

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE
BACTÉRIAS DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Samanta Balsini Peixoto

Bióloga (PUCRS)

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente; ênfase em Microbiologia de Alimentos.

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro, 2002

AGRADECIMENTOS

Ao professor Adriano Brandelli pela orientação, confiança e oportunidade em desenvolver este trabalho.

À Amanda e Simone pela amizade, compreensão e incentivo.

Ao Delmar e a Florência pela amizade e valiosa ajuda durante o trabalho.

Aos colegas de mestrado Alessandro, Gislaine, Eduardo, Tatiana, Cristiana, Virgínia, Diego, Francisco, Cláucia e Davi pela amizade.

Aos colegas de laboratório Adriane, Fernanda, Silvia, Juliana, Mariana, Luís Fernando, Mercedes e Fabiane pelo auxílio e amizade.

Aos meus pais pela amizade, oportunidade e apoio financeiro.

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE BACTÉRIAS DA REGIÃO AMAZÔNICA

Autora: Samanta Balsini Peixoto

Orientador: Adriano Brandelli

SINOPSE

Microrganismos foram isolados de solos e em ambientes aquáticos da região Amazônica. Entre os 87 isolados, dois bacilos gram-negativos, designados BL16 e BL20 foram selecionados pelo crescimento em ágar contendo carboximetilcelulase (CMC) como única fonte de carbono. Essas bactérias produziram largas zonas incolores em ágar contendo CMC e corado com vermelho Congo, característica de atividade celulolítica. O crescimento dos isolados ocorreu em pH 6,0 a 9,0 e entre 25°C e 45°C, com pH e temperatura ótimos em 7,0 e 37°C, respectivamente. Os microrganismos celulolíticos BL16 e BL20 foram crescidos em meio contendo resíduos agrícolas submetidos a métodos de pré-tratamento químicos e físicos. A quantidade de celulase produzida e açúcares redutores formados durante a hidrólise dos substratos foi monitorada.

1/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Microbiologia de Alimentos), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (96 p.). Fevereiro, 2002.

CHARACTERIZATION AND CELLULOLYTIC ACTIVITY OF BACTERIA FROM AMAZONIAN REGION

Author: Samanta Balsini Peixoto

Advisor: Adriano Brandelli

SYNOPSIS

Microorganisms were isolated from soil and aquatic samples of the Amazonian region environment. Among 87 isolates, two gram-negative rods designated BL16 e BL20 were selected by growth on carboxymethyl cellulose (CMC) as sole carbon source. These bacteria produced large clearing zones when screened for cellulase activity on CMC-agar stained with Congo red. Growth of the strains occurred between pH 6.0 and 9.0 and between 25°C and 45°C, with optimum pH and temperature 7.0 and 37°C respectively. The cellulolytic microorganisms BL16 and BL20 were growth in medium with crop residues chemical and physically pretreated. The amount of cellulase produced and reducing group formed during hydrolysis of substrates were monitored.

1/ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology (Food Microbiology), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (96 p.), February, 2002.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ASPECTOS SOBRE A PRODUTIVIDADE AGRÍCOLA NO BRASIL	3
2.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS DE ARROZ E TRIGO	4
2.3 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PAREDE CELULAR DOS VEGETAIS	5
2.3.1 Celulose	7
2.3.2 Hemicelulose	8
2.3.3 Lignina	9
2.4 BIODEGRADAÇÃO DA CELULOSE	9
2.5 MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS	10
2.6 CELULASES	13
2.6.1 Celobiohidrolases	13
2.6.2 Endoglucanases	13
2.6.3 β - glicosidasases	14
2.7 CELULOSSOMO	14
2.8 BIOSÍNTESE DE CELULASES	15
2.9 MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTOS DE SUBSTRATOS CELULÓSICOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 MICRORGANISMOS	18
3.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	18

3.3 ESTUDO TAXONÔMICOS	19
3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS	19
3.4.1 Observação do crescimento em diferentes meios de cultura	19
3.4.2 Crescimento em placa em diferentes temperaturas	19
3.4.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	20
3.5 PREPARAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO	20
3.6 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS	20
3.7 CURVAS DE CRESCIMENTO	21
3.7.1 Determinação da temperatura ótima de crescimento	21
3.7.2 Determinação do pH ótimo de crescimento	21
3.7.3 Observação do crescimento em meio mineral enriquecido com carboidratos	22
3.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	22
3.8.1 Determinação da atividade de celobiohidrolase e β -glicosidase	22
3.8.2 Determinação da atividade de carboximetilcelulase (CMCase)	23
3.9 CURVAS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	25
3.10 CARACTERIZAÇÃO DE CMCase	25
3.10.1 Atividade de CMCase em diferentes valores de pH e diferentes temperaturas	25
3.11 INDUÇÃO DE CMCase	26
3.11.1 Atividade de CMCase em meio LB acrescido de diferentes fontes de carbono	26

3.11.2 Atividade de CMCase em meio LB em diferentes concentrações de cloreto de sódio	26
3.12 OBTENÇÃO DOS RESÍDUOS DE ARROZ E TRIGO	27
3.13 MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DOS RESÍDUOS	27
3.13.1 Tratamentos físicos	27
3.13.2 Tratamento químico	28
3.14 DEGRADAÇÃO DOS RESÍDUOS AGRÍCOLAS PELOS ISOLADOS BL16 E BL20	28
3.14.1 Curva de crescimento	28
3.14.2 Determinação de açúcares redutores	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA	30
4.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DOS ISOLADOS BL16 E BL20	31
4.2.1 Características morfológicas	31
4.2.2 Características bioquímicas	35
4.2.3 Testes de suscetibilidade a antimicrobianos	37
4.2.4 Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas	39
4.2.5 Determinação da temperatura ótima de crescimento	39
4.2.6 Observação do pH ótimo de crescimento	40
4.2.7 Observação do crescimento em meio mineral com diferentes fontes de carbono..	49
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	52
4.3.1 Determinação da atividade de celobiohidrolase e β -glicosidase	52

4.3.2 Atividade de CMCCase em meio LB com pH modificado com incubação em diferentes temperaturas	53
4.3.3 Atividade de CMCCase em meio mineral com diferentes fontes de carbono	62
4.3.4 Atividade de CMCCase em meio LB acrescido de carboidratos	63
4.3.5 Atividade de CMCCase em placas contendo 0,1% de CMC com diferentes valores de pH e incubadas em diferentes temperaturas	65
4.3.6 Atividade de CMCCase em meio LB em diferentes concentrações de cloreto de sódio	67
4.4 DEGRADAÇÃO DOS RESÍDUOS AGRÍCOLAS PELAS BACTÉRIAS AMAZÔNICAS	69
5. CONCLUSÕES	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7. APÊNDICES	84

