



**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências
Genômicas e Biotecnologia**

**DIVERSIDADE MICROBIANA NA PRODUÇÃO DE ETANOL
UTILIZANDO
TÉCNICAS TRADICIONAIS E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Autora: Ohana Yonara de Assis Costa
Orientadora: Dra. Betania Ferraz Quirino**

**Brasília - DF
2014**

OHANA YONARA DE ASSIS COSTA

**DIVERSIDADE MICROBIANA NA PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO
TÉCNICAS TRADICIONAIS E BIOLOGIA MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Betania Ferraz Quirino

Brasília

2014



Dissertação de autoria de Ohana Yonara de Assis Costa, intitulada “DIVERSIDADE MICROBIANA NA PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO TÉCNICAS TRADICIONAIS E BIOLOGIA MOLECULAR”, apresentada como requisito parcial para a obtenção do título Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em 31/03/2014, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof^a. Dra. Betania Ferraz Quirino
Orientadora
Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia (UCB)
Embrapa Agroenergia (CNPAE)

Prof^a Dra. Cristine Chaves Barreto
Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia (UCB)

Prof^a. Dra. Cynthia Maria Kyaw
UnB/Instituto de Ciências Biológicas

Dr^a. Léia Cecilia de Lima Fávaro
Embrapa Agroenergia (CNPAE)

Brasília

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu cumprir mais essa jornada.

À minha mãe, que sempre me apoia e me auxilia em tudo que eu preciso.

À minha orientadora, Dr^a Betania Ferraz Quirino, pela oportunidade de realizar esse trabalho, e por ter me guiado durante o desenvolvimento do mesmo.

À minha “mãe adotiva científica”, Dr^a Cristine Chaves Barreto, por todas as ajudas e consultorias prestadas, assim como pelos momentos de descontração, cafezinhos, chocolates e balinhas.

Ao professor Dr. Ricardo Henrique Krüger, por ter nos levado até a usina, no dia da coleta de amostras.

Aos meus colegas de bancada Betúlia, que me auxiliou também com a coleta, e Carol, Clapton e Luís Felipe, que ficaram comigo até meia noite no laboratório para processar as amostras.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Tainá, Laninha, Carol (novamente!), Daniel e Daiva, que compartilharam comigo os momentos do mestrado, tornando-os mais leves com conversas e brincadeiras. Agradeço especialmente ao Daniel, por todas as consultorias e favores prestados, e à Daiva, por ter me ajudado de todas as formas possíveis.

A todos os professores do curso de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, por todos os ensinamentos.

Às professoras participantes da banca, por suas considerações.

À usina parceira, pela possibilidade de coletar e analisar as amostras, sem a qual este trabalho não teria sido realizado.

Ao CNPq, que forneceu minha bolsa de mestrado

À Universidade Católica de Brasília e Embrapa, por fornecer a estrutura necessária para a produção do trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na concretização deste trabalho.

Muito obrigada!!!!

RESUMO

Referência: COSTA, Ohana Yonara de Assis. **Diversidade microbiana na produção de etanol utilizando técnicas tradicionais e biologia molecular.** Dissertação (Mestrado). Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2014

O interesse na produção de biocombustíveis se iniciou na década de 2000, devido a uma maior preocupação com a produção de fontes de energia mais limpas e renováveis, necessárias para diminuição da presente dependência mundial dos combustíveis fósseis. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o segundo produtor mundial de etanol. Embora o processo de produção do etanol esteja bem estabelecido, a contaminação microbiana pode ser um obstáculo, gerando diminuição da produtividade. O objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade microbiana de contaminantes em seis etapas do processo de produção de etanol utilizando técnicas de dependentes e independentes de cultivo. Amostras triplicadas de diferentes estágios da produção de etanol foram coletadas: caldo da cana crua, caldo misto, caldo clarificado, caldo evaporado, mosto e vinho. Cada amostra foi diluída e semeada em quatro meios de cultura: PCA, MRS, CZAPEK e YPD. As colônias foram contadas, isoladas e armazenadas em glicerol a -80°C . Foi feita a extração de DNA das amostras, e o DNA das replicatas de cada amostra foi utilizado para o pirosequenciamento dos genes do RNAr 16S dos domínios *Bacteria* e *Archaea* e da região ITS do reino *Fungi*. As sequências geradas foram submetidas a análise bioinformática utilizando-se banco de dados específicos para os genes em questão. Foram isolados, armazenados e identificados por sequenciamento de Sanger 64 bactérias, 30 leveduras e 18 fungos filamentosos. O pirosequenciamento demonstrou a presença de 322 gêneros/grupos não classificados para o domínio *Bacteria*, 21 gêneros/grupos não classificados para o domínio *Archaea* e 184 para o reino *Fungi*, no total. Entre os gêneros de bactérias predominantes nas amostras de caldo da cana crua, caldo misto, caldo clarificado, caldo evaporado e mosto estão *Leuconostoc*, *Enterobacteriales* não classificados e *Actinomycetales* não classificados, enquanto que na amostra de vinho, o gênero predominante é *Lactobacillus*, um dos maiores contaminantes da produção de etanol. Para o reino *Fungi*, sequenciado apenas no caldo da cana crua e no caldo misto, foram predominantes os grupos *Lachancea*, *Hypocreales* não classificados e *Sordariomycetes* não classificados. Para o domínio *Archaea*, também sequenciado apenas no caldo da cana crua e no caldo misto, predominaram sequências não classificadas do *Soil Crenarchaeotic Group*. As curvas de rarefação mostraram que as amostras de caldo da cana crua, caldo misto, caldo clarificado não tiveram sua diversidade coberta em nível de gênero, sendo que para as amostras de caldo da cana crua e caldo misto a diversidade não foi coberta em nenhum dos domínios, de modo que são necessários mais estudos envolvendo a diversidade dessas amostras.

Palavras-chave: Produção. Etanol. Cultivo. Biologia Molecular.

ABSTRACT

The interest in biofuels started in the 2000s, due to a greater concern with the production of cleaner and renewable energy sources needed to decrease global dependency on fossil fuels. Brazil is the largest producer of sugar cane and the second largest producer of ethanol. Although the process is already well established, microbial contamination can be an obstacle, resulting in decreased productivity. The aim of this work was to study the microbial diversity of contaminants in six stages of ethanol production process using classical microbiology techniques and culture-independent techniques. Triplicate samples from different stages of ethanol production were collected: sugarcane juice, mixed juice, clarified juice, evaporated juice, must and wine. Each sample was diluted and plated on four culture media: PCA, MRS and YPD CZAPEK. The colonies were counted, isolated and stored in glycerol at -80° C. DNA extraction of samples was done, and the DNA of each one of the replicates of each sample was used for pyrosequencing of *Bacteria* and *Archaea* 16S rRNA genes, and *Fungi* ITS gene. The sequences generated were subjected to bioinformatics analysis using a specific database to the genes. It were isolated and stored in 64 bacteria, 30 yeasts, 20 filamentous fungi, which were identified by Sanger sequencing. The pyrosequencing showed 322 genera for the domain *Bacteria*, 21 genera for the domain *Archaea* and 184 genera for the domain *Fungi*. Among the predominant genera of bacteria in samples of sugarcane juice, mixed juice, clarified juice, evaporated juice and must are *Leuconostoc*, unclassified *Enterobacteriales* and unclassified *Actinomycetales*, while in the wine sample, the predominant genus was *Lactobacillus*, one of the major contaminants of ethanol production. For the domain *Fungi*, only sequenced in the sugarcane juice and mixed juice, the predominant groups were *Lachancea*, unclassified *Hypocreales* and unclassified *Sordariomycetes*. For the domain *Archaea*, also sequenced only in the sugarcane juice and mixed juice, the predominant group was *unclassified Soil Crenarchaeotic group*. Rarefaction curves showed that the samples of sugarcane juice, mixed juice and clarified juice did not have diversity at the genus level covered, and for sugarcane juice and mixed juice samples, the diversity was not covered in any of the domains, showing that further studies involving the diversity of these samples are needed.

Keywords: Production. Ethanol. Cultivation. Molecular Biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Produção da cana-de-açúcar por estado	15
Figura 2: Distribuição das usinas por estado.....	17
Figura 3: Processo de fermentação de Melle-Boinot.....	19
Figura 4: Fluxograma do processo de produção do etanol.	22
Figura 5: Representação esquemática do gene que codifica para o RNA ribossômico 16S.....	28
Figura 6: Representação esquemática das regiões do RNA ribossômico utilizadas para a identificação de fungos.	29
Figura 7: Quantidade de diferentes tipos coloniais por amostra.....	46
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo..	47
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.	48
Figura 10: Distribuição dos grupos das bactérias isoladas de cada amostra.....	49
Figura 11: Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene do RNA ribossomal 16S das bactérias isoladas..	50
Figura 12: Gêneros encontrados na identificação das leveduras pela região D1/D2.	51
Figura 13: Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região D1/D2 de leveduras.....	52
Figura 14: Gêneros de fungos filamentosos presentes nas amostras.....	53
Figura 15: Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região ITS de leveduras e fungos filamentosos cultivados.	55
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo do DNA extraído das amostras.....	59
Figura 17: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.....	60
Figura 18: Curva de rarefação para as sequências do gene que codificam para o RNAr 16S do domínio <i>Bacteria</i>	63
Figura 19: Curva de rarefação para as sequências do gene que codificam para o RNAr 16S do domínio <i>Archaea</i>	63
Figura 20: Curva de rarefação para as sequências da região do espaçador interno transcrito (ITS) do reino <i>Fungi</i>	64
Figura 21: Gráfico contendo os filos do domínio <i>Bacteria</i> mais abundantes em cada amostra..	66

Figura 22: Gráfico contendo os filos raros do domínio <i>Bacteria</i> em cada amostra..	.66
Figura 23: Gráfico contendo as classes do domínio <i>Bacteria</i> mais abundantes em cada amostra.....	68
Figura 24: Grupos e gêneros mais abundantes do domínio <i>Bacteria</i> em cada amostra das diferentes etapas do processo de produção de etanol.	69
Figura 25: Filos do domínio <i>Archaea</i> em cada amostra.	70
Figura 26: Classes do domínio <i>Archaea</i> mais abundantes em cada amostra.....	71
Figura 27: Gráfico contendo os grupos e gêneros abundantes do domínio <i>Archaea</i> em cada amostra.....	72
Figura 28: Filos do reino <i>Fungi</i> em cada amostra.	73
Figura 29: Classes do filo <i>Ascomycota</i> presentes em cada amostra.	73
Figura 30: Classes do filo <i>Basidiomycota</i> presentes em cada amostra.	74
Figura 31: Grupos e gêneros mais abundantes do reino <i>Fungi</i> em cada amostra.	76
Figura 32: Grupos e gêneros das sequências geradas por pirosequenciamento para as amostras de vinho. V1 - vinho 1; V2 - vinho 2; V3 - vinho 3.....	76
Figura 33: Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região ITS geradas por pirosequenciamento.....	76
Figura 34: Análise das Coordenadas Principais (PCoA).	78
Figura 35: Análise das Coordenadas Principais (PCoA).	79
Figura 36: Análise das Coordenadas Principais (PCoA).	79

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1.	HISTÓRICO DO ETANOL.....	12
2.2.	ETANOL NO BRASIL.....	13
2.3.	PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL.....	17
2.3.1.	Processamento	19
2.3.2.	Contaminantes do processo de produção do etanol	22
2.4.	DIVERSIDADE MICROBIANA E TÉCNICAS MOLECULARES.....	27
3.	OBJETIVOS	33
3.1.	OBJETIVO GERAL	33
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4.	JUSTIFICATIVA	34
5.	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1.	COLETA DE AMOSTRAS.....	35
5.2.	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS – TÉCNICAS DEPENDENTES DE CULTIVO.....	35
5.2.1.	Isolamento dos microrganismos	35
5.2.2.	Cultura monospórica dos fungos filamentosos	37
5.2.3.	Extração de DNA dos microrganismos	38
5.2.4.	Amplificação do gene que codifica o RNA ribossômico 16S de <i>Bacteria</i>, região D1/D2 para leveduras e ITS de fungos filamentosos e leveduras.	39
5.2.5.	Sequenciamento e análise das sequências	40
5.2.6.	Ensaio antimicrobiano	41
5.3.	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS – TÉCNICAS INDEPENDENTES DE CULTIVO.....	42
5.3.1.	Extração de DNA total	42
5.3.2.	Amplificação do gene que codifica o RNA ribossômico, região ITS e pirosequenciamento	42
5.3.3.	Análise computacional das sequências	44
6.	RESULTADOS	46

6.1.	ISOLAMENTO.....	46
6.2.	EXTRAÇÃO DE DNA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS	47
6.3.	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL, PIROSEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS.....	59
7.	DISCUSSÃO	80
7.1.1.	Domínio <i>Bacteria</i>.....	81
7.1.2.	Reino <i>Fungi</i>	89
7.1.3.	Domínio <i>Archaea</i>.....	94
8.	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
	APÊNDICE A - TABELA CONTENDO O NOME DAS BACTÉRIAS, SUAS FOTOS E DESCRIÇÕES MORFOLÓGICAS.....	114
	APÊNDICE B - TABELA CONTENDO O NOME DAS LEVEDURAS, SUAS FOTOS E DESCRIÇÕES MORFOLÓGICAS.....	122
	APÊNDICE C - TABELA CONTENDO O NOME DOS FUNGOS FILAMENTOSOS, SUAS FOTOS E DESCRIÇÕES MORFOLÓGICAS	127
	APÊNDICE D - SEQUÊNCIAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS E SEUS NÚMEROS DE ACESSO DO GENBANK.	130
	APÊNDICE E –TABELA CONTENDO OS GÊNEROS DO DOMÍNIO <i>BACTERIA</i> COM MENOS SEQUÊNCIAS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS	131
	APÊNDICE F –TABELA CONTENDO OS GÊNEROS DO DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i> COM MENOS SEQUÊNCIAS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS	143
	APÊNDICE G –TABELA CONTENDO OS GÊNEROS DO <i>REINO FUNGI</i> COM MENOS SEQUÊNCIAS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS.....	143

1. INTRODUÇÃO

O mais recente período de interesse pela produção de biocombustíveis iniciou-se na década de 2000, devido a uma maior preocupação com o desenvolvimento de fontes energéticas renováveis e mais limpas, cujo objetivo é modificar a atual dependência dos combustíveis fósseis.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor de etanol. A produção do bioetanol de cana-de-açúcar pode ser realizada diretamente a partir do caldo de cana ou de misturas de caldo e melaço. As primeiras etapas do processo envolvem o tratamento do caldo de cana, gerando uma solução chamada mosto, açucarada e pronta para a fermentação. Ao mosto são adicionadas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que fermentam a mistura por 8 a 12 horas, gerando o mosto fermentado com uma concentração de 7 a 10% de etanol. Após o processo, as leveduras são recuperadas e tratadas novamente, para uso posterior. O material fermentado é, em seguida, enviado para a destilação, visando à recuperação do bioetanol (BNDES; CGEE, 2008).

Embora o processo esteja bem estabelecido, aprimoramentos são sempre necessários, já que ainda existem entraves principalmente durante a fermentação, sendo a contaminação um dos principais obstáculos do procedimento. Ao contrário da produção de bebidas, o processo de fermentação para a produção de etanol combustível não é realizado sob condições estéreis de modo que a contaminação com microrganismos é esperada e tolerada (SKINNER; LEATHERS, 2004). Entretanto, a infecção de microrganismos pode gerar diversos problemas. Os microrganismos contaminantes podem competir com as leveduras pelos nutrientes necessários ao seu crescimento ótimo, assim como gerar substâncias, como ácidos orgânicos, que vão inibir o crescimento das leveduras (BAYROCK; INGLEDEW, 2004). Produtos bacterianos como ácido lático e acético podem inclusive travar a fermentação, levando a paradas dispendiosas para limpeza das instalações (SKINNER-NEMEC et al., 2007; BISCHOFF et al., 2009).

Microrganismos contaminantes podem ainda trazer outros obstáculos para a fermentação, como a presença de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido à produção de toxinas, fatores que acarretam

em uma diminuição do rendimento do processo e de sua produtividade (NOBRE et al., 2007).

Embora os contaminantes do processo de produção do etanol combustível tenham sido estudados há bastante tempo, a maioria dos trabalhos é realizada por meio de técnicas dependentes de cultivo. Desta maneira, este trabalho visa, além da utilização de técnicas de microbiologia clássica, a caracterização da microbiota contaminante por meio de técnicas independentes de cultivo: extração de DNA total, seguida de pirosequenciamento e análise filogenética dos genes que codificam para o RNA ribossômico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO DO ETANOL

Na década de 70, imperava uma forte dependência mundial do petróleo produzido pelos países árabes. Porém, no ano de 1973, o preço do barril de petróleo se elevou significativamente, produzindo um impacto expressivo na economia dos países importadores (OHASHI, 2008). Como tentativa de solucionar o problema, substituindo a gasolina por álcool, o Brasil criou o Proálcool, um programa cuja finalidade foi elevar a produção de álcool etílico anidro (ANDRIETTA et al., 2006).

O fator que levou à implantação do programa foi o primeiro choque do petróleo, que levou ao aumento do preço do barril de US\$ 2.59 em janeiro de 1973, para US\$ 10,95 em janeiro de 1974 (PIACENTE, 2006). Esse acréscimo promoveu um déficit na balança comercial brasileira, assim como aumento da inflação. Em 1974, o saldo da balança comercial passou de 7 milhões de dólares positivos para 4,7 bilhões negativos, e em 1980 a dívida externa chegou a 43,935 bilhões de dólares (OHASHI, 2008).

Para dar continuidade às metas de crescimento do país, o governo criou programas cujos objetivos eram substituir as importações de produtos substanciais e encontrar combustíveis alternativos. Esses programas foram o Proóleo, o Procarvão e o Proálcool, no entanto, apenas o último merece destaque, devido ao seu sucesso (FURTADO, 1983). O Proálcool possibilitou o uso do álcool etílico anidro como matéria prima para a indústria química e sua adição à gasolina. Dessa forma, a parte da gasolina importada seria substituída e a capacidade produtiva das usinas e destilarias que estava inativa poderia ser utilizada (PIACENTE, 2006).

O objetivo inicial da implementação do Proálcool, em 1975, foi auxiliar os produtores do complexo canavieiro, e não a produção de uma fonte inovadora de energia menos poluente. Houve inclusive forte pressão dos usineiros, já que o complexo canavieiro havia entrado em crise, devido aos baixos preços do açúcar no mercado internacional, que poderia ser superada pela produção e venda de etanol no mercado nacional (OHASHI, 2008).

O programa foi concretizado em 1979, com a produção de álcool hidratado a ser utilizado como combustível em veículos movidos apenas a etanol, cujas montadoras instaladas já iniciavam a produção. A tecnologia para produção desses

carros foi desenvolvida primariamente pelo setor público e posteriormente foi passada ao setor privado (PUPPIM DE OLIVEIRA, 2002).

O segundo choque do petróleo, o qual deu continuidade aos preços elevados, acima de US\$ 20 dólares por barril, foi um estímulo ao Proálcool e à utilização de etanol combustível por parte dos consumidores. Embora os indicadores econômicos brasileiros não fossem os melhores, o programa possibilitou aos produtores de cana-de-açúcar uma forma de contornar a crise do petróleo e a diminuição da dependência interna de importação do petróleo (OHASHI, 2008).

Contudo, posteriormente, o Proálcool passou por um período de crise, que se iniciou com a quebra de safra em 1986/1987, por consequência da falta de chuvas. Houve então, uma diminuição do investimento na produção do etanol hidratado, e conseqüentemente, em 1989 faltou álcool em vários postos do país, frustrando os donos de automóveis movidos a álcool. Somada à quebra de safra, ainda houve a queda no preço do petróleo, diminuindo o preço da gasolina, em contraste com o preço elevado do álcool. O baixo preço pago aos produtores de álcool também foi importante para o não aumento da produção interna do mesmo. Com a falta de álcool nos postos em 1989, aconteceu uma diminuição da venda de veículos movidos a álcool, impulsionando o abandono do programa (OHASHI, 2008).

O interesse na utilização do etanol como combustível voltou a crescer aproximadamente a partir da década de 2000, principalmente por causa da assinatura do protocolo de Kyoto, que visa à diminuição da emissão de gases poluentes na atmosfera. A partir de 2002 houve o recomeço da produção e da venda de álcool combustível. A preocupação com o meio ambiente reforçou essa retomada, e o uso de combustíveis mais limpos passou a ser uma tendência entre diversos países. Em 2003 foram lançados os automóveis *flexfuel*, o que foi importante para a recuperação da produção do etanol, já que os mesmos possibilitam a utilização de qualquer proporção entre álcool e gasolina nos veículos (MORAES, 2007).

2.2. ETANOL NO BRASIL

A produção do bioetanol pode ser realizada a partir de diferentes materiais que possuem em sua composição açúcares fermentáveis, como cana-de-açúcar, beterraba e sorgo, ricos em sacarose. Pode ser produzido também a partir de

polissacarídeos cuja hidrólise produz açúcares que podem ser transformados em álcool etílico. A cana-de-açúcar, sob a forma de caldo ou melaço, é a matéria-prima mais importante na produção do etanol de países tropicais e subtropicais. Na Europa, o material mais utilizado é o melaço da beterraba (CARDONA; SANCHEZ, 2007).

Cana-de-açúcar é o nome comum que se dá a uma herbácea semiperene pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das *Poaceae*, cuja espécie é *Saccharum officinarum*. Seu cultivo se dá principalmente em países que alternam estações secas e úmidas, para a produção de açúcar, etanol e aguardente, proporcionada pela sacarose presente em seu caule (BORTOLAZZO, 2011). É uma planta tolerante à seca, que possui entre 12 e 17% de açúcares em seu peso seco total, dos quais 68 a 72% são uma mistura de 90% de sacarose e 10% de glicose e frutose. A eficiência da extração para a produção do caldo de cana chega a 95%, restando desse processo o bagaço, composto por fibras (WHEALS et al., 1999). Em usinas produtoras de etanol e açúcar, cristais de açúcar formados após a concentração do caldo são retirados por centrifugação, formando o melaço, que contém por volta de 65% (p/p) de açúcares. Ambos normalmente possuem a quantidade necessária de nutrientes para a fermentação, após o ajuste da concentração de açúcares (WHEALS et al., 1999).

Além da produção de etanol, a cana-de-açúcar é o material utilizado para a produção de 75% do açúcar mundial, e o restante é proveniente da beterraba, cujo maior produtor é a Rússia. O Brasil é responsável por 25% do cultivo global de cana-de-açúcar, enquanto que os países da Ásia possuem aproximadamente 40% da produção, destacando-se China e Tailândia (CARVALHO et al., 2011).

A posição geográfica do Brasil no globo terrestre permite a produção da cana-de-açúcar e seus derivados em um grande espaço geográfico. A presença de diversos microclimas, devido a um grande território, permite ao país a produção em escala econômica de boa parte das culturas do comércio mundial. As exigências econômicas e climáticas da cultura de cana-de-açúcar com alto conteúdo de sacarose proporcionam sua produção em uma larga faixa de espaço do país, possibilitando, também, o funcionamento de unidades produtoras de açúcar e álcool desde o Rio Grande do Norte até o Paraná, em uma linha reta de aproximadamente 3.000 quilômetros. Dessa maneira, a cana-de-açúcar pode ser produzida em muitas regiões e variados períodos de tempo, possibilitando uma logística de transporte de

baixo custo, além de proporcionar o abastecimento dos grandes centros urbanos que possuem as maiores frotas de veículos leves (CONAB, 2012).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A área de cultivo a ser colhida e designada para o setor sucroalcooleiro na safra 2013/14 está estimada em 8,81 milhões de hectares, difundida entre todos os estados produtores. A maior produção é proveniente do estado de São Paulo, com 51,66% (4,56 milhões de hectares), em seguida, Goiás, com 9,29% (818,39 milhões de hectares), Minas Gerais, com 8,85% (779,83 milhões de hectares), Paraná, com 6,66% (586,4 milhões de hectares), Mato Grosso do Sul, com 7,08% (624,11 milhões de hectares), Alagoas, com 5,02% (442,59 milhões de hectares) e Pernambuco, com 3,25% (286,030 milhões de hectares). A representação dos outros estados está abaixo de 3% individualmente (Figura 1). A produtividade da safra de 2013/14 foi de 74.891 kg/ha, apresentando um aumento de 7,9% em relação à safra anterior, que foi de 69.407 kg/ha (CONAB, 2013).

Figura 1: Produção da cana-de-açúcar por estado

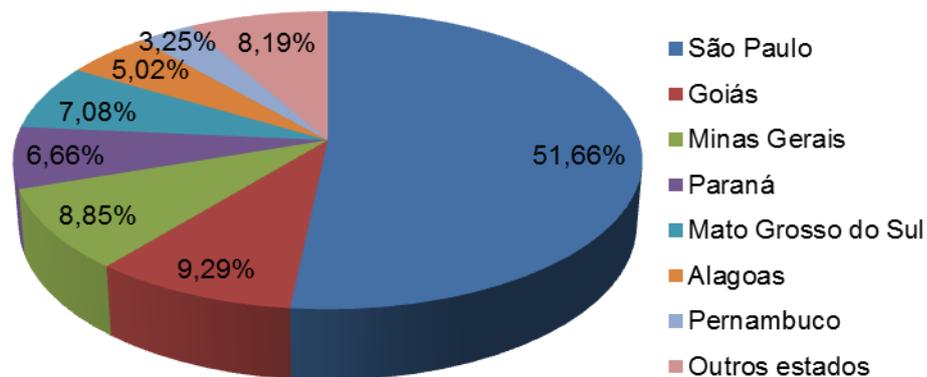


Ilustração por Ohana Costa. Fonte: CONAB, 2013.

A moagem da cana-de-açúcar de abril a dezembro de 2013 resultou em aproximadamente 630,89 milhões de toneladas, representando em torno de 97% da produção nacional prevista para os oito primeiros meses da safra de 2013/14. Esses números geraram por volta de 27,2 bilhões de litros de etanol, sendo 15,7 bilhões de litros de etanol hidratado e 11,5 bilhões de litros de etanol anidro (BRASIL, 2014).

Em novembro de 2012, as exportações de etanol somaram 96,35 milhões de litros, um volume 42% menor se comparado ao mês anterior, e 48% menor se comparado a novembro de 2013. O volume acumulado de exportações reuniu, no

ano de 2013, 2,9 bilhões de litros, o que representa uma diminuição de 6% no volume acumulado de exportações, se comparado ao valor do período de janeiro a dezembro de 2012. A receita gerada pelo volume exportado de etanol no ano de 2013 foi de aproximadamente US\$ 1,87 bilhão (BRASIL, 2014).

Em 2008, as usinas faturaram US\$ 22,6 bilhões, divididos em: US\$ 12,4 bilhões com etanol (55%), US\$ 9,8 bilhões com açúcar (43%), US\$ 389,6 milhões com bioeletricidade (1,7%), e US\$ 67,1 milhões com leveduras, aditivos e créditos de carbono (0,3%). As exportações do etanol geraram US\$ 2,4 bilhões (US\$ 1,2 bilhão de etanol hidratado e US\$ 1,2 bilhão de etanol anidro)(SOUSA; MACEDO, 2010). Já na safra 2012/2013, o setor sucroenergético obteve uma receita total de US\$ 36 bilhões, segundo levantamento da União da Indústria da Cana-de-Açúcar (UNICA). Dessa receita total, 53% (US\$ 19,08 bilhões) foi obtida com operações com o açúcar, sendo 38% (US\$ 13,68 bilhões) com exportações, e 15% (US\$ 5,4 bilhões) com sua comercialização dentro do país. Outros 44% (US\$ 15,84 bilhões) da receita são provenientes da comercialização do etanol, sendo 7% (US\$ 2,52 bilhões) resultado da exportação do produto, 35% (US\$ 12,6 bilhões) para consumo como combustível veicular no país e 2% (US\$ 720 milhões) para outros fins (CANANEWS, 2013).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013), existem 389 unidades produtoras cadastradas no Departamento da Cana-de-açúcar e Agroenergia, das quais 250 são unidades mistas, produtoras de etanol e açúcar, 11 são produtoras apenas de açúcar e 117 apenas de etanol, e ainda 11 unidades sem identificação da atividade. A predominância das unidades mistas se deve a vantagens empresariais do negócio, já que há a possibilidade de dispor da matéria-prima para a geração de produtos alternativos, possibilitando a eleição do produto com melhor custo-benefício do momento. Por exemplo, em épocas chuvosas e de muita umidade, o rendimento em sacarose da cana-de-açúcar possui baixos níveis, de modo que é mais interessante aumentar a produção de etanol e diminuir ao máximo possível a produção de açúcar. Nos períodos de seca, o rendimento em sacarose está máximo, permitindo o procedimento inverso. Porém, mesmo assim, é levada em conta a relação de preço dos produtos (CONAB, 2012). A distribuição das usinas pelo Brasil é demonstrada na Figura 2.

Mais uma vantagem das unidades de produção mistas é o reaproveitamento do melaço residual do processo de fabricação de açúcar. Após uma reidratação, o

mesmo pode ser utilizado para a produção de etanol, adicionando valor a um subproduto que normalmente é utilizado para alimentação animal e possui apenas uma parte do preço do açúcar, produto principal (CONAB, 2012).

Figura 2: Distribuição das usinas por estado.

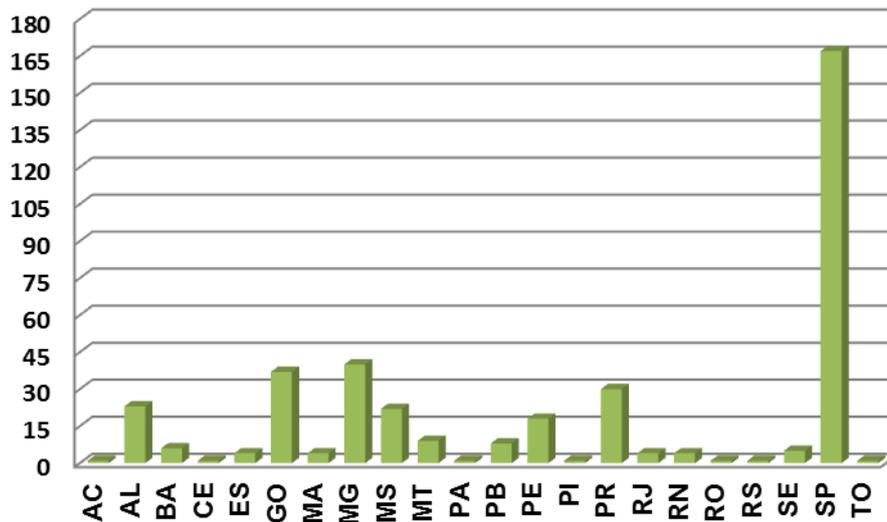


Ilustração por Ohana Costa. Fonte: BRASIL, 2013.

2.3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL

O microrganismo mais estudado e utilizado na indústria para a produção de fermentados é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seguida pela bactéria *Zymomonas mobilis*. *S. cerevisiae* é amplamente encontrada na natureza, porém é mais comumente associada a processos de fermentação industrial, em geral, produção de bebidas alcoólicas e etanol combustível, embora também seja empregada na panificação (ANDRIETTA et al., 2006; SANTOS et al., 2011). *Z. mobilis* é uma bactéria gram-negativa, utilizadora de sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono e energia, produzindo quantidades equimolares de etanol e gás carbônico, além de crescer em faixas de pH entre 3.5 e 7.5 (SWINGS; DE LEY, 1977). Esta bactéria tem sido estudada devido ao seu grande potencial fermentativo, pois sua produção de etanol é comparável ou até mesmo superior a de leveduras (NETO et al., 2005).

O sucesso nos processos fermentativos está ligado à escolha correta do microrganismo a ser utilizado. É necessária a seleção de leveduras com alta velocidade de fermentação, dominância e permanência durante a safra, produção

pequena de glicerol, pouca formação de espuma, alta tolerância ao substrato e ao etanol, resistência a altas temperaturas entre outras. Apesar de todas essas características, as maiores exigências são elevada eficiência de conversão de açúcares em etanol, assim como resistência à acidez, devido ao tratamento com ácido sulfúrico para eliminar contaminações (SANTOS et al., 2011). Assim, *S. cerevisiae* é ideal para a fermentação industrial, já que possui atributos como: capacidade de converter açúcares em etanol rapidamente, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, resistência a grandes variações de temperatura e atividade celular em pH baixo (ANDRIETTA et al., 2006). Outras leveduras utilizadas na indústria são: *S. ellipsoideus* (produção de vinho); *S. calbergensis* (produção de cerveja); *S. uvarum* (produção de vinho)(GTC, 2011). As cepas de leveduras selecionadas PE2 e CAT1 têm sido utilizadas com sucesso nos processos fermentativos das usinas brasileiras. Durante muitos anos, esses isolados têm demonstrado a maior taxa de dominância e persistência nos processos industriais (AMORIM et al., 2011). CAT1 foi a quarta levedura a ter seu genoma sequenciado, e junto com PE2, é a mais utilizada nas destilarias brasileiras, sendo responsáveis por aproximadamente 60% da produção nacional (ESALQ, 2007). Milhões de dólares têm sido investidos no desenvolvimento de linhagens de leveduras tolerantes a condições estressantes, assim como as leveduras brasileiras. Além disso, PE2 e CAT1 estão entre os melhores candidatos para expressão de genes heterólogos de importância industrial (AMORIM et al., 2011).

Existem diversos tipos de fermentação, os quais são classificados em contínuos e descontínuos (batelada), que podem ou não reutilizar o inóculo de microrganismos. Nos processos em batelada, o enchimento da dorna, o inóculo e a retirada do mosto fermentado são realizadas de modo intermitente, ou seja, somente ao final da fermentação, o vinho levedurado é levado para separação. Quando o processo é contínuo, o fermentador é alimentado continuamente com mosto, que ao ser fermentado é retirado de forma também contínua, numa vazão constante. O processo utilizado na maioria das destilarias do Brasil é o de Melle-Boinot, também conhecido como batelada alimentada, pois há introdução de nutrientes de forma não contínua e não há retirada de porções antes do final da fermentação (Figura 3). Ao término do procedimento, o vinho levedurado é enviado a um tanque-pulmão, onde são separadas duas frações: o vinho delevedurado, que segue para a dorna volante,

e posteriormente para a destilação, e o leite de leveduras, um concentrado que é enviado para as cubas de tratamento com ácido sulfúrico (SANTOS et al., 2011).

Figura 3: Processo de fermentação de Melle-Boinot.

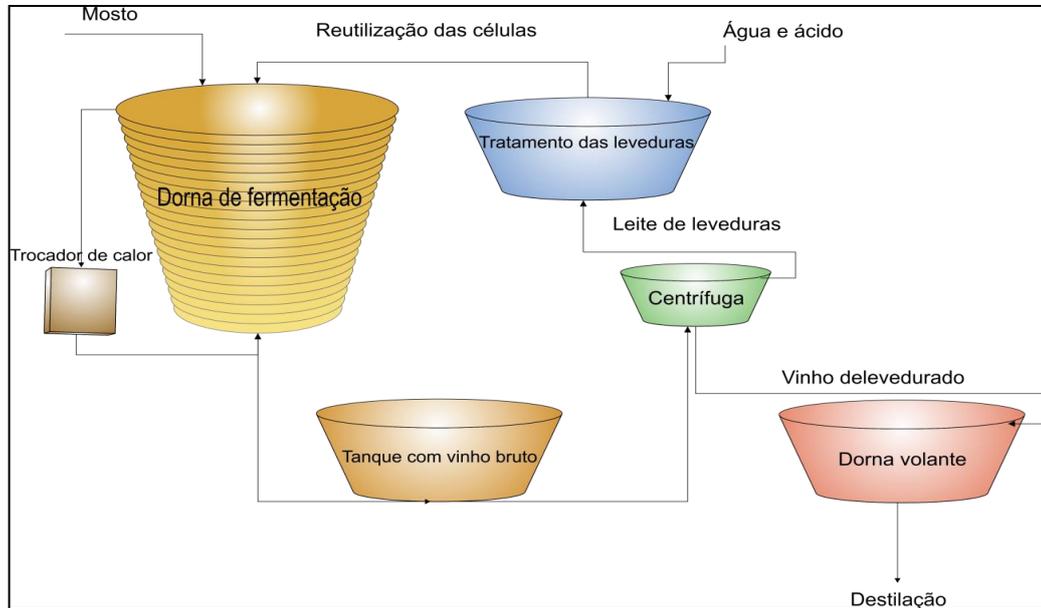


Ilustração por Ohana Costa

O método possui vantagens econômicas. Pela reutilização dos microrganismos fermentadores, apresenta menores perdas de fermento, tempo de fermentação, consumo de nutrientes, volume de vinho e gasto com ácido sulfúrico, se comparado com os outros tipos de fermentação. Oferece ainda maiores eficiência de fermentação e produtividade, o vinho contém maior teor alcoólico e não é necessária a renovação constante do fermento, a não ser em casos de contaminação grave (SANTOS et al., 2011).

2.3.1. Processamento

Depois do corte, a cana-de-açúcar deve ser transportada o mais rápido possível para a usina, para evitar perdas de sacarose. O transporte utilizado são os caminhões, cuja capacidade de carga varia de 15 a 60 toneladas. O armazenamento da cana-de-açúcar deve ser de curto período, já que a fase em que a matéria-prima é mais suscetível à deterioração se dá durante o tempo decorrido entre o corte e a moagem. A deterioração se inicia no momento da queima/corte da cana-de-açúcar. (BNDES; CGEE, 2008; MUTTON, 2008). As usinas trabalham somente durante o período de safra, que varia de acordo com o período de chuvas, visando alcançar o

melhor ponto de maturação e acumulação de açúcares. Na região Centro-Sul, a colheita é de abril a dezembro, enquanto que na região Nordeste acontece de agosto a abril. O sistema tradicional de colheita, utilizado ainda em aproximadamente em 70% das áreas cultivadas, envolve a queima prévia do canavial e o corte manual da planta. Porém, o procedimento vem sendo substituído pela colheita mecanizada sem queima, devido a restrições ambientais (BNDES; CGEE, 2008).

Toda a cana-de-açúcar que entra na usina é pesada, ainda dentro do caminhão, utilizando-se uma balança do tipo plataforma. O peso da carga é obtido pela diferença entre o caminhão cheio e vazio. Em seguida, a cana pode ser processada imediatamente, ou estocada para a moagem posteriormente. A cana-de-açúcar cortada em toletes, por possuir maior superfície de contato, não é armazenada (ABRAHÃO, 2007).

Ao chegar à usina, normalmente, a cana-de-açúcar inteira é lavada e segue para o sistema de extração do caldo, baseado em moendas que pressionam a cana-de-açúcar para a retirada do caldo. Os conjuntos podem possuir entre quatro e sete ternos de moenda (BNDES; CGEE, 2008). Antes de entrar nas moendas, a cana-de-açúcar ainda passa por picadores, que trituram os colmos, preparando-a para a moagem. Nos ternos, a cana-de-açúcar é desfibrada, separando o caldo do bagaço. A cana-de-açúcar desfibrada, então, passa por sucessivas lavagens com água quente, liberando seus açúcares por lixiviação. A função desse processo, repetido até seis vezes, é embeber o interior das células da cana-de-açúcar, diluindo os açúcares e aumentando a eficiência da extração para até 96% do açúcar existente. O caldo é enviado para o tratamento, e o bagaço segue para as caldeiras, com a finalidade de ser queimado como combustível (BNDES; CGEE, 2008; CHIEPPE JÚNIOR, 2012).

