

Avaliação da diversidade microbiana do processo de produção de etanol de cana-de-açúcar por meio de abordagem independente de cultivo

Ohana Y.A. Costa^{1}; Betúlia M. Souto¹; Daiva D. Tupinambá²; Jessica C. Bergmann³; Ricardo H. Kruger⁴; Cynthia M. Kyaw³; Cristine C. Barreto⁵; Betania F. Quirino¹*

Contexto

O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar e o segundo maior produtor de etanol. Embora o processo de produção de etanol esteja bem estabelecido, melhorias sempre podem ser implementadas. A produção industrial de etanol não ocorre sob condições estéreis, logo a presença de microrganismos contaminantes é esperada e tolerada. Porém, esses microrganismos podem diminuir a produtividade por meio de competição pelos nutrientes necessários para a fermentação e o crescimento da levedura, assim como podem produzir ácidos orgânicos que inibem seu metabolismo. Além disso, produzem gomas, promovem floculação e sintetizam toxinas que inibem o crescimento das leveduras e diminuem sua viabilidade. A maioria dos trabalhos que caracterizaram microrganismos contaminantes do processo de produção do etanol utilizam técnicas de microbiologia clássica, e, embora técnicas independentes de cultivo tenham sido utilizadas para a descrição de contaminantes de diferentes processos industriais, ainda não foram empregadas para o estudo dos contaminantes presentes no processo de produção de etanol.

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade microbiana em seis etapas da produção industrial de etanol utilizando técnicas independentes de cultivo.

Métodos

Amostras triplicadas de seis estágios da produção de etanol foram coletadas: caldo da cana crua, caldo misto, caldo clarificado, caldo evaporado, mosto e vinho. O DNA total das amostras foi extraído com o FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) e usado para a amplificação do gene que codifica o RNA ribossomal 16S dos domínios *Bacteria* e *Archaea* com os pares de primers 27F-519R (domínio *Bacteria*), 109F-915R (domínio *Archaea*) e

1 Embrapa-Agroenergia, Brasília, DF, Brasil

2 Embrapa Sede, Brasília, DF, Brasil

3 Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brasil.

4 Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brasil.

5 Programa de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, DF, Brasil

*Ohana.costa@colaborador.embrapa.br; betania.quirino@embrapa.br

região ITS (Espaçador Interno Transcrito) do reino Fungi com o par de primers ITS1f-ITS4R. Os amplicons foram purificados e enviados para pirosequenciamento utilizando a plataforma GS FLX Titanium. As sequências foram analisadas utilizando o pacote de softwares Mothur (SCHLOSS et al., 2009), com o banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013) para os domínios *Bacteria* e *Archaea*, e o banco de dados UNITE (KÖLJALG et al., 2013) para o reino Fungi.

Resultados e Conclusões

O pirosequenciamento demonstrou a presença, em todas as amostras juntas, de 355 gêneros para o domínio *Bacteria*, 22 para o domínio *Archaea* e 203 para o reino Fungi. Análises das sequências bacterianas mostraram que as mudanças na comunidade estão relacionadas a aumentos de temperatura em determinados estágios do processo de produção de etanol. Após a fermentação, *Lactobacillus* e *Lactobacillaceae* não classificados perfazem aproximadamente 100% das sequências. Para o reino Fungi, assim como para *Archaea*, foram obtidas sequências apenas para o caldo da cana crua e o caldo misto. Os grupos predominantes de Fungi identificados foram Fungi não classificados, *Meyerozima* e *Candida*. Para *Archaea*, o grupo predominante identificado foi Thaumarchaeota não classificados. A Cobertura de Good demonstrou que o número de sequências obtidas para o caldo evaporado, mosto e vinho foram suficientes para cobrir a diversidade bacteriana nas amostras, assim como cobriu a diversidade de *Archaea* e Fungi no caldo da cana crua e no caldo misto. Porém, a diversidade bacteriana não foi coberta nas amostras de caldo da cana crua, caldo misto e caldo clarificado, o que evidencia que a diversidade de bactérias nas amostras é maior do que o esperado. Esse foi o primeiro trabalho a caracterizar a diversidade de *Bacteria*, *Archaea* e Fungi associados com o processo de produção de etanol a partir de cana de açúcar no Brasil por meio de técnicas independentes de cultivo.

Apoio Financeiro

O projeto foi financiado por Embrapa, CNPq e FAP-DF.

Referências

KÖLJALG, U.; NILSSON, R. H.; ABARENKOV, K.; TEDERSOO, L.; TAYLOR, A. F. S.; BAHRAM, M.; BATES, S. T.; BRUNS, T. D.; BENGTSSON-PALME, J.; CALLAGHAN, T. M. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, Hoboken, v. 22, n. 21, p. 5271–5277, 2013.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLOCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J. Introducing mothur: open-source, platform independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.