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MATERIAIS CELULÓSICOS DERIVADOS DA PRODUÇÃO DE ARROZ E TRIGO	5
TABELA 2. CARACTERÍSTICA MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS ISOLADOS BL16 E BL20	36
TABELA 3. TESTE DE SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS BL16 E BL20 À ANTIMICROBIANOS	38
TABELA 4. INDUÇÃO DE CELULASES EM MEIO COM SUBSTRATOS CELULÓSICOS	70

RELAÇÃO DAS FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DOS VEGETAIS	6
FIGURA 2. MOLÉCULA DE CELULOSE	8
FIGURA 3. MORFOLOGIA DA CÉLULAS	31
FIGURA 4. MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS EM ÁGAR NUTRIENTE	32
FIGURA 5. MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS EM ÁGAR LB	33
FIGURA 6. MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS EM ÁGAR MUELLER HINTON MODIFICADO	34
FIGURA 7. CURVA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO BL16 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES	42
FIGURA 8. CURVA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO BL20 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES	43
FIGURA 9. CURVA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO BL16 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES	44

- FIGURA 10.** CURVA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO BL20 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 5,0, 6,0 E 7,0 E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 45
- FIGURA 11.** CURVA DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS BL16 E BL20 REALIZADA 45°C EM MEIO LB COM pH 7,0. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 46
- FIGURA 12.** CURVA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO BL16 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 5,0, 6,0 E 7,0 E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 37°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 47
- FIGURA 13.** CURVA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO BL20 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 37°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 48
- FIGURA 14.** CURVA DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO BL20 EM MEIO MINERAL BUSCHNELL-HASS ENRIQUECIDO COM MANOSE, SACAROSE, GLICOSE E GALACTOSE E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 50
- FIGURA 15.** CURVA DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS BL16 E BL20 EM MEIO MINERAL BUSCHNELL-HASS ENRIQUECIDO GALACTOSE E COM LACTOSE DURANTE 100 HORAS DE CULTIVO. TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 51
- FIGURA 16.** PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELO ISOLADO BL16 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 COM TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 55

- FIGURA 17.** PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELO ISOLADO BL20 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 COM TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 25°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 56
- FIGURA 18.** PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELO ISOLADO BL16 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 COM TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 57
- FIGURA 19.** PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELO ISOLADO BL20 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 COM TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 30°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 58
- FIGURA 20.** PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELO ISOLADO BL16 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 COM TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 37°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 59
- FIGURA 21.** PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELO ISOLADO BL20 EM MEIO LB COM AJUSTE DE pH EM 6,0, 7,0 E 8,0 COM TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 37°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 60
- FIGURA 22.** PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELOS ISOLADOS BL16 E BL20, EM MEIO LB COM pH 7,0 E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 45°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 61
- FIGURA 23.** PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELOS ISOLADOS BL16 E BL20 EM CALDO LB ENRIQUECIDO COM DIFERENTES AÇÚCARES, INCUBADOS A 30°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 64

FIGURA 24. PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELO ISOLADO BL16 APÓS 24 DE CRESCIMENTO EM MEIO LB. O SOBRENADANTE FOI INOCULADO EM PLACAS CONTENDO CMC COM AJUSTE DE PH ENTRE 5,0 E 10,0 E INCUBADOS NAS TEMPERATURAS DE 25°C, 30°C, 37°C, 45°C. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES 66

FIGURA 25. PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELOS ISOLADOS BL16 E BL20 EM MEIO LB CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DE DUAS DETERMINAÇÕES..... 68

FIGURA 26. PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELA BACTÉRIA BL16 A PARTIR DE PALHA DE ARROZ, PALHA DE TRIGO E CASCA DE ARROZ, EM MEIO MINERAL BUSCHNELL-HASS INCUBADO A TEMPERATURA DE 30°C 72

FIGURA 27. PRODUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE PELA BACTÉRIA BL20 A PARTIR DE PALHA DE ARROZ, PALHA DE TRIGO E CASCA DE ARROZ, EM MEIO MINERAL BUSCHNELL-HASS INCUBADO A TEMPERATURA DE 30°C 73

1. INTRODUÇÃO

As culturas agrícolas além da produção de alimentos geram grande quantidade de resíduos. As plantas destinadas à produção de grãos, produzem uma quantidade igual ou maior de material vegetativo do que grãos.

Estima-se que anualmente sejam produzidas no mundo inteiro cerca de 2 bilhões de toneladas de resíduos da agroindústria. O aproveitamento destes resíduos é pouco significativo, principalmente quando aplicados com fins industriais e comerciais, devido a falta de conhecimento de métodos que reduzam os altos custos dos processos e permitam sua melhor utilização. Neste contexto, o Brasil é um destacado produtor de grãos, gerando portanto grande quantidade de resíduos agroindustriais.

Os resíduos agrícolas são compostos basicamente por celulose e hemicelulose, polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular de todos os vegetais superiores e hidrolisáveis por diversos microrganismos presentes no ambiente.

A Amazônia, é constituída de uma microflora ampla mas atualmente desconhecida. Microrganismos encontrados nesse ecossistema certamente

apresentam propriedades específicas para degradação de compostos lignocelulósicos, principalmente se considerarmos as características desse bioma cujo clima oferece temperaturas favoráveis.

A importância em agregar valor aos materiais celulósicos justifica-se por vários aspectos, visto que representam uma das principais fontes de carbono renovável na biosfera.

Economicamente, os substratos celulósicos podem servir de biomassa para produção de açúcares fermentáveis e outros metabólitos de interesse industrial através de processos microbianos e enzimáticos. Os materiais celulósicos também podem ser utilizados como substrato para obtenção de biomassa microbiana e na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas

Nutricionalmente, microrganismos celulolíticos podem ser utilizados para melhorar a digestibilidade das palhas utilizadas na alimentação de ruminantes, aumentando o valor nutritivo da ração.

Ecologicamente, os resíduos quando utilizados ou não com fins lucrativos, evitam o acúmulo e poluição do ambiente.

A caracterização e identificação de 2 bactérias isoladas na região amazônica foram os objetivos iniciais do trabalho. O crescimento e a produção de enzimas celulolíticas pelos isolados foi acompanhada a partir de alterações nas condições de cultivo, pH, temperatura, concentração de celulose e outros nutrientes.