O caldo gerado na extração pode ter entre 0,1 a 1% de impurezas, comumente areia e partículas de bagaço, eliminadas com a utilização de telas fixas com malhas de 0,5 a 2,0 mm, seguidas de telas rotatórias ou vibratórias, com malhas de 0,2 a 0,7 mm. (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994). O tratamento completo inclui a utilização de cal, corrigindo o pH para 6,8 a 7,2, aquecimento a 105°C, seguidos de decantação, para eliminação de partículas mais pesadas, produzindo o caldo clarificado (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994; BNDES; CGEE, 2008).

A próxima etapa é a evaporação do caldo a 115°C para concentração de açúcares a aproximadamente 20° brix, eventualmente havendo a mistura com o melaço para a formação do mosto. O brix se refere à quantidade de sólidos solúveis presentes em uma solução (CHIEPPE JÚNIOR, 2012). Esse aquecimento favorece também a eliminação de alguns microrganismos contaminantes (BNDES; CGEE, 2008; CHIEPPE JÚNIOR, 2012). Posteriormente, o líquido é resfriado a aproximadamente 30°C para a realização da fermentação (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994).

O mosto, líquido açucarado pronto para ser fermentado, segue para as dornas de fermentação, onde é feito o inóculo com os microrganismos fermentadores. O processo é realizado por um período de 8 a 12 horas, produzindo o vinho, com uma concentração de 7 a 10% de álcool (BNDES; CGEE, 2008).

Após a fermentação, a levedura é recuperada por centrifugação, separando-se o fermento do vinho bruto. O vinho sai pela parte superior, e o leite de leveduras, pela parte inferior da centrífuga (ABRAHÃO, 2007). A concentração do fermento é de aproximadamente 60%. O mesmo é diluído em água e seu pH é ajustado para aproximadamente 3 com ácido sulfúrico, que também tem propriedades desfloculantes e bacteriostáticas. Esse tratamento dura aproximadamente uma hora, e o fermento está pronto para realizar um novo ciclo fermentativo (CHIEPPE JÚNIOR, 2012)

A destilação do vinho gera o etanol em forma de vapor (flegma, 40-50°GL), e a vinhaça, rica em água, matéria orgânica, nitrogênio, potássio e fósforo, o que possibilita sua utilização como fertilizante na lavoura, na chamada fertirrigação (CHIEPPE JÚNIOR, 2012).

O flegma é, então, concentrado a 96°GL, gerando o etanol hidratado e produzindo-se algumas impurezas como o óleo fúsel (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994; BNDES; CGEE, 2008). Para a produção do álcool anidro, é necessário que o etanol hidratado passe por uma coluna de desidratação, já que o mesmo é uma mistura azeotrópica, o que não permite que seus componentes sejam separados por destilação simples. Para isto podem ser utilizadas colunas de benzeno (não mais utilizado devido a sua toxicidade) ou cicloexano. Na coluna de desidratação, o componente hidrofóbico é posto no topo, e o etanol anidro é retirado no fundo, com 99,7°GL. Posteriormente, a mistura no topo é condensada e decantada, enquanto que a fase inferior, rica em água, é enviada para uma coluna de recuperação do

composto hidrofóbico (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994; BNDES; CGEE, 2008). O processo de produção do etanol está simplificado na Figura 4

Figura 4: Fluxograma do processo de produção do etanol.

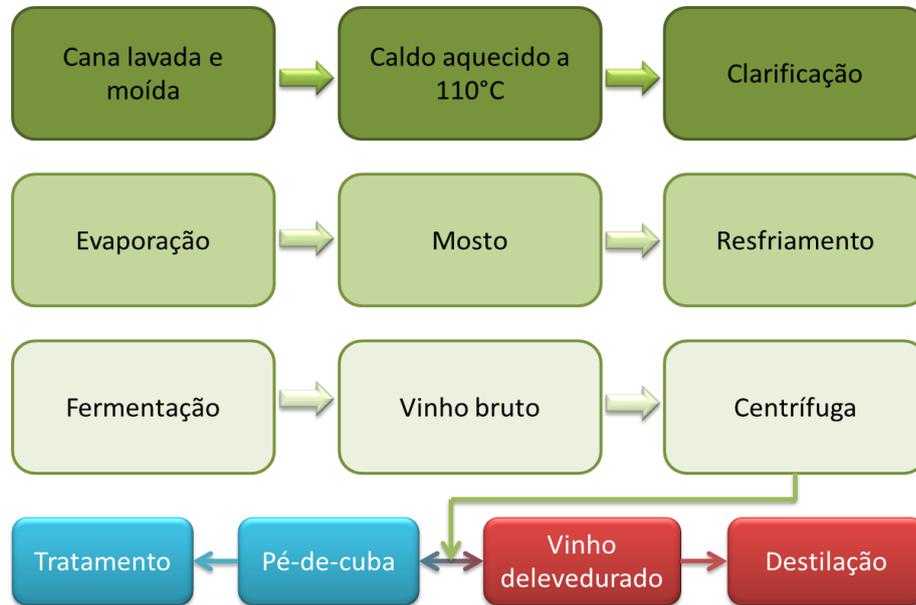


Ilustração por Ohana Costa

2.3.2. Contaminantes do processo de produção do etanol

A contaminação, principalmente bacteriana, é um problema recorrente nas unidades produtoras de etanol. Tanto as infecções agudas quanto as crônicas devem ser levadas em consideração, devido à competição com as leveduras por açúcares e outros nutrientes (SKINNER; LEATHERS, 2004). Já que ao contrário de indústrias de bebidas, a produção do etanol combustível não é realizada em condições estéreis, (SKINNER; LEATHERS, 2004; SKINNER-NEMEC et al., 2007) as contaminações são esperadas e toleradas, embora normalmente afetem negativamente a produção de etanol (SKINNER; LEATHERS, 2004).

O caldo de cana-de-açúcar possui características que o tornam um ótimo substrato para o crescimento de microrganismos, já que possui nutrientes orgânicos, alta atividade de água, pH e temperatura ideais, de maneira que uma ampla microbiota é encontrada normalmente no mosto utilizado para a produção do açúcar e do etanol. O mesmo possibilita ainda a multiplicação dos organismos presentes (GALLO, 1989).

Fatores como forma de colheita, tipo de terreno, variedade da cana-de-açúcar, clima, pragas e doenças, tipo de transporte, armazenamento, entre outros,

contribuem para a quantidade de microrganismos na cana-de-açúcar (GALLO, 1989). A terra é uma das principais impurezas carregadas pela cana-de-açúcar a ser moída, levando consigo bactérias que causam problemas para o processo de produção (AMORIM et al., 2000). A queima da cana-de-açúcar, embora diminua a quantidade de impurezas, leva a planta a um processo de deterioração mais rápido. Isso ocorre devido à retirada da camada serosa do colmo, produzindo fissuras por onde são liberados líquidos ricos em açúcares, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos deterioradores (LARRAHONDO et al., 1998). Ao que se refere à colheita, Eggleston e cols. (2001), constataram que o sistema de colheita mecânico promove deterioração da cana mais rapidamente do que a colheita manual. As colheitadeiras mecânicas promovem múltiplos cortes no colmo, rompendo as células, o que permite a conversão da sacarose, que seria utilizada na indústria, em glicose e frutose. As moléculas de glicose ficam, então, disponíveis para os microrganismos que deterioram a planta, e que, posteriormente, são inseridos no processo de produção.

Já no setor de extração do caldo, os microrganismos são essencialmente provenientes do solo e vegetais, que transportam fungos filamentosos e leveduriformes, bactérias lácticas e formadoras de esporos. Outros focos de contaminação são as moendas, esteiras e outros equipamentos (GALLO, 1989). Os contaminantes podem estar presentes também na água utilizada para embebição e diluição (MUTTON, 2008). Os ciclos sucessivos de reciclagem de toneladas de células de leveduras, assim como a dificuldade para a esterilização de grandes volumes de água e mosto são também fatores que permitem a introdução de microrganismos contaminantes (ABREU-CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013).

As bactérias, ao promover a deterioração da cana-de-açúcar, diminuem o tempo de armazenamento da mesma. Inserem no processo metabólitos indesejáveis que dificultam tanto etapas anteriores à fermentação, quanto alteram o ambiente fermentativo, gerando um ambiente desfavorável à levedura. Provocam floculação e perda de fermento, consomem sacarose e outros nutrientes utilizados pelas leveduras, o que podem diminuir o rendimento alcóolico da fermentação (GALLO, 1989; DE CARVALHO; MONTEIRO, 2011). Podem ainda causar consumo do álcool produzido, perdas de células de leveduras no fundo das dornas, formação de gomas, dificuldade de centrifugação, aumento do uso de ácido no tratamento do fermento e aumento do tempo de fermentação (CHERUBIN, 2003; CEBALLOS-

SCHIAVONE, 2009). Em alguns casos, a contaminação pode chegar a 10^8 bactérias/mL, produzindo perdas de 10.000 a 30.000 litros de etanol por dia em destilarias que produzem milhões de litros (AMORIM et al., 2011).

Mais de 500 bactérias já foram isoladas e identificadas em diferentes etapas da produção do etanol (VIDAL, 2012). O principal gênero de bactérias contaminantes é *Lactobacillus*, adaptado a altas concentrações de etanol, baixo pH e baixas concentrações de oxigênio, condições presentes na fermentação (BECKNER et al., 2011).

Gallo (1989), utilizando amostras do leite de levedura, do mosto e do vinho final, encontrou uma microbiota bacteriana predominantemente Gram-positiva (98,52%), de bastonetes (87,76%) e não esporulados (73,95%). O gênero predominante foi *Lactobacillus*, seguido de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, linhagens de *Enterobacteriaceae*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Ao pesquisar a diversidade de bactérias lácticas na produção do bioetanol em quatro destilarias, entre o 1° e o 180° dia de produção, Lucena e cols. (2010), encontraram principalmente *Lactobacillus vini* e *Lactobacillus fermentum*, que predominaram a partir do 30° dia, indicando sua adaptação ao processo. Outras espécies encontradas foram *L. amylovorus*, *L. manihotivorans*, *L. hilgardii* e *Weissella paramesenteroides*.

Skinner e Leathers (2004), ao estudar contaminantes bacterianos na produção de etanol a partir de milho, encontraram, em sua maioria, bactérias produtoras de ácido láctico. *Lactobacillus* spp. representaram entre 44 e 60% dos isolados, e a espécie mais abundante foi *L. delbrueckii*, de 21 a 45% das espécies de lactobacilos. Foram encontrados também *L. acidophilus* e *L. crispatus*. No trabalho de Chang e cols. (1995), com amostras uma companhia produtora de etanol a partir de tapioca e cevada, foram encontradas também bactérias lácticas, com predominância de *Lactobacillus fermentum*, *L. casei* e *L. salivarius*.

Em seu estudo em escala de laboratório, Makanjuola e cols. (1992), confirmaram que bactérias contaminantes podem inibir a produção de etanol em até 21%, com um inóculo concentrado. Entre as bactérias utilizadas, duas causaram rápida floculação, o que pode interferir na difusão de substratos e produtos para dentro e fora das células de leveduras. Sob condições laboratoriais, Skinner-Nemec e cols. (2007) comprovaram a habilidade dos contaminantes de formar biofilmes, o que pode explicar a persistência de contaminações, dificultando o controle das

mesmas. O resultado dos estudos de Narendranath e cols. (1997) indicam que a produção de ácido láctico e uma provável competição por nutrientes entre bactérias e leveduras são razões importantes para a redução do crescimento e do metabolismo de leveduras, levando a uma diminuição da produção do etanol.

Embora sejam feitos esforços para a prevenção da contaminação por meio de lavagens e desinfecções, tanques de sacarificação, reciclagem de leveduras e biofilmes podem atuar como fontes contínuas de reintrodução de contaminantes. Deste modo, antibióticos podem ser utilizados para controlar ou prevenir a contaminação (DAY et al., 1954). Diversos antibióticos são rotineiramente utilizados para o controle dos contaminantes, como penicilina, tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, virginiamicina e monensina (AQUARONE, 1960; HYNES et al., 1997; BAYROCK et al., 2003). No entanto, o surgimento de cepas resistentes a essas drogas limita a efetividade das mesmas. Já foi observada a diminuição da susceptibilidade de cepas isoladas de *Lactobacillus* aos antibióticos virginiamicina e penicilina (BISCHOFF et al., 2007). A utilização desses antibióticos, porém, tem sido evitada por destilarias que vendem o leite de levedura para a alimentação animal, já que os mesmos deixam resíduos. Desta maneira, é necessário o desenvolvimento de novos compostos com atividade antibiótica que controlem a contaminação, mas que sejam mais seguros para a indústria de alimentação animal e para o meio ambiente (AMORIM et al., 2011; GÓIS et al., 2013).

A contaminação também se dá por leveduras, das quais a mais importante é *Dekkera bruxelensis*, ainda mais difícil de controlar sem atingir diretamente *S. cerevisiae* (BECKNER et al., 2011). Cabrini e Gallo (1999b) definem levedura contaminante como qualquer levedura observada no processo que não seja aquela escolhida para a fermentação alcoólica. Já foi observada a diminuição da produção de etanol, assim como fermentações lentas na presença aumentada de leveduras selvagens, com produção de ácido acético, mesmo na ausência de bactérias lácticas (ABBOTT et al., 2005). Contaminação por leveduras selvagens, principalmente do gênero *Saccharomyces*, são mais difíceis de controlar porque as mesmas possuem um metabolismo muito similar ao das leveduras industriais, no entanto, possuem também características indesejadas, como floculação, produção excessiva de espuma, baixo rendimento fermentativo, e fermentação incompleta de açúcares (AMORIM et al., 2011).

Leveduras selvagens estão presentes na cana-de-açúcar no momento da colheita, de forma que são adicionadas ao processo desde seu início. As leveduras selvagens mais encontradas são: *Dekkera bruxelensis*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis* e *C. intermedia*. A mais estudada é *D. bruxelensis*, capaz de utilizar o etanol como fonte de carbono, o que pode explicar a queda de etanol vista em sua presença (BECKNER et al., 2011).

Cabrini e Gallo (1999a) realizaram a identificação de leveduras na Usina Santa Elisa, a partir de amostras de caldo de cana-de-açúcar, mosto e leite de leveduras. Encontraram 55 isolados, que pertenciam a 19 espécies. Dentre estes, observaram a predominância de *Saccharomyces uvarum* (32,79%), e *Torulopsis dattila* (18,24%), assim como a presença de *Candida*, *Pichia* e *Trichosporon*, entre outros gêneros menos frequentes. Os autores realizaram o mesmo trabalho na Usina da Pedra (1999b) e encontraram 72 isolados pertencentes a 15 espécies, cujas predominantes foram *S. uvarum* (34,95%), *C. entomophila* (16,83%), *S. coreanus* e *S. bayanus* (ambas com 11,1%).

Castro (1995) isolou e caracterizou leveduras de amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado de duas usinas em São Paulo. Das 221 linhagens isoladas da usina Costa Pinto, os gêneros encontrados foram *Saccharomyces* (44,80%), *Candida* (38,91%), *Pichia* (5,43%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (2,72%), *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (1,81%), *Cryptococcus* (1,36%), *Issatchenkia* (1,36%), *Schizosaccharomyces* (1,36%), *Trichosporon* (1,36%) e *Rhodotorula* (0,9%). Na usina Santa Cruz foram isoladas 218 linhagens. Os gêneros observados foram: *Candida* (43,58%), *Saccharomyces* (33,03%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (10,09%), *Kluyveromyces* (8,71%), *Issatchenkia* (1,83%), *Rhodotorula* (0,92%), *Schizosaccharomyces* (0,92%), *Pichia* (0,46%) e *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (0,46%).

Shehata (1960) isolou um total de 139 leveduras de 77 amostras de água utilizada para a lavagem da cana-de-açúcar e caldo de cana-de-açúcar de várias usinas. As leveduras pertenciam a 9 gêneros e 26 espécies. Dos 9 gêneros, os mais frequentes foram *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Torulopsis*.

Embora as leveduras possam trazer problemas para o processo de produção, pode ser também que alguns contaminantes apresentem características interessantes, como bom desempenho fermentativo, de forma que podem ser

escolhidas para operar na fermentação em safras posteriores (CABRINI; GALLO, 1999a).

A produção do açúcar em usinas mistas compartilha parte de seu processo de produção com a produção de etanol, no entanto, após a produção do mosto, o mesmo segue caminhos diferentes, sendo utilizado para a evaporação, na produção do açúcar, e para a fermentação, no caso da produção de etanol (VIEIRA; FERNANDES, 2012). A produção do açúcar deve seguir padrões microbiológicos de qualidade, de modo que seja possível sua ingestão por parte dos consumidores. Os microrganismos presentes no local de fabricação de açúcares, como bactérias, fungos e leveduras são de considerável importância, já que afetam a qualidade do produto e podem representar perigo à saúde. Sua presença, no entanto, resulta, normalmente, da não utilização das normas básicas de procedimentos de produção de alimentos, como as boas práticas de fabricação (BPF) e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), necessárias para a fabricação de alimentos microbiologicamente seguros (PARAZZI et al., 2009; VIEIRA; FERNANDES, 2012).

2.4. DIVERSIDADE MICROBIANA E TÉCNICAS MOLECULARES

As técnicas independentes de cultivo revolucionaram os estudos de diversidade microbiana. Enquanto que anteriormente os microbiologistas eram limitados devido à impossibilidade de caracterizar microrganismos não cultivados, o advento das técnicas independentes de cultivo possibilitou aos pesquisadores revelar a composição de comunidades microbianas e identificar microrganismos importantes ainda não cultivados (FORNEY et al., 2004)

As sequências que codificam para o RNA ribossômico têm sido utilizadas para elucidar as relações taxonômicas entre vários organismos, além de ser uma ferramenta poderosa no estudo da diversidade genética de amostras ambientais. A amplificação, por meio da técnica de PCR, dos genes do RNA ribossômico de microrganismos não cultiváveis pelas técnicas atuais, proporcionaram uma melhor compreensão de estruturas de diversas comunidades microbianas, especialmente daquelas residentes em ambientes com condições extremas, cujas características são difíceis de reproduzir em laboratório (BAKER et al., 2003).

Entre as macromoléculas utilizadas para análises filogenéticas, os genes dos RNA ribossômicos, principalmente o RNA 16S/18S, foram considerados os mais

convenientes para inferir relações filogenéticas, devido à grande quantidade de informação que possuem, natureza conservada e distribuição universal (LANE et al., 1985). De acordo com Woese (1987), são os melhores “cronômetros moleculares”, já que ocorrem em todos os organismos, suas bases em diferentes posições mudam a taxas muito diversas, permitindo o estabelecimento de relações filogenéticas mesmo entre os organismos mais distantes, têm um tamanho grande e vários domínios.

O gene que codifica o RNA ribossômico 16S presente em bactérias e arqueias, é o mais largamente utilizado. Primeiramente porque sua estrutura com regiões altamente conservadas intercaladas com regiões variáveis e altamente variáveis o faz bastante conveniente para o desenvolvimento de *primers*, assim como a disponibilidade grande quantidade de sequências desse gene em bancos de dados, possibilitando a comparação de clones com sequências de microrganismos cultivados e não cultivados (Figura 5) (LANE et al., 1985; GARCIA-MARTINEZ et al., 1999).

Figura 5: Representação esquemática do gene que codifica para o RNA ribossômico 16S. As áreas em lilás (C1 a C9) representam os domínios conservados, e as outras áreas (V1 a V9) representam as regiões variáveis.



Ilustração por Ohana Costa. Adaptado de (PETROSINO et al., 2009)

Em contraste às bactérias, a identificação taxonômica de fungos baseada em sequências de DNA da subunidade menor do ribossomo eucariótico, o 18S, é um pouco mais problemática, com identificação restrita aos níveis de gênero e família. Isso é primariamente devido à falta de variação dentro dos genes do 18S de espécies mais próximas, resultado de um período pequeno de evolução se comparado às bactérias. (ANDERSON; CAIRNEY, 2004). No entanto, o espaçador interno transcrito (ITS), que separa o gene que codifica a subunidade 18S do gene que codifica a subunidade 28S do RNA ribossômico em eucariotos evolui a uma taxa mais rápida, e pode ser utilizado para identificar fungos em nível de gênero ou inclusive espécie. Devido a uma grande utilização do ITS para estudos moleculares de sistemática fúngica, há agora uma base de dados considerável desse tipo de

sequência (O'BRIEN et al., 2005). O ITS é formado por duas regiões variáveis conhecidas como ITS1 e ITS2, localizadas entre as subunidades 18S e 5.8S e 5.8S e 28S respectivamente (Figura 6) (VIAUD et al., 2000). Segundo Gardes e Bruns (1993), algumas características tornam o ITS uma região conveniente para a identificação molecular de fungos: a região possui entre 600 e 800 pares de base, podendo ser rapidamente amplificada com *primers* universais; o gene que codifica o RNA ribossomal possui diversas cópias, de maneira que pode ser amplificada a partir de amostras de DNA com pouca quantidade, diluídas ou inclusive degradadas; diversos estudos demonstraram que a região possui hipervariabilidade entre espécies de fungos diversas (GARDES; BRUNS, 1991; GARDES et al., 1991; CHEN et al., 1992; WANG et al., 2003), assim como baixa variabilidade intraespecífica (GARDES; BRUNS, 1991; GARDES et al., 1991; CHEN et al., 1992; LEE; TAYLOR, 1992), com apenas uma exceção, o ascomiceto *Fusarium sambucinum* (O'DONNELL, KERRY, 1992).

Para a identificação de leveduras, a região D1/D2, presente no gene que codifica o RNA ribossomal 28S, já era utilizada antes do reconhecimento da região ITS como melhor opção para a identificação de fungos em geral (SCHOCH et al., 2012). A maioria das espécies pode ser identificada utilizando-se essa região, embora o ITS seja necessário para a distinção de espécies próximas, sendo recomendado para diferenciações entre espécies e cepas (FELL et al., 2000).

Figura 6: Representação esquemática das regiões do RNA ribossômico utilizadas para a identificação de fungos. São demonstrados os locais de anelamento dos pares de *primers* ITS1F/ITS4 e NL1/NL4.

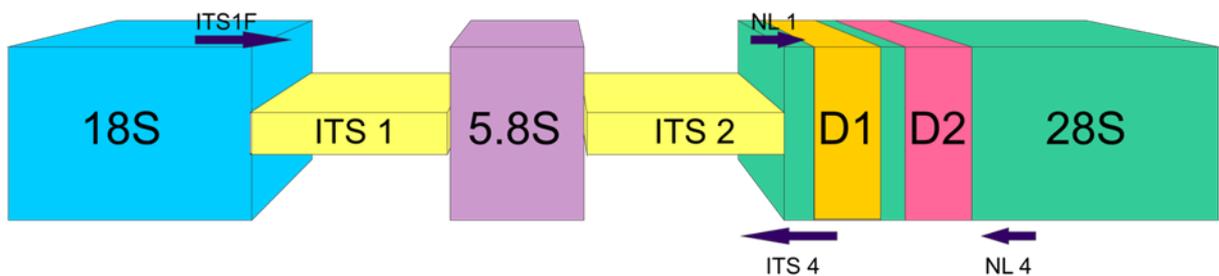


Ilustração por Ohana Costa. Adaptado de (GARDES; BRUNS, 1993; PORTER; GOLDING, 2012)

A abordagem filogenética-molecular de microrganismos não cultivados pode oferecer também uma visão das funções dos microrganismos na comunidade,

através de uma comparação com seus semelhantes previamente estudados (PACE, 1997).

Um dos métodos utilizados para o estudo dos genes que codificam para o RNA ribossômico é a análise da diversidade baseada na extração do DNA total. O DNA é posteriormente utilizado para amplificação por PCR utilizando *primers* universais ou desenhados especificamente para amplificar genes do RNA ribossômico de um grupo específico de organismos. O produto de PCR é clonado em um vetor de escolha e em seguida é feito o sequenciamento (HEAD et al., 1998).

Embora uma grande quantidade de microrganismos tenha sido identificada por meio do sequenciamento de Sanger, novas tecnologias de sequenciamento surgiram revolucionando a descrição e a comparação de comunidades microbianas complexas (PETROSINO et al., 2009; AMEND et al., 2010). O avanço tecnológico permitiu a caracterização de comunidades microbianas de modo mais rápido e com melhor desempenho do que é permitido utilizando-se clonagem e sequenciamento de Sanger (AMEND et al., 2010). Entre as novas técnicas está o pirosequenciamento, um método de sequenciamento de DNA, cujo princípio é o sequenciamento por síntese, primeiramente descrito em 1985. A técnica utilizada é a detecção da incorporação sequencial de nucleotídeos durante a síntese do DNA. Durante a polimerização, a enzima DNA polimerase I libera uma molécula de pirofosfato, que é utilizado pela ATP sulfurilase como substrato para a produção de ATP. O ATP é, então, convertido pela enzima luciferase em sinal luminoso, que então é detectado pela máquina. O sinal é detectado apenas quando um nucleotídeo é adicionado à fita de DNA, e é proporcional à quantidade de nucleotídeos inseridos (ARMOUGOM; RAOULT, 2009). Enquanto o aparelho de primeira geração (GS20, *Life Sciences*) proporcionava apenas sequências de 100 pares de bases e 25 megabase de dados, o mais novo (GS FLX Titanium, *Life Sciences*) produz sequências de aproximadamente 400 pares de bases e 400 megabase de dados. Além disso, é uma alternativa com bom custo-benefício, especialmente para estudos metagenômicos, já que estudos indicaram que o pirosequenciamento produz uma quantidade muito maior de dados a um custo 30 vezes menor do que o sequenciamento convencional (ARMOUGOM; RAOULT, 2008; 2009).

A maioria dos estudos relacionados aos microrganismos contaminantes do processo de produção do etanol envolve apenas o cultivo dos mesmos e testes bioquímicos para sua identificação. No entanto, atualmente, técnicas moleculares

têm sido utilizadas para facilitar essa identificação, e até o momento não há relatos de estudos que utilizam a extração do DNA total seguida de pirosequenciamento para o estudo da comunidade microbiana contaminante existente no processo de produção do etanol.

Lucena e cols., (2010), ao procurar por bactérias ácido lácticas em quatro usinas brasileiras, isolaram morfotipos bacterianos para identificação taxonômica. Para a identificação foram utilizadas as técnicas de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) *fingerprinting* sequenciamento dos genes *pheS* e 16S e REP-PCR (*Repetitive sequence-based PCR*) *fingerprinting*. Liberal e cols. (2006) fizeram a identificação de leveduras retiradas de amostra de mosto de 6 destilarias brasileiras utilizando as técnicas de PCR *fingerprinting*, amplificação das regiões ITS e D1/D2 do RNA ribossômico e PCR-RFLP. Liberal e cols., (2005) utilizaram a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do RNA ribossômico para detectar a presença de leveduras contaminantes de diversas partes do processo de produção de etanol, sem, no entanto, realizar o sequenciamento das mesmas.

Leja e Broda (2009) utilizaram a amplificação do gene do RNA ribossômico 16S para identificar isolados bacterianos de grãos obtidos em destilarias na Polônia. Nos grãos foram encontradas bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Os autores acreditam que a presença de *Enterococcus* e *Enterobacter* indica a permanência de animais no local de armazenamento dos grãos, já que esses gêneros são provenientes do trato gastrointestinal dos mesmos.

Guillamon e cols. (1998) amplificaram a região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do RNA ribossômico para identificar 300 isolados de levedura provenientes da produção de vinho em uma região da Espanha. Para a identificação, os fragmentos amplificados foram clivados com enzimas de restrição, e foram utilizados como referência os fragmentos de restrição de 33 cepas de leveduras já identificadas. Foram encontrados sete padrões de restrição entre os isolados, dos quais cinco foram identificados após comparação, e os outros dois, após testes bioquímicos. Como leveduras dominantes, foram encontradas *Hanseniaspora uvarum* e *Saccharomyces cerevisiae*, no primeiro dia do processo, e apenas o gênero *Saccharomyces*, do terceiro ao décimo segundo dia de fermentação.

Rich e cols. (2011) identificaram bactérias isoladas a partir de biofilmes utilizando a amplificação do gene que codifica o RNA ribossômico 16S. Dez

microrganismos foram isolados, dos quais, seis foram identificados como *Lactobacillus fermentum*, dois identificados como *L. johnsonii*, um *L. mucosae* e um *L. amylovorus*.

Netto (2007) fez a identificação de bactérias contaminantes de fermento da cachaça também por meio do sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossômico 16S, conseguindo um total de 707 sequências. Das 707 sequências, 120 eram sequências de cloroplasto de cana-de-açúcar, 560 eram sequências de bactérias cultivadas, e 27 eram sequências de bactérias não conhecidas. Foram identificados 17 gêneros e 17 espécies entre todas as sequências. A espécie *Lactobacillus brevis* foi encontrada nas quatro amostras utilizadas, e *L. hilgardii*, *L. casei* e *Leuconostoc mesenteroides* foram identificadas em três amostras.

A utilização de técnicas independentes de cultivo para o estudo dos contaminantes do processo de produção de etanol tem o poder de demonstrar que tipos de contaminantes estão presentes em cada etapa do processo, bem como torna possível inferir em que parte do processo os microrganismos são inseridos. A análise de sequências permite a comparação com diversos outros locais e tipos de processos de produção que utilizam outras matérias primas. O conhecimento da comunidade microbiana contaminante pode inclusive proporcionar um melhor controle sobre a mesma.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa o estudo da diversidade de microrganismos contaminantes em seis etapas do processo de produção de etanol utilizando técnicas clássicas de cultivo, assim como técnicas independentes de cultivo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar microrganismos de 6 etapas do processo de produção de etanol;
- Identificar os microrganismos isolados por meio do cultivo com técnicas moleculares;
- Fazer o pirosequenciamento de bactérias, arqueias e fungos presentes nas seis etapas do processo de produção;
- Analisar filogeneticamente as sequências obtidas, avaliando a diversidade microbiana existente nas seis etapas do processo;
- Comparar os resultados do sequenciamento entre as amostras e também com os microrganismos cultivados.

4. JUSTIFICATIVA

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, e o segundo maior produtor de etanol, perdendo apenas para os Estados Unidos. A importância dessa fonte de energia se deve ao interesse no desenvolvimento de energias renováveis e mais limpas, em vista da dependência mundial do petróleo, além da importância econômica para o país.

O processo de produção do etanol combustível, ao contrário da produção alimentícia, não é realizado sob condições estéreis, de maneira que as contaminações são esperadas e toleradas. As principais bactérias contaminantes são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, enquanto que a principal levedura contaminante é *Dekkera bruxelensis*.

Os microrganismos contaminantes da produção de etanol são bem estudados e conhecidos, no entanto, grande parte dos estudos é baseada em técnicas de isolamento em meios de cultivo, técnicas que não revelam toda a composição da comunidade microbiana, já que parte dos microrganismos não são cultiváveis pelas técnicas atuais.

Assim sendo, para compreender melhor a composição da comunidade microbiana contaminante do processo de produção de etanol, é necessária a utilização de técnicas independentes de cultivo, como o sequenciamento e análise do gene que codifica o RNA ribossômico. A técnica permite ainda a comparação entre a composição das comunidades, bem como a comparação com os microrganismos cultivados e estudos realizados anteriormente.

O estudo de diversas etapas do processo de produção proporciona o conhecimento de qual momento os contaminantes são inseridos, gerando a possibilidade de controlar melhor o processo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram coletadas no dia 12 de julho de 2012, em uma usina, no estado de Goiás. Foram coletadas triplicatas das seguintes frações do processo de produção: caldo da cana crua (provenientes da moagem 3kg de plantas de cana-de-açúcar antes de sua entrada no processo), caldo misto (proveniente dos ternos de moagem), caldo clarificado, caldo evaporado, mosto e vinho levedurado. As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro de 500 mL esterilizados e identificados. Os recipientes foram transportados em caixas de isopor com gelo até o processamento das amostras. Um total de 50 mL de cada amostra foram acondicionados em tubos cônicos tipo Falcon, também transportados nas caixas de isopor com gelo. Após o cultivo, todas as amostras foram armazenadas em sacos plásticos a -80°C . Temperatura e pH das amostras, verificados no momento da coleta, estão na tabela 1.

Tabela 1: Temperatura e pH das amostras de diferentes etapas do processo de produção de etanol.

Amostra	Temperatura	pH
Caldo da cana crua	T. A.*	4 - 5
Caldo misto	45°C	5 - 6
Caldo clarificado	83°C	5 - 6
Caldo evaporado	92°C	5
Mosto	35°C	5 - 6
Vinho levedurado	31°C	4

*T.A: Temperatura ambiente.

5.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS – TÉCNICAS DEPENDENTES DE CULTIVO

5.2.1. Isolamento dos microrganismos

Para o isolamento dos microrganismos, foram utilizados quatro meios de cultura pré-selecionados: PCA com cicloeximida 1 mg/L, para bactérias em geral, Man Rogosa e Sharpe (MRS) com cicloeximida 1 mg/L, para bactérias lácticas, YPD com tetraciclina 20 mg/L, para leveduras, e CZAPEK com tetraciclina 20 mg/L, para fungos filamentosos. Os componentes de cada meio de cultura estão listados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Componentes dos meios de cultura PCA e YPD

Meio PCA	Gramas por litro	Meio YPD	Gramas por litro
Peptona	5	Peptona	10
Extrato de levedura	2,5	Extrato de levedura	5
Glicose	1	Glicose	20
Ágar	12	Ágar	12

Meio PCA (ZIMBRO et al., 2009); Meio YPD (SHERMAN, 1991)

Tabela 3: Componentes dos meios de cultura MRS e CZAPEK

Meio MRS	Gramas por litro	Meio CZAPEK	Gramas por litro
Peptona animal	10	Sacarose	30
Extrato de carne	8	NaNO ₃	2
Extrato de levedura	5	K ₂ HPO ₄	1
Glicose	20	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Tween 80	1 mL	KCl	0,5
K ₂ HPO ₄	2	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
CH ₃ COONa	5	Ágar	15
C ₆ H ₁₄ O ₇ N ₂	2		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2		
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,05		
Ágar	12		

Meio MRS (DE MAN et al., 1960); CZAPEK (THOM; RAPER, 1945)

As amostras de caldo da cana crua, caldo misto, caldo evaporado, caldo clarificado e mosto foram diluídas serialmente até 10^{-7} , e as amostras de vinho levedurado foram diluídas até 10^{-8} , devido à sua consistência. Foram semeadas as diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} do vinho levedurado, e 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} das demais amostras. De cada diluição foram semeados 100 μ L em cada um dos quatro meios de cultura, totalizando 216 placas. As placas com meio de cultura PCA e MRS foram incubadas a 37°C e as placas com meio de cultura YPD e CZAPEK foram incubadas a 30°C. A incubação durou sete dias para os meios para bactérias, com verificação das placas todos os dias, e a incubação para os meios para fungos durou 14 dias, com verificação diária de crescimento. Foi feita a contagem de microrganismos nas placas, e os mesmos foram isolados e reisolados até que se restasse visualmente apenas um tipo de colônia em cada placa. Após o isolamento, as bactérias e leveduras foram crescidas em meio líquido, de acordo com o meio em que foram isoladas, e foram armazenadas a -80°C com glicerol 20%. Os fungos filamentosos,

após esporulação, tiveram seus esporos armazenados a -80°C com glicerol 20%. Foram tiradas fotos de todos os microrganismos, e os mesmos foram descritos morfológicamente. Os microrganismos foram nomeados conforme a amostra de origem, por exemplo: C1L1: “C1” representa a primeira replicata da amostra caldo da cana crua. Pode variar para C2, C3 (cana crua); CM1, CM2, CM3 (caldo misto); CCL1, CCL2, CCL3 (caldo clarificado); CE1, CE2, CE3 (caldo evaporado); M1, M2, M3 (mosto) e V1, V2, V3 (vinho). Após a identificação da amostra, está o tipo de microrganismo, que pode ser B (bactéria), L (levedura), e F (fungo filamentosos), seguido do número recebido pelo microrganismo.

5.2.2. Cultura monospórica dos fungos filamentosos

Para a identificação molecular dos fungos filamentosos, primeiramente foi feita a cultura monospórica dos mesmos. Os fungos filamentosos estocados foram cultivados em meio BDA sólido com tetraciclina 20 mg/L. Para a produção de 1 litro de meio BDA sólido, 200 g de batatas descascadas foram cozidas em 500 mL de água destilada até ficarem macias, o caldo resultante do cozimento foi filtrado com gaze, foram adicionados 20 g de glicose. A glicose foi dissolvida e o volume foi completado para um litro com água destilada, homogeneizado com 15 g de ágar, e autoclavado. Após o meio ser vertido, os fungos foram inoculados e crescidos em estufa a 30° até sua esporulação, por aproximadamente sete dias. Após a esporulação, foi realizada a cultura monospórica. Para tal, foi adicionada à cultura 1 mL de água destilada, em seguida a água foi recuperada e foram feitas diluições seriadas até 10^{-3} . As três diluições foram semeadas e incubadas na estufa a 30°C . Foram feitas observações diárias, até que as culturas que cresceram em colônias isoladas pudessem ser observadas, e inoculadas em novo meio de cultura e deixadas na estufa a 30°C por sete dias, gerando a cultura monospórica. As culturas monospóricas foram armazenadas a -80°C com glicerol 20%. Posteriormente, foram novamente inoculadas em meio BDA sólido e crescidas em estufa a 30°C por sete dias, para o inóculo da extração de DNA.

5.2.3. Extração de DNA dos microrganismos

A extração de DNA de bactérias e leveduras foi realizada utilizando-se o kit *MasterPure™ DNA Purification Kit* (Epicentre, Madison, WI). Primeiramente, colônias isoladas de cada um dos microrganismos foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura líquido, PCA ou MRS para bactérias e YPD ou CZAPEK para leveduras. As bactérias foram incubadas a 37°C e as leveduras a 30°C, por 24h, sob agitação constante. Posteriormente prosseguiu-se com a extração de DNA, de acordo com as instruções do fabricante.

A extração de DNA dos fungos filamentosos foi feita de acordo com Cenis (1992), com modificações. Foi realizada a cultura de fungos em 1 mL de meio BDA líquido, em tubos de microcentrífuga de 2 mL, por 72 horas a 30°C, sob agitação. Após o tempo necessário, foi adicionado 0,1% de SDS à cultura, e a mesma foi centrifugada a 13000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 1 mL de solução STE (NaCl 0,1 M, Tris HCL pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1mM) e 0,1% de SDS, e a cultura foi novamente centrifugada a 13000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 600 µL de tampão de lise (Tris HCL pH 8.0 200mM, NaCl 250 mM, EDTA pH 8.0 25 mM, SDS 1%) e uma *bead* de vidro estéril de 4 mm de diâmetro. Os tubos foram dispostos no aparelho *TissueLyser* LT (QIAGEN, Hilden, Germany), no qual foram realizados 2 ciclos de 1 min com 45 vibrações. Para os fungos que não demonstraram ruptura visualmente com 2 ciclos, foram realizados 3 ou 4 ciclos. As amostras foram centrifugadas a 13000 g por 30 s para retirada de espuma. Em seguida, foram adicionadas 200 mg/mL de proteinase K. As amostras foram incubadas a 65 °C por 15 min, vortexando-se as mesmas à velocidade máxima rapidamente a cada 5 min. A seguir, foram adicionados 60 mg/mL de RNase A, e as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução de precipitação de proteínas (acetato de sódio 3M pH 5.2) e as amostras foram incubadas a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 13000 g por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 500 µL de isopropanol, e as amostras foram invertidas 40 vezes. As amostras foram centrifugadas a 13000 g por 10 minutos. O pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70%, que em seguida foi descartado. O etanol restante foi evaporado, e as amostras

foram ressuspensas em 25 μ L de H₂O ultrapura (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, USA).

