a etapa de liofilização

Identificação	Amostra	Peso (mg)
1A	Controle 1 - 7 dias (LB/M9)	32,3
2A	Controle 2 - 14 dias (LB/M9)	31,5
3A	Controle 3 - 14 dias (LB/M9)	31,8
4A	Controle 1 - 7 dias (0,1 %)	30,1
5A	Controle 2 - 14 dias (0,1 %)	29,9
6A	<i>P. putida</i> KT2440 M9/M9 - 7 dias	31,0
7A	<i>P. putida</i> KT2440 M9/M9 - 14 dias	31,1
8A	<i>P. putida</i> KT2440 LB/M9 - 7 dias	30,1
9A	<i>P. putida</i> KT2440 LB/M9 - 14 dias	29,9
10A	<i>P. putida</i> KT2440 (0,1 %) - 7 dias	30,1
11A	<i>P. putida</i> KT2440 (0,1 %) - 14 dias	30,7
12A	<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12 M9/M9 - 7 dias	31,6
13A	<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12 M9/M9 - 14 dias	33,1
14A	<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12 LB/M9 - 7 dias	
15A	<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12 LB/M9 - 14 dias	31,2
16A	<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12 (0,1 %) - 7 dias	32,1
17A	<i>Pseudomonas citronellolis</i> C12 (0,1 %) - 14 dias	32,2
18A	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 M9/M9 - 7 dias	31,5
19A	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 M9/M9 - 14 dias	33,3
20A	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 LB/M9 - 7 dias	31,2
21A	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 LB/M9 14 dias	30,1
22A	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 (0,1 %) 7 dias	30,2
23A	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain FDAARGOS_786 (0,1 %) 14 dias	30,1
24A	<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y M9/M9 - 7 dias	30,1
25A	<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y M9/M9 - 14 dias	29,8
26A	<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y LB/M9 - 7 dias	30,0
27A	<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y LB/M9 - 14 dias	29,8
28A	<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y (0,1 %) - 7 dias	30,0
29A	<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Y (0,1 %) - 14 dias	29,8
30A	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2 M9/M9 - 7 dias	30,6
31A	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2 M9/M9 - 14 dias	30,5
32A	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2 LB/M9 - 7 dias	29,8
33A	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2 LB/M9 - 14 dias	29,8

34A	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2 (0,1 %) - 7 dias	30,4
35A	<i>Brucella intermedia</i> strain XG-2 (0,1 %) - 14 dias	29,9
36A	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27 M9/M9 - 7 dias	30,5
37A	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27 M9/M9 - 14 dias	30,1
38A	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27 LB/M9 - 7 dias	30,4
39A	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27 LB/M9 - 14 dias	30,5
40A	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27 (0,1 %) - 7 dias	30,0
41A	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain WA5-1-27 (0,1 %) - 14 dias	30,0