A partir de então o potencial de degradação de resíduos agrícolas pelos isolados foram objeto de estudo. A taxa de hidrólise foi acompanhada por meio da liberação de açúcares redutores e produção de celulasas após o cultivo dos microrganismos em meio mineral contendo materiais celulósicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS SOBRE A PRODUTIVIDADE AGRÍCOLA NO BRASIL

As culturas de trigo e arroz despontam, respectivamente, como os cereais de mais amplo cultivo no mundo, sendo o Brasil expressivo produtor de grãos em âmbito mundial. (Vieira *et al.*, 1999; AGRIANUAL, 2002).

O Brasil está entre os principais produtores de arroz, onde ocupa a décima posição, colhendo anualmente 1,8% da produção mundial. Na safra de 2000/2001 foram produzidas 10,5 milhões de toneladas, mais da metade da produção concentrada no Rio Grande do Sul, com 5,3 milhões de toneladas de arroz em casca (Vieira *et al.*, 1999; Silva, 1987; AGRIANUAL, 2002).

A produção brasileira de trigo na safra 2000/2001 alcançou 2,8 milhões de toneladas das quais 2,7 milhões foram colhidos na região Sul. Apesar da pequena representatividade no Brasil, o trigo possui entre todas as culturas alimentícias, a maior área plantada no mundo, isto representa em torno de 20% da área cultivada, e, sua comercialização internacional é maior que a soma de todos os outros grãos alimentícios. (Guerra *et al.*, 1996; AGRIANUAL, 2002).

Como resultado dessa alta produtividade, são gerados anualmente no Brasil milhões de toneladas de resíduos de arroz e trigo. Estima-se que para cada 1 kg de grão colhido resulte cerca de 1 kg a 1,5 kg de resíduos vegetais.

2.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS DE ARROZ E TRIGO

Os resíduos de arroz são compostos principalmente por casca, palha, grãos quebrados, grãos inteiros, farelos e partículas não identificadas, e todos estes resíduos são gerados durante o processo de colheita até a industrialização do produto. As cascas e a palha de arroz representam em torno de 45% do resíduo total produzido pela agroindústria (Gonçalves e Saccol, 1995).

A casca do arroz é composta de duas folhas modificadas, denominadas lema e pálea e representa 20% do peso do arroz em casca. As cascas são frágeis e porosas, e tem como principal função proteger os grãos do ataque de insetos e fungos (Gonçalves e Saccol, 1995).

As palhas resultantes da produção de cereais possuem composição química semelhante, visto que são compostas basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, apresentando algumas variações consideráveis de acordo com a idade e espécie do vegetal, tipo de solo, período de colheita, práticas culturais e local de produção. O alto teor de lignina, geralmente presente, causam limitações quanto a degradabilidade das palhas.

A composição química dos resíduos de arroz e trigo pode ser visualizada na TABELA 1, onde verifica-se que a composição química da palha de arroz é semelhante a da palha de trigo. (Gonçalves e Saccol, 1995).

TABELA 1. Composição química de materiais celulósicos derivados da produção de arroz e trigo (Spedding, 1981; Moo Young, 1994; Vieira *et al.*, 1999; Silva, 1987).

Resíduos Agrícolas	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Palha de arroz	35-45	14-36	7-10
Palha de trigo	36-41	24-30	14,5
Cascas de arroz	36-40	15-20	19

2.3 ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DOS VEGETAIS

Os vegetais superiores apresentam suas células envolvidas pela membrana citoplasmática e pela parede celular, característica que as diferenciam da célula animal. A parede celular é secretada pela célula durante o desenvolvimento das plantas, com a função de sustentação, proteção contra desidratação e penetração por fitopatógenos (Selinger *et al.*, 1996; Berg, 1997).

Celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas são os principais compostos encontrados na parede celular, porém, a espécie e idade do vegetal são fatores determinantes na sua composição química. Sabe-se que tecidos suculentos são comumente pobres em celulose e abundantes em substâncias pécnicas, e, que gramíneas possuem cerca de 15% de celulose quando jovens alcançando 45% quando adultas (Selinger *et al.*, 1996; Berg, 1997).

Durante o crescimento do vegetal é formada inicialmente a parede primária, esta é expandida com o aumento do tamanho das células. Após o desenvolvimento completo, é formada uma parede secundária pela deposição de camadas adicionais,

entre a parede primária e a membrana citoplasmática, em células que necessitem de uma parede celular reforçada (Berg, 1997). As paredes primárias de células adjacentes, são unidas umas as outras pela lamela média, que é constituída principalmente por pectina (Salisbury e Ross, 1992).

O principal componente da parede celular dos vegetais é a celulose, constituída de microfibrilas formadas a partir de ligações intermoleculares e associadas a outros polissacarídeos como hemicelulose e pectina. Incrustações de lignina podem estar presentes em vegetais que necessitem de rigidez (Berg, 1997).

As camadas formadoras da parede celular diferem em estrutura e conteúdo. A parede primária possui baixa quantidade de celulose, enquanto na parede secundária a celulose representa 90% do peso seco e alto grau de cristalinidade (FIGURA 1) (Berg, 1997).

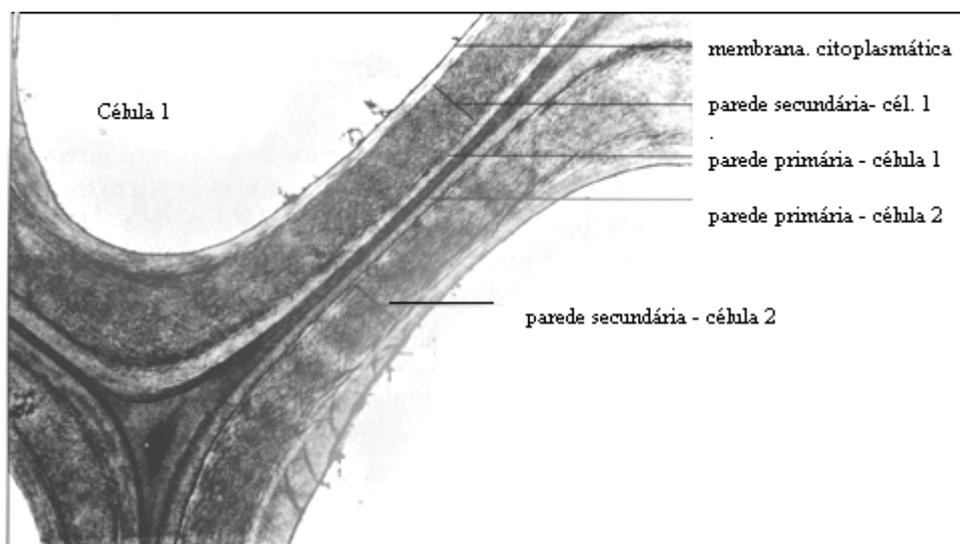


FIGURA 1. Composição da parede celular vegetal (Berg, 1997).