5.2.4. Amplificação do gene que codifica o RNA ribossômico 16S de *Bacteria*, região D1/D2 para leveduras e ITS de fungos filamentosos e leveduras.

O DNA genômico das bactérias foi empregado para a amplificação por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3')(LANE, 1991), e 1492R (5' GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (STACKEBRANDT; LIESACK, 1993), universais para o domínio *Bacteria*. A reação foi realizada em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, USA), com os seguintes parâmetros: 95°C por 3 min, 25 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 1 min e 40 s, e um ciclo final de 72°C por 7 min. Cada reação de 20 μ L continha aproximadamente 10 ng de DNA total, 0,25 μ M de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 0,4U da enzima Taq Polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Minas Gerais, BR) e 1X de tampão da enzima (com 1,5 mM de MgCl₂). Como controle positivo foi utilizado o DNA genômico de *Escherichia coli*, e água destilada foi utilizada como controle negativo.

A amplificação do DNA das leveduras foi realizado utilizando-se os *primers* para o domínio D1/D2, presente no gene que codifica o RNA ribossomal 28S, NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3') (O'DONNELL, K., 1993). A reação foi realizada em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, USA), com as seguintes condições: 95°C por 4 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 7 min. Cada reação de 20 μ L continha aproximadamente 10 ng de DNA total, 0,25 μ M de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 0,4u da enzima Taq Polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 1X de tampão da enzima (com 1,5 mM de MgCl₂). Também foram utilizados os *primers* para o domínio ITS, específicos para fungos, ITS1F (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3') (GARDES; BRUNS, 1993) e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE, T. J. et al., 1990). A reação foi realizada em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, USA), com os seguintes parâmetros: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Cada reação de

20 μ L continha aproximadamente 10 ng de DNA total, 0,25 μ M de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 0,4U da enzima Taq Polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 1X de tampão da enzima (com 1,5 mM de $MgCl_2$).

Para a amplificação do DNA dos fungos filamentosos foi usado o par de *primers* ITS1F e ITS4. A reação foi realizada em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, USA), com os seguintes parâmetros: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Cada reação de 20 μ L continha aproximadamente 10 ng de DNA total, 0,25 μ M de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 0,4U da enzima Taq Polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 1X de tampão da enzima (com 1,5 mM de $MgCl_2$). Todas as reações foram purificadas utilizando-se o kit *GeneJET PCR Purification Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo para as reações contendo os pares de *primer* NL1/NL e ITS1F/ITS4 foi utilizado DNA genômico de levedura, e água destilada foi utilizada como controle negativo.

5.2.5. Sequenciamento e análise das sequências

A reação de sequenciamento dos clones selecionados foi executada no sequenciador automático *ABI PRISM 3130 Genetic Analyser* (*Applied Biosystems* Foster City, Califórnia, USA). Para cada reação foram utilizados 3.2 pM de *primer* (27F para bactérias, NL1 e ITS1F para leveduras e ITS1F para fungos filamentosos), e 3 μ L de mix do kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, USA). A reação foi realizada sob as seguintes condições: 96°C por 1 minuto, 25 ciclos consistindo de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 2 minutos e posteriormente um último ciclo de 60°C por 4 minutos.

A análise das sequências foi realizada por meio de ferramentas de bioinformática. As sequências de baixa qualidade foram retiradas utilizando-se a ferramenta de verificação de qualidade do programa *Sequence Scanner v.2.0* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, USA). As sequências restantes de bactérias e D1/D2 de leveduras foram submetidas ao *Ribosomal Database Project II*

Release X (RDP) (COLE et al., 2009) para a comparação filogenética por meio da ferramenta *CLASSIFIER*, utilizando-se um limite de confiança de 90%. As sequências de ITS de leveduras e fungos filamentosos foram classificadas utilizando-se a ferramenta *classify.seqs* do pacote de softwares *Mothur* (SCHLOSS, P. D. et al., 2009), utilizando-se a base de dados UNITE (KÖLJALG et al., 2013). O alinhamento das sequências de bactérias foi realizado utilizando-se a ferramenta *align.seqs*, contida no pacote de softwares *Mothur* (SCHLOSS, P. D. et al., 2009) Como referência, foi utilizada as bases de dados SILVA (QUAST et al., 2013). Já as sequências de leveduras (ITS e D1/D2) e fungos filamentosos foram alinhadas utilizando-se a ferramenta de alinhamento *online* MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) (KATO; STANDLEY, 2013). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o programa MEGA 6 (TAMURA, KOICHIRO et al., 2013), empregando-se o método de *Maximum Likelihood* (ML), com o modelo de *Tamura-Nei* (TAMURA, K.; NEI, 1993) e *bootstrap* de 1000 repetições. Para a construção das árvores filogenéticas foram utilizadas também sequências de referência, retiradas dos bancos de dados RDP e Genbank. As sequências e seus números de acesso no *Genbank* estão no apêndice D.

5.2.6. Ensaios antimicrobianos

Para os ensaios preliminares com antimicrobianos, foi escolhido um representante de cada um dos sete gêneros predominantes entre as bactérias cultivadas, determinados após a análise das sequências dos mesmos. Foi feito um pré-inóculo de cada um dos microrganismos em 5 mL de meio PCA líquido, e os mesmos foram incubados sob agitação a 37°C por 24 horas. Posteriormente, densidade óptica (OD) dos pré-inóculos foi medida a 600nm em espectrofotômetro Ultrospec™ 3100 pro (*Amersham Biosciences*, Amersham, UK), e em seguida, foram diluídas para atingir a densidade óptica (OD) de 0,05, utilizada para o experimento. Foram utilizados para os testes três antibióticos cedidos pela usina, KAMORAN® (Elanco Brasil, Morumbi, São Paulo, BR), CORSTAN® (Elanco Brasil, Morumbi, São Paulo, BR) e BACTRAN® (BIOFERM, Cosmópolis, São Paulo, BR). Também foram utilizados 4 peptídeos antimicrobianos, cedidos pelo aluno de doutorado Osmar Nascimento, Catelecidina LL-37, Cecropina, Clavanina A e Mastoparano. As concentrações utilizadas para os antibióticos foram 0,006 mg/mL,

0,003 mg/mL, 0,0015 mg/mL e 0,0007 mg/mL. Os peptídeos antimicrobianos foram utilizados nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL. Os ensaios foram realizados em placas de ELISA de 96 poços de fundo chato. As bactérias foram incubadas com os antibióticos comerciais e peptídeos antimicrobianos por 48 horas a 37°C sob agitação. Como controle de crescimento positivo bacteriano, foi utilizada a bactéria testada sem antibiótico, e como controle de inibição de crescimento, foi utilizada a bactéria testada incubada com gentamicina 100 µg/mL. Posteriormente, as densidades ópticas foram lidas em espectrofotômetro *Eon™ Microplate Spectrophotometer (Bio Tek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, USA)*. Os resultados foram reunidos em planilhas do Excel.

5.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS – TÉCNICAS INDEPENDENTES DE CULTIVO

5.3.1. Extração de DNA total

Para a extração de DNA, foi realizada primeiramente a concentração das amostras por centrifugação. Aproximadamente 40 mL de cada amostra foram descongelados e centrifugados a 18.650 g por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado para a extração de DNA total. O DNA foi extraído utilizando-se o kit de extração *FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, Califórnia, USA)*. A qualidade do DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% e o tamanho foi estimado por meio de comparação com o marcador *1kb plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA)*.

5.3.2. Amplificação do gene que codifica o RNA ribossômico, região ITS e pirosequenciamento

O DNA total das amostras foi empregado para a amplificação por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados os *primers* 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') (LANE, 1991), e 519R (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3') (TURNER et al., 1999) universais para o domínio *Bacteria*, os *primers* 109F (5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3') (WHITEHEAD; COTTA, 1999) e 915R (5'-

GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') (STAHL; AMANN, 1991) para o domínio *Archaea*, e os *primers* ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') (GARDES; BRUNS, 1993) e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (WHITE, T. J. et al., 1990) para o reino *Fungi*. Para o pirosequenciamento, as sequências de oligonucleotídeos foram montadas incluídos os adaptadores A ou B da 454 *Life Sciences* (*Roche Diagnostics*, Indianapolis, USA), e os MIDs (*Multiplex Identifiers*) (*Technical Bulletin* TCB N°04/05-2009 Abril 2009). Para cada amostra a ser sequenciada, foi utilizado um MID diferente adjacente ao *primer* direto (*primer* F), 27F, 109F ou ITS1F, de modo que após o sequenciamento, as amostras pudessem ser separadas. No *primer* reverso (*primer* R) de cada um dos pares, não houve adição do MID. A montagem dos *primers* ficou da seguinte forma: *primer* F (5'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC TCAG MID sequência do *primer* F-3'), e *primer* R (5'-CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TC TCAG sequência do *primer* R-3').

Com os *primers* para *Bacteria*, foram sequenciadas as amostras de caldo da cana crua 1, 2 e 3, caldo misto 1, 2 e 3, caldo clarificado 2, caldo evaporado 2, mosto 2 e vinho 1, 2 e 3. Com os *primers* de *Archaea* foram sequenciadas as amostras de cana crua 1, 2 e 3 e caldo misto 1, 2 e 3. Com os *primers* para *Fungi*, foram sequenciadas as amostras cana crua 1, 2 e 3, caldo misto 1, 2 e 3 e vinho 1, 2 e 3.

As PCRs foram realizadas em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Para os *primers* 27F/519R foram utilizados os seguintes parâmetros: 95°C por 3 min, 25 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 1min e 40 s, e um ciclo final de 72°C por 7 minutos. Cada reação de 20 µL continha aproximadamente 10 ng de DNA total, 0,25 µM de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 0,4 u da enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, BR) e 1X de tampão da enzima (com 1,5 mM de MgCl₂).

Para os *primers* 109F/915R foram utilizadas as seguintes condições: 5 min a 94°C, 25 ciclos consistindo de 60s a 52°C, 90s a 72°C e 60s a 94°C, e um último ciclo de 52°C por 60s e 72°C por 6 min. Para cada 20 µL de reação foram utilizados aproximadamente 10 ng de DNA, 0,25 mM de dNTP, 0,3 µM de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP e 0,4u de enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, BR) e 1X de tampão da enzima (com 1,5 mM de MgCl₂).

A amplificação com os *primers* ITS1/ITS4 se deu sob as seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Cada reação de 20 µL continha aproximadamente 10 ng de DNA total, 0,25 µM de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 0,4u da enzima Taq Polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 1X de tampão da enzima (com 1,5 mM de MgCl₂). Um total de 10 PCRs foram realizadas para cada amostra. Essas reações foram unidas e purificadas com o kit *GeneJET PCR Purification Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA). Após a purificação, as amostras foram quantificadas em gel de agarose em camada fina 1%, por meio do fluorômetro Qubit ® (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, USA) e por meio do espectrofotômetro *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA). Em seguida, as amostras foram enviadas para a empresa Macrogen (Geumcheon-gu, Seoul, KOR), onde foi realizado o pirosequenciamento no sequenciador *GS FLX Titanium* (*Roche Diagnostics*, Indianapolis, USA). Utilizou-se um quarto de placa (*PicoTiter Plate™*), dividida em duas partes. Todas as amostras puderam ser sequenciadas dessa maneira, já que a presença dos MIDs permite a separação das amostras. A empresa juntou 15 amostras em uma região da placa, e 16 na outra região. Após o sequenciamento, foram recebidos os arquivos no formato *.sff* das duas regiões da placa.

5.3.3. Análise computacional das sequências

As sequências recebidas foram analisadas seguindo-se o *pipeline* 454 SOP (*Standard Operational Procedure*), (disponível em: http://www.mothur.org/wiki/454_SOP), com o pacote de *softwares* Mothur (SCHLOSS, P. D. et al., 2011) As informações contidas nos arquivos *.sff* foram extraídas com a ferramenta *sffinfo*, gerando arquivos *.fasta*, *.qual* e *.flow*. As sequências foram, então, separadas de acordo com os MIDs com a ferramenta *trim.flows*, e então os artefatos (ruídos) das sequências foram retirados com a ferramenta *shhh.flows*, uma adaptação do algoritmo PyroNoise. Os MIDs e adaptadores foram retirados com *trim.seqs*. As sequências de *Bacteria* e *Archaea* foram, então, alinhadas com a ferramenta *align.seqs*, utilizando-se as bases de dados SILVA (QUAST et al., 2013) como referência. As mesmas bases de dados foram utilizadas para a retirada de sequências quiméricas na ferramenta

chimera.uchime. Para o alinhamento das sequências de *Fungi* foi utilizada a ferramenta de alinhamento *online* MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013). Para a retirada das sequências quiméricas foi utilizado o *chimera.perseus*, cujos cálculos não exigem a presença de sequências de referência. As sequências de ITS das amostras de vinho 1, vinho 2 e vinho 3, após a retirada das quimeras, foram analisadas separadamente, já que poucos dados foram gerados.

Foi feita a classificação filogenética das sequências por meio da ferramenta *classify.seqs*, utilizando-se as bases de dados SILVA para *Bacteria* e *Archaea*, e a base de dados UNITE (KÖLJALG et al., 2013) para *Fungi*. Em seguida, foram definidas as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) para cada grupo de amostras com a ferramenta *cluster*, baseadas na identidade de 97%.

As curvas de rarefação foram produzidas com *rarefaction.single*, e para esta análise, foi feita uma normalização de cada grupo de amostras, deixando-se o mesmo número de sequências para todas as amostras de cada domínio. Posteriormente, foram calculados os índices de riqueza *Chao1* e *ACE*, os índices de diversidade *Shannon* e *Inverse Simpson*, assim como a cobertura sequenciamento para cada grupo de amostras.

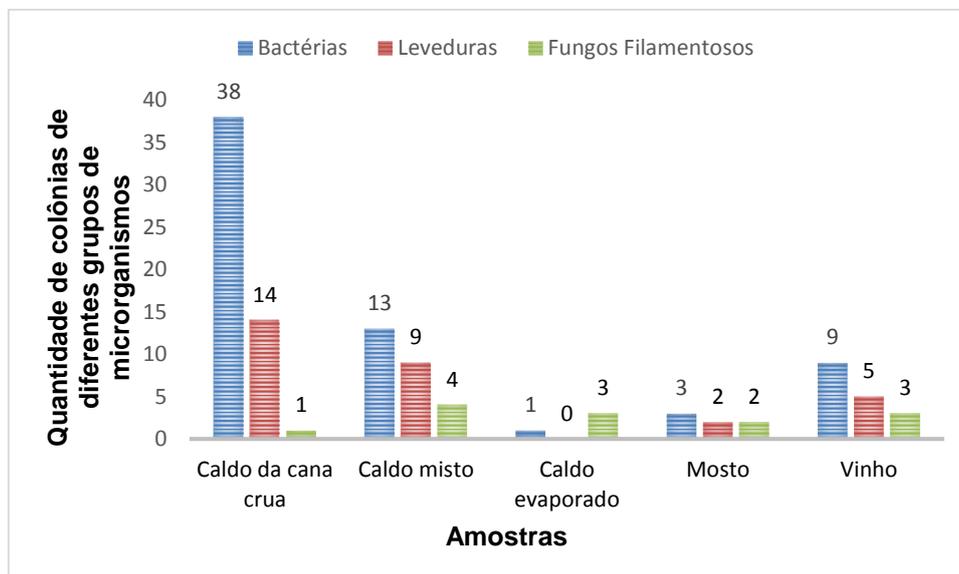
A comparação da entre as comunidades microbianas de cada amostra foi realizada e visualizada por meio de gráficos de PCoA (Análise de Coordenadas Principais), utilizando-se o *software online* UniFrac (LOZUPONE et al., 2006) (disponível em: <http://bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp>). O valor de *p-value*, para detectar se as diferenças entre as comunidades eram estatisticamente significantes foi calculado por meio da ferramenta AMOVA (Análise de variância molecular), disponível no pacote de *softwares* *Mothur*.

6. RESULTADOS

6.1. ISOLAMENTO

. No total, foram obtidos 61 isolados de bactérias, 33 isolados de leveduras e 18 isolados de fungos filamentosos. Foram armazenados, no total, 112 microrganismos. Porém, após o sequenciamento, sete dos microrganismos isolados em meio de cultura para leveduras revelaram ser bactérias, assim como quatro microrganismos isolados em meio de cultura para bactérias se revelaram leveduras. Desse modo, o número de bactérias isoladas passou de 61 para 64, e o número de leveduras isoladas foi para 30. Das bactérias “novas”, quatro pertencem ao caldo da cana crua, duas ao caldo misto e uma ao caldo evaporado. Das “novas” leveduras, duas pertencem a cana crua e duas ao caldo misto. Seis das bactérias ainda aguardam sequenciamento, assim como duas leveduras. Na Figura 7, pode-se observar a distribuição dos diferentes grupos de microrganismos entre as amostras. As fotos e as descrições dos microrganismos estão nos apêndices A, B e C.

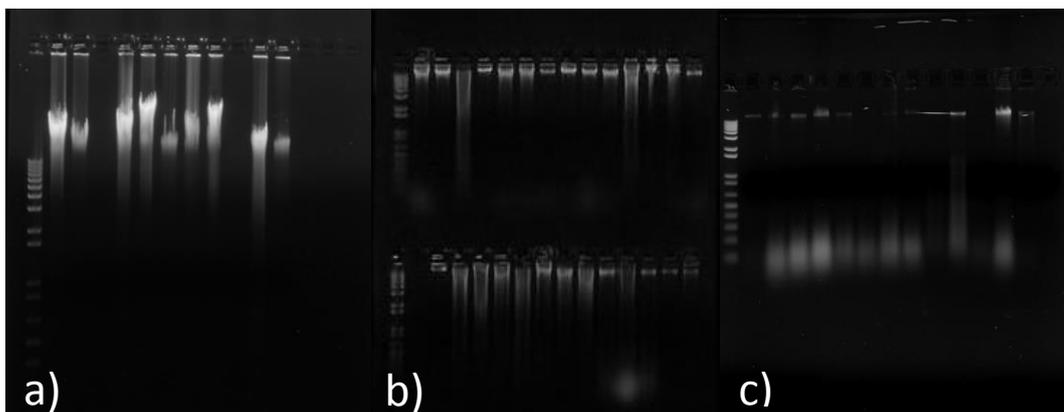
Figura 7: Quantidade de diferentes tipos coloniais por amostra



6.2. EXTRAÇÃO DE DNA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

O kit de extração de DNA utilizado, *MasterPure™ DNA Purification Kit* (Epicentre, Madison, WI), se mostrou eficiente para as para a extração de DNA de bactérias e leveduras, assim como o protocolo de extração de DNA de fungos filamentosos, possibilitando a obtenção de DNA de qualidade e quantidade suficientes para a identificação molecular dos mesmos. Na Figura 8, pode-se observar exemplos de qualidade do DNA obtido por meio das extrações.

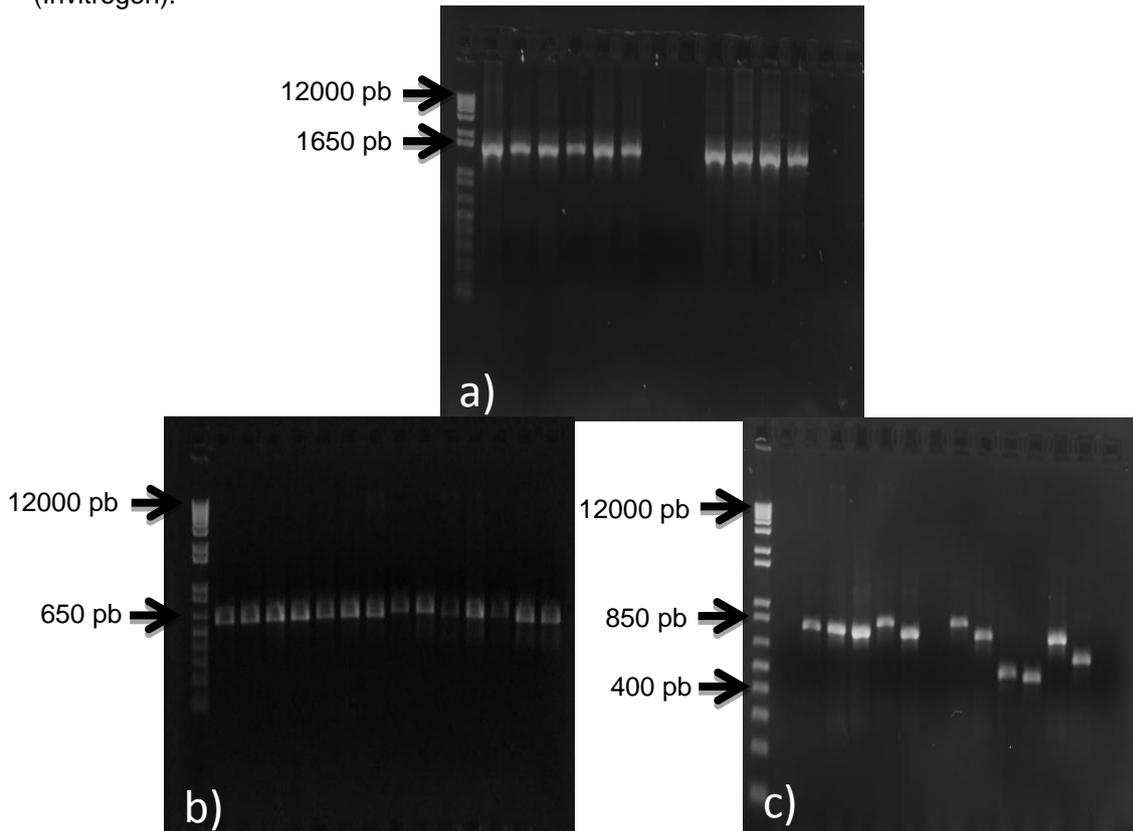
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Exemplos de qualidade e quantidade de DNA de algumas das extrações realizadas para a) bactérias; b) leveduras; c) fungos filamentosos. No primeiro poço de cada gel está o marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen).



O DNA extraído foi empregado com sucesso para a PCR das regiões utilizadas para a identificação molecular. Para as bactérias, foi amplificada a região de 1465 pares de base, pertencente ao gene que codifica o RNA ribossomal 16S (Figura 9).

Para as leveduras, a sequência da região D1/D2 obtida foi de aproximadamente 550 pares de base. Já a região ITS amplificada para leveduras e fungos filamentosos variou de 450 a 850 pares de base, como esperado (Figura 9)

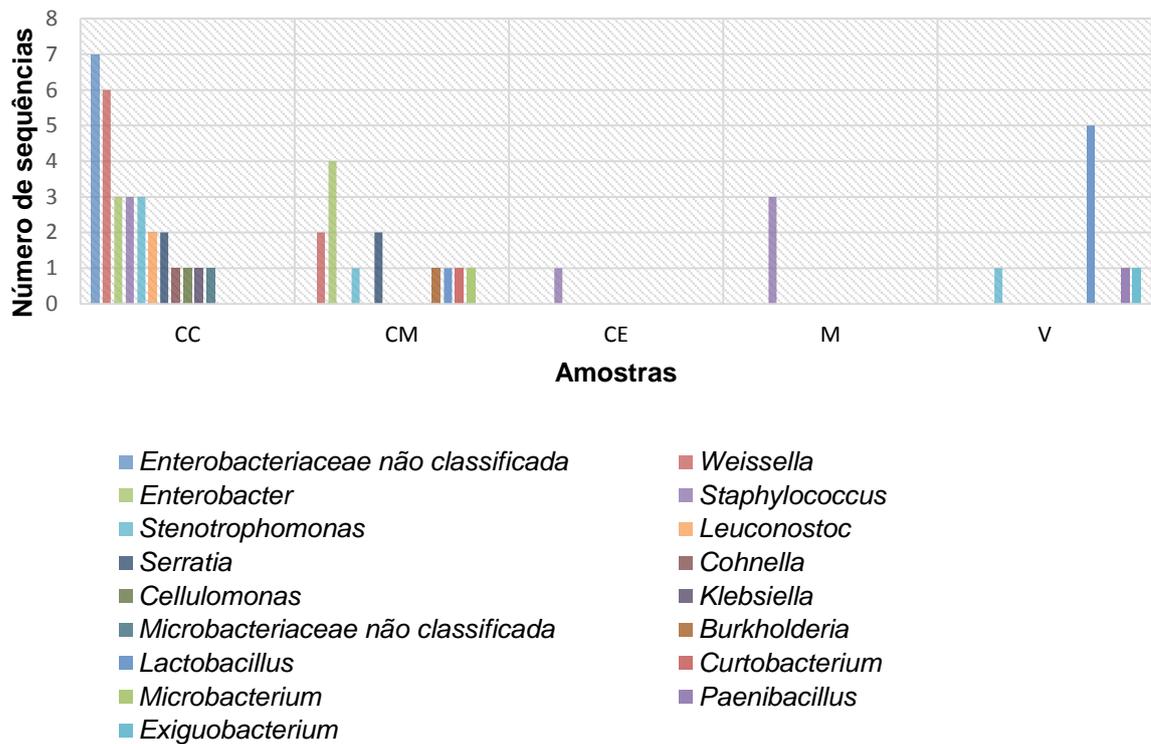
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Tamanhos de sequência obtidos com as PCRs para as regiões utilizadas para identificação molecular dos microrganismos. a) Gene que codifica para o RNAr 16S de bactérias; b) região D1/D2 de leveduras; c) região ITS de leveduras e fungos filamentosos. No primeiro poço de cada gel está o marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).



Os grupos de bactérias predominantes no caldo da cana crua foram *Enterobacteriaceae* não classificada (sete colônias) e *Weissella* (seis colônias). Em seguida, os gêneros com mais representantes foram *Enterobacter*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*, com três colônias cada. Houve também representantes dos grupos *Leuconostoc*, *Serratia* (duas colônias cada) *Cohnella*, *Cellulomonas*, *Klebsiella* e *Microbacteriaceae* não classificada (uma colônia cada). No caldo misto predominou o gênero *Enterobacter* (quatro colônias), seguido de *Weissella* e *Serratia* (duas colônias cada). Também houve representantes dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Lactobacillus*, *Curtobacterium* e *Microbacterium* (uma colônia cada). A única bactéria isolada do caldo evaporado pertenceu ao gênero *Staphylococcus*, assim como as três bactérias isoladas do mosto. No vinho,

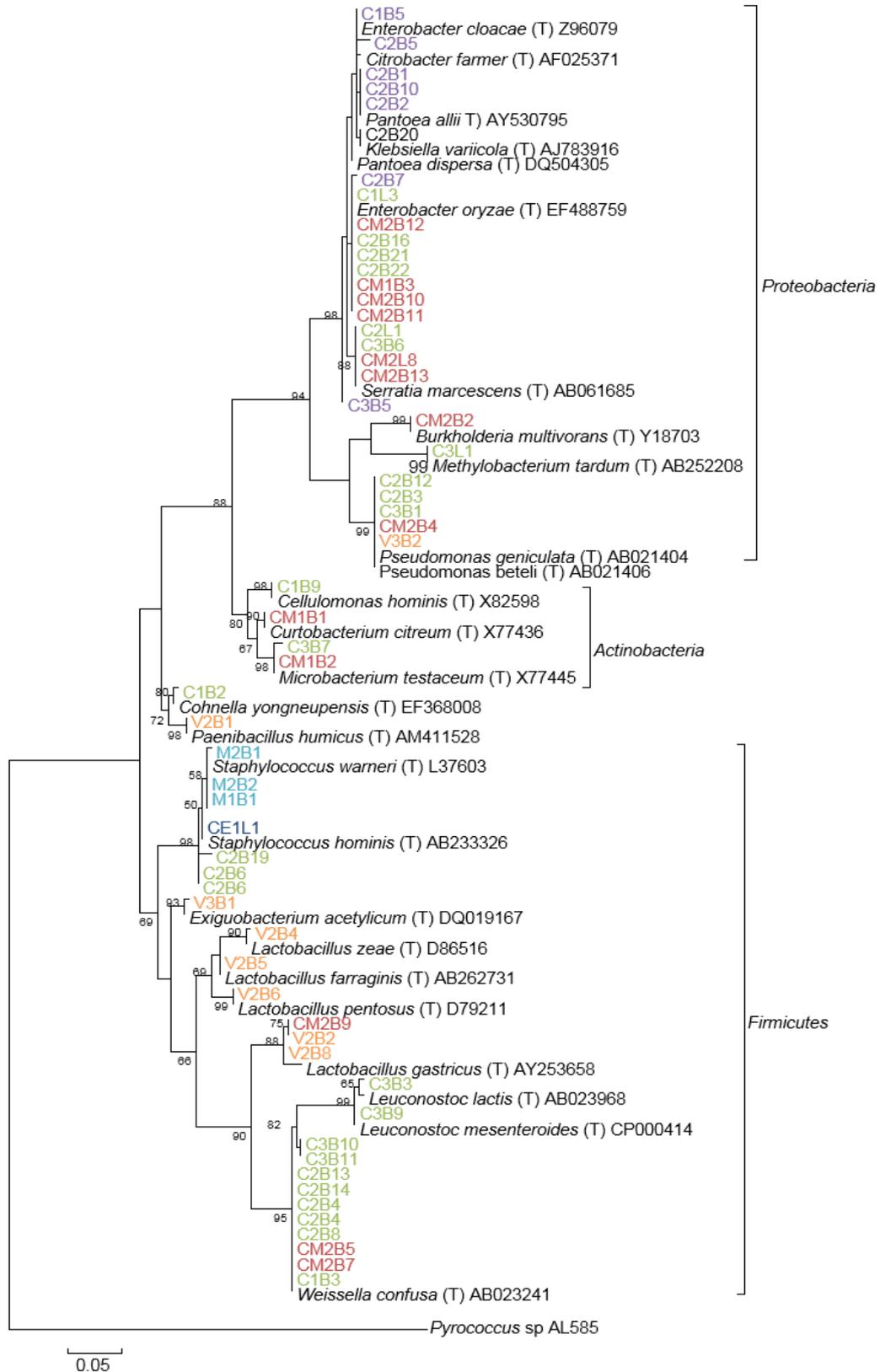
das oito colônias de microrganismos encontrados, cinco eram representantes do gênero *Lactobacillus*, um do gênero *Stenotrophomonas*, um *Paenibacillus* e um *Exiguobacterium* (Figura 10).

Figura 10: Distribuição dos grupos das bactérias isoladas de cada amostra. CC-caldo da cana crua; CM- caldo misto; CE- caldo evaporado; M-mosto; V-vinho.



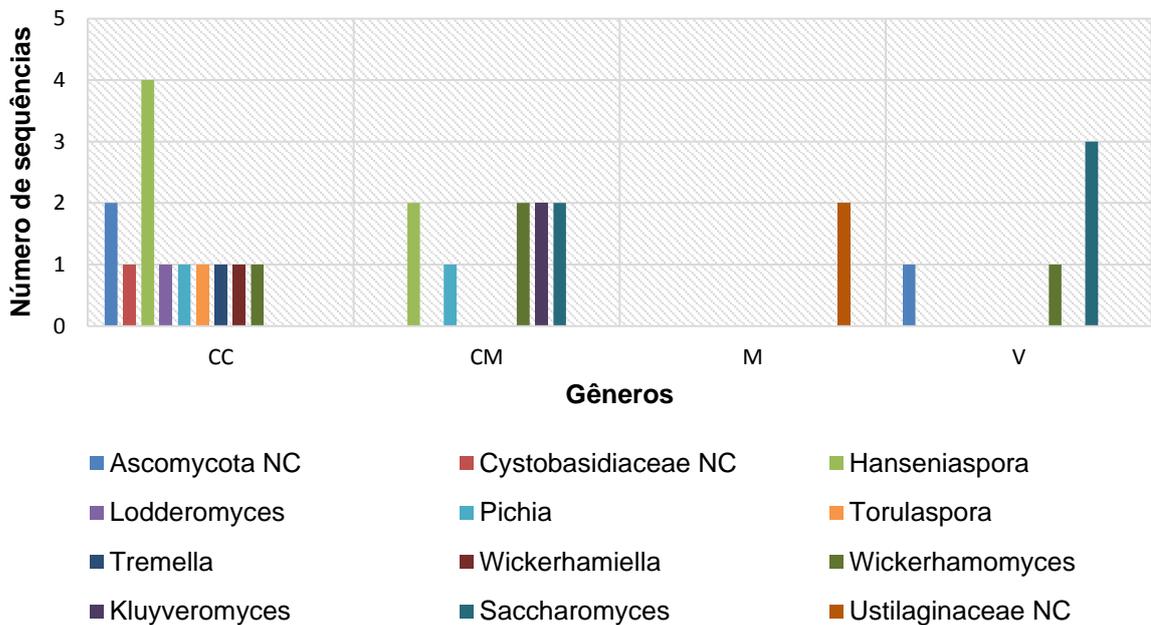
A árvore filogenética gerada pelo programa MEGA 6.0 demonstrou a formação de dois grandes grupos: o filo *Firmicutes* (28 bactérias) e o filo *Proteobacteria* (27 bactérias). Também houve a formação de um grupo menor, com quatro bactérias do filo *Actinobacteria*, e embora pertença ao filo *Firmicutes*, a sequência de *Cohnella yongneupensis*, junto com a sequência da bactéria C1B2 não se agruparam com as sequências deste filo. As sequências de *Enterobacteriaceae* não classificadas se agruparam próximo aos gêneros *Enterobacter*, *Pantoea* e *Citrobacter*, e apenas uma delas (C3B5) não se agrupou especificamente a nenhum gênero (Figura 11).

Figura 11: Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene do RNA ribossomal 16S das bactérias isoladas. Em verde, bactérias isoladas a partir da cana crua, em vermelho, isoladas do caldo misto, em azul escuro, isolada do caldo evaporado, em azul claro, isoladas do mosto, e em laranja, isoladas do vinho. Como *outgroup* foi utilizada a arqueia *Pirococcus* sp.



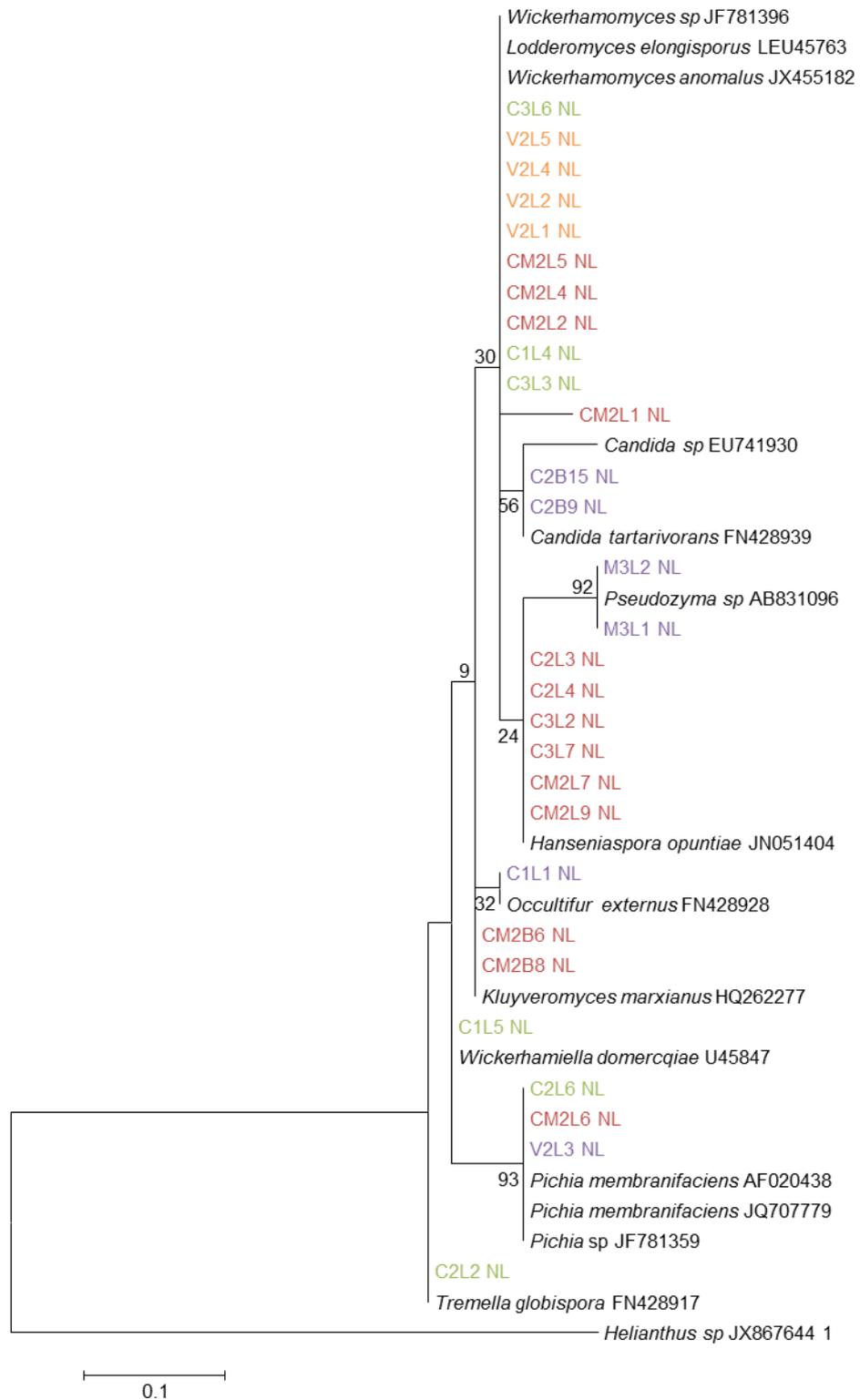
O sequenciamento da região D1/D2 das leveduras isoladas demonstrou que o gênero predominante na amostra de caldo da cana crua foi *Hanseniaspora* (quatro leveduras), seguido de *Ascomycota* não classificadas (duas leveduras). Houve também representantes dos grupos *Cystobasidiaceae* não classificada, *Lodderomyces*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Tremella*, *Wickerhamiella* e *Wickerhamomyces*, cada um com uma levedura (Figura 12).

Figura 12: Gêneros encontrados na identificação das leveduras pela região D1/D2. NC-Não classificada. CC-caldo da cana crua; CM-caldo misto; M-mosto, V-vinho.



Na amostra de caldo misto, houve dois representantes do gênero *Hanseniaspora*, dois *Wickerhamomyces*, dois *Saccharomyces*, dois *Kluyveromyces* e um representante do gênero *Pichia*. Os dois isolados do mosto pertenceram foram *Ustilaginaceae* não classificados. Do vinho, três leveduras foram classificadas como *Saccharomyces* e uma como *Ascomycota* não classificada. Na árvore filogenética gerada a partir dessas sequências, não houve formação de grandes grupos. No entanto, duas das sequências de *Ascomycota* não classificadas se agruparam com *Candida tartarivorans*, e a terceira, com *Pichia sp.* A sequência de *Cystobasidiaceae* não classificada se agrupou com *Occultifur externus*, e as sequências de *Ustilaginaceae* não classificadas foram agrupadas com *Pseudozyma sp* (Figura 13).