As paredes primária e secundária também diferem quanto a orientação das fibras celulósicas e quantidade de lignina e hemicelulose, todas essas diferenças

influenciam em termos acessibilidade e degradação por enzimas microbianas (Moo Young, 1994).

2.3.1 Celulose

A celulose é o composto orgânico de maior abundância na natureza, constituinte de todos vegetais superiores. A decomposição deste carboidrato tem fundamental importância no ciclo biogeoquímico do carbono, visto que a maior parte da vegetação adicionada ao solo é celulósica (20-40 %). Considerável atenção deve ser dispensada aos microrganismos responsáveis pela decomposição dos substratos lignocelulósicos (Alexander, 1982).

A celulose é um homopolímero formado por moléculas de glicose unidas linearmente por ligações glicosídicas β -1,4 (FIGURA 2). O grau de polimerização da cadeia ocorre em torno de 1500 a 15000 moléculas, alcançando 7 μ m de comprimento. O alto peso molecular torna a celulose nativa insolúvel em água (Moo Young, 1994).

As moléculas de celulose paralelas e adjacentes são encontradas interligadas, por meio de pontes de hidrogênio formando resistentes microfibrilas caracterizadas por 2 regiões, regiões cristalinas que são mais resistentes por apresentarem maior número de ligações intermoleculares e as regiões amorfas que são facilmente hidrolizáveis por enzimas (Da Silva *et al.*, 1997).

Na parede celular, a celulose está organizada em unidades separadas por um espaço, que em tecidos de plantas maduras poderá posteriormente ser preenchido com lignina (Alexander, 1982).

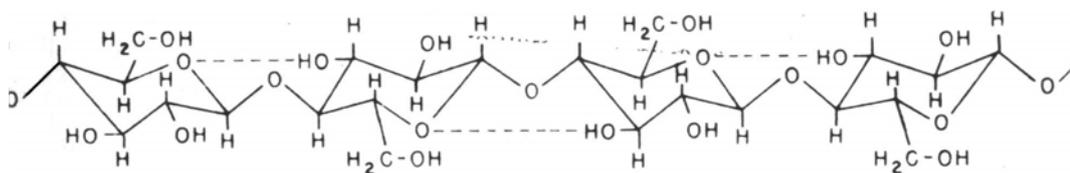


FIGURA 2. Estrutura da molécula de celulose (Bobbio e Bobbio, 1989).

2.3.2 Hemicelulose

Segundo Selinger *et al.* (1996), hemiceluloses constituem o segundo maior componente na parede celular das folhas e caule das gramíneas. Devido sua abundância e suscetibilidade a degradação por microrganismos, são de extrema importância na decomposição dos resíduos agrícolas.

São heteropolímeros compostos principalmente por resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4 além de ramificações laterais de cadeias curtas constituídas por resíduos de xilose, manose, arabinose e galactose e por seus ácidos urônicos. As moléculas de hemicelulose ligam-se firmemente à superfície das microfibrilas de celulose e entre si, através de pontes de hidrogênio formando ligações cruzadas. (Bowes, 1996; Selinger *et al.*, 1996).

2.3.3 Lignina

A lignina é encontrada na camada secundária da parede celular e em alguma extensão na lamela média onde atua como agente protetor conferindo rigidez ao

vegetal. O conteúdo de lignina em plantas jovens é relativamente baixo, porém a quantidade aumenta com o amadurecimento das plantas (Bowes, 1996; Berg, 1997).

A lignina nas gramíneas é formada pela polimerização de 3 precursores, álcool coumaril, álcool coniferil e álcool sinapil. A polimerização dos monômeros envolve a formação de radicais livres que resultam de reações com oxigênio ou peróxido. A luz ultravioleta pode induzir a dimerização que é irreversível. O resultado é um composto fenólico altamente insolúvel (Alexander, 1982).

A lignina aparece fortemente associada a hemicelulose e, ligações químicas entre lignina e celulose ou lignina e pectina não tem sido encontradas. A lignina nunca ocorre livre mas associada a polissacarídeos sendo sua presença sempre prejudicial à degradação microbiana visto que diminui a disponibilidade dos substratos (Alexander, 1982).

2.4 BIODEGRADAÇÃO DA CELULOSE

Uma comunidade complexa de microrganismos está envolvida na bioconversão da celulose depositada no ambiente. Essa microflora é hábil em decompor celulose em ambientes com pH ácido à alcalino e em temperaturas próximas do congelamento até 65°C positivos. A associação entre microrganismos celulolíticos e não-celulolíticos é comum na natureza, pois acelera o processo de degradação devido a remoção dos produtos finais inibitórios (Moo Young, 1994; Alexander, 1982).

A degradação da celulose em culturas puras dependerá da quantidade de celulose presente no substrato, do grau de polimerização, da organização estrutural das microfibrilas (cristalina e amorfa) e da área de superfície disponível pela união

com a lignina, fatores estes que variam de acordo com a espécie e idade do vegetal (Moo Young, 1994; Alexander, 1982).

A teoria sobre a biodegradação de compostos celulósicos amplamente aceita é da ação sinérgica entre endo e exoglucanases. Inicialmente, endoglucanase realizam a hidrólise aleatória das ligações glicosídicas internas da molécula produzindo extremidades livres para ação das celobiohidrolases. As celobiohidrolases (CBH I e CBH II) removem celobiose de ambas extremidades reductoras e não reductoras da molécula que posteriormente são hidrolisadas pelas β -glicosidases (Stahlberg *et al.*, 1993; Persson *et al.*, 1991; Robson e Chambliss, 1989; Shewale e Sadana, 1978).

2.5 MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS

As enzimas celulolíticas são produzidas por amplo número de bactérias e fungos, entretanto, são relativamente poucos os microrganismos capazes de produzir o grupo de enzimas necessárias para a degradação da celulose cristalina (Singh e Hayashi, 1995; Persson *et al.*, 1991; Robson e Chambliss, 1989; Shewale e Sadana, 1978).

Durante muito tempo, as celulasas produzidas por fungos são extensivamente estudadas. Diferentes espécies de *Trichoderma* foram descritas, sendo o *Trichoderma reesei* o microrganismo melhor conhecido quanto a produção de enzimas celulolíticas, apesar da produção de β -glicosidase pouco significativa (Singh e Hayashi, 1995; Robson e Chambliss, 1989). O constante interesse dos pesquisadores em celulasas produzidas por fungos deve-se ao fato destas espécies

sintetizarem grandes quantidades das diferentes celulases constituintes do complexo enzimático (Persson *et al.*, 1991; Kubicek *et al.*, 1996).

Segundo Alexander (1982) e Moo-Young (1994) fungos pertencentes aos gêneros *Penicilium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Chaetomium* e *Rhizopus* são conhecidamente eficazes na solubilização da celulose cristalina pela ação sinérgica entre as atividades de exo e endo-glucanases.

Anaerobicamente, a hidrólise da celulose pode ser comumente realizada no rúmen, através de simbiose com microrganismos altamente celulolíticos. *Neocalimastix frontalis*, microrganismo bastante estudado, caracteriza-se pela alta atividade de β -glicosidases. Libera glicose como principal produto de degradação ao invés de celobiose (Selinger *et al.*, 1996; Singh e Hayashi, 1995; Pearce *et al.*, 1985).

Entretanto nos últimos anos, houve maior interesse pelas bactérias produtoras de celulases ocasionando vasta literatura, porém, geralmente a maioria destes microrganismos não é hábil em degradar significativamente a celulose cristalina (Singh e Hayashi, 1995).

As bactérias produzem endo- β -1,4-glucanases dentro de um complexo que consiste da atividade de exo e endoglucanases. No entanto, a teoria amplamente aceita para a degradação da celulose cristalina pelo sinérgismo de exo- e endoglucanases é baseada na hidrólise de celulose por sistemas enzimáticos de fungos, e não parece ser aplicável a todas as bactérias celulolíticas (Mawadza *et al.*, 2000; Robson e Chambliss, 1989).

Segundo Robson e Chambliss (1989) e Persson *et al.* (1991), um modelo alternativo sugere que endoglucanases com afinidade por celo-oligossacarídeos

realizam a hidrólise de celulose cristalina quando houver alta concentração de enzimas. Segundo Robson e Chambliss (1989) existem evidências de que endoglucanases podem exibir atividade de exoglucanases. Outra possibilidade é a incapacidade de vários laboratórios em isolar exoglucanases de sistemas bacterianos capazes de degradar celulose, devido a instabilidade da enzima.

O sistema celulolítico de bactérias anaeróbias, principalmente do termófilo *Clostridium thermocellum* e mesófilo *C. cellulolyticum* tem recebido considerável interesse visto a possibilidade de utilização em processos industriais (Gal *et al.*, 1996; Singh e Hayashi, 1995). Sabe-se que a celulólise é vigorosa em altas temperaturas, e vários microrganismos apresentam temperatura ótima de degradação entre 55°C e 65°C (Moo Young, 1994; Alexander, 1982).

Várias outras espécies de bactérias anaeróbias, incluindo *Acetovibrio cellulolyticus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *R. albus* também estão sendo estudados com relação a degradação de celulose e produção de celulases (Singh e Hayashi, 1995; Selinger *et al.*, 1996)

Entre as bactérias aeróbias, espécies celulolíticas de *Bacillus*, tais como *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. brevis* além de espécies de *Pseudomonas*, *Cellulomonas* e *Cytophaga* já foram descritas (Robson e Chambliss, 1989; Prasertsan e Doelle, 1987; Persson *et al.*, 1991; Alexander, 1982).

2.6 CELULASES

Celulases são enzimas pertencentes à família das glicohidrolases e responsáveis pela hidrólise da celulose para produção de açúcares menores e solúveis que sejam capazes de atravessar a membrana citoplasmática microbiana. O

complexo enzimático é formado pela atividade de exo- β -1,4-glucanases, endo- β -1,4-glucanases e β -glicosidasas (Bayer *et al.*, 1998; Singh e Hayashi, 1995).

2.6.1 Celobiohidrolases

As celobiohidrolases (exo- β -1,4-glucanases) degradam celulose pela remoção de unidades de celobiose ou glicose nas extremidades redutoras e não redutoras do polímero. Apresentam atividade contra celulose amorfa e celoligossacarídeos solúveis e ação limitada ou nula em celuloses substituídas como carboximetilcelulose (CMC) ou hidroxietilcelulose (HEC). Exoglucanases não possuem ação eficaz contra celulose nativa, entretanto, na presença de endoglucanases são eficazes na hidrólise da celulose com alto grau de cristalinidade. A ação das celobiohidrolases é essencial para evitar que as ligações glicosídicas hidrolisadas pelas endoglucanases sejam refeitas, sua atividade é inibida por celobiose e em menor extensão por glicose (Mawadza *et al.* 2000; Singh e Hayashi, 1995; Stahlberg *et al.*, 1997; Robson & Chambliss, 1989; Shewale & Sadana, 1978).

2.6.2 Endoglucanases

As endoglucanases ou carboximetilcelulases (CMCase) hidrolizam CMC ou celulose amorfa aleatoriamente na molécula de celulose. A hidrólise das ligações internas da molécula reduzem o efeito de rede dos polímeros resultando em cadeias menores e com maior quantidade de grupos redutores disponíveis para ação de outras enzimas. As CMCases não apresentam atividade contra celulose cristalina e sua ação em celo-oligossacarídeos diminui gradativamente com o encurtamento da

cadeia (Singh e Hayashi, 1995; Reyes e Corona,1997; Moo Young, 1994; Stahlberg *et al.*, 1997).

2.6.3 Glicosidases

β -glicosidases ou celobiasas são as enzimas envolvidas na hidrólise da celulose menos estudadas, alguns autores não a consideram parte do complexo enzimático visto que não hidrolisa celulose. Possuem atividade máxima para celobiose, alta atividade para celotriose e menor atividade para celooligosacarídeos maiores, em ambos libera glicose. Não apresentam atividade contra celulose cristalina, amorfa ou substituída. (Singh e Hayashi, 1995; Moo Young, 1994; Shewale e Sadana,1978).