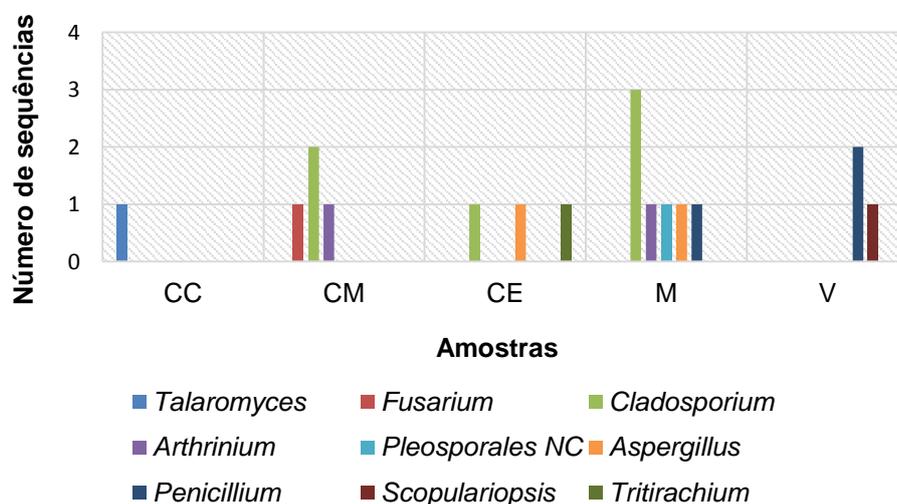
Figura 13: Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região D1/D2 de leveduras. Em verde, leveduras isoladas a partir do caldo da cana crua, em vermelho, do caldo misto e em laranja, do vinho. Em roxo, as sequências não classificadas Como *outgroup* foi utilizado o vegetal *Helianthus sp* (girassol).



Ao sequenciar a região ITS das leveduras, houve apenas uma inconsistência. A levedura classificada como *Lodderomyces* (C1L4) pela região D1/D2, pela região ITS foi classificada como *Candida tropicalis*. Porém, ao observar a árvore filogenética para a região D1/D2, a sequência se localizou mais próxima dos gêneros *Lodderomyces* e *Wickerhamomyces*. Todas as outras leveduras tiveram seus gêneros confirmados. A levedura classificada como *Cystobasidiaceae* não classificada (C1L1) pela região D1/D2 foi classificada como *Occultifur sp* pela região ITS. Duas das *Ascomycota* não classificadas (C2B15 E C2B9) continuaram sem classificação, e a terceira V2L3, foi classificada como *Pichia sp*, confirmando sua posição na árvore filogenética. As *Ustilaginaceae* não classificadas foram classificadas como *Pseudozyma sp* pela região ITS, também confirmando sua posição na árvore filogenética.

O sequenciamento da região ITS dos fungos filamentosos isolados demonstrou que o único representante isolado do caldo da cana crua pertencia ao gênero *Talaromyces*. Na amostra de caldo misto, houve dois representantes do gênero *Cladosporium*, um do *Fusarium* e um do gênero *Arthrinium*. Na amostra de caldo evaporado houve um representante do gênero *Cladosporium*, um do gênero *Aspergillus* e um do gênero *Tritirachium*. Na amostra de mosto houve predominância do gênero *Cladosporium*, com 3 representantes, e um representante do gênero *Arthrinium*, um do gênero *Aspergillus*, um do gênero *Penicillium* e um *Pleosporales* não classificado. Deste modo, nenhum gênero apareceu em todas as amostras (Figura 14).

Figura 14: Gêneros de fungos filamentosos presentes nas amostras: CC - caldo da cana crua; CM - caldo misto; CE - caldo evaporado; M - mosto; V - vinho.



Na árvore filogenética gerada para a região ITS dos microrganismos cultivados, os agrupamentos das sequências de leveduras se mantiveram com os mesmos gêneros, inclusive as leveduras não classificadas. As duas *Ascomycota* não classificadas, assim como na árvore da região D1/D2, se agruparam com *Candida tartarivorans*. A levedura C1L4, cuja classificação diferiu para as duas regiões, se localizou entre os dois gêneros nos quais sua participação é duvidosa, *Lodderomyces* e *Candida*. A maioria dos fungos filamentosos se agrupou com as sequências de referência de acordo com sua classificação. Entre os fungos classificados, o único que não formou grupo com nenhuma outra sequência foi M2F3, embora tenha sido classificado como *Arthrinium*. Entre os não classificados, CM1F1 ficou próximo a *Fusarium sp* e M2F1 se uniu a *Paraphaeosphaeria sp*. O fungo V1F2, no entanto, embora tenha sido classificado como *Scopulariopsis*, se agrupou com *Graphium dubautiae*, embora o valor de bootstrap não tenha sido muito alto (Figura 15).

Figura 15: Árvore filogenética obtida a partir das seqüências da região ITS de leveduras e fungos filamentosos cultivados. Em verde, microrganismos isolados a partir do caldo da cana crua, em vermelho, do caldo misto, em azul escuro, do caldo evaporado, e em laranja, do vinho. Em roxo, as seqüências não classificadas pela região D1/D2, para comparação, e fungos filamentosos não classificados. Como *outgroup* foi utilizado o vegetal *Helianthus sp* (girassol).



A análise dos resultados dos testes antimicrobianos indicou que a maioria das bactérias testadas possui resistência tanto aos antibióticos comerciais quanto aos peptídeos antimicrobianos utilizados. A bactéria que apresentou os maiores níveis de inibição pelos antibióticos comerciais foi C3B10, pertencente ao gênero *Weissella*, da qual o menor nível de inibição foi 38%, pelo antibiótico Bactran, 0.0007 mg/mL, e o maior nível foi 64%, para o antibiótico Kamoran, 0,006 mg/mL. Também foi esta bactéria que apresentou as maiores porcentagens de inibição para os peptídeos antimicrobianos, variando de 61%, para Cecropina 12,5 mg/mL, até 98% para Clavanina A, todas as concentrações. À parte da bactéria C3B10, as maiores inibições apresentadas foram, para os antibióticos comerciais: bactéria CM2B10 (gênero *Enterobacter*), 47% de inibição, antibiótico Constan, 0,006 mg/mL, e bactéria C2L1 (gênero *Serratia*), antibiótico Kamoran, 0,006 mg/mL; para os peptídeos antimicrobianos: bactéria CM2B10, 52% de inibição, peptídeo Mastoparano, 0,0007 mg/mL e 61% de inibição, peptídeo Catelecidina LL 37, 100 mg/mL; bactéria C2B2 (*Enterobacteriaceae* não classificada), 76% de inibição, peptídeo Cecropina 100mg/mL e 77% de inibição, peptídeo Mastoparano; bactéria C2L1, 53% de inibição, peptídeo Catelecidina LL 37, 100 mg/mL. É possível observar que os maiores níveis de inibição, em geral, são produzidos pelas maiores concentrações de antibióticos comerciais e peptídeos antimicrobianos. Nas tabelas 4 e 5 estão as porcentagens de inibição para cada antibiótico comercial e peptídeos antimicrobianos testados.

Tabela 4: Porcentagem de Inibição apresentada pelas bactérias testadas com antibióticos comerciais.

Nome da bactéria, gênero a que pertence e concentração de antibiótico.	Antibióticos utilizados e porcentagem de inibição		
	Kamoran	Bactran	Constan
C2L1 - <i>Serratia</i>	Kamoran	Bactran	Constan
0,006 mg/mL	48%	37%	36%
0,003 mg/mL	32%	31%	32%
0,0015 mg/mL	29%	30%	29%
0,0007 mg/mL	30%	29%	29%
C2B2 - <i>Enterobacteriaceae</i>	Kamoran	Bactran	Constan
0,006 mg/mL	28%	19%	18%
0,003 mg/mL	17%	18%	18%
0,0015 mg/mL	17%	19%	18%
0,0007 mg/mL	20%	18%	16%
C2B19 - <i>Staphylococcus</i>	Kamoran	Bactran	Constan
0,006 mg/mL	37%	25%	24%
0,003 mg/mL	20%	18%	17%
0,0015 mg/mL	18%	16%	16%
0,0007 mg/mL	18%	16%	15%
CM2B4 - <i>Stenotrophomonas</i>	Kamoran	Bactran	Constan
0,006 mg/mL	20%	16%	15%
0,003 mg/mL	20%	17%	12%
0,0015 mg/mL	13%	12%	13%
0,0007 mg/mL	13%	12%	13%
CM2B10 - <i>Enterobacter</i>	Kamoran	Bactran	Constan
0,006 mg/mL	30%	40%	47%
0,003 mg/mL	23%	34%	38%
0,0015 mg/mL	16%	37%	36%
0,0007 mg/mL	14%	26%	39%
C3B10 - <i>Weissella</i>	Kamoran	Bactran	Constan
0,006 mg/mL	64%	52%	61%
0,003 mg/mL	42%	40%	42%
0,0015 mg/mL	45%	41%	45%
0,0007 mg/mL	44%	38%	43%
V2B4 - <i>Lactobacillus</i>	Kamoran	Bactran	Constan
0,006 mg/mL	14%	11%	11%
0,003 mg/mL	11%	9%	9%
0,0015 mg/mL	11%	9%	9%
0,0007 mg/mL	11%	9%	9%

Em negrito, as maiores porcentagens de inibição encontradas.

Tabela 5: Porcentagem de Inibição apresentada pelas bactérias testadas com peptídeos antimicrobianos.

Nome da bactéria, gênero a que pertence e concentração de antibiótico.		Peptídeos utilizados e utilizados e porcentagem de inibição			
C2L1 - <i>Serratia</i>	Catelecidina LL-37	Cecropina	Clavanina A	Mastoparano	
100 mg/mL	53%	26%	26%	26%	
50 mg/mL	30%	30%	28%	29%	
25 mg/mL	30%	32%	28%	29%	
12,5 mg/mL	30%	30%	28%	29%	
C2B2 - Enterobacteriaceae	Catelecidina LL-37	Cecropina	Clavanina A	Mastoparano	
100 mg/mL	29%	76%	20%	77%	
50 mg/mL	19%	22%	20%	19%	
25 mg/mL	18%	21%	18%	19%	
12,5 mg/mL	17%	21%	16%	19%	
C2B19 - <i>Staphylococcus</i>	Catelecidina LL-37	Cecropina	Clavanina A	Mastoparano	
100 mg/mL	35%	23%	15%	17%	
50 mg/mL	18%	27%	17%	14%	
25 mg/mL	18%	23%	19%	14%	
12,5 mg/mL	16%	23%	19%	14%	
CM2B4 - <i>Stenotrophomonas</i>	Catelecidina LL-37	Cecropina	Clavanina A	Mastoparano	
100 mg/mL	18%	15%	11%	14%	
50 mg/mL	12%	19%	16%	16%	
25 mg/mL	12%	19%	16%	16%	
12,5 mg/mL	12%	17%	15%	15%	
CM2B10 - <i>Enterobacter</i>	Catelecidina LL-37	Cecropina	Clavanina A	Mastoparano	
100 mg/mL	61%	12%	26%	40%	
50 mg/mL	41%	18%	27%	36%	
25 mg/mL	39%	15%	34%	40%	
12,5 mg/mL	39%	22%	44%	52%	
C3B10 - <i>Weissella</i>	Catelecidina LL-37	Cecropina	Clavanina A	Mastoparano	
100 mg/mL	96%	71%	98%	80%	
50 mg/mL	80%	66%	98%	87%	
25 mg/mL	74%	62%	98%	73%	
12,5 mg/mL	65%	61%	98%	65%	
V2B4 - <i>Lactobacillus</i>	Catelecidina LL-37	Cecropina	Clavanina A	Mastoparano	
100 mg/mL	23%	14%	12%	11%	
50 mg/mL	10%	13%	11%	10%	
25 mg/mL	9%	11%	10%	10%	
12,5 mg/mL	9%	10%	10%	10%	

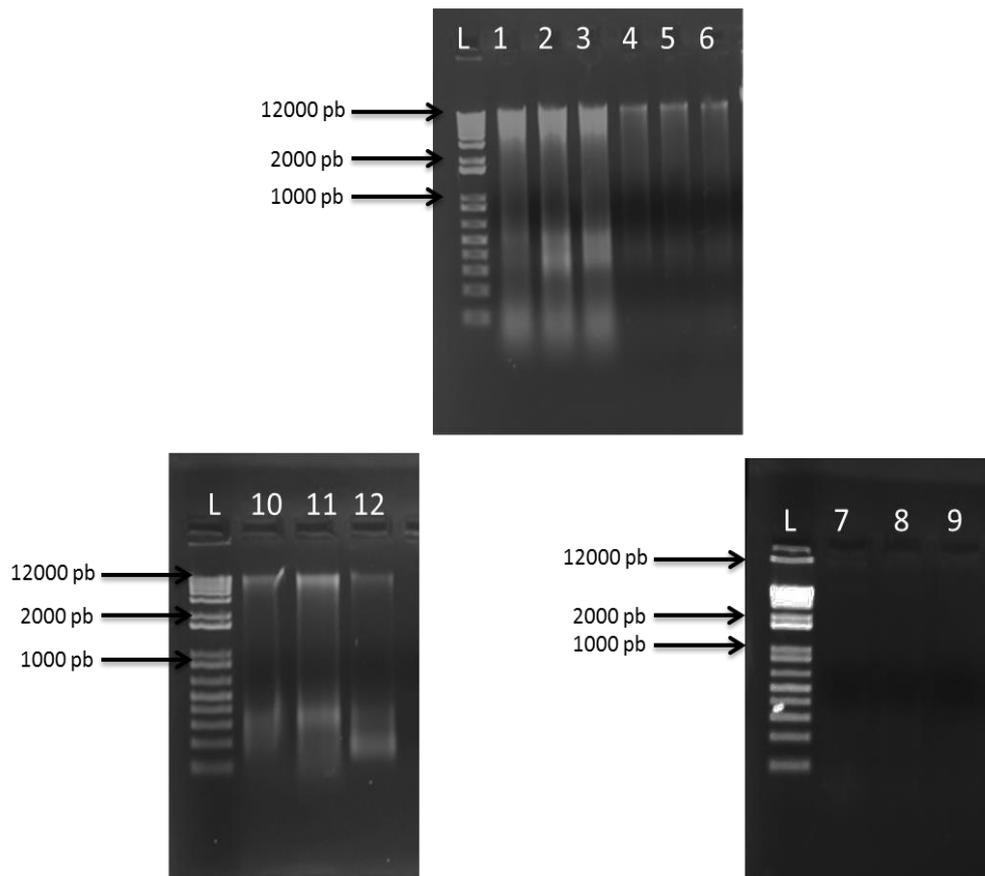
Em negrito, as maiores porcentagens de inibição encontradas.

6.3. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL, PIROSEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

O kit de extração de DNA utilizado, *FastDNA® Spin Kit for Soil* (MP Biomedicals, LLC), se mostrou eficiente para as amostras de caldo de cana crua, caldo misto e vinho. Para as amostras de caldo clarificado, caldo evaporado e mosto só foi possível realizar uma única extração da replicata biológica nº2 (Figura 16).

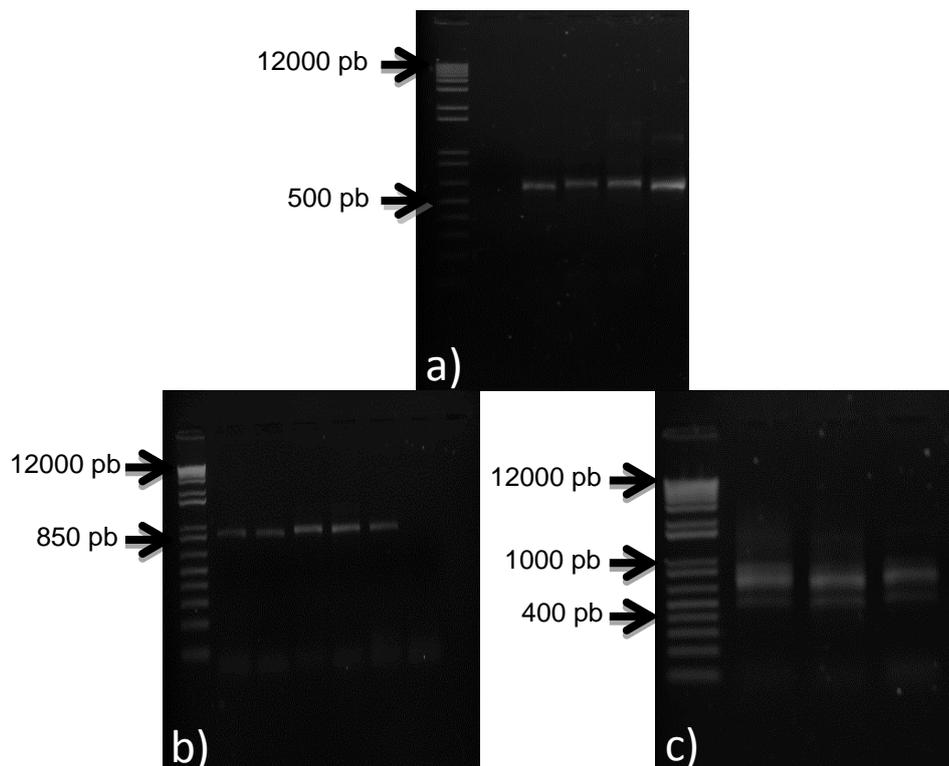
O DNA extraído foi utilizado na (PCR) para a amplificação do gene que codifica o RNAr 16S dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, e região ITS do *reino Fungi*.

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo do DNA extraído das amostras. L – Marcador 1 Kb plus DNA Ladder (*Invitrogen*); 1 – DNA do caldo da cana crua 1; 2 – DNA do caldo da cana crua 2; 3 – DNA do caldo da cana crua 3; 4 – DNA do vinho 1; 5 – DNA do vinho 2; 6 – DNA do vinho 3; 7 – DNA do caldo misto 1; 8 – DNA do caldo misto 2; 9 – DNA do caldo misto 3; 10 – DNA do caldo clarificado 2; 11 – DNA do caldo evaporado 2; 12 – DNA do mosto 2.



A amplificação foi realizada com sucesso, para todos os domínios. Para o domínio *Bacteria*, foi amplificada a região de 1465 pares de base, para o domínio *Archaea*, foi amplificada uma região de aproximadamente 850 pares de base e para o reino *Fungi*, a região amplificada variou de 450 a 850 pares de base, como esperado (Figura 17).

Figura 17: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Tamanhos de sequência obtidos com as PCRs para as regiões utilizadas para o pirosequenciamento do DNA total das amostras. a) gene que codifica para o RNAr 16S do domínio *Bacteria*; b) gene que codifica para o RNAr 16S do domínio *Archaea*; c) região do espaçador interno transcrito (ITS) do reino *Fungi*. No primeiro poço de cada gel está o marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (*Invitrogen*).



O pirosequenciamento dos genes que codificam para o RNA ribossômico do domínio *Bacteria* e *Archaea* e da região ITS do reino *Fungi* gerou 172.450 sequências de alta qualidade. Após a retirada dos ruídos e quimeras, restaram 140.791 sequências para a análise. O tamanho médio das sequências foi de 300 pares de base. Após a separação das sequências de acordo com os domínios a serem analisados, obteve-se 70111 sequências para *Bacteria*, 21073 para *Archaea* e 49607 para *Fungi*. Nas tabelas 6,7 e 8 podemos observar o número de sequências para cada grupo de amostras, o número de OTUs observadas, e os índices de diversidade alfa.

Tabela 6: Resultado em número do pirosequenciamento do gene que codifica o RNAr16S do domínio *Bacteria* e cálculos de diversidade alfa

Amostra	Nº de seq. não quiméricas	Nº de OTUS observadas	Chao1	ACE	Índice de diversidade de Shannon	Índice de diversidade de Simpson Inverso	Cobertura*
C1	8820	212	451,78	757,66	3,09	5,69	47%
C2	8386	203	438,89	801,11	3,12	5,99	46%
C3	8118	213	666,00	1186,25	3,17	6,36	32%
CM1	1267	381	736,52	1014,56	4,96	54,11	52%
CM2	1651	396	792,16	1288,47	4,91	38,58	50%
CM3	1398	379	761,38	1124,84	4,90	45,22	50%
CCL	7201	248	612,79	893,35	4,05	21,00	40%
CE	4584	64	93,18	109,59	1,63	2,80	69%
M	10313	62	122,00	245,06	0,66	1,22	51%
V1	12303	20	27,00	32,42	1,82	4,89	74%
V2	3583	17	19,00	26,12	1,72	4,52	89%
V3	2487	19	20,50	26,80	1,71	4,17	93%

*Estimativa de cobertura calculada tendo-se o número de OTUs observadas dividido pelo índice de diversidade esperado (Chao1).

Tabela 7: Resultado em número do pirosequenciamento do gene que codifica o RNAr16S do domínio *Archaea* e cálculos de diversidade alfa

Amostra	Nº de seq. não quiméricas	Nº de OTUS observadas	Chao1	ACE	Índice de diversidade de Shannon	Índice de diversidade de Simpson Inverso	Cobertura
C1A	1117	106	159,45	215,70	2,87	6,88	66%
C2A	4940	59	125,43	174,35	2,17	4,01	47%
C3A	3130	57	66,56	68,74	2,11	3,51	86%
CM1A	4458	54	126,50	212,80	1,98	3,86	43%
CM2A	4008	54	108,38	240,46	1,96	3,77	50%
CM3A	3420	56	90,36	166,08	2,01	3,89	62%

*Estimativa de cobertura calculada tendo-se o número de OTUs observadas dividido pelo índice de diversidade esperado (Chao1).

Tabela 8: Resultado em número do pirosequenciamento da região do espaçador interno transcrito (ITS) *reino Fungi* e cálculos de diversidade alfa

Amostra	Nº de seq. não quiméricas	Nº de OTUS observadas	Chao1	ACE	Índice de diversidade de Shannon	Índice de diversidade de Simpson Inverso	Cobertura
C1F	7675	506	861,62	1189,26	4,03	18,75	59%
C2F	9774	479	982,63	1173,97	3,93	16,55	49%
C3F	9891	501	898,23	1169,76	3,95	16,44	56%
CM1F	7130	516	1050,02	1362,11	4,04	17,74	49%
CM2F	8600	468	786,28	976,11	3,83	13,32	60%
CM3F	6537	504	953,79	1299,07	4,03	19,43	53%

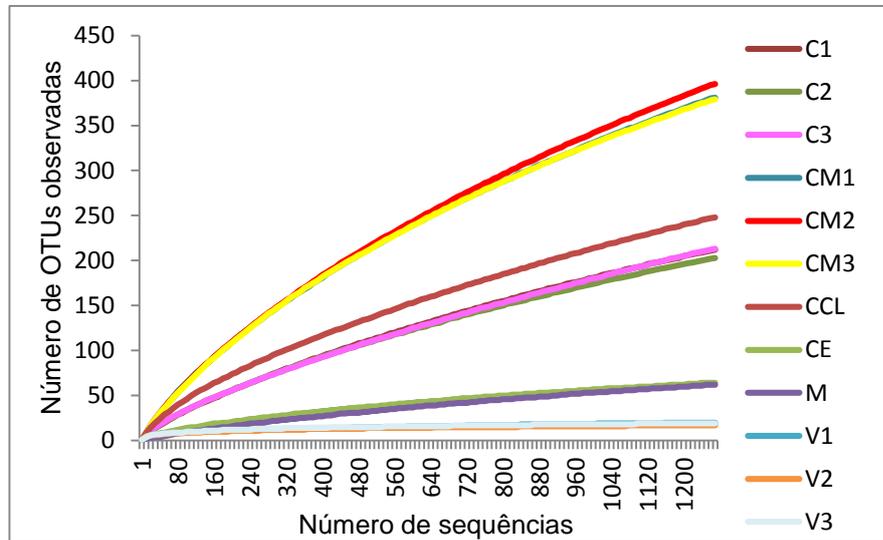
*Estimativa de cobertura calculada tendo-se o número de OTUs observadas dividido pelo índice de diversidade esperado (Chao1).

A análise das sequências do gene que codifica o RNA ribossômico do domínio *Bacteria* demonstrou que a amostra com o maior número de OTUs, após uma normalização das amostras para 1267 sequências, foi o caldo misto, sendo que a replicata biológica 2 obteve o maior número entre todas as amostras (396 OTUs). Em seguida, a replicata biológica 2 do caldo clarificado, com 248 OTUs, seguidas pelas amostras de caldo de cana crua (213, 212 e 203 OTUs). Logo após, aparecem as a replicata biológica 2 do caldo evaporado (64 OTUs) e do mosto (62 OTUs). Por último, as amostras com menor número de OTUs são as replicatas biológicas do vinho (20, 19 e 17 OTUs). As amostras de caldo misto também apresentaram os maiores índices de riqueza de Chao 1 e ACE. No entanto, em seguida está a replicata biológica 3 do caldo da cana crua, que possui valores maiores dos dois índices de riqueza do que as duas outras replicatas biológicas da mesma amostra. As replicatas das amostras de caldo misto também possuem os maiores valores para os índices de diversidade de Shannon e Simpson inverso, de maneira que são as amostras com maior diversidade. De acordo com os mesmos índices, a amostra que possui a menor diversidade é a replicata biológica 2 da amostra de mosto. A porcentagem de cobertura das amostras indicou que o número de sequências geradas não foi suficiente para cobrir 100% da diversidade das amostras.

A curva de rarefação gerada com as sequências evidenciou que as únicas amostras que chegaram a um platô foram as replicatas biológicas 2 de caldo evaporado e mosto, assim como as replicatas biológicas da amostra de vinho. Para as outras amostras, o número de sequências não foi suficiente para alcançar um platô (Figura 18).

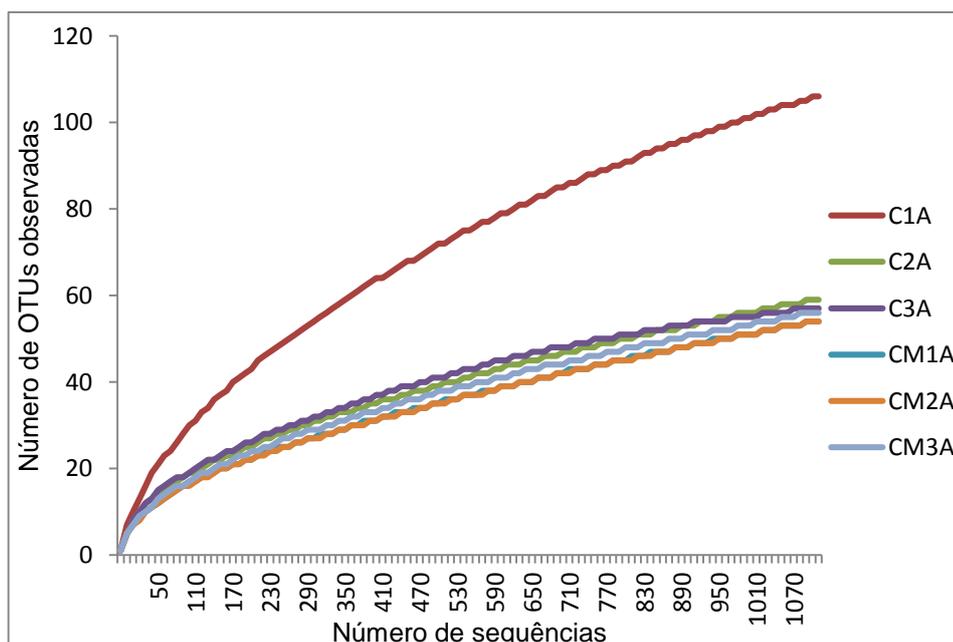
Para as sequências do gene que codifica o RNA ribossômico de *Archaea*, normalizadas para 1117 sequências, a amostra com o maior número de OTUs foi a replicata biológica 1 do caldo da cana crua, com 106 OTUs. As outras amostras, no entanto, se mantiveram homogêneas, com o número de OTUs entre 54 e 59. A replicata biológica 1 do caldo da cana crua também obteve os maiores valores para os índices de riqueza de Chao1 e Ace, assim como para os índices de diversidade de Shannon e Simpson. Os menores valores para os índices de riqueza foram da replicata biológica 3 do caldo da cana crua, e para os índices de diversidade foram da replicata biológica 2 do caldo misto. A porcentagem de cobertura nesse caso também indicou que a diversidade das amostras não foi 100% coberta.

Figura 18: Curva de rarefação para as sequências do gene que codificam para o RNAr 16S do domínio *Bacteria*, gerada pelo pacote de softwares *Mothur*, com *cutoff* de 0,03, correspondente ao nível de gênero.



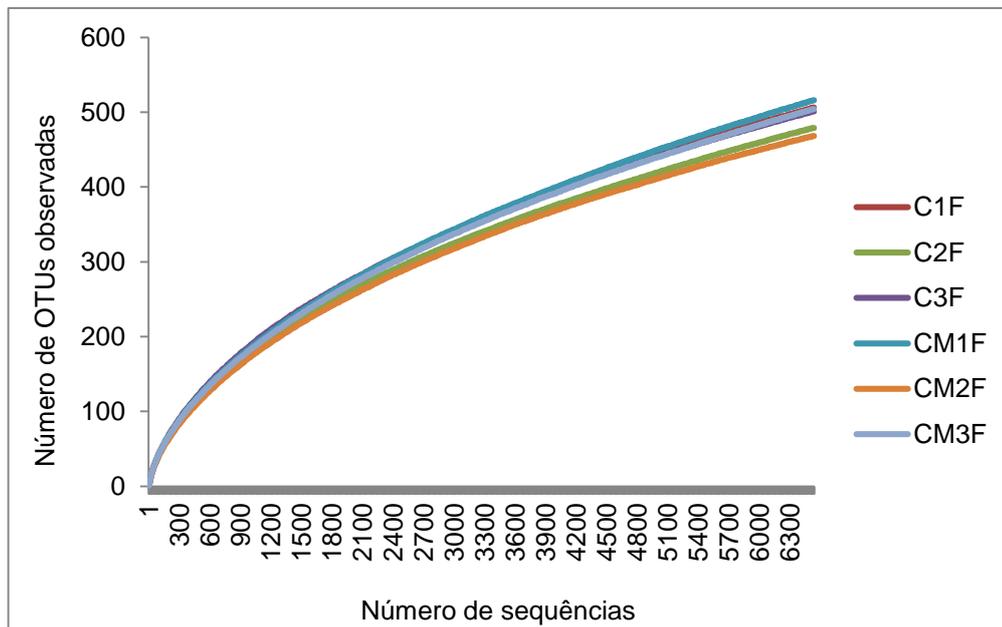
A curva de rarefação para as sequências do gene que codifica o RNA ribossômico 16S de *Archaea* demonstrou que nenhuma das amostras chegou a um platô, de maneira que o esforço amostral não foi suficiente para cobrir a diversidade presente nas amostras. Visivelmente, a replicata biológica 1 da amostra de caldo da cana crua se distancia das outras com relação ao número de OTUs (Figura 19).

Figura 19: Curva de rarefação para as sequências do gene que codificam para o RNAr 16S do domínio *Archaea*, gerada pelo pacote de softwares *Mothur*, com *cutoff* de 0,03, correspondente ao nível de gênero.



As sequências da região ITS do *reino Fungi*, após a normalização para 6537 sequências, demonstraram que a amostra com o maior número de OTUs foi a replicata biológica 1 da amostra de caldo misto (516 OTUs), e aquela com o menor número foi a replicata biológica 2 da mesma amostra (468 OTUs). As mesmas amostras possuíram também, o maior e menor índice de riqueza de Chao1 e ACE, e de diversidade de Shannon, respectivamente. Para o índice de Simpson inverso, a replicata biológica 3 do caldo misto apresentou o maior valor, e a replicata biológica 2 da mesma amostra apresentou o menor valor. No entanto, embora replicata biológica 1 de caldo misto seja amostra com maior riqueza e diversidade, entre as replicatas da amostra não houve uma variação extrema. O número de sequências gerado também não foi suficiente para cobrir 100% da diversidade das amostras, de acordo com a cobertura calculada, o que foi confirmado pela curva de rarefação obtida para as amostras, na qual nenhuma chegou a um platô (Figura 20).

Figura 20: Curva de rarefação para as sequências da região do espaçador interno transcrito (ITS) do *reino Fungi*, gerada pelo pacote de softwares *Mothur*, com *cutoff* de 0,03, correspondente ao nível de gênero.



A classificação das sequências do gene que codifica o RNA ribossômico 16S do domínio *Bacteria* possibilitou a identificação de 20 filos em todas as amostras. Destes, ao considerar todas as amostras em conjunto, seis filos estiveram mais presentes nas amostras, assim como as sequências de bactérias não classificadas. O filo *Proteobacteria* foi o predominante nas amostras de caldo da cana crua (1, 2 e 3) (48,33%, 49,62%, e 49,47% das sequências, respectivamente), nas amostras de

caldo misto (1,2 e 3) (38,57%, 33,22% e 31,75% das sequências, respectivamente), nas amostras de caldo evaporado (50,41% das sequências) e mosto (77,05% das sequências). Nas amostras do caldo da cana crua 1, 2 e 3, houve mais três fillos predominantes: *Firmicutes* (22,88%, 19,97% e 19,83% das sequências), *Bacteroidetes* (13,11%, 11,72% e 12,24% das sequências), *Actinobacteria* (10,11%, 10,71% e 10,79% das sequências), além de bactérias não classificadas (2,66%, 3,40% e 2,72% das sequências). Nas amostras de caldo misto 1, 2 e 3, o filo *Proteobacteria* também foi seguido de mais três predominantes *Actinobacteria* (19,92%, 20,99% e 22,62% das sequências, respectivamente), *Firmicutes* (15,09%, 19,01% e 17,86% das sequências), *Bacteroidetes* (13,63%, 15,70%, 14,48% das sequências) e bactérias não classificadas (6,08%, 5,45%, 4,96% das sequências). Na amostra de caldo evaporado, os outros fillos predominantes foram: *Firmicutes* (45,70% das sequências), *Actinobacteria* (2,25% das sequências), *Bacteroidetes* (1,02% das sequências), e *Acidobacteria* (0,41% das sequências). Nessa amostra não foram identificadas sequências de bactérias não classificadas. Na amostra de mosto, o filo *Proteobacteria* foi seguido de *Firmicutes* (15,78% das sequências), *Actinobacteria* (3,89% das sequências) e *Bacteroidetes* (1,84% das sequências). Na amostra de caldo clarificado, o filo predominante foi *Firmicutes* (43,24% das sequências), seguido de outros três predominantes: *Proteobacteria* (38,70% das sequências), *Bacteroidetes* (8,46% das sequências), *Actinobacteria* (5,16% das sequências), além de bactérias não classificadas (2,27% das sequências) Nas amostras de vinho (1,2 e 3), o filo predominante foi *Firmicutes* (97,72%, 98,79% e 98,68% das sequências, respectivamente), no entanto, não houve grande quantidade de outros fillos presentes.

Na Figura 22, é possível observar a mudança de comunidade que ocorre entre as amostras de caldo da cana crua até chegar à amostra de vinho. Enquanto que nas primeiras amostras há grande quantidade de fillos, com muitas sequências cada um, nas últimas resta apenas um com grande quantidade de sequências. Para a confecção do gráfico, foram escolhidos os cinco grupos com maior número de sequências para cada uma das amostras, e dentre estes, os sete grupos com maior número de sequências em geral foram selecionados.

Figura 22: Gráfico contendo os filios do domínio *Bacteria* mais abundantes em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; CCL caldo clarificado; CE-caldo evaporado; M - mosto; V – vinho; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica, quando necessário.

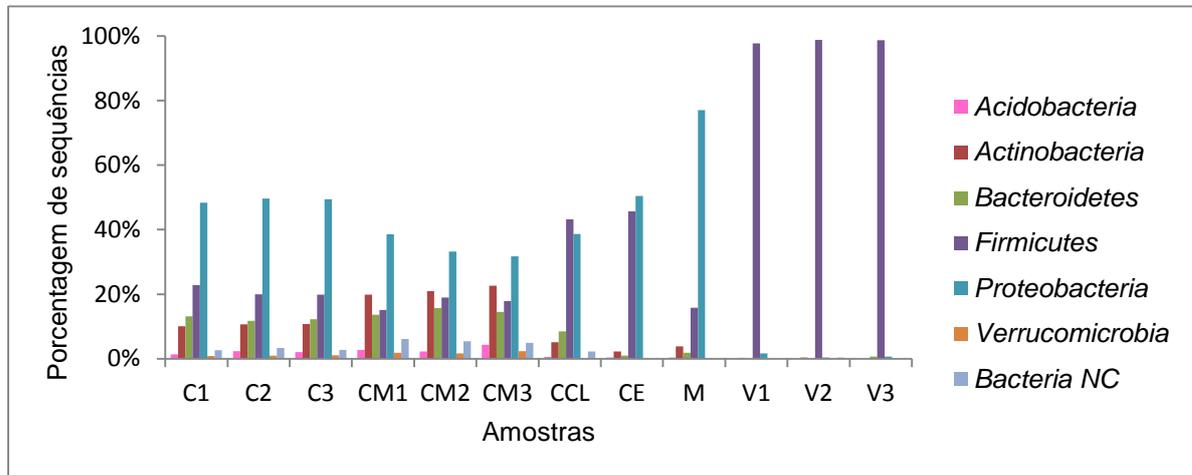
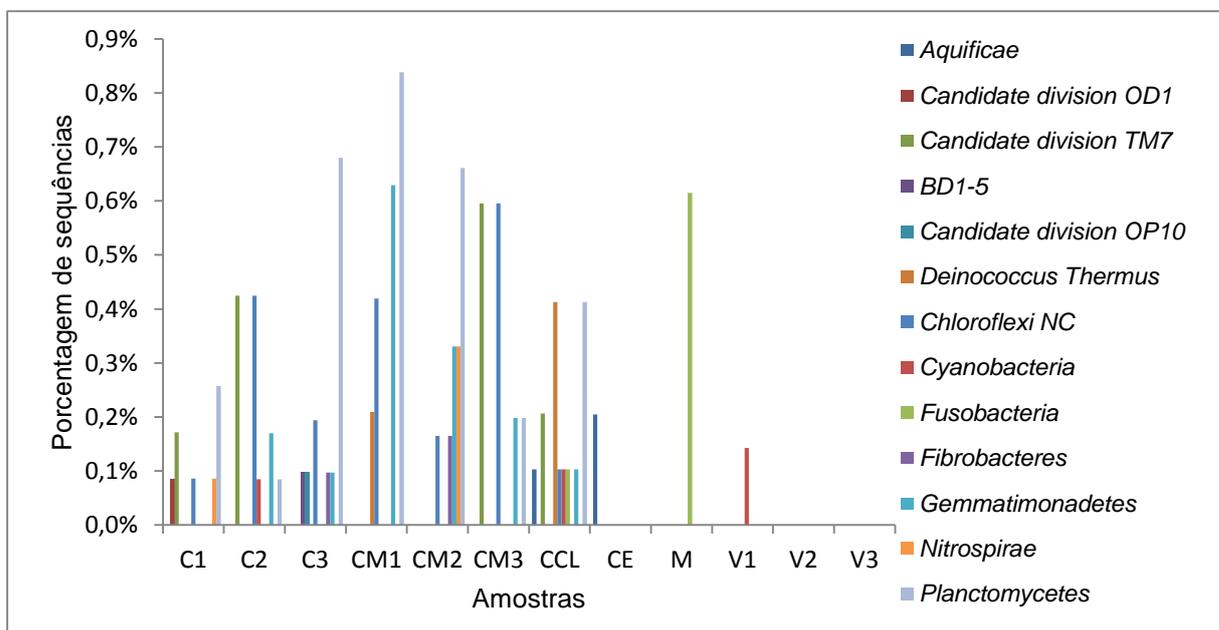


Figura 21: Gráfico contendo os filios raros do domínio *Bacteria* em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; CCL caldo clarificado; CE-caldo evaporado; M - mosto; V – vinho; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.