2.7 CELULOSSOMOS

Celulossomos são complexos multienzimáticos, cujos componentes interagem de maneira sinérgica para degradação da celulose. Na natureza são enzimas modulares, onde cada módulo ou domínio compreende uma porção consecutiva da cadeia polipeptídica formando unidades distintas estruturalmente e funcionalmente (Ohmiya *et al.*, 1997; Bayer *et al.*,1998).

Todas as celulasas possuem domínio catalítico definido, portanto são classificadas em uma família de acordo com a homologia apresentada na sequência de aminoácidos. As enzimas constituintes do celulossomo não diferem das celulasas livres, ambas possuem tipos comuns de domínios catalíticos. O termo celulase é aplicado para enzimas livres ou enzimas do complexo. (Bayer *et al.*, 1998; Moo Young, 1994).

Durante anos acreditou-se que as celulases microbianas consistissem apenas de numerosos tipos de celulases livres que interagem sinergisticamente em substratos insolúveis. De fato, muitos sistemas de celulases, particularmente em bactérias aeróbias caracterizaram-se pela produção de enzimas livres. Entretanto, o celulosomo foi descrito em bactérias anaeróbias termófilas, como em espécies de *Clostridium*. (Bayer *et al.*,1998).

2.8 BIOSÍNTESE DE CELULASES

As celulases, geralmente são enzimas extracelulares sintetizadas pelos microrganismos no citoplasma. Após a síntese, a enzima atravessa a membrana sob a forma linear e assume a estrutura terciária do lado de fora da célula (Singh e Hayashi, 1995; Moo Young, 1994).

As celulases ocorrem livres ou fixadas na membrana das células. A síntese de enzimas livres é vantajosa porque permite aos microrganismos explorar substratos em distância maiores, entretanto, aumenta a probabilidade do produto ser perdido para outros microrganismos. As enzimas unidas a membrana das células minimizam o risco reduzindo a distância de difusão, porém, limitam a quantidade de substrato disponível a degradação. (Moo Young, 1994).

As enzimas celulolíticas são induzíveis, sua síntese e liberação ocorrem principalmente na fase estacionária. Os melhores indutores do complexo enzimático são celulose, celobiose e lactose, no entanto, são necessárias altas concentrações de substrato (Moo Young, 1994).

Segundo Singh e Hayashi (1995) e Moo Young (1994) a celulose é incapaz de atravessar a membrana citoplasmática microbiana e atuar como componente

indutor visto que é um substrato insolúvel. Para ocorrer o processo de indução, a celulose deve ser hidrolisada extracelularmente em produtos solúveis que difundam-se para as células microbianas produtoras de enzimas celulolíticas. Essa degradação inicial torna-se possível pela ação de celulasas pré-formadas em nível basal ou celulasas constitutivas.

2.9 MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DE SUBSTRATOS CELULÓSICOS

Os substratos celulósicos são altamente degradáveis devido as concentrações de celulose e hemicelulose que possuem (Cantarella *et al.*, 1992; Moo Young, 1994; Ryu *et al.*, 1982).

Entretanto, a forte associação destes carboidratos com a lignina, composto fenólico que atua como agente adesivo entre as fibras celulósicas e extremamente resistente as enzimas celulolíticas, prejudicam a degradação (Moo Young, 1994; Ryu *et al.*, 1982).

A taxa de hidrólise da celulose dependerá do tipo de lignina e da sua associação com os carboidratos presentes na parede celular (Alexander, 1982).

Métodos de pré-tratamentos permitem a remoção total ou parcial da lignina, individualizando as fibras celulósicas e aumentando a superfície disponível para hidrólise enzimática. Os resíduos agrícolas de diferentes origens mas com quantidade similar de lignina podem necessitar de diferentes graus de deslignificação para aumentar a degradabilidade.

Os materiais celulósicos encontrados na parede celular e submetidos a métodos de pré-tratamento, apresentam a dissociação da lignina. Os métodos de pré-tratamento químico mais comumente utilizados são a partir de NaOH ou H₂SO₄,

e físicos, através da moagem ou vapor d'água em altas temperaturas (Cantarella *et al.*, 1992; Moo Young, 1994; Ryu *et al.*, 1982).

O pré-tratamento de materiais celulósicos com microondas, segundo Ooshima *et al.* (1984) também são efetivos para aceleração de sua sacarificação.

Métodos de pré-tratamentos são indicados para melhoria das propriedades estruturais do substrato, reduzindo a cristalinidade, disponibilizando maior área de superfície para ataque de microrganismos, aumentando a acessibilidade da superfície da celulose para adsorção da celulase e reduzindo o grau de polimerização. (Cantarella *et al.*, 1992; Moo Young, 1994; Ryu *et al.*, 1982).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas no trabalho 2 bactérias selecionadas entre 87 microrganismos isolados em solos e ambientes aquáticos na região Amazônica. Os isolados, denominados BLs e numerados, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

As bactérias BL16 e BL20 foram selecionadas por apresentarem maior atividade específica para celulase (Heck, 2001).

3.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

As culturas foram preservadas em placas contendo ágar LB (Apêndice 1) e ágar nutriente e armazenadas à temperatura de 4°C. A renovação das culturas foi realizada a cada 15 dias. As culturas também foram mantidas congeladas em glicerol. Para isso, os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Apêndice 3) e incubados por 24 horas à 37°C, sendo posteriormente transferidos para tubos de microcentrífuga 800µL do cultivo e 200µL de glicerol estéril.

3.3 ESTUDOS TAXONÔMICOS

A análise morfológica dos isolados e vários testes bioquímicos foram utilizados para identificação dos microrganismos, segundo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Holt, 1986).

3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

3.4.1 Observação do crescimento em diferentes meios de cultura

Os isolados BL16 e BL20 foram semeados através do método de esgotamento, em placas de Petri contendo ágar sangue, ágar nutriente, ágar LB (Apêndice 1) e ágar Mueller Hinton. A incubação foi realizada durante 24 horas a temperatura de 37°C e as colônias foram analisadas quanto à morfologia, cor, viscosidade e presença de vesículas.

A técnica de coloração de Gram foi utilizada para caracterização da morfologia celular, em culturas com crescimento de 24 horas.

As bactérias foram submetidas às condições de aerobiose, microaerofilia e anaerobiose em culturas contendo ágar Mueller Hinton modificado (0,5% extrato de levedura, 0,5% extrato de malte, 1% NaCl, 1% glicose e 0,16% de púrpura de bromocresol). O crescimento e morfologia das colônias foram observados.