Quanto aos filios raros, não houve homogeneidade quanto à distribuição entre as amostras. Nenhum deles esteve presente em todas as amostras, porém, as amostras com maior quantidade de filios raros foram as amostras de caldo misto 1, 2 e 3 (2,10%, 1,65%, 1,59% das sequências, respectivamente). As replicatas biológicas 2 e 3 da amostra de vinho não apresentaram nenhum filo entre os raros. (Figura 21)

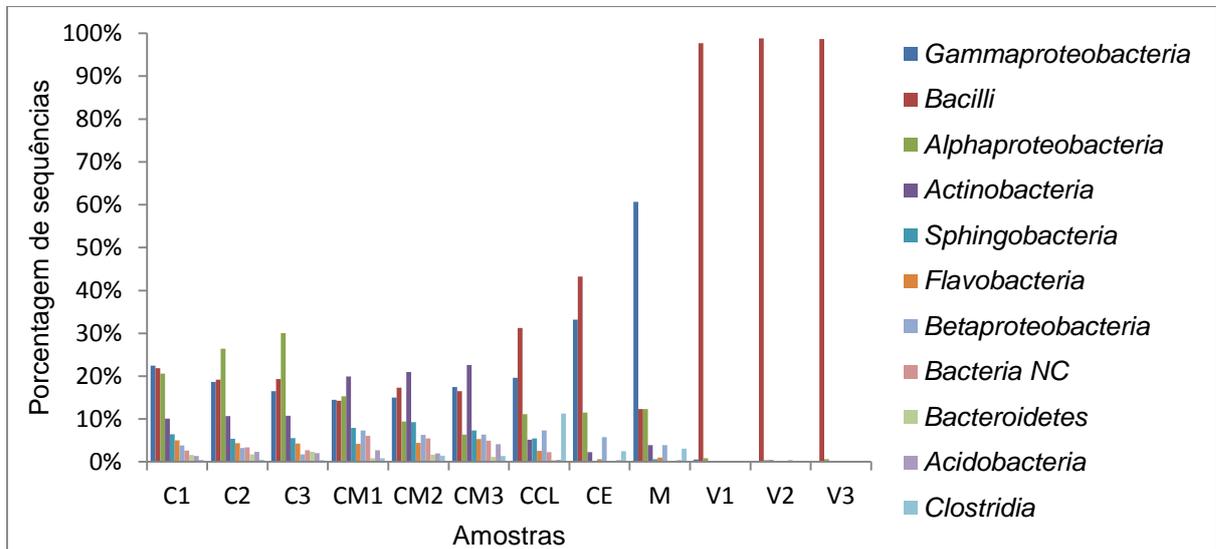
Em todas as amostras foram encontradas 52 classes no total, no entanto, algumas obtiveram maior número de sequências do que as outras, o que variou entre as amostras. Na replicata biológica 1 da amostra de caldo da cana crua, a classe dominante foi *Gammaproteobacteria*, com 22,45% das sequências, seguida de *Bacilli* (21,85%), *Alphaproteobacteria* (20,57% das sequências) e *Actinobacteria* (10,11% das sequências) Nas replicatas biológicas 2 e 3, a classe predominante foi *Alphaproteobacteria* (26,42% e 30,03% das sequências, respectivamente), seguida de *Bacilli* (19,20% e 19,34% das sequências), *Gammaproteobacteria* (18,69% e 16,52% das sequências) e *Actinobacteria* (10,71% e 10,79% das sequências).

Nas amostras de caldo misto, a classe predominante foi *Actinobacteria*, com 19,92%, 20,99% e 22,62% das sequências, respectivamente. Na replicata biológica 1, a classe *Actinobacteria* foi seguida de *Alphaproteobacteria* (15,30% das sequências), *Gammaproteobacteria* (14,47% das sequências) e *Bacilli* (14,26% das sequências). Na replicata biológica 2, foi seguida de *Bacilli* (17,36% das sequências), *Gammaproteobacteria* (15,04% das sequências) e *Alphaproteobacteria* (9,42% das sequências). Na replicata biológica 3 foi seguida de *Gammaproteobacteria* (17,46% das sequências), *Bacilli* (16,47% das sequências) e *Sphingobacteria*. (7,34% das sequências).

Nas amostras de caldo clarificado e caldo evaporado, a classe mais abundante foi *Bacilli* (31,27 e 43,24% das sequências, respectivamente), seguida de *Gammaproteobacteria* (19,61% das sequências), *Clostridia* (11,25% das sequências) e *Alphaproteobacteria* (11,15% das sequências), no caldo clarificado, e *Gammaproteobacteria* (33,20% das sequências), e *Alphaproteobacteria* (11,48% das sequências) no caldo evaporado.

Na amostra de mosto, a classe mais abundante foi *Gammaproteobacteria*, com 60,66% das sequências, seguida de *Bacilli* e *Alphaproteobacteria*, com 12,30% das sequências cada. Nas amostras de vinho (1, 2 e 3), a classe *Bacilli* predominou, com 97,72%, 98,79% e 98,68% das sequências, respectivamente. A presença de outras classes nas amostras de vinho foi bem baixa. Para a confecção do gráfico de classes abundantes, 11 classes com os maiores números de sequências entre todas as amostras foram escolhidas, deste modo, podemos ver sua distribuição entre todas as amostras (Figura 23). É possível perceber que o número de classes diminuiu consideravelmente nas amostras de vinho. Novamente, as amostras de caldo da cana crua e caldo misto possuíram os maiores números de classes raras.

Figura 23: Gráfico contendo as classes do domínio *Bacteria* mais abundantes em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; CCL caldo clarificado; CE-caldo evaporado; M - mosto; V – vinho; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica, quando necessário.

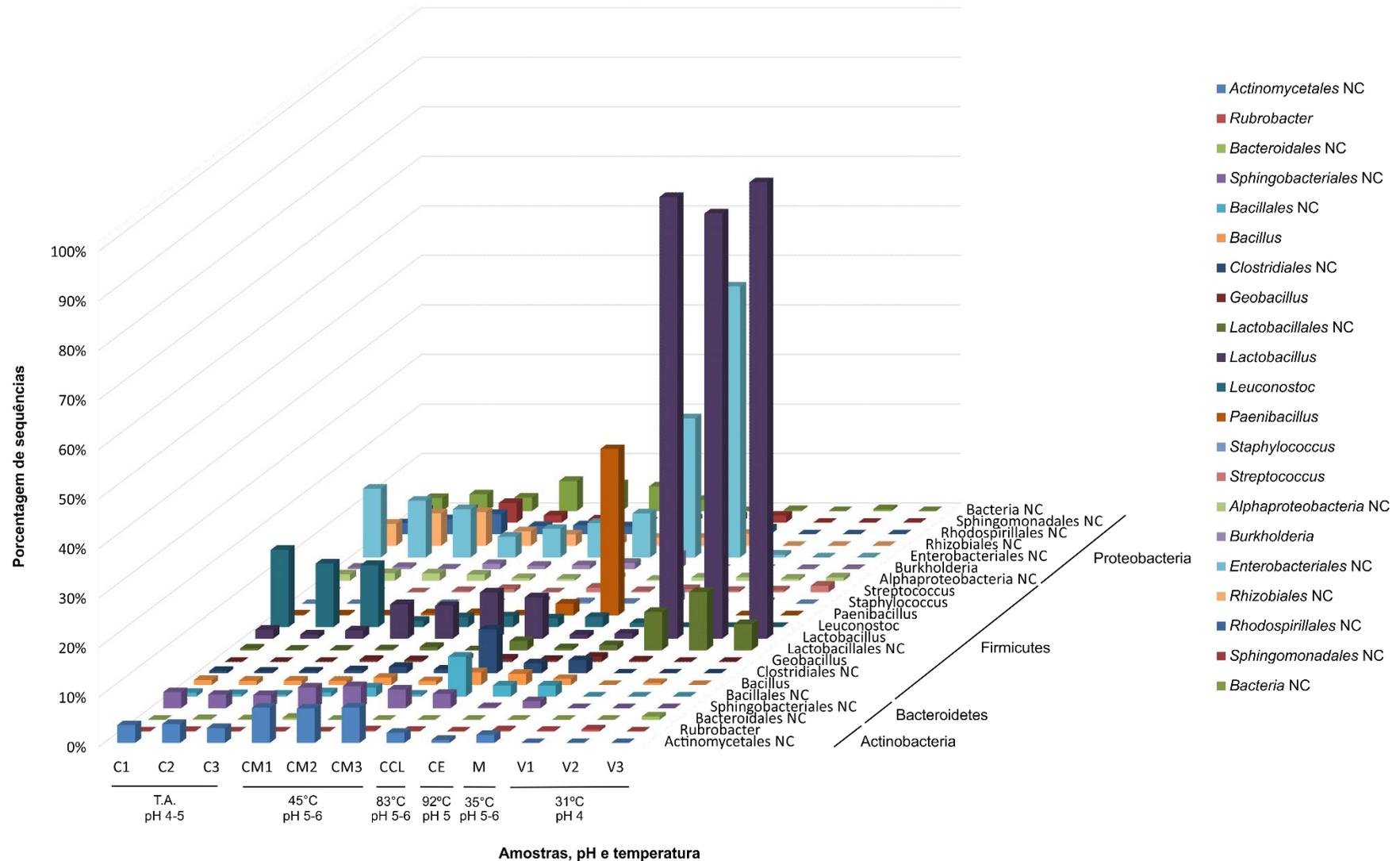


A análise dos gêneros demonstrou a presença de 248 gêneros de microrganismos e 74 grupos de microrganismos cuja classificação não chegou a gênero. Os gêneros predominantes variaram entre as amostras (Figura 24).

Nas amostras de caldo da cana crua 1, 2 e 3, o gênero predominante foi *Leuconostoc* (15,60%, 12,83%, 12,54% das seqüências, respectivamente), seguido de *Enterobacteriales* não classificados (13,88%, 11,47% e 9,72% das seqüências). Nas replicatas biológicas 1 e 2 da amostra de caldo misto predominou o grupo *Actinomycetales* não classificados (7,13%, 6,94% das seqüências, respectivamente), seguido do gênero *Lactobacillus* (6,92% e 6,61% das seqüências). Já na replicata biológica 3 ocorreu o inverso, *Lactobacillus* foi o gênero predominante (9,33% das seqüências), seguido de *Actinomycetales* não classificados (7,14% das seqüências).

Na amostra de caldo clarificado, os grupos predominantes foram *Clostridiales* não classificados e *Enterobacteriales* não classificados, com 8,88% das seqüências, seguidos do gênero *Lactobacillus* (8,36% das seqüências). Na amostra de caldo evaporado, o gênero predominante foi *Paenibacillus* (33,61% das seqüências), seguido do grupo *Enterobacteriales* não classificadas (28,07% das seqüências). Já na amostra de mosto, o grupo predominante foi *Enterobacteriales* não classificados, com 54,71% das seqüências. Nas amostras de vinho, o gênero predominante foi *Lactobacillus* (89,16%, 85,83% e 92,11% das seqüências,

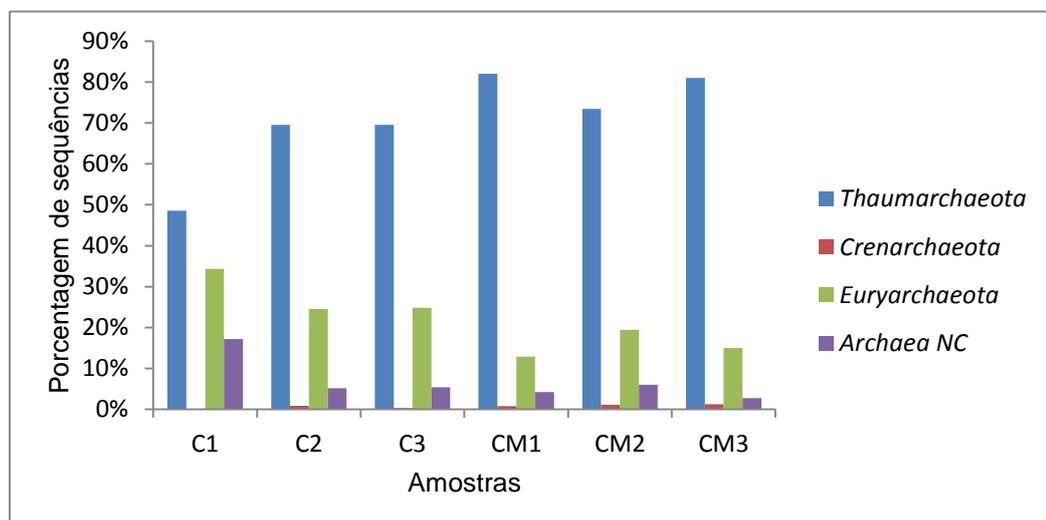
Figura 24: Grupos e gêneros mais abundantes do domínio *Bacteria* em cada amostra das diferentes etapas do processo de produção de etanol. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; CCL – caldo clarificado; CE – caldo evaporado; M – mosto; V – vinho; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica, quando necessário.



respectivamente). Quanto ao número de gêneros e grupos não classificados, a amostra que apresentou o maior número foi o caldo clarificado, com 171 gêneros/grupos de microrganismos não classificados. Em seguida, foram as amostras de caldo da cana crua 1, 2 e 3 (150, 149 e 150 gêneros/grupos respectivamente), as amostras de caldo misto 1, 2 e 3 (127, 130 e 121 gêneros/grupos respectivamente), mosto (95 gêneros/grupos) e caldo clarificado (74 gêneros/grupos). As amostras de vinho 1, 2 e 3 apresentaram apenas 15, 8 e 5 gêneros/grupos, respectivamente. Os gêneros com menores quantidades de sequências para todas as amostras estão descritos no apêndice E.

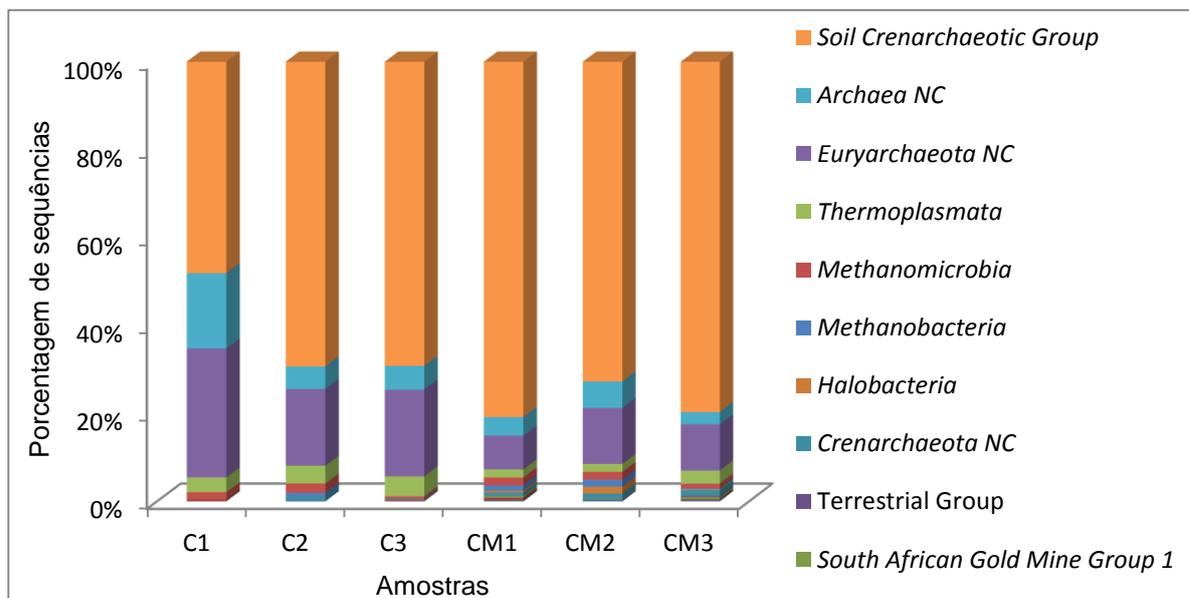
A análise do gene que codifica o RNA ribossômico 16S do domínio *Archaea* possibilitou a identificação de 3 filos e um grupo de arqueias não identificadas nas amostras nas quais ocorreu a amplificação do gene: replicatas biológicas do caldo da cana crua 1, 2 e 3, e do caldo misto 1, 2 e 3. O filo predominante foi *Thaumarchaeota*, com 48,54%, 69,57%, 69,52%, 82,06%, 73,44% e 81,00% das sequências respectivamente, seguido de *Euryarchaeota*, com 34,31%, 24,47%, 24,79%, 12,90%, 19,42% e 15,00% das sequências, respectivamente. Em seguida, o grupo com maior número de sequências foi *Archaea* não classificadas (17,15%, 5,11%, 5,41%, 4,23%, 6,03% e 2,75% das sequências), e por último, *Crenarchaeota*, que não esteve presente na replicata biológica 1 do caldo da cana crua, mas esteve presente em pequena quantidade nas replicatas biológicas 2 e 3 (0,85% e 0,28% das sequências) e nas replicatas biológicas 1, 2 e 3 do caldo misto (0,81%, 1,12%, e 1,25% das sequências) (Figura 25).

Figura 25: Filos do domínio *Archaea* em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.



Foram observadas, no total, do domínio *Archaea* 9 classes de microrganismos, além dos grupos de *Crenarchaeota* não classificadas, *Euryarchaeota* não classificadas e *Archaea* não classificadas. A classe predominante em todas as amostras foi o *Soil Crenarchaeotic Group* (filó *Taumarchaeota*), que apresentou entre 48,12%, 69,36% e 69,23% das sequências nas replicatas biológicas 1, 2 e 3 do caldo da cana crua, respectivamente, e 80,85%, 72,77% e 79,75% das sequências nas replicatas biológicas do caldo misto 1, 2 e 3, respectivamente. O segundo grupo predominante foi *Euryarchaeota* não classificadas (de 7,66% a 29,29% das sequências) e *Archaea* não classificadas (de 2,75% a 17,15% das sequências). Também houve representantes de outras classes, que somadas, representaram de 5,44% a 8,48% do total de sequências das amostras (Figura 26).

Figura 26: Classes do domínio *Archaea* mais abundantes em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.

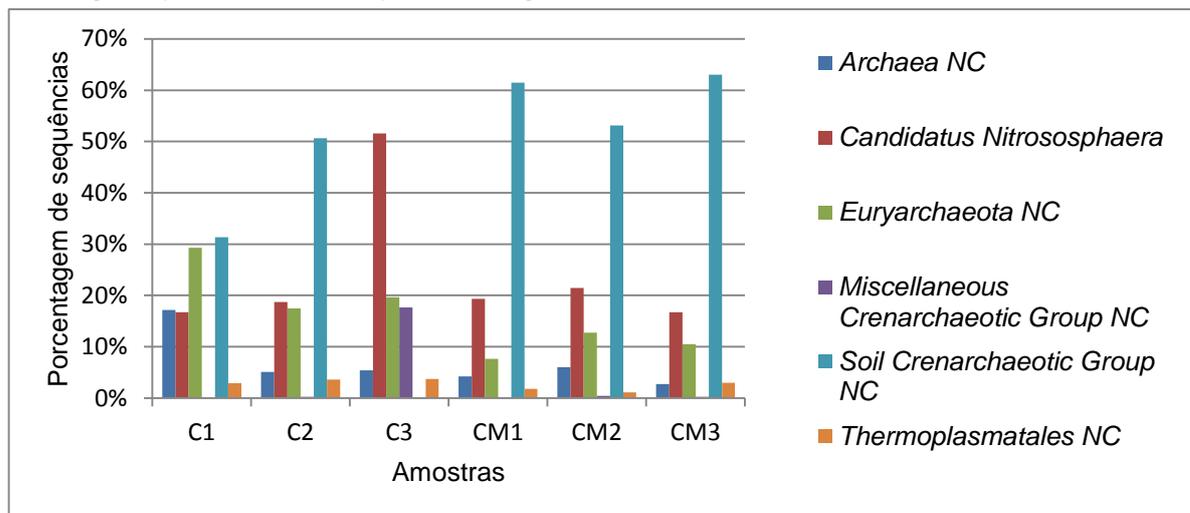


Foram identificados, em todas as amostras, apenas 5 gêneros do domínio *Archaea*, e 16 grupos de arqueias não classificadas. Porém, entre os grupos abundantes, o único gênero participante foi *Candidatus Nitrososphaera* (filó *Taumarchaeota*). Esse gênero obteve 16,74%, 18,72% e 51,57% das sequências nas replicatas biológicas 1, 2 e 3 do caldo da cana crua, respectivamente, e 19,35%, 21,43% e 16,75% das sequências nas replicatas biológicas 1, 2 e 3 do caldo misto. Todos os outros grupos foram de arqueias cuja classificação não chegou ao nível de

gênero, como *Soil Crenarchaeotic Group* não classificadas e *Thermoplasmatales* não classificadas (Figura 27).

Os outros gêneros, *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* e *Candidatus Methanoregula*, apresentaram pequenas quantidades de sequências, assim como os outros grupos de arqueias não classificadas, disponíveis no apêndice F.

Figura 27: Gráfico contendo os grupos e gêneros abundantes do domínio *Archaea* em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.



Ao analisar as sequências geradas a partir do pirosequenciamento da região do espaçador interno transcrito (ITS) do reino *Fungi*, foi possível a identificação de 3 filós em todas as amostras, assim como sequências do reino *Fungi* não classificadas.

O filo *Ascomycota* foi o predominante, apresentando, nas replicatas biológicas do caldo da cana crua 1, 2 e 3: 65,3%, 62,7% e 61,8% das sequências respectivamente, e nas replicatas biológicas do caldo misto 1, 2 e 3: 65,2%, 64,6% e 66,7% das sequências. O segundo grupo predominante foi *Fungi* não classificados (de 22,7% a 26,2% das sequências), seguido de *Basidiomycota* (de 9,2% a 14,2% das sequências). O filo *Chytridiomycota* obteve apenas um representante, na replicata biológica 3 da amostra de caldo misto (Figura 28).

Dentro do filo *Ascomycota*, as classes predominantes foram *Saccharomycetes*, *Sordariomycetes* e *Ascomycota* não classificados (Figura 29). Nas replicatas biológicas 1 e 2 do caldo da cana crua, a classe predominante foi *Saccharomycetes* (24,40% e 19,61% das sequências, respectivamente), seguida de

Sordariomycetes (19,73% e 17,97% das seqüências). Na replicata biológica 3 da mesma amostra, no entanto, ocorreu o inverso, *Sordariomycetes* (18,95% das seqüências) predominou sobre *Saccharomycetes* (18,04% das seqüências), com, porém, pequena porcentagem de seqüências a mais.

Figura 28: Filos do reino *Fungi* em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.

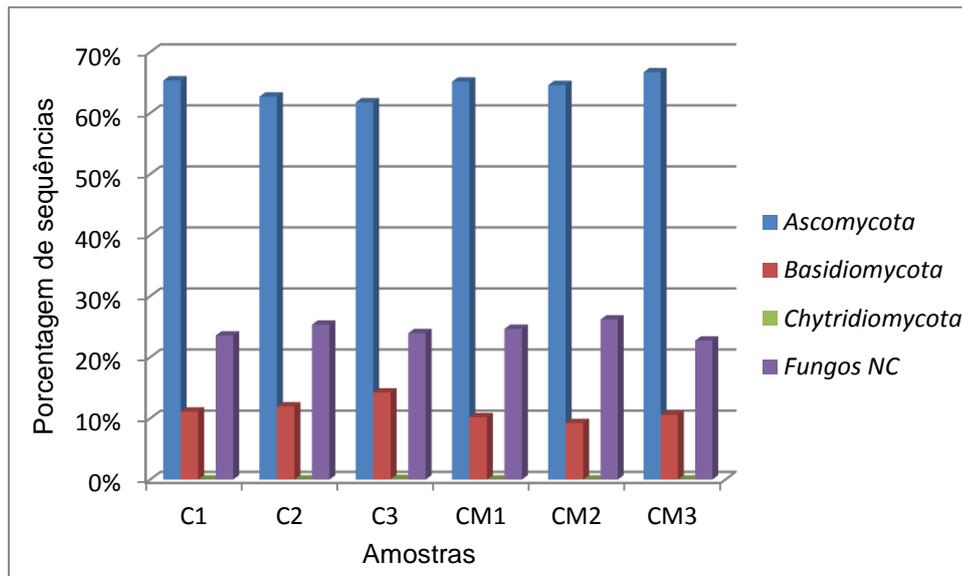
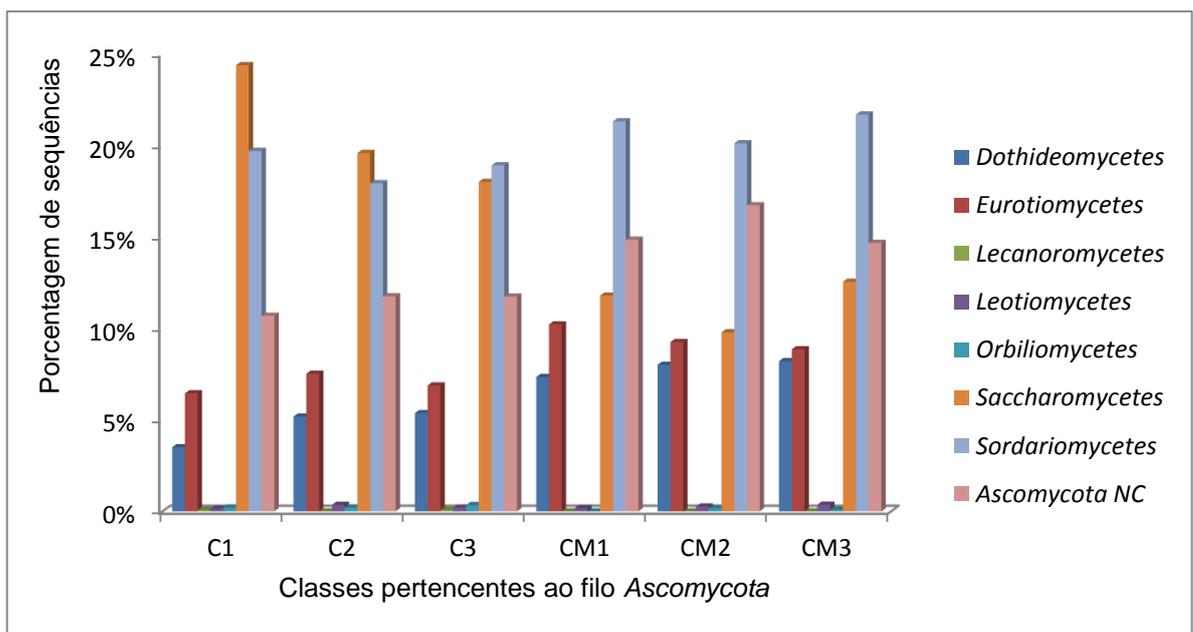


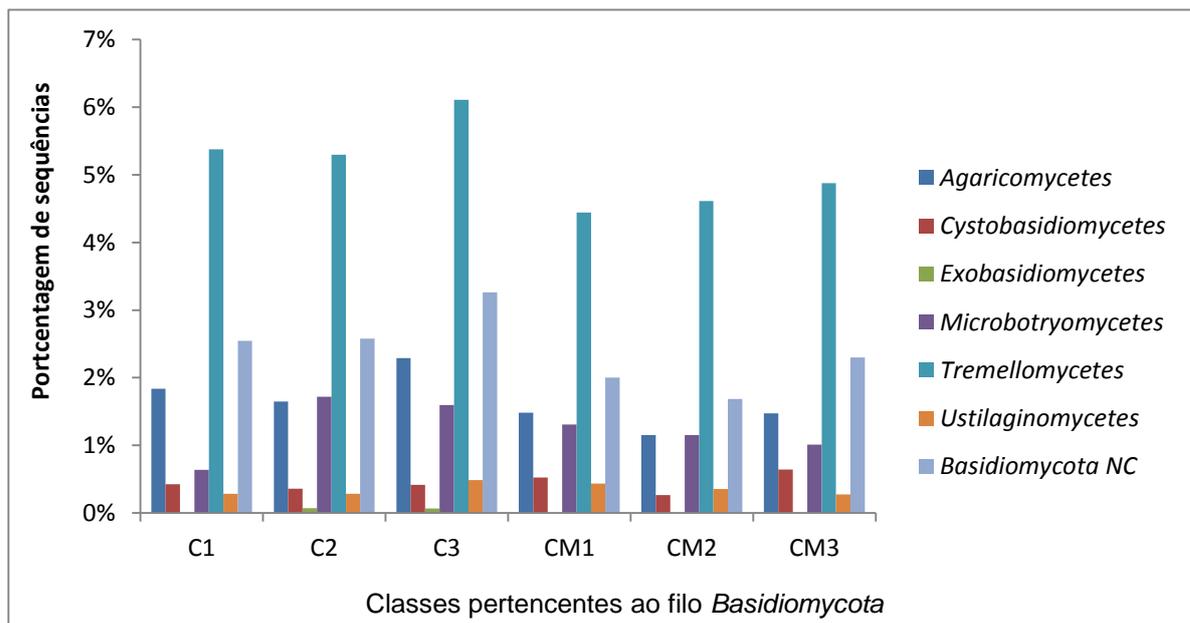
Figura 29: Classes do filo *Ascomycota* presentes em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.



Nas replicatas biológicas do caldo misto, a classe predominante foi *Sordariomycetes*, seguida do grupo *Ascomycota* não classificadas e *Saccharomycetes*. A classe *Sordariomycetes* obteve, nas replicatas biológicas 1, 2 e 3, 21,34%, 20,14% e 21,71% das sequências, respectivamente, o grupo *Ascomycota* não classificados obteve 14,90%, 16,77% e 14,72% das sequências, e a classe *Saccharomycetes* obteve 11,85%, 9,85% e 12,60% das sequências. Em menor quantidade, em todas as amostras, apareceram as classes *Eurotiomycetes*, com 6,51% a 10,28% das sequências e *Dothideomycetes*, com 3,54% a 8,28% das sequências. As classes *Leotiomycetes* e *Orbiliomycetes* apresentaram poucos representantes, e a classe *Lecanoromycetes* só foi encontrada nas replicatas biológicas 1 e 3 do caldo da cana crua.

Dentro do filo *Basidiomycota*, as classes predominantes em todas as amostras foram *Tremellomycetes* e o grupo de *Basidiomycota* não classificados (Figura 30). Nas replicatas biológicas 1, 2 e 3 do caldo da cana crua, foram observadas 5,37%, 5,30% e 6,11% das sequências para a classe *Tremellomycetes*, e 2,55%, 2,58%, e 3,26% das sequências de *Basidiomycota* não classificados. Nas replicatas biológicas 1, 2 e 3 do caldo misto foram encontradas 4,44%, 4,61% e 4,88% das sequências para a classe *Tremellomycetes* e 2,00%, 1,69% e 2,30% de *Basidiomycota* não classificados. As classes *Agaricomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Exobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Ustilaginomycetes* e *Basidiomycota NC* apresentaram porcentagens menores.

Figura 30: Classes do filo *Basidiomycota* presentes em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.

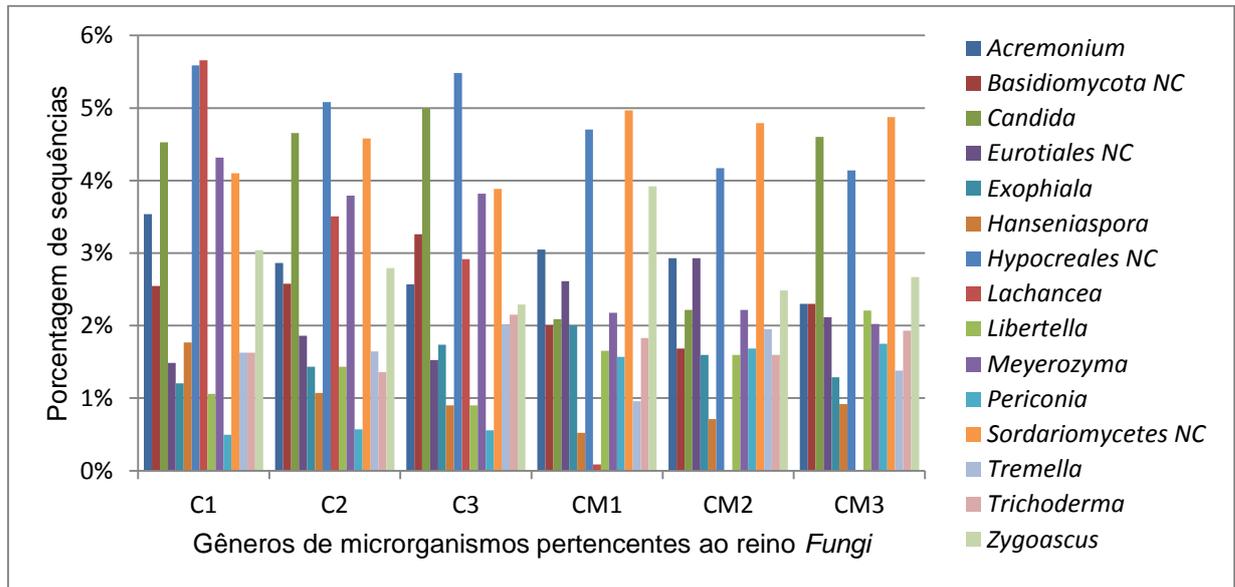


Microbotryomycetes e *Ustilaginomycetes* apresentaram menor número de sequências, enquanto que a classe *Exobasidiomycetes* só foi encontrada nas replicatas biológicas 2 e 3 do caldo da cana crua.

Em nível de gênero, foram encontrados 148 gêneros e 36 grupos cuja classificação não chegou a gênero, no entanto, apenas 15 destes possuíram maior abundância nas amostras (Figura 31). Na replicata biológica 1 da amostra de caldo de cana crua, o gênero mais abundante foi *Lachancea* (5,66% das sequências), seguido do grupo *Hypocreales* não classificados (5,59% das sequências), *Candida* (4,53% das sequências) e *Meyerozyma* (4,31% das sequências). Nas replicatas biológicas 2 e 3, o grupo com maior quantidade de sequências foi *Hypocreales* não classificados (5,08% e 5,48% das sequências), seguido de *Candida* (4,65% e 5,00% das sequências), *Sordariomycetes* não classificados (4,58% e 3,89% das sequências) e *Meyerozyma* (3,79% e 3,82%). O gênero *Lachancea* se destaca na primeira replicata biológica, enquanto que nas outras duas possui aproximadamente 3% das sequências. Outros gêneros dos 15 mais abundantes participaram com 0,5% a 3,54% das sequências.

Para as replicatas biológicas do caldo misto 1,2 e 3, o grupo *Sordariomycetes* não classificados apresentou o maior número de sequências (4,97%, 4,79% e 4,88% das sequências). Na replicata biológica 1, foi seguido de *Hypocreales* não classificados (4,70% das sequências) e *Zygoascus* (3,92% das sequências). Na replicata biológica 2, foi seguido de *Hypocreales* não classificados (4,17% das sequências) e *Eurotiales* não classificados (2,93% das sequências). Na replicata biológica 3, foi seguido do gênero *Candida* (4,60% das sequências) e *Hypocreales* não classificados (4,14% das sequências). O gênero *Lachancea* só esteve presente na replicata biológica 1. Os outros gêneros entre os mais abundantes participaram com 0,52% a 3,05% das sequências. A quantidade de sequências para cada amostra dos gêneros/grupos raros está descrita no apêndice G.

Figura 31: Grupos e gêneros mais abundantes do reino *Fungi* em cada amostra. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.



As sequências geradas por pirosequenciamento para a região ITS dos microrganismos presentes nas amostras de vinho 1, vinho 2 e vinho 3 foram analisadas separadamente, já que o número de sequências foi baixo. Para a amostra de vinho 1, foram geradas 37 sequências, para a amostra de vinho 2, 6 sequências, e para a amostra de vinho 3, 48 sequências. Na amostra de vinho 1, predominou o gênero *Saccharomyces*, com 32 sequências, e também houve um representante do gênero *Pichia*, um do gênero *Cladosporium*, dois do gênero *Candida*, e um fungo não classificado. Na amostra de vinho 2, houve três representantes do gênero *Saccharomyces*, um do gênero *Wickerhamomyces*, um *Saccharomycetales* não classificado, e um *Ascomycota* não classificado. Na amostra de vinho 3, houve 40 sequências pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, uma pertencente ao gênero *Metschnikowia* e cinco *Fungi* não classificados. Mesmo com a pequena quantidade de sequências, foi possível notar a predominância do gênero *Saccharomyces* em todas as replicatas biológicas das amostras de vinho (Figura 32). Na árvore filogenética gerada para essas sequências, 81 das 92 sequências se agruparam com sequências do gênero *Saccharomyces*, incluindo aquelas identificadas como *Sacchromycetales* não classificados, *Ascomycota* não classificados e uma dos *Fungi* não classificados. As outras sequências não formaram grupos muito definidos, inclusive com valores de bootstrap baixos (Figura 33).

Figura 32: Grupos e gêneros das sequências geradas por pirosequenciamento para as amostras de vinho. V1 - vinho 1; V2 - vinho 2; V3 - vinho 3

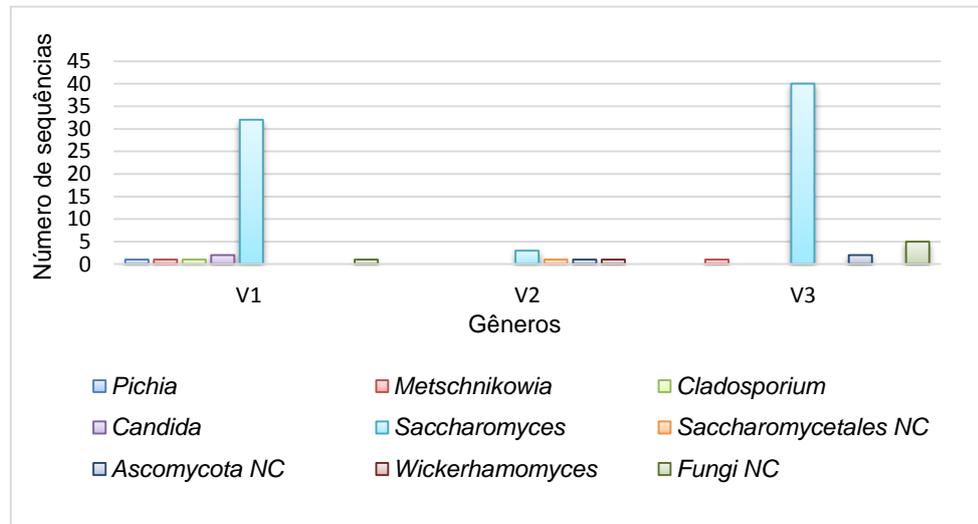
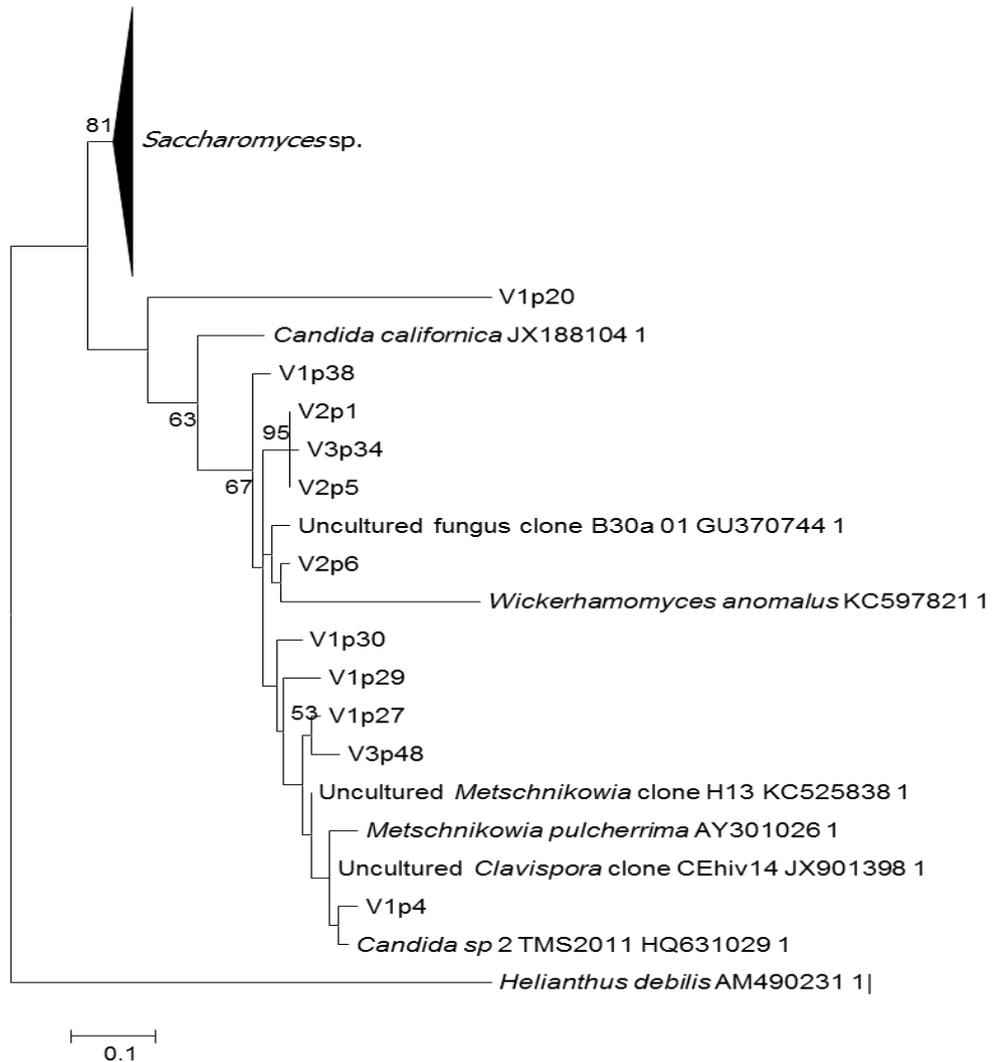
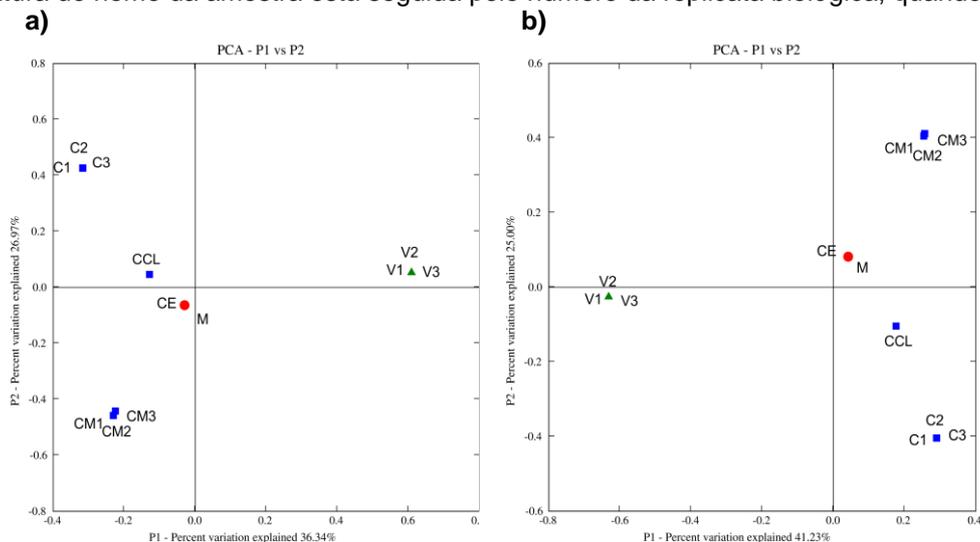


Figura 33: Árvore filogenética obtida a partir das seqüências da região ITS geradas por pirosequenciamento. Como outgroup foi utilizado o vegetal *Helianthus* sp. (girassol)



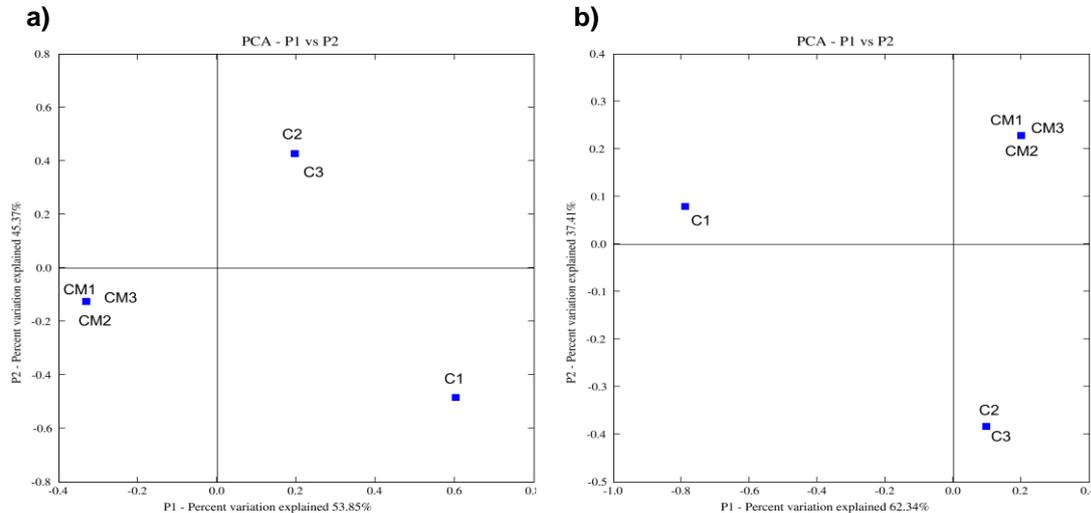
Os gráficos de PCoA gerados evidenciaram, que para o domínio *Bacteria*, há diferenças de comunidade entre as amostras de caldo de cana crua, caldo misto, caldo clarificado, caldo evaporado e vinho, e, que não há diferença entre as amostras de caldo evaporado e mosto. Os pontos representantes das replicatas biológicas das amostras de caldo da cana crua e vinho ficaram sobrepostos, assim como os pontos representantes das amostras de caldo evaporado e mosto. As diferenças são tanto qualitativas (*unweighted*) quanto quantitativas (*weighted*). O *p-value* para diferença entre as amostras é <0.001 , demonstrando que as mesmas são estatisticamente significantes (Figura 34).

Figura 34: Análise das Coordenadas Principais (PCoA). a) UniFrac *unweighted* (análise qualitativa). b). UniFrac *weighted* (análise quantitativa). PCoA para as seqüências do domínio *Bacteria*. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; CCL – caldo clarificado; CE – caldo evaporado; M – mosto; V – vinho. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica, quando necessário.



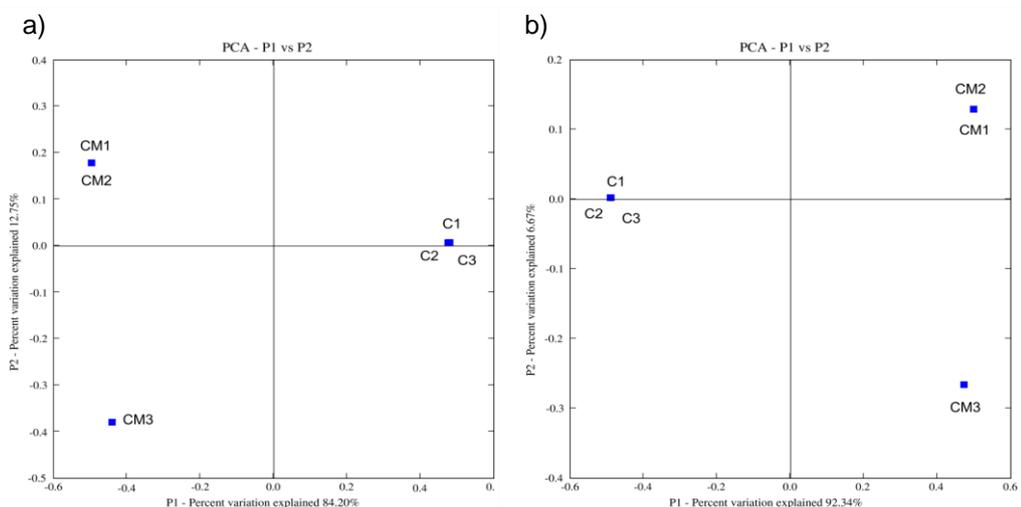
Para as seqüências do domínio *Archaea*, foram encontradas diferenças entre as amostras de caldo da cana crua e de caldo misto, assim como a replicata biológica 1 do caldo da cana crua se distanciou de todas as outras amostras, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Os pontos representantes das replicatas biológicas das amostras de caldo misto se sobrepuseram, assim como os pontos das replicatas biológicas 2 e 3 do caldo da cana crua. O *p-value* para essas amostras foi de 0,086 demonstrando que estatisticamente as diferenças são significativas (Figura 35).

Figura 35: Análise das Coordenadas Principais (PCoA). a). UniFrac *unweighted* (análise qualitativa). b). UniFrac *weighted* (análise quantitativa). PCoA para as sequências do domínio *Archaea*. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica



Para as sequências da região ITS do *reino Fungi*, houve diferenças entre as comunidades da amostra de caldo da cana crua e caldo misto, e a replicata biológica 3 do caldo misto se distanciou de todas as outras amostras, qualitativa e quantitativamente. Os pontos representantes das replicatas biológicas das amostras de caldo da cana crua se sobrepuseram, assim como os pontos das replicatas biológicas 1 e 2 do caldo misto. O *p-value* para essa análise foi de 0,013, tornando as diferenças entre as comunidades presentes nas amostras estatisticamente significativas (Figura 36).

Figura 36: Análise das Coordenadas Principais (PCoA). a). UniFrac *unweighted* (análise qualitativa). b). UniFrac *weighted* (análise quantitativa). PCoA para as sequências do *reino Fungi*. C- caldo da cana crua; CM - caldo misto. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica.



7. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo o estudo dos microrganismos contaminantes existentes no processo de produção de etanol, por meio de técnicas dependentes e independentes de cultivo. Apesar do avanço das técnicas moleculares atuais, a maioria dos estudos nessa área utiliza as técnicas clássicas de cultivo, que limitam o acesso a grande parte da diversidade de microrganismos presentes nas diferentes etapas da produção de etanol.

Para a obtenção das amostras, foi feita uma parceria com uma usina produtora de etanol, e até o momento da coleta de amostras, não estavam disponíveis informações sobre as características destas, como pH e temperatura. Dessa maneira, os meios de cultura foram escolhidos de acordo com informações existentes na literatura, assim como foi feita uma padronização de temperatura (37°C) e pH (6.5) de cultivo, já que, além do desconhecimento sobre as amostras, não seria possível reproduzir todas as variações em laboratório. Assim sendo, microrganismos cujas condições de crescimento eram diferentes das condições utilizadas não foram recuperados no processo de cultivo.

Foi feita a utilização de dois meios de cultura para bactérias, já que o meio PCA é comumente utilizado para contagem de microrganismos, e o meio de cultura MRS é utilizado para o isolamento de *Lactobacillus*, conhecido como um contaminante do processo de produção de etanol, tendo sido desenvolvido para o cultivo deste gênero de bactérias e utilizado em outros estudos para o mesmo fim (GALLO, 1989; BAYROCK et al., 2003; SOUZA et al., 2012). Porém, apenas três bactérias foram isoladas com o meio MRS (Apêndice A), o que pode ser explicado pelo fato deste meio ser bastante seletivo. Embora tenham sido utilizados quatro meios de cultura diferentes para cada amostra, buscando ao máximo abranger a diversidade existente em cada uma delas, não foi possível isolar uma grande quantidade de microrganismos, considerando, que, no total, foram obtidas 18 amostras. Outro fator que influenciou na quantidade de isolados adquiridos, além das diferentes características de pH, temperatura e nutrientes das amostras, foi a distante localização da usina. O tempo de transporte dificultou a estabilização das amostras, e mesmo que tenham sido transportadas em gelo; algumas possuíam temperaturas superiores a 83°C, prejudicando ainda mais a conservação das mesmas até o momento do seu processamento. Deste modo, diversos fatores

influenciaram na quantidade final de microrganismos isolados, impossibilitando uma contagem de UFC/mL. Todavia, foi realizada a identificação de alguns gêneros de microrganismos que permanecem viáveis durante o processo, podendo ter algum tipo de influência no mesmo.

Embora mais bactérias tenham sido isoladas a partir do caldo da cana crua, esse tipo de avaliação não permite determinar se esse ambiente é o que possui maior diversidade e maior número de microrganismos, já que com o isolamento não é possível acessar toda a diversidade presente na amostra. Porém, com o pirosequenciamento, foi possível realizar uma melhor estimativa da diversidade de microrganismos existente em cada porção coletada.

7.1.1. Domínio *Bacteria*

Poucos estudos existentes focam na diversidade microbiana presente no caldo da cana-de-açúcar e no caldo misto, já que a contaminação importante, que afeta a produção do etanol, ocorre no vinho e no leite de leveduras. Para o caldo da cana-de-açúcar, os estudos estão focados em bactérias endofíticas diazotróficas, como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, devido a sua habilidade de fixação de nitrogênio, assim como bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (DONG et al., 1995; BODDEY et al., 2003; QUECINE et al., 2012). Apenas alguns gêneros bacterianos endofíticos foram isolados e estudados, como *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Klebsiella* (RENNIE et al., 1982), *Pantoea* (LOIRET et al., 2004), *Bacillus* (RENNIE et al., 1982), além dos já citados *Burkholderia* (REIS et al., 2004), *Gluconacetobacter* (PERIN et al., 2004) e *Herbaspirillum* (JAMES, E. K. et al., 1997).

Entre os estudos focados na microbiota da cana está o de Rosseto (2008), que avaliou o efeito da cana-de-açúcar transgênica resistente ao herbicida imazapir sobre a comunidade bacteriana associada e estudou a interação entre a planta e bactérias do gênero *Methylobacterium*, importante endófito encontrado em várias plantas de interesse econômico. Por meio do sequenciamento de Sanger do gene que codifica o RNA ribossômico 16S, foi verificado que a comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar pertence aos gêneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardiosis*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*.

O trabalho de Mendes e cols. (2007) foi isolar bactérias presentes na rizosfera e no interior de raízes e colmos de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campos experimentais de Piracicaba (São Paulo) e caracterização bioquímica dos isolados do complexo *Burkholderia cepacia*. Para identificação dos 18 isolados bacterianos, foi utilizado o sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossômico 16S e do gene que codifica a recombinase RecA. Os gêneros encontrados foram *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Microbacterium*, sendo que o gênero predominante entre os endófitos foi *Burkholderia*.

Nascimento (2006), ao isolar microrganismos endofíticos e da rizosfera de cana-de-açúcar, observou 267 microrganismos endofíticos, sendo 191 isolados de raízes, 75 isolados das folhas e 25 isolados da rizosfera. Entre as bactérias, predominou o gênero *Streptomyces*, uma actinobactéria. Duncan e Colmer (1964) estudaram os coliformes presentes em cana-de-açúcar, e encontraram *Aerobacter cloacae* como gênero predominante nas porções mais altas das plantas, e *A. aerogenes* como predominante na parte inferior. Esses gêneros também foram encontrados no caldo da cana, assim como *Escherichia coli*.

Neste estudo, foram isoladas 51 bactérias do caldo da cana-de-açúcar, sendo que 38 foram provenientes do caldo da cana crua, e 13, do caldo misto. Os gêneros identificados foram: *Weissella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Leuconostoc*, *Serratia*, *Cohnella*, *Cellulomonas*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Lactobacillus*, *Curtobacterium* e *Microbacterium*, além de sete *Enterobacteriaceae* não identificadas e uma *Microbacteriaceae* não identificada. Gêneros como *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Nocardiopsis* não foram isolados neste estudo, assim como os gêneros isolados *Weissella*, *Cohnella*, *Stenotrophomonas* e *Cellulomonas* não foram relatados anteriormente. No entanto, ao analisar o resultado do pirosequenciamento das amostras de caldo da cana crua e caldo misto, foram encontrados 196 gêneros e 71 grupos de bactérias não classificadas, alcançando-se uma diversidade muito maior do que o isolamento de microrganismos, tanto neste como em outros estudos.

Nas amostras de caldo da cana crua, o gênero com maior abundância é *Leuconostoc*, pertencente ao filo *Firmicutes*, que está entre os predominantes nessas amostras. As bactérias do gênero *Leuconostoc* são cocos gram positivos, imóveis e não formadores de esporos (DICKS et al., 1990; SALMINEN et al., 2012). Estão presentes em diversos ambientes, estando associados a plantas e material

vegetal em apodrecimento (SALMINEN et al., 2012), e inclusive estão relacionados à deterioração da cana-de-açúcar e da beterraba (EGGLESTON et al., 2008; GILLIAN et al., 2010). Além de *Leuconostoc*, os grupos que possuem maior abundância nessas amostras são, contudo, grupos de bactérias não classificadas, como *Enterobacteriales* não classificados e *Rhizobiales* não classificados. *Enterobacteriales* é uma ordem de bactérias gram-negativas, cuja única família contida é *Enterobacteriaceae*. São bactérias ubíquas, encontradas em solo, água, frutas, carne, ovos, vegetais, grãos, árvores com flores, e em muitos animais, de insetos a homens. Sua patogenicidade é importante tanto em animais quanto em plantas, causando doenças em milho, batata, cana-de-açúcar, entre outras culturas (IMHOFF, 2005). *Rhizobiales* são parte da classe *Alphaproteobacteria*, grupo que possui bactérias fixadoras de nitrogênio e alguns representantes metilotróficos (ZHANG, L.; XU, 2008). Ambos os grupos pertencem ao filo *Proteobacteria*, que foi o mais abundante nas amostras de caldo da cana crua e no caldo misto. O filo *Proteobacteria* abrange bactérias gram-negativas com uma grande diversidade de metabolismos e representam a maioria das bactérias de importância clínica, industrial ou agrícola (MADIGAN et al., 2004). Nas amostras de caldo misto, o grupo predominante foi *Actinomycetales* não classificados. Este grupo pertence ao filo *Actinobacteria*, um dos maiores filios do domínio *Bacteria*, cujos representantes são bactérias gram-positivas com alto conteúdo de GC em seu DNA. O grupo inclui microrganismos com variadas morfologias, desde cocóides a formato de hifas, além de alta variação metabólica e fisiológica. Inseridos no filo estão patógenos humanos (ex. *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia*), habitantes do solo (ex. *Streptomyces*), comensais de plantas (*Leifsonia*) e comensais gastrintestinais (*Bifidobacterium*) (VENTURA et al., 2007). Além deste grupo, foi predominante nas amostras de caldo misto o gênero *Lactobacillus*, um representante do *Firmicutes*, naturalmente presente no trato gastrintestinal, urogenital, cavidade oral, pele de animais, plantas e solo (MADIGAN et al., 2004), cuja importância será discutida posteriormente. Desta maneira, é possível ressaltar que a microbiota encontrada no caldo na cana crua e no caldo misto possui tanto representantes endofíticos e epifíticos da planta como microrganismos naturalmente presentes em solo, que são carregados em conjunto com a planta e acabam sendo inserido no processo de produção do etanol. Deste modo, a microbiota é proveniente não só da planta, mas

também das impurezas carregadas e dos próprios equipamentos por onde o caldo passou.

A amostra de caldo clarificado sofre correção de seu pH com cal e um aumento de temperatura na tentativa de eliminar parte dos microrganismos presentes. Assim, pode-se observar uma mudança nos microrganismos predominantes nas próximas amostras, caldo clarificado, caldo evaporado e mosto. No caldo clarificado quatro grupos se destacaram: *Clostridiales* não classificados, *Enterobacteriales* não classificados, o gênero *Lactobacillus* e *Bacillales* não classificados. A ordem *Clostridiales* é composta de microrganismos fenotipicamente, quimiotaxonomicamente, fisiologicamente e ecologicamente diversos, com microrganismos gram-positivos e negativos (VOS et al., 2009). A ordem *Bacillales* contém bacilos gram-positivos, e ambas as ordens pertencem ao filo *Firmicutes*, predominantes na amostra de caldo clarificado. Sob condições adversas, como depleção de nutrientes e altas temperaturas, muitos membros das ordens *Bacillales* e *Clostridiales* são capazes de esporulação (PAREDES-SABJA et al., 2011). Os formadores de esporo podem ser recuperados a partir de solo, alimentos, poeira e outros ambientes (VOS et al., 2009), e esse é um possível mecanismo de sobrevivência destes microrganismos às altas temperaturas. Quanto aos *Lactobacillus* e *Enterobacteriales*, não são conhecidos por ser termotolerantes, no entanto, podem formar biofilmes protetores, que podem ser resistentes inclusive a desinfetantes (KUBOTA et al., 2008; VAN HOUDT; MICHIELS, 2010; IGNATOVA-IVANOVA; IVANOV, 2013), o que explicaria sua presença nessa amostra.

O caldo evaporado também possui alta temperatura, e sofreu evaporação, de modo que a quantidade de açúcares é ainda maior do que nas amostras anteriores. Os grupos de destaque são o gênero *Paenibacillus* e *Enterobacteriales* não classificados. O gênero *Paenibacillus* é um grupo de bastonetes gram-positivos, formadores de esporos, separados do gênero *Bacillus* em 1993. Entre seus membros está *P. polimyxa*, que está relacionada ao crescimento de diversos vegetais. O gênero produz antimicrobianos que têm o poder de antagonizar outros microrganismos (HOON et al., 2005; TIMMUSK et al., 2005). Embora estes dois grupos tenham sido predominantes, a única bactéria isolada dessa amostra foi identificada como *Staphylococcus*, membro da ordem *Bacillales* não produtor de esporos, mas também capaz de formar biofilmes (OTTO, 2008). Desse modo, não é possível afirmar se os gêneros predominantes possuíam representantes viáveis

nessa amostra, ou se os gêneros cultivados foram privilegiados pelos métodos de cultivo utilizados.

Antes da fermentação, a solução concentrada de açúcares, o mosto, é resfriada a aproximadamente 45°C para permitir a fermentação pelas leveduras. No estudo de Gallo (1989), onde também foi estudada a microbiota do mosto antes da fermentação, predominaram os bastonetes gram-positivos, *Bacillus* e *Lactobacillus*, sendo que as *Enterobacteriaceae* alcançaram no máximo uma porcentagem de 9,52% de microrganismos isolados. Neste estudo, o grupo predominante na amostra de mosto antes da fermentação foi *Enterobacteriales* não classificados. Contudo, os microrganismos isolados foram ambos pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, demonstrando mais uma vez a diferença entre resultados obtidos pela utilização de técnica dependentes e independentes de cultivo.

A maior mudança de comunidade entre as amostras ocorre na amostra de vinho. O grupo predominante foi *Lactobacillus*, seguido por *Lactobacillales* não classificados, e cinco das oito bactérias isoladas a partir do vinho pertenceram ao gênero *Lactobacillus*. Lactobacilos são bactérias ácido-láticas gram-positivas e microaerofílicas encontradas normalmente em diversos ambientes, como locais ricos em nutrientes, microbiota de diversos animais, assim como no meio ambiente, em plantas e solos. O gênero pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Lactobacillales*. Compreende mais de 100 espécies, entre as quais *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* e *L. salivarius*, bem caracterizadas, e importantes biológica, tecnológica e comercialmente. Seu metabolismo gera majoritariamente ácido lático (SALMINEN et al., 2012).

As bactérias do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus* parecem ser os maiores contaminantes do processo de produção de etanol (ALCARDE et al., 2003; SKINNER; LEATHERS, 2004; LUCENA et al., 2010). As bactérias ácido-láticas causam problemas não apenas na fermentação a partir de cana-de-açúcar, mas também na produção de etanol a partir de milho (SKINNER; LEATHERS, 2004), trigo (HYNES et al., 1997), tapioca, cevada (CHANG, I.-S. et al., 1995; CHANG, I. S. et al., 1997), malte (MAKANJUOLA; SPRINGHAM, 1984), triticale e centeio (LEJA; BRODA, 2009). São conhecidos pelos seus representantes benéficos, bactérias probióticas que auxiliam na manutenção do ambiente gastrintestinal, mas também causam problemas no setor alimentício. Causam contaminação ou deterioração de produtos cárneos, pickles, maionese, molho de salada, queijo, molho de soja, saquê e

cerveja. Na maioria dos casos, são originários do processo de produção ou da matéria-prima (KUBOTA et al., 2008). São os mais problemáticos possivelmente devido à sua resistência a altas temperaturas, baixo pH, tolerância ao etanol e habilidade de crescer rapidamente (NARENDRANATH et al., 1997)

Já foi observado que as bactérias ácido-láticas são capazes de produzir biofilmes. Kubota e cols. (2008) observaram a formação de biofilmes por 3 bactérias ácido-láticas: *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* e *L. fructivorans*, importantes na deterioração de alimentos. Os microrganismos formaram biofilmes em lamínulas, e estes foram resistentes a ácido acético e etanol. Skinner e cols. (2007) testaram a produção de biofilmes em um reator a partir de amostras retiradas da produção de etanol e observaram que os microrganismos produtores dos biofilmes foram as mesmas espécies existentes nas amostras, com predominância de bactérias ácido-láticas.

De Carvalho e Monteiro (2011) observaram, em seus experimentos, que o rendimento fermentativo das leveduras decresce de acordo com o aumento da contaminação bacteriana no mosto durante a fermentação. O ácido produzido pelas bactérias afeta diretamente a conversão em açúcar pelas leveduras, de maneira que foi comprovado que as bactérias e seus metabólitos afetam diretamente a produção de etanol. Alguns dos *Lactobacillus* isolados em estudos já apresentaram, inclusive, sensibilidade reduzida a virginiamicina, um dos antibióticos utilizados para o controle da contaminação microbiana (BISCHOFF et al., 2007).

Embora se acredite que as bactérias ácido-láticas possuam tolerância elevada à temperatura, Ceballos-Schiavone (2009) não confirmou essa teoria em seu estudo. Sete espécies diferentes de *Lactobacillus* foram submetidas a tratamento térmico, e verificou-se que estas possuíam sensibilidade à temperatura, morrendo em quatro minutos. Assim, a autora levantou a hipótese de que as mesmas se fazem presentes nas dornas de fermentação devido a falhas no processamento, como clarificação ineficiente do caldo, e recontaminações posteriores. Alcarde e cols. (2003) verificaram que a contaminação microbiana foi reduzida após irradiação gama do mosto, assim como a acidez, aumentou a viabilidade das leveduras e o rendimento da fermentação em 1,9%. Desta maneira, é possível inferir que a contaminação microbiana no processo de produção pode ser diminuída se forem adquiridos cuidados maiores com a limpeza do processo, desde que seja economicamente viável.

No estudo de White e cols. (2011), os autores fizeram a análise dos contaminantes bacterianos de amostras de combustíveis hidrocarbonados (gasolina, querosene de aviação, diesel, biodiesel automotivo), e encontraram um perfil diferente dos contaminantes da produção de etanol. A identificação de microrganismos cultivados demonstrou a predominância do gênero *Pseudomonas*, enquanto que o pirosequenciamento de quatro das amostras de combustíveis (*gas oil*, diesel, *diesel engined road vehicle*, *marine gas oil*) demonstrou a predominância de gêneros como *Marinobacter*, *Achromobacter*, *Burkholderia* e *Halomonas*. Segundo os autores do trabalho, em geral, o cultivo dos microrganismos contaminantes foi representativo dos gêneros encontrados por pirosequenciamento, no entanto, superestimou a presença de certos grupos, como *Pseudomonas*.

A comparação entre as amostras por meio de índices de riqueza e diversidade e número de OTUs, demonstrou que a amostra mais diversa é o caldo misto, o que foi confirmado pela curva de rarefação das replicatas biológicas da amostra, que não atingiram um platô. No entanto, as amostras de caldo de cana crua e caldo clarificado também não atingiram, indicando que para alcançar o platô é necessário um número maior de sequências para cobrir a diversidade total das amostras. Para a amostra de caldo da cana crua, seriam necessárias entre 18.230 e 25.368 sequências, para a amostra de caldo misto, entre 2436 e 6643 sequências, e para a amostra de caldo clarificado, 18.002 sequências. Embora a cobertura estimada das amostras de caldo evaporado e mosto não seja muito alta, a curva de rarefação de ambas atingiu um platô, o que pode ser explicado pelos baixos índices de diversidade inverso de Simpson e de Shannon. As replicatas da amostra de vinho também atingiram platô na curva de rarefação. Os gráficos de PCoA e o *p-value* demonstraram que as comunidades de replicatas biológicas dentro de uma mesma amostra são semelhantes, e que as comunidades entre amostras são significativamente diferentes, a não ser as amostras de caldo evaporado e mosto, consideradas iguais.

Das bactérias utilizadas para os testes com antimicrobianos, somente aquela pertencente ao gênero *Weissella* apresentou sensibilidade aos antibióticos e peptídeos. No entanto, a representante do gênero *Lactobacillus*, que foi isolada a partir da amostra de vinho, e está entre os contaminantes que atrapalham efetivamente o processo de produção, não apresentou sensibilidade a nenhum composto testado. Dessa maneira, são necessários mais estudos para encontrar um

peptídeo antimicrobiano que possa ser utilizado na indústria da produção do etanol, um composto natural que possa ser inserido, diminuindo a quantidade de antibióticos comerciais a serem oferecidos aos animais que utilizam o leite de leveduras como alimentação. Porém, tendo em vista a resistência apresentada pelos microrganismos, outra abordagem a ser utilizada seria adotar medidas de prevenção mais eficazes, como uma higienização da cana-de-açúcar mais eficiente antes de sua entrada no processo, assim como a clarificação adequada do caldo da cana-de-açúcar a ser utilizado para a fermentação. Além disso, lavagens mais eficientes dos equipamentos utilizados no processo poderiam ser úteis para diminuir o nível de contaminação.

A análise das sequências do domínio *Bacteria* demonstrou que a diversidade de bactérias presentes em diversas etapas do processo de produção de etanol ainda é pouco explorada, já que as técnicas dependentes de cultivo limitam esse trabalho. É possível observar também a mudança de comunidade bacteriana que ocorre durante o processo. Nas amostras de caldo da cana crua e caldo misto, que estão à temperatura ambiente, predomina o filo *Proteobacteria*, e diversos grupos de microrganismos encontrados em solo, que são carregados para o processo de produção. Ao aumentar a temperatura e adicionar cal ao caldo da cana crua, gerando o caldo clarificado, as bactérias contaminantes passam a ser do filo *Firmicutes*, o qual possui representantes formadores de esporos e biofilmes, resistentes a condições adversas. No caldo evaporado, ainda com a temperatura alta, mas concentração de açúcares maior, volta a ser mais abundante o filo *Proteobacteria*, com seus representantes *Paenibacillus*, formador de esporos, e *Enterobacteriales* não classificados, com capacidade de produzir biofilmes. Na amostra de mosto, cuja temperatura é diminuída, predominaram *Enterobacteriales* não classificadas, do filo *Proteobacteria*, provavelmente favorecidas pela quantidade de nutrientes presente. Há também a possibilidade de que o equipamento utilizado já estivesse contaminado por bactérias de fermentações anteriores, favorecendo ainda mais sua presença nessa amostra. Por último, a maior mudança acontece após a fermentação, nas amostras de vinho. As condições favorecem a presença de representantes do filo *Firmicutes*, especialmente as bactérias do gênero *Lactobacillus*, bastante conhecidas pela indústria pelos prejuízos causados por sua presença no processo, como a produção de ácidos que diminuem a viabilidade da levedura. Nessa amostra também há a possibilidade de uma contaminação do

equipamento por microrganismos de fermentações passadas, já que a quantidade de *Lactobacillus* é muito maior do que nas amostras anteriores. Dessa maneira, seria necessário testar os equipamentos para a presença de contaminação, o que reforça a necessidade de uma higienização mais eficiente das máquinas para a diminuição da quantidade de microrganismos contaminantes. Na tabela 9 estão descritos os principais gêneros/grupos não classificados de bactérias encontrados em cada amostra, classe e filo a que pertencem.

Tabela 9: Gêneros/grupos do domínio *Bacteria* predominantes em cada amostra.

Amostra*	Gêneros/grupos	Classes	Filos
C1	<i>Leuconostoc</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
	Enterobacteriales NC	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
C2	<i>Leuconostoc</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
	Enterobacteriales NC	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
C3	<i>Leuconostoc</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
	Enterobacteriales NC	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
CM1	Actinomycetales NC	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
CM2	Actinomycetales NC	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
CM3	Actinomycetales NC	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
CCL	Clostridiales NC	<i>Clostridia</i>	<i>Firmicutes</i>
	Enterobacteriales NC	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
CE	<i>Paenibacillus</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
	Enterobacteriales NC	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
M	Enterobacteriales NC	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
V1	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
V2	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
V3	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>

*C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; CCL caldo clarificado; CE-caldo evaporado; M - mosto; V – vinho; NC – não classificadas. A abreviatura do nome da amostra está seguida pelo número da replicata biológica, quando necessário.

7.1.2. Reino *Fungi*

Diversos gêneros de fungos já foram associados à cana-de-açúcar, mesmo com a quantidade escassa de estudos sobre microbiota fúngica relacionada à planta: Trabalhando com cultivares de cana-de-açúcar no Iraque, Abdullah e Saleh (2010a) encontraram dez ascomicetos: *Arxiomyces zubairiensis*, *Chaetomium atrobrunneum*, *C.convolutum*, *C.elatum*, *C.globosum*, *C.murorum*, *C.spiralotrichum*,

Coniochaeta saccardoi, *Kerinia nitida* e *Leptosphaeria sacchari*. Em outro estudo, os mesmos autores (ABDULLAH; SALEH, 2010b) relataram 16 fungos mitosporicos, dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exserohilum* e *Dreschlera*. De Azeredo e cols. (1998), isolaram fungos leveduriformes de folhas, colmos e rizosfera de diferentes fases do desenvolvimento da cana-de-açúcar, e reportaram que as espécies predominantes foram *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Debaryomyces hanseni*.

Mendes (2008) estudou a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar geneticamente modificada para a resistência ao herbicida imazapir, e por sequenciamento da região ITS de fungos isolados, encontrou os seguintes gêneros: *Alternaria*, *Ampelomyces*, *Aspergillus*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Hypochnicium*, *Hypocreales*, *Mariannaea*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Saccharicola*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Trichodermae* e *Xylaria*.

Neste estudo, foram isoladas 22 leveduras a partir das amostras de caldo da cana crua e caldo misto, das quais 19 foram identificadas pela região D1/D2, presente no gene que codifica o 28S do reino *Fungi*. Os gêneros foram confirmados pelo sequenciamento da região ITS das leveduras, com somente uma divergência, na qual a levedura foi classificada pela região D1/D2 como *Lodderomyces*, e pela região ITS como *Candida*. É compreensível a dificuldade na diferenciação entre os dois gêneros, mesmo por abordagem molecular, já que anteriormente se acreditava que *L. elongiosporus* era a forma teleomórfica de *C. parapsilopsis*, e os gêneros só foram distinguidos após sequenciamento do gene que codifica a subunidade 18S do reino *Fungi* (JAMES, S. A. et al., 1994; LOCKHART et al., 2007). Além das duas leveduras *Ascomycota* não identificadas, foram observados os gêneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Tremella*, *Wickerhamiella*, *Wickerhamomyces*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. No trabalho de De Azeredo (1998), os gêneros *Pichia*, *Torulaspota*, *Tremella* e *Saccharomyces* foram relatados como associados a folhas, colmos e rizosfera de cana-de-açúcar, sem, porém, serem predominantes. Os fungos filamentosos isolados a partir das amostras de caldo misto e caldo da cana crua pertenceram aos gêneros *Talaromyces*, *Fusarium*, *Cladosporium*, também isolados no estudo de Mendes (2008), e *Arthrimum*, um gênero que ocorre comumente em grama, folhas, colmos e raízes de diferentes plantas (AGUT; CALVO, 2004).

As análises das sequências do pirosequenciamento da região ITS demonstrou a presença de 148 gêneros e 36 grupos de fungos não classificados nas amostras de caldo da cana crua e caldo misto. O filo predominante foi *Ascomycota*, seguido das sequências de fungos não classificados, e do filo *Basidiomycota*. Em todas as amostras, só houve uma sequência pertencente ao filo *Chytridiomycota*, do gênero *Rhizophlyctis*.

Nas amostras de cana crua, os grupos predominantes foram *Lachancea*, *Hypocreales* não classificados, *Candida*, *Meyerozima* e *Sordariomycetes* não classificados. Nas amostras de caldo misto, os grupos mais abundantes foram *Sordariomycetes* não classificados, *Hypocreales* não classificados, *Zygoascus* e *Eurotiales* não classificados. Os gêneros/grupos não classificados do reino *Fungi* predominantes nas amostras, classes e filas a que pertencem, estão descritos na tabela 10.

O gênero *Lachancea* se destaca na primeira replicata biológica do caldo da cana crua, porém os testes estatísticos realizados demonstram que não é uma diferença significativa. Este gênero, embora ainda não muito estudado, já foi isolado a partir de alimentos fermentados (SENSES-ERGUL et al., 2006).

Tabela 10: Gêneros/grupos não classificados do reino *Fungi* predominantes em cada amostra.

Amostra*	Gêneros/grupos	Classe	Filo
CC	<i>Lachancea</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
	<i>Hypocreales</i> NC	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
	<i>Candida</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
	<i>Meyerozima</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
	<i>Sordariomycetes</i> NC	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
CM	<i>Sordariomycetes</i> NC	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
	<i>Hypocreales</i> NC	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
	<i>Zygoascus</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
	<i>Eurotiales</i> NC	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>

*C- caldo da cana crua; CM - caldo misto; NC – não classificadas.