3.4.2 Crescimento em placa em diferentes temperaturas

O crescimento dos isolados BL16 e BL20 foi acompanhado em placas de Petri contendo ágar nutriente, estas foram preparadas a partir de pré-inóculo realizado em meio LB (50 mL) durante 48 horas. As placas foram incubadas durante 24 horas nas temperaturas de 4°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C e 55°C e as colônias contadas para a determinação do número de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL).

3.4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A suscetibilidade a antibióticos foi determinada pelo método modificado de Kirby-Bauer (Hindler *et al.*, 1994). Para o preparo do pré-inóculo os isolados foram incubados a 30°C durante 5 horas em ágar BHI. Um swab estéril foi submerso no inóculo e em seguida inoculado sobre toda a superfície da placa contendo ágar Mueller Hinton. Os discos de antibiótico foram colocados na placa com auxílio de uma pinça estéril. A incubação ocorreu durante 24 horas a 30°C, em seguida o diâmetro das zonas de inibição foram medidos e comparados com valores padronizados para cada antibiótico segundo Becton Dickinson (1995).

3.5 PREPARAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO

As colônias dos isolados BL16 e BL20, armazenadas em ágar LB foram coletadas por raspagem de placas e transferidas para Erlenmeyers contendo 50 mL de meio BHI. As culturas foram incubadas a 30°C durante 24 ou 48 horas em equipamento incubador com agitação de 125 rpm. O inóculo inicial foi estabelecido 10^5 U.F.C./ mL.

3.6 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

A determinação do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (U.F.C./ mL), em meio sólido foi realizada segundo o método de Milles e Misra (1938), com modificações, pelo uso de micropipetas.

Alíquotas de 500µL foram coletadas e diluídas de 10^1 a 10^6 em tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina (NaCl 0,85%). As amostras foram homogeneizadas e inoculadas em triplicatas de 20 µL por quadrante de placa

contendo ágar nutriente; o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical, marca Pachane, modelo PA-115. As placas foram incubadas por 20 horas, a 37°C, em estufa incubadora De Leo. A contagem foi efetuada na diluição onde as colônias encontraram-se isoladas, entre um mínimo de 30 e máximo de 300 colônias, em contador de colônias marca Phoenix CP 608. Os resultados foram expressos em log U.F.C./ mL.

3.7 CURVAS DE CRESCIMENTO

3.7.1 Determinação da temperatura ótima de crescimento

Observou-se o crescimento dos isolados BL16 e BL20 em cultivo em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio LB. O material foi transferido para incubadora rotatória (Nova Técnica/ modelo NT711/ Brasil) com agitação de 125 rpm nas seguintes temperaturas: 25°C, 30°C, 37°C, 45°C e 55°C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo regulares para leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro (600 nm) e análise da atividade enzimática.

3.7.2 Determinação do pH ótimo de crescimento

O crescimento dos microrganismos foi acompanhado em caldo LB com os valores de pH ajustados entre 5,0 e 10,0.

A influência do pH inicial no crescimento dos microrganismos foi analisada em cultivos contendo 50 mL de meio LB em frascos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando o mesmo método de incubação e agitação citados no item anterior. Os valores de pH dos meios de cultivo foram ajustados em 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0

e após incubados a 25°C, 30°C e 37°C. Regularmente foram coletadas alíquotas para leitura da densidade ótica (600 nm) e análise enzimática.

3.7.3 Observação do crescimento em meio mineral enriquecido com carboidratos

Para verificação da utilização de açúcares pelos isolados, foram realizadas curvas em meio mineral enriquecido com diferentes carboidratos. Cultivos foram preparados com 100 mL de meio mineral Bushnell Hass (Apêndice 6) e acondicionados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 1% de manose, glicose, sacarose, lactose ou galactose. O pré- inóculo foi preparado conforme item 3.5. A incubação foi realizada a 30°C em equipamento incubador com agitação de 125 rpm. Alíquotas foram retiradas para contagem de células viáveis, leitura da D.O. e análise enzimática.

3.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.8.1 Determinação da atividade de β -glucosidase e celobiohidrolase

A atividade da β -glucosidase e celobiohidrolase foi determinada utilizando como substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo e p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo.

Os microrganismos BL16 e BL20 foram cultivados em caldo BHI durante 48 horas em incubadora com agitação (125 rpm) a temperatura de 30°C. Em seguida foram coletadas 2 amostras do cultivo de cada linhagem para realização do ensaio.

Uma alíquota de 1 mL foi retirada e centrifugada (10.000 rpm / 10 min.). Os sobrenadantes foram separados. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de PBS, centrifugados e os sobrenadantes descartados. Os pellets foram novamente

ressuspensos em 0,5 mL de PBS. Uma segunda alíquota também contendo 1 mL foi sonicada e em seguida centrifugada, o sobrenadante foi separado. O pellet foi lavado com 0,5 mL de PBS, após ressuspensos na mesma solução. A atividade foi determinada em todas estas frações.

P-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo e p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (2 mg/mL) foram utilizados para o preparo do substrato concentrado que foi diluído 10 vezes para as condições do ensaio.

O ensaio foi realizado em tubos de microcentrífuga contendo 100 μ L do substrato da enzima, 100 μ L da preparação enzimática e 100 μ L de tampão citrato 0,25 M pH 5,0 incubados durante 1 hora a 37°C. A reação foi terminada com adição de 1 mL de solução 1 M Carbonato/ Bicarbonato pH 10,0. As amostras onde os pellets foram ressuspensos foram centrifugadas antes da leitura da absorbância a 405 nm.

A atividade foi expressa em unidades de proteína por mg^{-1} , onde uma unidade representa a quantidade de enzima necessária para produção de 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto a 37°C.