A família *Hypocreales* pertence à classe *Sordariomycetes*, um dos maiores clados do filo *Ascomycota*, com mais de 600 gêneros e mais de 3000 espécies conhecidas. Os membros da classe *Sordariomycetes* são ubíquos e cosmopolitas, existindo em quase todos os ecossistemas como patógenos e endofíticos de plantas, artrópodes e mamíferos, e envolvidos também em decomposição e ciclo dos nutrientes. A maioria dos patógenos de plantas desse grupo está distribuída nas

famílias *Diaporthales*, *Hypocreales*, *Microascales*, *Ophiostomatales*, *Phyllachorales* e *Xylariales*. Os fungos endofíticos mais bem estudados pertencem às famílias *Hypocreales* (ex. *Balansia* e *Epichloe*), *Xylariales* (ex. *Nemania* e *Xylaria*), além de *Colletotrichum* (ZHANG, N. et al., 2007). O gênero *Candida*, que pertence ao filo *Ascomycota*, compreende mais de 160 espécies e está presente em quase todos os ambientes. É abundantemente distribuída na natureza, na terra, no mar, associada a animais e plantas, e diferentes espécies estão presentes no trato gastrointestinal e genital de humanos e mamíferos (DE LLANOS FRUTOS et al., 2004). O gênero *Meyerozyma*, membro do filo *Ascomycota*, já foi isolado a partir de diversos substratos, como solo, amido, cana de açúcar, flores, frutos, produtos alimentícios inclusive de infecções humanas. Já o gênero *Zygoascus*, também membro do filo *Ascomycota*, possui representantes isolados de uva, frutas podres, solo japonês e fluido proveniente de vegetais (KURTZMAN et al., 2011). A ordem *Eurotiales* inclui as famílias *Trichocomaceae* e *Elaphomycetaceae*. A família *Trichocomaceae* possui representantes saprófitas, que crescem comumente em solo ou material vegetal apodrecido, e entre seus representantes mais bem estudados estão *Aspergillus* e *Penicillium*. Os membros da família *Elaphomycetaceae* são encontrados em solo, sendo saprófitas ou formadores de micorrizas (BATTAGLIA et al., 2011).

Também foram observadas diferenças para os grupos de fungos encontrados nas amostras de caldo da cana crua e do caldo misto, assim como ocorreu para os grupos de bactéria, reforçando que microrganismos são inseridos no processo de fermentação por meio das impurezas trazidas nos vegetais. Dos gêneros isolados, *Hanseniaspora*, *Tremella*, *Wickerhamomyces* e *Torulaspota* foram também encontrados no pirosequenciamento, porém, com quantidades menores de sequências. Os gêneros *Wickerhamiella*, *Wickerhamomyces*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* não foram identificados, mas também houve grande quantidade de sequências que não obtiveram classificação até gênero.

A partir do caldo clarificado não foram isolados fungos, e a partir do caldo evaporado foram isolados apenas dois fungos filamentosos, um do gênero *Cladosporium*, já isolado a partir de cana de açúcar, e um pertencente ao gênero *Tritirachium*. O gênero *Tritirachium* possui apenas três espécies reconhecidas, *T. dependens*, *T. oryzae* e *T. cinnamomeum*, e embora pareçam ser saprófitos, *T. oryzae* já foi isolado de infecções na córnea humana (SCHELL et al., 2011).

Do mosto, foram isoladas duas leveduras, identificadas como *Pseudozyma*, e sete fungos filamentosos, dos gêneros *Cladosporium*, *Arhrinium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e um *Pleosporales* não classificado, todos associados a plantas. O gênero *Pseudozyma* é composto por leveduras em sua maioria epífitas ou saprófitas, não patogênicas para plantas (BUXDORF et al., 2013). Os estudos sobre a microbiota do mosto envolvem, em geral, as bactérias, contaminantes, no entanto, De Souza Liberal e cols. (2005) utilizaram a amplificação da região ITS do *reino Fungi* para detectar a presença de leveduras não-*Saccharomyces* no processo de fermentação. A amplificação da região ITS a partir do DNA total extraído de mosto não fermentado e fermentado foi comparada com a amplificação da mesma região de *Saccharomyces cerevisiae* e de leveduras contaminantes anteriormente isoladas: *Hansenula anomala*, *Dekkera anomala*, *Torulopsis pulcherrima*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula minuta* e *Kloeckera apiculata*. Ao comparar os padrões de amplificação, os autores puderam determinar com sucesso a presença dessas espécies no mosto fermentado, assim como a ausência das mesmas no mosto não fermentado.

As amostras de caldo clarificado, caldo evaporado e mosto não geraram amplificação da região ITS do *reino Fungi*, mesmo com a presença de isolados, de maneira que não foi realizado o pirosequenciamento dessas amostras.

A partir das amostras de vinho, foram isoladas cinco leveduras, dos gêneros *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces* e uma *Ascomycota* não classificada, e três fungos filamentosos, sendo dois do gênero *Penicillium* e um do gênero *Scopulariopsis*. O pirosequenciamento para essas amostras, no entanto, não obteve sucesso, gerando pouquíssima quantidade de sequências. Foram geradas no total apenas 92 sequências, que foram analisadas para evitar perda de informação, contudo não é possível fazer muitas inferências sobre a diversidade das amostras. Nessas, o gênero predominante foi *Saccharomyces*, mas foram encontrados também os gêneros *Pichia*, *Metschnikowia*, *Cladosporium*, *Candida*, *Wickerhamomyces*, assim como *Saccharomycetales* não classificados, *Ascomycota* não classificados e fungos não classificados. Porém, no trabalho de Basílio (2008), ao identificar leveduras contaminantes em destilarias de Pernambuco e Paraíba, as principais espécies de leveduras contaminantes encontradas foram *Dekkera bruxelensis*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis* e espécies de *Candida*, envolvidas em episódios agudos de contaminação. Segundo Beckner e cols. (2011) a espécie de levedura contaminante mais prejudicial é *Dekkera bruxelensis* que, no entanto,

não foi identificada nesse estudo. Porém, no trabalho de Cabrini e Gallo (1999b) na usina da Pedra, entre as leveduras contaminantes, o gênero predominante também foi *Saccharomyces*, e os outros gêneros identificados foram *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*. Ao realizar trabalho semelhante na Usina Santa Elisa, Cabrini e Gallo mais uma vez encontraram o gênero *Saccharomyces* como levedura contaminante de maior incidência, seguida dos gêneros *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia* e *Trichosporon*. Castro (1995) isolou leveduras contaminantes de duas usinas do Estado de São Paulo, e verificou que na Usina de Piracicaba, o contaminante mais frequente pertenceu ao gênero *Saccharomyces*, e na Usina de Capivari, o contaminante mais frequente foi do gênero *Candida*.

Assim, é possível perceber que os contaminantes variam de usina para usina, dependendo do material utilizado para fermentação e das condições da usina. Segundo Andrietta e cols. (2011) as linhagens contaminantes são provenientes da própria matéria-prima, e as que dominam o processo são aquelas que possuem características que melhoram sua adaptação ao processo. Já que as condições de operação variam de uma indústria para outra, de safra para safra em uma mesma unidade industrial, e até mesmo em diferentes períodos de uma safra, é esperado que os microrganismos contaminantes, bactérias e fungos, sejam diferentes a cada período.

As curvas de rarefação geradas para as sequências do *reino Fungi* demonstram que a diversidade das amostras ainda não foi suficientemente explorada, já que nenhuma delas chegou a um platô. Para isto, seriam necessárias aproximadamente entre 12333 e 14551 sequências para a amostra de caldo da cana crua e entre 14333 e 19946 sequências para a amostra de caldo misto. Os gráficos de PCoA indicaram que as replicatas biológicas do caldo da cana crua são semelhantes entre si e significativamente diferentes das replicatas 1 e 2 da amostra de caldo misto. A replicata biológica 3 da amostra de caldo misto é significativamente diferente das outras, o que pode ter ocorrido por viés metodológico.

7.1.3. Domínio *Archaea*

Estudos sobre a diversidade de *Archaea* já foram realizados em diversos ambientes, como oceanos (DELONG, 1992; KARNER et al., 2001; SANTORO;

CASCIOTTI, 2011), rúmen de animais (WRIGHT et al., 2006; CUNHA et al., 2011) e solo (BINTRIM et al., 1997; HANSEL et al., 2008; CAO et al., 2012), porém, até o momento, não foram encontrados estudos sobre a diversidade de *Archaea* em cana-de-açúcar ou no processo de produção de etanol. Neste estudo, foi possível realizar o pirosequenciamento do gene que codifica o RNA ribossômico 16S do domínio *Archaea* das amostras de caldo da cana crua e caldo misto, já que as outras não apresentaram amplificação para esse domínio. Existe a possibilidade de as arqueias estivessem ausentes nessas amostras, e no caso de sua existência, é possível que o DNA extraído não tenha sido suficiente para a amplificação, ou ainda, os *primers* utilizados podem não ter sido capazes de abranger as arqueias presentes. O filo predominante em todas as amostras foi *Thaumarchaeota*, seguido de *Euryarchaeota*. Também houve arqueias não classificadas e uns poucos representantes não classificados do filo *Crenarchaeota*. Foram encontrados apenas cinco gêneros, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*, *Candidatus Methanoregula* e *Candidatus Nitrososphaera*, além de 16 grupos cuja classificação não chegou a gênero. Porém, entre os grupos com maior número de sequências o único gênero presente foi *Candidatus Nitrososphaera*, que foi mais abundante na replicata biológica 3 do caldo da cana crua, enquanto que nas outras amostras, o grupo mais abundante foi *Soil Crenarchaeotic Group*, ausente na amostra citada. Os outros grupos mais abundantes foram *Euryarchaeota* não classificados, *Thermoplasmatales* não classificados, *Miscellaneous Crenarchaeotic group* não classificados e arqueias não classificadas. Os grupos/gêneros de *Archaea* predominantes nas amostras estão descritos na tabela 11, assim como classe e filo a que pertencem.

Tabela 11: Gêneros/grupos não classificados do domínio *Archaea* predominantes nas amostras de caldo da cana crua e caldo misto.

Gêneros/grupos	Classe	Filo
<i>Archaea</i> NC	-	-
<i>Candidatus Nitrososphaera</i>	<i>Soil Crenarchaeotic Group</i>	<i>Thaumarchaeota</i>
<i>Euryarchaeota</i> NC	NC	<i>Euryarchaeota</i>
<i>Miscellaneous Crenarchaeotic Group</i> NC	<i>Miscellaneous Crenarchaeotic Group</i>	<i>Thaumarchaeota</i>
<i>Soil Crenarchaeotic Group</i> NC	<i>Soil Crenarchaeotic Group</i>	<i>Thaumarchaeota</i>
<i>Thermoplasmatales</i> NC	<i>Thermoplasmata</i>	<i>Euryarchaeota</i>

O filo *Thaumarchaeota* está entre os que possuem as arqueias mais abundantes da terra. Inicialmente classificado como '*Crenarchaeota* mesofílico', análises recentes o separaram como um filo independente. Análises de sequências do gene que codifica o RNA ribossômico 16S demonstram que o filo compreende desde arqueias oxidadoras de amônia até microrganismos cujos metabolismos energéticos são desconhecidos, presentes em diversos ambientes, de mesofílicos até termofílicos (BROCHIER-ARMANET et al., 2011; PESTER et al., 2011). Entre os componentes do filo *Thaumarchaeota* está o gênero candidato *Nitrososphaera*, que possui dois representantes reconhecidos, *Nitrososphaera gargensis*, uma arqueia oxidadora de amônia termofílica (PITCHER et al., 2010), e *Nitrososphaera viennensis* uma arqueia oxidadora de amônia isolada a partir de amostra de solo (TOURNA et al., 2011). No filo também se incluem os grupos *Soil Crenarchaeotic Group* e *Miscellaneous Crenarchaeotic Group*.

O filo *Euryarchaeota*, embora seja conhecido por estar presente em diversos ambientes, ainda é pouco explorado, e contém microrganismos com tipos de metabolismos diversos, como psicrófilos, termófilos, mesófilos, halófilos e alcalífilos, muitos deles com propriedades metabólicas desconhecidas. Já foram encontrados participantes em ambientes marinhos, rúmens, solo, entre outros locais (HU et al., 2013). Os gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*, *Candidatus Methanoregula* fazem parte do filo *Euryarchaeota*. A ordem *Thermoplasmatales*, que pertence ao filo *Euryarchaeota*, até o momento, engloba os gêneros *Thermoplasma*, *Picrophilus* e *Thermogymnomonas*, termofílicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e acidofílicos, assim como o gênero *Ferroplasma*, não termofílico (ITOH et al., 2007).

As curvas de rarefação para as sequências do domínio *Archaea* também demonstraram que a diversidade das amostras ainda não foi suficientemente coberta, para isso, necessitando-se de um número maior de sequências. Seriam necessárias aproximadamente entre 1692 e 10510 sequências para a amostra de caldo da cana crua e entre 5516 e 10367 sequências para a amostra de caldo misto. O gráfico de PCoA para essas sequências indicou que as replicatas biológicas do caldo misto são semelhantes, assim como as replicatas biológicas 2 e 3 do caldo da cana crua, e as amostras são diferentes entre si. A replicata 1 do caldo da cana crua, que possui maior número de OTUs, é diferente de todas as outras, e embora o

valor do *p-value* para as sequências de *Archaea* não seja tão baixo quanto o *p-value* para os outros domínios, a distância pode ser devida a viés metodológico.

Estas análises permitiram observar que, embora existam diversos estudos sobre os contaminantes do processo de produção etanol, ainda é pouco conhecida a diversidade de representantes dos domínios *Bacteria* e *Archaea* e do reino *Fungi* associada tanto ao processo, como à cana de açúcar e ao caldo misto utilizados nas usinas para a fermentação, sendo especialmente desconhecida a diversidade de *Archaea* presente nesses ambientes, de maneira que são necessários mais estudos para explorar esses microrganismos.

8. CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade microbiana dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* presente em etapas da produção de etanol por meio de técnicas dependentes e independentes de cultivo. A identificação dos microrganismos isolados permitiu a observação de gêneros anteriormente isolados de cana-de-açúcar, como *Klebsiella* e *Bulkholderia*, assim como gêneros não isolados em outros estudos, como *Weissella* e *Cohnella*, e apenas da amostra de caldo clarificado não foi conseguido nenhum isolado. O pirosequenciamento de sequências dos três grupos de microrganismos demonstrou uma diversidade muito maior do que aquela observada em qualquer um dos estudos baseado em técnicas de cultivo, e é possível observar inclusive a mudança de diversidade bacteriana que ocorre durante o processo, confirmando o gênero *Lactobacillus* como um dos maiores contaminantes da produção de etanol. Os ensaios preliminares com antimicrobianos demonstraram que a maioria dos microrganismos isolados é resistente aos mesmos, sendo necessários mais testes para encontrar um peptídeo que possa ser utilizado na indústria.

O pirosequenciamento permitiu, ainda, a demonstração de 322 gêneros e grupos não classificados para o domínio *Bacteria*, 21 gêneros e grupos não classificados para o domínio *Archaea* e 184 gêneros e grupos não classificados para o reino *Fungi*, números não apresentados por nenhum outro trabalho. A diferença de resultado entre as abordagens dependentes e independentes de cultivo pode ser devida a incapacidade atual de se cultivar todos os microrganismos presentes na amostra, ou ao fato de que os mesmos não estavam mais viáveis, principalmente nas etapas do processo que possuem condições mais adversas.

Os resultados obtidos no cultivo e no pirosequenciamento demonstram que, além dos contaminantes inseridos no processo por meio de impurezas carregadas com a cana, é possível que os equipamentos estejam contaminados, sendo necessário testar os mesmos. Já que os contaminantes variam entre usinas, e inclusive entre safras, o melhor modo de diminuir a sua presença no processo é a prevenção, que pode ser feita por meio de higienização da cana, dos equipamentos e melhor clarificação do caldo a ser utilizado.

Desta maneira, foi demonstrada a diversidade de microrganismos presente nas amostras de etapas da produção de etanol, sendo necessários mais esforços

para cobrir melhor a diversidade daquelas que não alcançaram o platô na curva de rarefação, além de mais estudos sobre o domínio *Archaea* e o reino *Fungi* dessas amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, D. A.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, 641-7, 2005.
- ABDULLAH, S. K.; SALEH, Y. A. Mycobiota Associated with Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Cultivars in Iraq. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 4, 2010a.
- _____. Mycobiota associated with sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) in Iraq. Mitosporic fungi. **Journal of University of Duhok**, v. 13, n. 1, 2010b.
- ABRAHÃO, M. C. B. **Agroindústria de álcool para fins carburantes na região de Jandáia - Go**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel). Curso de Agronomia, Universidade Paulista - UPIS, Brasília.
- ABREU-CAVALHEIRO, A.; MONTEIRO, G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, 665-671, 2013.
- AGUT, M.; CALVO, M. A. In vitro conidial germination in *Arthrimum aureum* and *Arthrimum phaeospermum*. **Mycopathologia**, v. 157, n. 4, 2004.
- ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, 677-681, 2003.
- AMEND, A. S.; SEIFERT, K. A.; BRUNS, T. D. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? **Molecular Ecology**, v. 19, n. 24, 5555-65, 2010.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 91, n. 5, 1267-75, 2011.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; SILVA, L. F. et al. Impact of sugarcane quality on sugar and alcohol yields. **International Sugar Journal**, v. 102, n. 1214, 86-88, 2000.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, 2004.
- ANDRIETTA, M. D. G. S.; ANDRIETTA, S.; STUPIELLO, E. N. A. S. Uma nova visão da microbiota de leveduras habitantes do processo de produção do bioetanol brasileiro. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 30, n. 2, 2011.
- ANDRIETTA, M. D. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência**, v. 7, 2006.

AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 8, 263-8, 1960.

ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Use of pyrosequencing and DNA barcodes to monitor variations in *Firmicutes* and *Bacteroidetes* communities in the gut microbiota of obese humans. **BMC Genomics**, v. 9, 576, 2008.

_____. Exploring Microbial Diversity Using 16S rRNA High-Throughput Methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, v. 2, 74-92, 2009.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 3, 541-55, 2003.

BASÍLIO, A. C. M.; DE ARAÚJO, P. R. L.; DE MORAIS, J. O. F. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, 322-326, 2008.

BATTAGLIA, E.; VISSER, L.; NIJSSEN, A. et al. Analysis of regulation of pentose utilisation in *Aspergillus niger* reveals evolutionary adaptations in *Eurotiales*. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 1, 31-38, 2011.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, 362-8, 2004.

BAYROCK, D. P.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, 498-502, 2003.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. Letters in Applied Microbiology, 387-94, 2011.

BINTRIM, S. B.; DONOHUE, T. J.; HANDELSMAN, J. et al. Molecular phylogeny of *Archaea* from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 1, 277-282, 1997.

BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D. et al. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, 117-22, 2009.

BISCHOFF, K. M.; SKINNER-NEMEC, K. A.; LEATHERS, T. D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, 739-44, 2007.

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**: BNDES: 316 p. 2008.

BODDEY, R.;URQUIAGA, S.;ALVES, B. R. et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, 139-149, 2003.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. Dissertação (Mestrado). Curso de Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).**Relação das unidades produtoras cadastradas no Departamento da Cana-de-açúcar e Agroenergia (Dezembro/13)**. 2013, p.

_____. Ministério de Minas e Energia (MME).**Boletim mensal dos combustíveis renováveis. Janeiro/2014**. 2014, p.

BROCHIER-ARMANET, C.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Spotlight on the *Thaumarchaeota*. **The ISME Journal**, v. 6, n. 2, 227-230, 2011.

BUXDORF, K.;RAHAT, I.;GAFNI, A. et al. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid- and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. **Plant Physiology**, v. 161, n. 4, 2014-22, 2013.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras contaminantes no processo de fermentação alcoólica na Usina Santa Elisa. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 17, n. 4, 1999a.

_____. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina no estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 1, 1999b.

CANANEWS. **Açúcar foi principal produto do setor sucroenergético na safra 2012/2013**. Portal do Agronegócio: Cana News 2013.

CAO, P.;ZHANG, L.-M.;SHEN, J.-P. et al. Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 1, 146-158, 2012.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, 2415-57, 2007.

CARVALHO, C. D.;VENCATO, A. Z.;KIST, B. B. et al. Editora Gazeta Santa Cruz.**Anuário brasileiro da cana-de-açúcar 2011**. 2011, 128 p.

CASTRO, M. M. D. S. **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica**. 1995. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. D. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos - *Lactobacillus* - na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CENIS, J. L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 9, 2380, 1992.

CHANG, I.-S.;BYUNG-HONG, K.;PYONG-KYUN, S. et al. Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 6, 304-314, 1995.

CHANG, I. S.; KIM, B. H.; SHIN, P. K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, 1997.

CHEN, W.; HOY, J. W.; SCHNEIDER, R. W. Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. **Experimental Mycology**, v. 16, n. 1, 22-34, 1992.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da conaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. Tese (Doutorado). Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CHIEPPE JÚNIOR, J. B. **Tecnologia e fabricação do álcool**. Inhumas: Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

COLE, J. R.;WANG, Q.;CARDENAS, E. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Database issue, D141-5, 2009.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento (Conab).**Perfil do setor do açúcar e do álcool no Brasil - Edição para a safra 2009-2010**. Brasília, 2012, p.

_____. Companhia Nacional de Abastecimento (Conab).**Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2013**. Brasília, 2013, p.

CUNHA, I. S.;BARRETO, C. C.;COSTA, O. Y. A. et al. *Bacteria* and *Archaea* community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. **Anaerobe**, v. 17, n. 3, 118-124, 2011.

DAY, W. H.;SERJAK, W. C.;STRATTON, J. R. et al. Contamination inhibition, antibiotics as contamination-control agents in grain alcohol fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 5, 252-258, 1954.

DE AZEREDO, L. A.;A., G. E.;MENDONCA-HAGLER, L. C. et al. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, 1998.

DE CARVALHO, G. G.; MONTEIRO, R. A. B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. **FAZU em Revista**, n. 8, 47-54, 2011.

DE LLANOS FRUTOS, R.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; QUEROL, A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 3, 175-185, 2004.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, 130-135, 1960.

DE SOUZA LIBERAL, A. T.; BASILIO, A. C. M.; DO MONTE RESENDE, A. et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 2006.

DE SOUZA LIBERAL, A. T.; DA SILVA FILHO, E. A.; DE MORAIS, J. O. et al. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 1, 2005.

DELONG, E. F. *Archaea* in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 12, 5685-9, 1992.

DICKS, L. M. T.; VAN VUUREN, H. J. J.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, 83-91, 1990.

DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K. et al. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, 1843-6, 1995.

DUNCAN, C. L.; COLMER, A. R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Journal of Applied Microbiology**, v. 12, 1964.

EGGLESTON, G.; LEGENDRE, B.; RICHARD, C. Effect of harvest method and storage time on sugarcane deterioration I: cane quality changes. **International Sugar Journal**, v. 103, n. 1232, 2001.

EGGLESTON, G.; MOREL DU BOIL, P. G.; WALFORD, S. N. A review of sugarcane deterioration in the United States and South Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, v. 81, 72-85, 2008.

ESALQ. **Linhagem de levedura que teve genoma sequenciado**. São Paulo: Agência USP de Notícias 2007.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain

sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50 Pt 3, 1351-71, 2000.

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN, C. J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, 210-20, 2004.

FURTADO, A. T. **Energie de la biomasse et style de developpement - Les leçons du Programme Préalcool au Brésil**. 1983. Tese de Doutorado (Ph.D). Université de Paris I Pantheon - Sorbonne, Paris.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

GARCIA-MARTINEZ, J.; ACINAS, S. G.; ANTON, A. I. et al. Use of the 16S--23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods** v. 36, n. 1-2, 55-64, 1999.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFLP pattern of their PCR amplified-ITS. **Mycological Society Newsletter**, v. 41, 14, 1991.

_____. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, 113-8, 1993.

GARDES, M.; WHITE, T. J.; FORTIN, J. A. et al. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. **Canadian Journal of Botany** v. 69, n. 1, 1991.

GILLIAN, E.; JESSICA, G.; CLAY, A. Enzymatic analysis of mannitol as a *Leuconostoc mesenteroides* deterioration marker in sugarcane and sugar beet factories. In: (Ed.). **Sustainability of the Sugar and Sugar-Ethanol Industries**: American Chemical Society, v.1058, 2010. cap. 13, p.207-227. (ACS Symposium Series).

GÓIS, C. G. M.; LOPES-SANTOS, L.; BERANGER, L. P. et al. The control of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, 194-201, 2013.

GOLDEMBERG, J.; MACEDO, I. C. Brazilian alcohol program. An overview. **Energy for Sustainable Development**, v. 1, n. 1, 1994.

GTC. **Produção de Etanol**. Porto Alegre: Grupo Tchê Química (GTC) 2011.

GUILLAMON, J. M.; SABATE, J.; BARRIO, E. et al. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 5, 387-92, 1998.

- HANSEL, C. M.; FENDORF, S.; JARDINE, P. M. et al. Changes in *Bacterial* and *Archaeal* community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, 1620-1633, 2008.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of fibosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v. 35, n. 1, 1-21, 1998.
- HOON, C.; PARK, S.-Y.; RYU, C.-M. et al. Diversity of root-associated *Paenibacillus* spp. in winter crops from the southern part of Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 6, 2005.
- HU, H.-W.; ZHANG, L.-M.; YUAN, C.-L. et al. Contrasting *Euryarchaeota* communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 64, 18-27, 2013.
- HYNES, S. H.; KJARSGAARD, D. M.; THOMAS, K. C. et al. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, 284-91, 1997.
- IGNATOVA-IVANOVA, T.; IVANOV, R. Anticorrosion effect of biofilm forming by *Lactobacillus* strains on metal surfaces. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 19, n. 2, 2013.
- IMHOFF, J. F. "Enterobacteriales". In: BRENNER, D.; KRIEG, N., et al (Ed.). **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**: Springer US, 2005. cap. 13, p.587-850.
- ITOH, T.; YOSHIKAWA, N.; TAKASHINA, T. *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order *Thermoplasmatales*, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 11, 2557-2561, 2007.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. et al. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 3, 785-798, 1997.
- JAMES, S. A.; COLLINS MD FAU - ROBERTS, I. N.; ROBERTS, I. N. The genetic relationship of *Lodderomyces elongisporus* to other ascomycete yeast species as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. **Letters in Applied Microbiology**, 1994.
- KARNER, M. B.; DELONG, E. F.; KARL, D. M. *Archaeal* dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. **Nature**, v. 409, n. 6819, 507-510, 2001.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, 772-80, 2013.

KÖLJALG, U.;NILSSON, R. H.;ABARENKOV, K. et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 21, 5271-5277, 2013.

KUBOTA, H.;SENDA, S.;NOMURA, N. et al. Biofilm formation by Lactic Acid Bacteria and resistance to environmental stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 4, 381-386, 2008.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study** 5 ed. Elsevier Science, 2011.

LANE, D. J. 16S/23S sequencing. In: (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991.

LANE, D. J.;PACE, B.;OLSEN, G. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, 6955-9, 1985.

LARRAHONDO, J.;BRICENO, C. O.;VIVEROS, C. et al. Evaluation of cane trash. **International Sugar Journal**, v. 100, n. 1200, 587,590-591, 1998.

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora species*, inferred from the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, 636-653, 1992.

LEJA, K.; BRODA, M. The occurrence and identification of microbiological contamination in fuel ethanol production. **Acta Scientiarum Polonorum**, v. 8, n. 4, 2009.

LOCKHART, S. R.;MESSER, S. A.;PFALLER, M. A. et al. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, 374-376, 2007.

LOIRET, F. G.;ORTEGA;KLEINER, D. et al. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea sp.* from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, 2004.

LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac-an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics**, v. 7, 371, 2006.

LUCENA, B. T.;DOS SANTOS, B. M.;MOREIRA, J. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, 298, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock, Biología de Los Microorganismos** 10 ed. Pearson Prentice Hall, 2004.

MAKANJUOLA, D. B.; SPRINGHAM, D. G. Identification of lactic acid bacteria isolated from different stages of malt whisky distillery fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 90, 13-19, 1984.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, 1992.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008 Tese (Doutorado). Curso de Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MENDES, R.;PIZZIRANI-KLEINER, A. A.;ARAUJO, W. L. et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, 7259-67, 2007.

MORAES, M. A. F. D. D. Considerações sobre a indústria do etanol do Brasil. In: (Ed.). **Biocombustíveis no Brasil - Realidade e Perspectivas**. Brasília: Ministério das Relações Exteriores - MRE, 2007.

MUTTON, M. J. R. **Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica**. Workshop sobre "Produção de etanol: qualidade de matéria-prima". Lorena 2008.

NARENDRANATH, N. V.;HYNES, S. H.;THOMAS, K. C. et al. Effects of *Lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, 4158-63, 1997.

NASCIMENTO, C. B. D. Isolamento de microorganismos endofíticos da rizosfera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e análise da diversidade genética, antimicrobiana e celulolítica. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 3, n. 2, 2006.

NETO, D. C.;BUZATO, J. B.;CELLIGOI, M. A. P. C. et al. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melaço de cana-de-Açúcar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 2005.

NETTO, O. V. D. C. **Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento do gene 16SrDNA**. 2007. Dissertação (Mestrado). Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

NOBRE, T. D. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, 20-25, 2007.

O'BRIEN, H. E.;PARRENT, J. I.;JACKSON, J. A. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005.

O'DONNELL, K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). **Current Genetics**, v. 22, n. 3, 213-220, 1992.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: (Ed.). **The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics**. Newport: CABI, 1993. p.225-233.

OHASHI, F. H. **O advento, crescimento, crise e abandono do Proálcool**. 2008. Monografia (Bacharel). Ciências Econômicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, 207-28, 2008.

PACE, N. R. A molecular view of Microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, n. 5313, 734-740, 1997.

PARAZZI, C.; JESUS, D. A. D.; LOPES, J. J. C. et al. Análises microbiológicas do açúcar mascavo. **Bioscience Journal**, 2009.

PAREDES-SABJA, D.; SETLOW, P.; SARKER, M. R. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. **Trends in Microbiology**, 2011.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, 763-770, 2004.

PESTER, M.; SCHLEPER, C.; WAGNER, M. The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, 300-306, 2011.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, 856-66, 2009.

PIACENTE, E. A. **Perspectivas do Brasil no mercado internacional de etanol**. 2006. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PITCHER, A.; RYCHLIK, N.; HOPMANS, E. C. et al. Crenarchaeol dominates the membrane lipids of *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, a thermophilic group 1.1b Archaeon. **The ISME Journal**, 2010.

PORTER, T. M.; GOLDING, G. B. Factors that affect Large Subunit Ribosomal DNA amplicon sequencing studies of fungal communities: classification method, primer choice, and error. **PLoS One**, v. 7, n. 4, e35749, 2012.

- PUPPIM DE OLIVEIRA, J. A. The policymaking process for creating competitive assets for the use of biomass energy: the Brazilian alcohol programme. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 6, 129-140, 2002.
- QUAST, C.;PRUESSE, E.;YILMAZ, P. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, D590-6, 2013.
- QUECINE, M. C.;L., A. W.;ROSSETTO, P. B. et al. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012.
- REIS, V. M.;ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.;TENORIO-SALGADO, S. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, 2155-62, 2004.
- RENNIE, R. J.;FREITAS, J. R. D.;RUSCHEL, A. P. et al. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum sp.*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, n. 5, 462-467, 1982.
- RICH, J. O.;LEATHERS, T. D.;NUNNALLY, M. S. et al. Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, 1124-30, 2011.
- ROSSETO, P. D. B. **Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. 2008. Tese (Doutorado). Agronomia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, Piracicaba.
- SALMINEN, S.;WRIGHT, A. V.;LAHTINEN, S. et al. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 4ed. New York: Marcel Dekker, 2012. 633
- SANTORO, A. E.; CASCIOTTI, K. L. Enrichment and characterization of ammonia-oxidizing archaea from the open ocean: phylogeny, physiology and stable isotope fractionation. **The ISME Journal**, 2011.
- SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Alcool - Tecnologias e Perspectivas**. 2nd. Produção Independente, 2011.
- SCHELL, W. A.; LEE, A. G.; AIME, M. C. A new lineage in *Pucciniomycotina*: class *Tritirachiomycetes*, order *Tritirachiales*, family *Tritirachiaceae*. **Mycologia**, v. 103, n. 6, 1331-1340, 2011.
- SCHLOSS, P. D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S. L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. **PLoS One**, v. 6, n. 12, e27310, 2011.
- SCHLOSS, P. D.;WESTCOTT, S. L.;RYABIN, T. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and

comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009.

SCHOCH, C. L.;SEIFERT, K. A.;HUHNDORF, S. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, 6241-6, 2012.

SENSES-ERGUL, S.;AGOSTON, R.;BELÁK, A. et al. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. **International Journal of Food Microbiology**, 2006.

SHEHATA, A. M. Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. **Journal of Applied Microbiology**, v. 8, 73-5, 1960.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods in Enzimology**, 1991.

SKINNER-NEMEC, K. A.; NICHOLS, N. N.; LEATHERS, T. D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 29, 379-83, 2007.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, 401-8, 2004.

SOUSA, E. L. D.; MACEDO, I. D. C. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. UNICA - União da Indústria da Cana-de-açúcar, 2010.

SOUZA, R. B.;SANTOS, B. M. D.;FÁTIMA RODRIGUES DE SOUZA, R. et al. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 11, 1645-1650, 2012.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W. Nucleic acids and classification. In: (Ed.). **Handbook of new bacterial systematics**. London: Academic Press, 1993.

STAHL, D. A.; AMANN, R. I. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics In: (Ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York: Wiley, 1991.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 1, 1-46, 1977.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, 512-26, 1993.

TAMURA, K.;STECHER, G.;PETERSON, D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, 2725-2729, 2013.

THOM, C.; RAPER, K. B. **A manual of the *Aspergilli***. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1945.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; WAGNER, E. G. H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, 7292-7300, 2005.

TOURNA, M.;STIEGLMEIER, M.;SPANG, A. et al. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 20, 8420-8425, 2011.

TURNER, S.;PRYER, K. M.;MIAO, V. P. W. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among *Cyanobacteria* and plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, 327-338, 1999.

VAN HOUTT, R.; MICHELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, 1117-1131, 2010.

VENTURA, M.;CANCHAYA, C.;TAUCH, A. et al. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, 495-548, 2007.

VIAUD, M.; PASQUIER, A.; BRYGOO, Y. Diversity of soil fungi studied by PCR–RFLP of ITS. **Mycological Research**, v. 104, n. 09, 1027-1032, 2000.

VIDAL, J.-P. **Controllin bacterial contamination in ethanol fermentation processes**. France: Union Nationale des Groupements de Destillateurs D'Alcool 2012.

VIEIRA, D. A. D. P.; FERNANDES, N. C. D. A. Q. **Microbiologia Aplicada**. Inhumas: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2012.

VOS, P.;GARRITY, G.;JONES, D. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. 2ed. 2009.

WANG, P. H.; WANG, Y. T.; WHITE, J. G. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, 127-32, 2003.

WHEALS, A. E.;BASSO, L. C.;ALVES, D. M. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 12, 482-7, 1999.

WHITE, J.;GILBERT, J.;HILL, G. et al. Culture-Independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, 4527-4538, 2011.

WHITE, T. J.;BRUNS, T.;LEE, S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.;GELFAND, D. H., *et al* (Ed.). **PCR Protocols: A guide to Methods and Applications**. San Diego, U.S.A.: Academic Press, 1990.

WHITEHEAD, T. R.; COTTA, M. A. Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, 223-6, 1999.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, 221-71, 1987.

WRIGHT, A. D.; TOOVEY, A. F.; PIMM, C. L. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 3, 134-9, 2006.

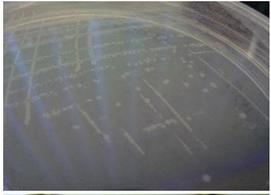
ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 8, n. 6, 379-388, 2008.

ZHANG, N.;CASTLEBURY, L. A.;MILLER, A. N. et al. An overview of the systematics of the *Sordariomycetes* based on a four-gene phylogeny. **Mycologia**, v. 98, n. 6, 1076-1087, 2007.

ZIMBRO, M. J.;POWER, D. A.;MILLER, S. M. et al. **Difco & BBL Manual - Manual of Microbiological Culture Media**. Maryland: 2009.

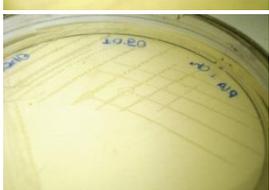
APÊNDICE A - Tabela contendo o nome das bactérias, suas fotos e descrições morfológicas

(Continua)

Nome	Imagem	Morfologia
C1B1 (PCA)		<p>Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido</p>
C1B2 (PCA) <i>Cohnella</i>		<p>Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco opaco</p>
C1B3 (PCA) <i>Weissella</i>		<p>Forma: circular Elevação: convexe Margem: inteira Cor: bege</p>
C1B4 (PCA)		<p>Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido</p>
C1B5 (PCA) <i>Enterobacteriaceae</i> NC		<p>Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege translúcido</p>
C1B8 (PCA)		<p>Forma: circular Elevação: chata Margem: irregular Cor: amarelo translúcido</p>
C1B9 (PCA) <i>Cellulomonas</i>		<p>Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco</p>
C2B1 (PCA) <i>Enterobacteriaceae</i> NC		<p>Forma: circular Elevação: chata Margem: irregular Cor: amarelo translúcido</p>

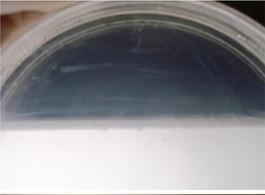
APÊNDICE A - Tabela contendo o nome das bactérias, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continuação)

Nome		Morfologia
C2B2 (PCA) <i>Enterobacteriaceae</i> NC		Forma: circular Elevação: chata Margem: ondulada Cor: branco translúcido
C2B3 (PCA) <i>Stenotrophomonas</i>		Forma: Circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: amarelo translúcido
C2B4 (PCA) <i>Weissella</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: irregular Cor: branco translúcido
C2B5 (PCA) <i>Enterobacteriaceae</i> NC		Forma: irregular Elevação: chata Margem: serrada Cor: bege
C2B6 (PCA) <i>Staphylococcus</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: branco
C2B7 (PCA) <i>Enterobacteriaceae</i> NC		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido
C2B8 (PCA) <i>Weissella</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: branco
C2B9 (PCA) <i>Ascomycota</i> NC		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege opaco

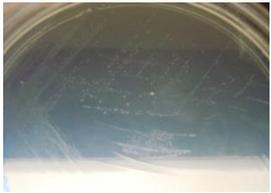
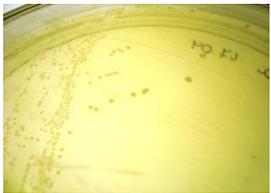
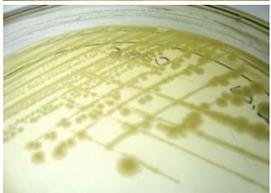
APÊNDICE A - Tabela contendo o nome das bactérias, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continuação)

Nome		Morfologia
C2B10 (PCA) <i>Enterobacteriaceae</i> NC		Forma: circular Elevação: chata Margem: levemente ondulada Cor: amarelo translúcido
C2B11 (PCA)		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido
C2B12 (PCA) <i>Stenotrophomonas</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: marrom
C2B13 (PCA) <i>Weissella</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco
C2B14 (PCA) <i>Weissella</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
C2B15 (PCA) <i>Ascomycota</i> NC		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege
C2B16 (PCA) <i>Enterobacter</i>		Forma: irregular Elevação: chata Margem: ondulada Cor: branca transparente
C2B19 (PCA) <i>Staphylococcus</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: irregular Cor: branca

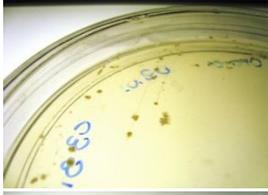
APÊNDICE A - Tabela contendo o nome das bactérias, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continuação)

Nome		Morfologia
C2B20 (PCA) <i>Klebsiella</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
C2B21 (PCA) <i>Enterobacter</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido
C2B22 (PCA) <i>Enterobacter</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege translúcido
C3B1 (PCA) <i>Stehotrophomonas</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: marrom translúcido
C3B3 (PCA) <i>Leuconostoc</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: irregular Cor: bege opaco
C3B5 (PCA) <i>Enterobacteriaceae</i> NC		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege translúcido
C3B6 (PCA) <i>Serratia</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: irregular Cor: bege translúcido
C3B7 (PCA) <i>Microbacteriaceae</i> NC		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: amarelo translúcido

APÊNDICE A - Tabela contendo o nome das bactérias, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continuação)

Nome	Foto	Morfologia
C3B9 (PCA) <i>Leuconostoc</i>		Forma: puntiforme Elevação: convexa Margem: irregular Cor: bege
C3B10 (PCA) <i>Weissella</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
C3B11 (PCA) <i>Weissella</i>		Forma: irregular Elevação: chata Margem: curvada Cor: bege
C3B12 (PCA)		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege claro
C3B13 (PCA)		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
CM2B2 (PCA) <i>Burkholderia</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: irregular Cor: bege translúcido
CM2B4 (PCA) <i>Stenotrophomonas</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: amarelo translúcido
CM2B5 (PCA) <i>Weissella</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege

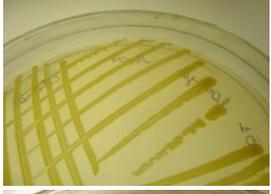
APÊNDICE A - Tabela contendo o nome das bactérias, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continuação)

Nome	Morfologia	Morfologia
CM2B6 (PCA) <i>Kluyveromyces</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: branca com halo translúcido
CM2B7 (PCA) <i>Weissella</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: irregular Cor: bege
CM2B8 (PCA) <i>Kluyveromyces</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: rosa opaco
CM2B9 (PCA) <i>Lactobacillus</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido
CM2B10 (PCA) <i>Enterobacter</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: irregular Cor: bege
CM2B11 (PCA) <i>Enterobacter</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido
CM2B12 (PCA) <i>Enterobacter</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido
CM1B1 (PCA) <i>Curtobacterium</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: laranja

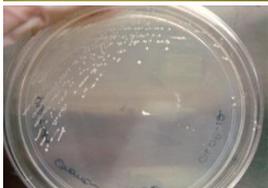
APÊNDICE A - Tabela contendo o nome das bactérias, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continuação)

Nome	Morfologia	Morfologia
CM1B2 (PCA) <i>Microbacterium</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: laranja
CM1B3 (PCA) <i>Enterobacter</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: branco translúcido
M1B1 (PCA) <i>Staphylococcus</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: laranja translúcido
M2B1 (PCA) <i>Staphylococcus</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: laranja
M2B2 (PCA) <i>Staphylococcus</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
V2B1 (PCA) <i>Paenibacillus</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
V2B2 (MRS) <i>Lactobacillus</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
V2B4 (MRS) <i>Lactobacillus</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege

APÊNDICE A - Tabela contendo o nome das bactérias, suas fotos e descrições morfológicas.

(Conclusão)

Nome		Morfologia
V2B5 (PCA) <i>Lactobacillus</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: branco
V2B6 (PCA) <i>Lactobacillus</i>		Forma: circular Elevação: elevada Margem: inteira Cor: bege claro
V2B8 (MRS) <i>Lactobacillus</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: circular Cor: bege
V3B1 (PCA) <i>Exiguobacterium</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: irregular Cor: laranja forte
V3B2 (PCA) <i>Stenotrophomonas</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: marrom

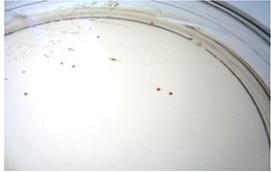
APÊNDICE B - Tabela contendo o nome das leveduras, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continua)

Nome		Morfologia
C1L1 (YPD) <i>Occultifur</i>		Forma: circular Elevação: elevada Margem: inteira Cor: laranja
C1L3 (CZAPEK) <i>Enterobacter</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege
C1L4 (YPD) <i>Lodderomyces</i>		Forma: circular rizóide Elevação: elevada Margem: inteira Cor: bege
C1L5 (YPD) <i>Wickerhamiella</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege claro
C2L1 (YPD) <i>Serratia</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: rosa escuro translúcido
C2L2 (YPD) <i>Tremella</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege translúcido
C2L3 (YPD) <i>Hanseniaspora</i>		Forma: circular Elevação: plana Margem: dentada Cor: bege com centro marrom
C2L4 (YPD) <i>Hanseniaspora</i>		Forma: circular Elevação: plana Margem: dentada Cor: bege com centro marrom

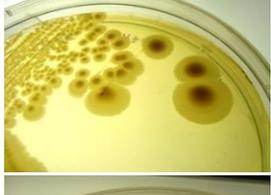
APÊNDICE B - Tabela contendo o nome das leveduras, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continuação)

Nome		Morfologia
C2L6 (YPD) <i>Pichia</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege com centro escuro
C3L1 (CZAPEK) <i>Methylobacterium</i>		Forma: puntiforme Elevação: convexa Margem: inteira Cor: rosa
C3L2 (YPD) <i>Hanseniaspora</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege com centro escuro
C3L3 (YPD) <i>Torulaspota</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege
C3L4 (CZAPEK)		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
C3L6 (CZAPEK) <i>Wickerhamomyces</i>		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: inteira Cor: rosa claro
C3L7 (YPD) <i>Hanseniaspora</i>		Forma: circular Elevação: plana Margem: ondulada Cor: bege com centro mais escuro
C3L9 (CZAPEK)		Forma: puntiforme Elevação: chata Margem: circular Cor: bege claro

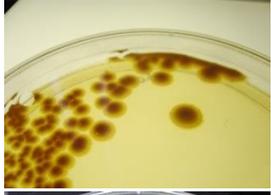
APÊNDICE B - Tabela contendo o nome das leveduras, suas fotos e descrições morfológicas.

(Continuação)

Nome	Imagem	Morfologia
CM2L1 (YPD) <i>Wickerhamomyces</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: amarelo-esverdeado
CM2L2 (YPD) <i>Wickerhamomyces</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege
CM2L3 (YPD)		Forma: circular Elevação: plana Margem: dentada Cor: bege translúcido
CM2L4 (YPD) <i>Saccharomyces</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: ondulada Cor: bege
CM2L5 (YPD) <i>Saccharomyces</i>		Forma: circular Elevação: leve Margem: ondulada Cor: amarelo escuro
CM2L6 (YPD) <i>Pichia</i>		Forma: rizoide Elevação: convexa Margem: irregular Cor: marrom
CM2L7 (YPD) <i>Hanseniaspora</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: dentada Cor: bege com centro marrom
CM2L8 (YPD) <i>Serratia</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege translúcido

APÊNDICE B - Tabela contendo o nome das leveduras, suas fotos e descrições morfológicas

(Continuação)

Nome		Morfologia
CM2L9 (YPD) <i>Hanseniaspora</i>		Forma: circular Elevação: plana Margem: levemente ondulada Cor: bege com centro marrom
CE1L1 (YPD) <i>Staphylococcus</i>		Forma: circular Elevação: chata Margem: inteira Cor: bege
M3L1 (CZAPEK) <i>Pseudozyma</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: irregular Cor: bege com centro marrom
M3L2 (CZAPEK) <i>Pseudozyma</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: amarelo claro com centro escuro
V2L1 (YPD) <i>Saccharomyces</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege
V2L2 (YPD) <i>Saccharomyces</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege
V2L3 (CZAPEK) <i>Pichia</i>		Forma: puntiforme Elevação: plana Margem: inteira Cor: branca

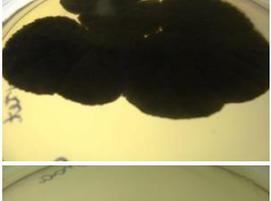
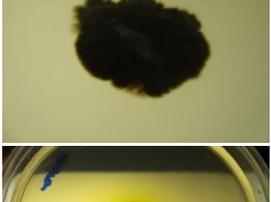
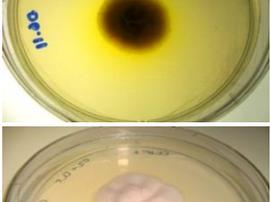
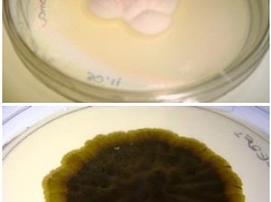
APÊNDICE B - Tabela contendo o nome das leveduras, suas fotos e descrições morfológicas

(Conclusão)

Nome		Morfologia
V2L4 (CZAPEK) <i>Wickerhamomyces</i>		Forma: circular Elevação: inteira Margem: convexa Cor: branco
V2L5 (YPD) <i>Saccharomyces</i>		Forma: circular Elevação: convexa Margem: inteira Cor: bege com centro mais escuro

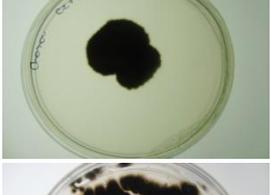
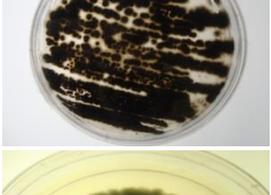
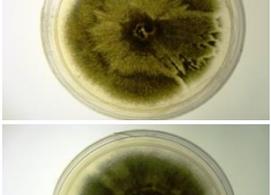
APÊNDICE C - Tabela contendo o nome dos fungos filamentosos, suas fotos e descrições morfológicas

(Continua)

Nome	Fotografia	Morfologia
C2F1 (CZAPEK) <i>Talaromyces minioluteus</i>		Anverso: verde escuro, endurecido, de bordas irregulares, se projeta pouco do meio, muda à cor do meio para amarelo. Verso: verde escuro.
CM1F1 (CZAPEK) <i>Fusarium sp.</i>		Anverso: branco algodinoso com centro laranja. Verso: branco acinzentado.
CM2F1 (YPD) <i>Cladosporium sp.</i>		Anverso: verde escuro, endurecido, sulcado, se projeta do meio. Verso: verde escuro sulcado.
CM2F2 (CZAPEK) <i>Cladosporium sp.</i>		Anverso: verde escuro quase preto, projeta-se do meio. Verso: verde escuro sulcado.
CM2F3 (YPD) <i>Arthrinium marii</i>		Anverso: laranja com bordas amarelas, sulcado, pulverulento, deixa o meio amarelo. Verso: laranja
CE1F1(CZAPEK) <i>Tritirachium sp.</i>		Anverso: branco, algodinoso, sulcado. Verso: branco sulcado
CE2F1 (YPD) <i>Cladosporium sp.</i>		Anverso: marrom com bordas mais claras, endurecido, sulcado, projeta-se do meio. Verso: marrom sulcado
CE3F1(YPD) <i>Aspergillus sp.</i>		Anverso: Marrom claro, sulcado, endurecido. Verso: marrom escuro sulcado.

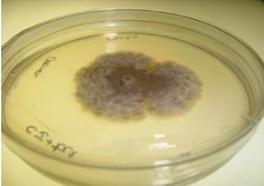
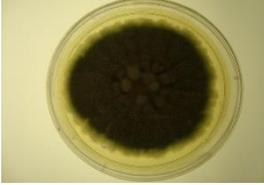
APÊNDICE C - Tabela contendo o nome dos fungos filamentosos, suas fotos e descrições morfológicas

(Continuação)

Nome	Morfologia	Morfologia
M2F1(CZAPEK) <i>Pleosporales</i> NC		Anverso: marrom, em forma de raízes, levemente algodinoso. Verso: marrom.
M2F3 (CZAPEK) <i>Arthrinium marii</i>		Anverso: verde claro pulverulento. Verso: verde claro.
M2F4 (CZAPEK) <i>Aspergillus</i> sp.		Anverso: marrom escuro, com centro claro, algodinoso, se projeta do meio. Verso: marrom sulcado.
M3F1(CZAPEK) <i>Cladosporium</i> sp.		Anverso: verde escuro, quase preto, endurecido, projeta-se do meio. Verso: verde escuro quase preto sulcado.
M3F2 (CZAPEK) <i>Cladosporium</i> sp		Anverso: verde escuro, endurecido, projeta-se pouco do meio. Verso: verde escuro.
M3F3 (CZAPEK) <i>Cladosporium</i> sp.		Anverso: verde, bordas irregulares, projeta-se do meio. Verso: verde escuro sulcado.
M3F4 (CZAPEK) <i>Penicillium</i> sp.		Anverso: verde, pulverulento. Verso: verde
V1F1 (CZAPEK) <i>Penicillium</i> sp.		Anverso: verde escuro, pulverulento. Verso: verde

APÊNDICE C - Tabela contendo o nome dos fungos filamentosos, suas fotos e descrições morfológicas

(Conclusão)

Nome		Morfologia
V1F2 (CZAPEK) <i>Scopulariopsis chartarum</i>		Anverso: marrom acinzentado, bordas irregulares, projeta-se pouco do meio. Verso: marrom.
V1F3 (YPD) <i>Penicillium sp.</i>		Anverso: verde escuro sulcado, pulverulento, deixa o meio amarelo. Verso: verde escuro.

APÊNDICE D - Sequências utilizadas para a produção das árvores filogenéticas e seus números de acesso do GenBank.

Cellulomonas hominis (T) X82598; *Curtobacterium citreum* (T) X77436; *Microbacterium testaceum* (T) X77445; *Burkholderia multivorans* (T) Y18703; *Citrobacter farmer* (T) AF0253.1; *Enterobacter cloacae* (T) Z96079; *Enterobacter oryzae* (T) EF488759; *Klebsiella variicola* (T) AJ783916; *Pantoea allii* (T) AY530795; *Pantoea dispersa* (T) DQ504305; *Serratia marcescens* (T) AB061685; *Pseudomonas geniculata* (T) AB021404; *Pseudomonas beteli* (T) AB021406; *Exiguobacterium acetylicum* (T) DQ019167; *Paenibacillus humicus* (T) AM411528; *Cohnella yongneupensis* (T) EF368008; *Staphylococcus warneri* (T) L37603; *Staphylococcus hominis* (T) AB233326; *Lactobacillus zeae* (T) D86516; *Lactobacillus pentosus* (T) D79211; *Lactobacillus farraginis* (T) AB262731; *Weissella confusa* (T) AB023241; *Leuconostoc lactis* (T); AB023968 *Leuconostoc mesenteroides* (T) CP000414; *Lactobacillus gastricus* (T) AY253658; *Methylobacterium tardum* (T) AB252208; *Pyrococcus* sp AL585; *Candida* sp EU741930; *Candida tartarivorans*; FN428939 *Hanseniaspora opuntiae* JN051404; *Kluyveromyces marxianus* HQ262277; *Occultifur externus* FN428928; *Pichia membranifaciens* AF020438; *Pichia membranifaciens* JQ707779; *Pichia* sp JF781359; *Pseudozyma* sp AB831096; *Tremella* aff *globispora* FN428917; *Wickerhamiella domercqiae* U45847; *Wickerhamomyces anomalus* JX455182; *Wickerhamomyces* sp JF781396; *Lodderomyces elongisporus* LEU45763; *Helianthus* sp JX867644.1; *Saccharomyces cerevisiae* strain CHY1011 EU649672 1; *Arthrinium marii* KF144900.1; *Aspergillus versicolor* KF954909.1; *Candida tropicalis* JN675332.1; *Lodderomyces elongisporus* AY391845.1; *Cladosporium cladosporioides* EF405864.1; *Fusarium* sp HQ631016.1; *Hanseniaspora guilliermondii* FJ491945 1; *Kluyveromyces marxianus* KF646188.1; *Occultifur externus* FN428928.1; *Penicillium chrysogenum* KF938419.1; *Pichia membranifaciens* DQ104722.1; *Pseudozyma* sp KF737866.1; *Torulaspota delbrueckii* KF057608.1; *Tremella globispora* FN428936.1; *Tritirachium* sp KF986419.1; *Wickerhamomyces anomalus* KC597821.1; *Candida tartarivorans* FN428939.1; *Aspergillus* sp KF143785.1; *Paraphaeosphaeria* sp JX401954. 1; *Graphium dubautiae* FJ914669.1; *Helianthus debilis* AM490231.1; *Saccharomyces cerevisiae* isolate DO AY251623.1; *Saccharomyces cerevisiae* isolate MA2 AY251630.1; *Saccharomyces cerevisiae* strain CHY1011 EU649672.1; *Arthrinium marii* KF144900.1; *Aspergillus versicolor* KF954909.1; *Candida tropicalis* JN675332.1; *Cladosporium cladosporioides* EF405864.1; *Fusarium* sp HQ631016.1; *Hanseniaspora guilliermondii* FJ491945.1; *Kluyveromyces marxianus* KF646188.1; *Metschnikowia pulcherrima* AY301026.1; *Occultifur externus* FN428928.1; *Penicillium chrysogenum* KF938419.1; *Pichia membranifaciens* DQ104722.1; *Pseudozyma* sp KF737866.1; *Torulaspota delbrueckii* KF057608.1; *Tremella globispora* FN428936.1; *Tritirachium* sp KF986419.1; *Wickerhamomyces anomalus* KC597821.1; *Candida tartarivorans* FN428939.1; *Aspergillus* sp KF143785.1; *Paraphaeosphaeria* sp JX401954.1; *Graphium dubautiae* FJ914669.1

APÊNDICE E –Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continua)

Gêneros	Número de sequências por amostra											
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3
32-20 NC	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Acetobacter</i>	6	14	10	4	3	2	6	2	3	1	0	0
<i>Achromobacter</i>	4	4	1	1	5	1	2	0	0	0	0	0
<i>Acidimicrobiales</i> NC	3	17	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acidobacteria</i> NC	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acidobacteriales</i> NC	12	17	14	7	9	13	1	2	1	0	0	0
<i>Acidobacterium</i>	2	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Acidocella</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Acidomonas</i>	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Acidotherrmus</i>	0	0	2	0	2	0	0	0	1	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	1	2	0	0	1	2	19	5	1	0	0	0
<i>Actinobacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Actinobacteria</i> NC	1	0	2	1	2	4	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomadura</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Actinospica</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Actinotalea</i>	1	0	1	0	2	1	1	0	0	0	0	0
<i>Aerococcus</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0
<i>Aeromicrobium</i>	1	4	2	0	2	1	1	0	0	0	0	0
AKIW543 NC	3	4	6	13	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	0	0	0	0	1	0	1	2	2	0	0	0
<i>Alishewanella</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Alloiococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Alteromonadales</i> NC	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Amaricoccus</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aminobacter</i>	1	5	6	4	0	0	2	1	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra											
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3
<i>Blastomonas</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bordetella</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Bosea</i>	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brachybacterium</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Bradyrhizobium</i>	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>Brevibacillus</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brevibacterium</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Brevundimonas</i>	5	6	5	0	1	0	1	1	0	0	0	0
<i>Burkholderiales</i> NC	17	10	9	17	18	10	23	1	3	0	0	0
<i>Buttiauxella</i>	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0
<i>Caenimonas</i>	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
<i>Caldilinea</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Caloramator</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Cand. Div.OD1 NC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cand. Div.OP10 NC	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cand.Div. TM7 NC	1	5	6	0	0	3	2	0	0	0	0	0
<i>Cand Chloroacidobacterium</i>	0	3	0	1	0	4	1	0	1	0	0	0
<i>Cand. Solibacter</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cardiobacteriales</i> NC	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Castellaniella</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Caulobacter</i>	3	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Caulobacterales</i> NC	3	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Cellulomonas</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Cellulosimicrobium</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Cellvibrio</i>	3	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra											
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3
<i>Chitinophaga</i>	1	4	4	1	3	1	0	0	0	0	0	0
<i>Chloroflexi</i> NC	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Chryseobacterium</i>	5	4	3	1	4	0	3	2	0	0	0	0
<i>Citrobacter</i>	1	2	3	1	2	1	1	3	1	0	0	0
<i>Cloacibacterium</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0
<i>Clostridium</i>	0	1	0	1	0	2	9	2	0	0	0	0
<i>Comamonas</i>	1	0	0	1	0	1	7	1	2	0	0	0
<i>Conexibacter</i>	0	3	0	1	4	3	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i>	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cupriavidus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Curtobacterium</i>	7	7	5	1	5	1	3	1	0	0	0	0
<i>Cyanobacteria</i> NC	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Cystobacter</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Cystobacteraceae</i> NC	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
DA101 NC	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
DB1-14 NC	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Dechloromonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Defluviibacter</i>	0	0	1	1	0	0	3	1	0	0	0	0
<i>Deinococcus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Delftia</i>	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Deltaproteobacteria</i> NC	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Desulfovibrio</i>	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Desulfurellales</i> NC	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Devosia</i>	7	15	15	2	3	0	1	4	3	0	0	0
<i>Diaphorobacter</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Dietzia</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra											
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3
<i>Dokdonella</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Dyadobacter</i>	1	2	4	1	1	0	3	0	0	0	0	0
<i>Dyella</i>	2	2	3	3	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Dysgonomonas</i>	0	0	0	1	5	2	0	1	0	0	0	0
<i>Edaphobacter</i>	2	7	6	4	2	4	1	0	0	0	0	0
<i>Enhydrobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	4	0	0	0
<i>Enterobacter</i>	5	4	3	3	2	2	4	1	2	0	0	0
<i>Enterococcus</i>	1	0	1	3	1	1	6	0	1	0	0	0
<i>Entomoplasmatales</i> NC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Erwinia</i>	2	3	3	0	0	0	5	2	2	0	0	0
<i>Erysipelotrichi</i> NC	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia</i>	0	0	0	0	0	0	3	2	3	0	0	0
<i>Exiguobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Fibrobacteriales</i> NC	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fibrobacteria</i> NC	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Firmicutes</i> NC	5	3	1	0	0	0	6	0	2	0	0	0
<i>Flavisolibacter</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Flavobacteriales</i> NC	30	19	21	10	11	15	7	1	1	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	18	21	15	6	0	9	7	0	2	0	0	0
<i>Flexibacter</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fluviicola</i>	3	5	4	2	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Frateuria</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Friedmanniella</i>	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fructobacillus</i>	0	0	0	2	4	2	0	0	1	0	0	0
<i>FukuN18</i> NC	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra												
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3	
<i>Fusobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Gammaproteobacteria</i> NC	6	9	3	6	3	3	5	0	1	0	0	0	0
<i>Gemmatimonadales</i> NC	0	0	11	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gemmatimonas</i>	0	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Gluconacetobacter</i>	21	18	0	6	4	5	8	3	2	0	0	0	0
<i>Gluconobacter</i>	4	6	4	1	1	2	4	3	1	0	0	0	0
<i>Gordonia</i>	1	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
GR-WP33-30 NC	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Haemophilus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Haliangium</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Haloferula</i>	2	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Herbaspirillum</i>	7	3	2	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0
<i>Hoeflea</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Humicoccus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hydrocarboniphaga</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hydrogenobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Hydrogenophilus</i>	0	0	0	0	0	0	3	1	4	1	0	0	0
<i>Hylemonella</i>	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hyphomicrobium</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Hyphomonas</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ideonella</i>	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
iii1-8 NC	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Ilyobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Janibacter</i>	0	0	0	0	0	0	2	3	1	0	0	0	0
<i>Janthinobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Kaistia</i>	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra											
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3
KD4-96 NC	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Kineococcus</i>	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Kluyvera</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Kocuria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Kozakia</i>	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Kurthia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Labrys</i>	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Lactococcus</i>	3	3	2	1	2	1	2	0	1	0	0	0
<i>Lechevalieria</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Legionella</i>	0	0	0	0	0	2	1	1	1	0	0	0
<i>Legionellales</i> NC	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leifsonia</i>	0	0	3	3	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>Leptotrichia</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Leucobacter</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Luteimonas</i>	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Luteolibacter</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lysobacter</i>	1	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Marmoricola</i>	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Massilia</i>	1	3	1	2	0	5	1	1	0	0	0	0
<i>Methylibium</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Methylobacillus</i>	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Methylobacter</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Methylobacterium</i>	14	18	18	2	5	1	7	0	4	0	0	0
<i>Microbacterium</i>	13	12	14	0	5	9	1	1	2	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra											
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3
<i>Ornithinimicrobium</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oxalicibacterium</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oxalophagus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Pandoraea</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Pantoea</i>	19	10	11	2	3	2	0	2	1	0	0	0
<i>Paracoccus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Parapedobacter</i>	2	3	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0
<i>Pectobacterium</i>	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pedobacter</i>	2	3	2	0	3	2	3	0	0	0	0	0
<i>Pelomonas</i>	1	2	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0
<i>Petrobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Phenylobacterium</i>	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phycisphaerae</i> NC	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pigmentiphaga</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Pirellula</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Planctomyces</i>	1	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Planctomycetales</i> NC	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
<i>Planctomycetes</i> NC	1	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Planifilum</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
<i>Polyangiaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Porphyrobacter</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Prevotella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Propionibacterium</i>	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
<i>Prostheco bacter</i>	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Proteobacteria</i> NC	5	3	5	3	1	2	2	0	0	1	0	0
<i>Proteus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra												
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3	
<i>Providencia</i>	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonadales</i> NC	3	2	0	0	3	3	1	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	18	16	11	11	0	8	19	2	5	0	0	0	0
<i>Pseudonocardia</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0	1	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Ralstonia</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0
<i>Raoultella</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Rarobacter</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizobium</i>	2	8	5	1	0	0	3	2	1	0	0	0	0
<i>Rhodanobacter</i>	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodobacter</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Rhodobacterales</i> NC	8	6	4	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Rhodococcus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodoferax</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodoplanes</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodopseudomonas</i>	1	2	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodovarius</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rickettsiales</i> NC	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Roseomonas</i>	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>Rothia</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Rubrivivax</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Schlegelella</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Sediminibacterium</i>	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Serratia</i>	1	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shewanella</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra											
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3
<i>Simplicispira</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Singulisphaera</i>	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Skermanella</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Solirubrobacter</i>	9	6	0	3	0	9	1	0	0	0	0	0
<i>Solirubrobacterales</i> NC	10	9	13	11	11	11	2	0	0	0	0	0
<i>Spartobacteria</i> NC	3	6	6	3	4	1	0	0	0	0	0	0
<i>Sphaerisporangium</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Sphingobacterium</i>	2	1	2	2	5	3	9	0	2	0	0	0
<i>Sphingobium</i>	2	4	5	1	0	0	4	1	0	0	0	0
<i>Sphingomonas</i>	8	14	12	2	3	1	3	5	4	0	0	0
<i>Sphingopyxis</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spirosoma</i>	0	1	1	1	3	0	3	0	0	0	0	0
<i>Sporolactobacillus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sporomusa</i>	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
<i>Stella</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas</i>	14	15	11	7	0	12	8	0	1	0	0	0
<i>Steroidobacter</i>	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i>	3	6	3	5	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Symbiobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
TA18 NC	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tanticharoenia</i>	2	3	3	1	1	1	1	1	2	0	0	0
<i>Teichococcus</i>	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Tepidimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Terriglobus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Terrimonas</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thermales</i> NC	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0

APÊNDICE E - Tabela contendo os gêneros do domínio *Bacteria* com menos sequências encontrados nas amostras

(Conclusão)

Gêneros	Número de sequências por amostra											
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3	CCL	CE	M	V1	V2	V3
<i>Thermoanaerobacter</i>	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	0	0
<i>Thermomicrobia</i> NC	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
TRA3-20 NC	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Turcibacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Ureibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Vagococcus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Variovorax</i>	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Verrucomicrobia</i> NC	0	0	2	1	4	4	0	0	1	0	0	0
<i>Verrucomicrobiae</i> NC	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Verrucomicrobiales</i> NC	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
WD2101 NC	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Weeksella</i>	3	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Weissella</i>	7	33	0	2	1	0	1	1	0	0	0	0
<i>Wolbachia</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthobacter</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonadales</i> NC	11	8	7	6	4	8	3	0	1	0	0	0
<i>Xanthomonas</i>	2	1	1	2	3	1	5	0	0	0	0	0
<i>Yeosuana</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Zoogloea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Zymobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

APÊNDICE F –Tabela contendo os gêneros do domínio *Archaea* com menos sequências encontrados nas amostras

Gêneros	Número de sequências por amostra					
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3
<i>Candidatus Methanoregula</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Crenarchaeota</i> NC	0	4	1	4	5	5
Deep Sea Hydrothermal Vent Group 6 NC	0	0	0	2	7	1
Marine Group I NC	1	0	1	3	0	1
<i>Methanobacterium</i>	0	1	0	3	2	1
<i>Methanobrevibacter</i>	0	3	1	3	5	0
<i>Methanomicrobia</i> NC	1	0	0	0	1	1
<i>Methanomicrobiales</i> NC	0	0	0	0	0	2
<i>Methanosarcina</i>	3	4	0	4	5	1
Rice Cluster I NC	0	6	0	2	2	0
South African Gold Mine Group 1 NC	0	0	0	2	1	2
<i>Terrestrial Group</i> NC	0	0	0	0	0	1
Terrestrial Miscellaneous Group NC	0	0	1	0	2	0
<i>Thermoplasmata</i> NC	1	1	2	0	0	0
vadinCA11 gut group NC	0	1	0	0	1	0

APÊNDICE G –Tabela contendo os gêneros do reino *Fungi* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continua)

Gêneros	Número de sequências por amostra					
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3
<i>Agaricomycetes</i> NC	5	11	4	4	3	1
<i>Alternaria</i>	3	0	3	1	3	2
<i>Arthopyreniaceae</i>	1	0	1	0	0	0
<i>Arthrimum</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Arthroascus</i>	0	0	1	1	0	1
<i>Arthrotrys</i>	2	2	1	0	1	1
<i>Aspergillus</i>	1	1	1	0	1	0
<i>Asterotremella</i>	14	16	10	16	14	0
<i>Auriculariales</i> NC	0	0	2	0	0	0
<i>Bandoniozyma</i>	1	0	1	0	0	1
<i>Bullera</i>	3	1	1	0	0	0
<i>Byssochlamys</i>	2	3	3	3	1	3
<i>Cantharellales</i> NC	1	0	1	9	7	3
<i>Capnodiales</i> NC	0	0	1	0	0	0
<i>Chaetomium</i>	3	5	9	10	14	13
<i>Chaetosartorya</i>	0	1	0	1	1	0
<i>Chaetosphaeria</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Chaetosphaeriales</i> NC	1	0	0	2	0	1
<i>Chaetothyriales</i> NC	0	1	0	0	0	0
<i>Chloridium</i>	7	10	10	6	6	12

APÊNDICE G - Tabela contendo os gêneros do *reino Fungi* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra					
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3
<i>Chrysosporium</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Citeromyces</i>	0	0	0	1	1	0
<i>Cladosporium</i>	2	7	4	0	0	0
<i>Clitopilus</i>	10	16	12	16	12	12
<i>Clonostachys</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Cochliobolus</i>	0	0	1	3	3	3
<i>Colletotrichum</i>	0	1	2	1	0	1
<i>Coniochaeta</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Coniophora</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Coprinellus</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Coprinopsis</i>	1	1	0	1	0	1
<i>Coprinus</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Cordyceps</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Cryptococcus</i>	3	0	0	1	0	1
<i>Curvularia</i>	19	19	19	13	7	12
<i>Cyberlindnera</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Cyphellophora</i>	0	0	2	1	0	0
<i>Dekkera</i>	8	11	8	8	5	8
<i>Dioszegia</i>	6	2	2	5	9	6
<i>Dothideomycetes</i> NC	1	0	0	0	1	0
<i>Epicoccum</i>	0	0	6	0	5	4
<i>Erythrobasidiales</i> NC	0	0	1	0	0	2
<i>Eurotiomycetes</i> NC	0	1	0	0	0	0
<i>Fellomyces</i>	0	0	4	0	0	0
<i>Fusarium</i>	5	2	5	3	2	4
<i>Gibellulopsis</i>	2	0	1	1	1	1
<i>Glomerella</i>	8	5	9	2	1	1
<i>Grammothele</i>	1	1	2	1	1	3
<i>Graphium</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Gymnopilus</i>	0	0	0	1	1	0
<i>Hannaella</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Hansfordia</i>	6	5	5	0	3	2
<i>Helotiales</i> NC	1	6	5	4	0	4
<i>Herpotrichiellaceae</i> NC	0	0	2	0	0	1
<i>Hohenbuehelia</i>	4	5	3	0	0	0
<i>Hyphoderma</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Hypocrea</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Kendrickiella</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Kloeckera</i>	4	3	2	5	6	5
<i>Kockovaella</i>	7	4	4	2	0	1
<i>Kwoniella</i>	1	1	2	1	1	2
<i>Lecanicillium</i>	1	0	1	0	0	0

APÊNDICE G - Tabela contendo os gêneros do *reino Fungi* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra					
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3
<i>Lecanoromycetes</i> NC	0	0	1	0	0	0
<i>Lectera</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Lecythophora</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Leotiomyces</i> NC	0	0	0	0	2	1
<i>Lepista</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Leptosphaerulina</i>	1	1	1	0	1	0
<i>Leptoxyphium</i>	0	0	1	3	3	2
<i>Letendraea</i>	1	1	1	0	1	2
<i>Marasmius</i>	1	1	2	1	1	1
<i>Meira</i>	1	1	0	0	0	1
<i>Metarhizium</i>	0	1	1	0	0	0
<i>Metschnikowia</i>	3	1	1	5	1	3
<i>Microascales</i> NC	0	0	0	1	2	1
<i>Microsphaeropsis</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Monacrosporium</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Monographella</i>	1	1	1	0	1	0
<i>Myriangiales</i> NC	0	1	1	0	0	0
<i>Myrmecridium</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Myrothecium</i>	2	6	2	4	11	3
<i>Nectria</i>	9	3	6	3	3	1
<i>Neurospora</i>	0	1	1	1	1	1
<i>Nigrospora</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Nomuraea</i>	6	5	3	7	8	8
<i>Occultifur</i>	4	2	1	1	0	0
<i>Ogataea</i>	6	4	6	6	3	7
<i>Oidiodendron</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Ophiostomatales</i> NC	0	0	0	0	1	0
<i>Orbiliales</i> NC	1	1	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i>	1	0	3	0	0	1
<i>Paraconiothyrium</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Parasola</i>	1	0	3	3	3	4
<i>Penicillium</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Penidiella</i>	10	11	12	12	11	8
<i>Peniophora</i>	0	0	0	2	3	2
<i>Perisporiopsis</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Pestalotiopsis</i>	1	2	0	0	0	0
<i>Phaeoseptoria</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Phaeosphaeria</i>	2	1	0	0	1	4
<i>Phaeosphaeriopsis</i>	0	0	0	0	2	0
<i>Phanerochaete</i>	2	0	2	1	0	0
<i>Phialocephala</i>	0	0	1	1	0	0

APÊNDICE G - Tabela contendo os gêneros do *reino Fungi* com menos sequências encontrados nas amostras

(Continuação)

Gêneros	Número de sequências por amostra					
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3
<i>Phialophora</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Phlebia</i>	1	1	0	0	0	4
<i>Phoma</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Pichia</i>	1	3	4	2	0	2
<i>Piriformospora</i>	8	13	0	12	2	3
<i>Plectosporium</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Pleosporales</i> NC	0	2	2	0	0	0
<i>Pleurotus</i>	13	0	23	0	17	17
<i>Podospora</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Polyporales</i> NC	0	0	0	0	1	0
<i>Polyporus</i>	5	0	6	13	1	1
<i>Preussia</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Pseudallescheria</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Pseudocercospora</i>	1	1	1	1	1	0
<i>Psilocybe</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Ramichloridium</i>	0	1	0	2	0	0
<i>Resinicium</i>	0	2	1	2	0	1
<i>Rhinocladiella</i>	7	5	11	2	2	2
<i>Rhizophlyctis</i>	2	1	2	4	2	3
<i>Rhodotorula</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Saccharomycetales</i> NC	1	1	0	0	1	1
<i>Saccharomycetes</i> NC	10	7	5	2	1	5
<i>Saccharomycodes</i>	1	1	2	1	1	1
<i>Sarocladium</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Scedosporium</i>	4	1	1	1	3	3
<i>Schizophyllum</i>	0	0	1	1	0	0
<i>Schizothyrium</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Scytalidium</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Sebacina</i>	1	4	1	2	2	2
<i>Sebacinales</i> NC	1	0	0	0	0	0
<i>Simplicillium</i>	1	0	2	0	0	1
<i>Sordariales</i> NC	1	0	0	0	0	0
<i>Spegazzinia</i>	2	1	1	1	1	2
<i>Sporidiobolales</i> NC	3	4	1	9	11	7
<i>Sporisorium</i>	3	8	7	1	4	2
<i>Sporobolomyces</i>	1	1	1	0	0	1
<i>Sporothrix</i>	5	15	16	14	8	8
<i>Stachybotrys</i>	0	1	1	0	3	1
<i>Strelitziana</i>	6	6	11	15	6	10
<i>Talaromyces</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Tetraploa</i>	0	1	1	3	2	1
<i>Thielavia</i>	0	0	0	1	0	0

APÊNDICE G - Tabela contendo os gêneros do *reino Fungi* com menos sequências encontrados nas amostras

(Conclusão)

Gêneros	Número de sequências por amostra					
	C1	C2	C3	CM1	CM2	CM3
<i>Thozetella</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Torula</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Torulasporea</i>	0	0	0	0	4	3
<i>Toxicocladosporium</i>	13	5	6	0	0	0
<i>Tremellales</i> NC	0	0	0	0	0	1
<i>Tremellomyces</i> NC	13	19	18	13	11	6
<i>Trichosphaeriales</i> NC	2	0	3	1	1	0
<i>Trichosporon</i>	3	2	4	5	4	15
<i>Ustilaginales</i> NC	0	1	0	0	3	9
<i>Ustilaginomyces</i> NC	1	1	0	2	2	0
<i>Ustilago</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Veronaea</i>	2	2	5	3	2	2
<i>Volutella</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Waitea</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Wickerhamomyces</i>	0	1	1	0	0	2
<i>Xylaria</i>	5	5	3	1	0	1
<i>Xylariaceae</i> NC	0	0	1	0	0	0
<i>Xylariales</i> NC	1	1	1	0	0	0
<i>Xylogone</i>	0	0	0	0	2	3
<i>Zasmidium</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Zygophiala</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Zygosaccharomyces</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Zymoseptoria</i>	0	7	7	9	4	5