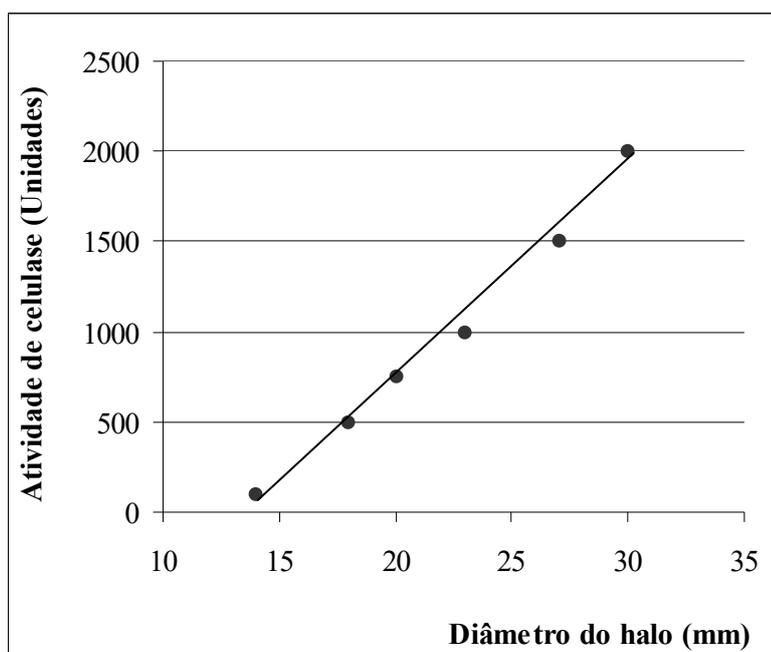
3.8.2 Determinação da atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade de carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada pela utilização do método de coloração com vermelho Congo (Carder 1986). Placas foram preparadas com 1% de carboximetilcelulose (CMC) e 1,5% de ágar que foram dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M e pH 6,0. Após a solidificação do meio, fez-se poços com aproximadamente 8 mm de diâmetro com auxílio de ponteiros de micropipetas com volume de 1 mL. Nos poços foram inoculados 80 μ L do

sobrenadante, obtido por centrifugação de uma amostra da cultura em experimento, 10.000 rpm durante 10 minutos. As placas foram incubadas em câmara úmida à 30°C durante 16 horas. Em seguida foram coradas com vermelho Congo 0,1 % por 30 minutos e após lavadas por 10 segundos com água destilada. O excesso de corante foi removido através de duas lavagens consecutivas com NaCl 1 M, com duração de 5 minutos cada. Por último, as placas foram enxaguadas com ácido acético. A presença de halos incolores foi indicativa de atividade celulolítica. O diâmetro das zonas de hidrólise foi medido em milímetros e transformado em unidades de atividade da celulase a partir de uma curva padrão. A curva padrão, que pode ser visualizada na figura abaixo, foi realizada a partir de celulase comercial obtida de *Trichoderma viride* (Fluka).

3.9 CURVAS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A produção de carboximetilcelulase foi observada quando os isolados BL16



e BL20 foram crescidos em 50 mL de meio LB incubados nas mesmas condições

descritas nos itens 3.7.1, 3.7.2 e 3.7.3. Amostras foram inoculadas nas placas de CMC com pH 6,0 e incubadas durante 16 horas. Posteriormente foram coradas e analisadas conforme item 3.8.2.

3.10 CARACTERIZAÇÃO DA CMCase

3.10.1 Atividade de CMCase em diferentes valores de pH e diferentes temperaturas

Foram preparadas placas contendo 0,1% de CMC e 1,5% de ágar que foram dissolvidos em fosfato 0,1 M. O pH do meio foi ajustado em 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0.

A cultura dos microrganismos foi preparada conforme descrição anterior. Foi coletada uma alíquota e centrifugada (10.000 rpm/10 minutos). Amostras de 80 μ L do sobrenadante foram inoculadas nas placas de CMC com diferentes pHs e incubadas nas temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C, 45°C e 55°C durante 16 horas. Posteriormente foram coradas e analisadas conforme item 3.8.2.

3.11 INDUÇÃO DA CMCase

3.11.1 Atividade de CMCase em meio LB acrescido de diferentes fontes de carbono

Meio LB foi preparado em tubos de ensaio (5 mL) e adicionado 0,5% dos seguintes carboidratos: celobiose, celulose, carboximetilcelulose, metilglucopirranose, galactose, lactose, glicose, sacarose, manose, maltose, arabinose e amido. O pré-inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.5. Alíquotas de 50 μ L foram coletadas e inoculadas nos tubos de ensaio. Os isolados foram incubados em uma incubadora com agitação de 125 rpm durante 40 horas a temperatura de 30°C. O sobrenadante foi obtido por centrifugação (10.000 rpm/10 min.) e inoculado (80 μ L) em placas de CMC. Os procedimentos de incubação e coloração das placas de CMC foram realizados conforme descrito no item 3.8.2.

3.11.2 Atividade de CMCase em diferentes concentrações de cloreto de sódio

As culturas foram testadas em meio LB com a concentração de NaCl ajustada para 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8%. Os pré-inóculos foram preparados conforme item 3.5, e incubados a 30°C por 24 horas com agitação de 125 rpm. Em seguida alíquotas de 50 μ L foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura. Novamente seguiu-se incubação de 24 horas a 30°C com agitação de 125 rpm. O sobrenadante foi obtido para análise enzimática pelo método do vermelho Congo.

3.12 OBTENÇÃO DOS RESÍDUOS DE ARROZ E TRIGO

As cascas de arroz (*Oryza sativa*) foram obtidas em uma indústria de beneficiamento de arroz. As cascas de arroz utilizadas nos experimentos foram separadas de outros resíduos remanescentes do processamento do arroz para comercialização, como grãos, farelos e outros componentes.

A palha de arroz (*Oryza sativa*) foi coletada diretamente na lavoura em período anterior a colheita. O vegetal foi dividido em 3 partes: raízes, colmo (talo) e grãos. O colmo foi separado, naturalmente desidratado (palha), e cortado em pequenos pedaços. As raízes e os grãos foram descartados.

O trigo (*Triticum aestivum*) foi coletado em época de colheita, como é um cereal colhido seco, o procedimento utilizado foi separar a palha das raízes e dos grãos e então cortá-lo em pedaços pequenos.

3.13 MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

Pré-tratamentos foram efetuados visando enfraquecer a associação com a lignina. Como os resíduos foram cortados como citado no item 3.12, todos os métodos de pré-tratamento aplicados foram realizados a partir desse substrato.

Os resíduos agrícolas utilizados nos experimentos foram pré-tratados química ou fisicamente e, em alguns casos ambos tratamentos foram utilizados.

3.13.1 Tratamentos físicos

As cascas de arroz e as palhas de arroz e trigo previamente picados, com diâmetro das partículas de 4 mm (série Tyler no. 5) foram selecionadas e em seguida moídas, em moinho de facas pulverisette 14 (Fritsch Co.). Diâmetro das partículas foi de 420 µm (série Tyler no. 40).

Vapor em altas temperaturas também foi utilizado para diminuir a resistência e aumentar a disponibilidade do substrato. Os resíduos picados ou moídos foram colocados em Erlenmeyers contendo meio mineral Buschnell-Hass e autoclavados durante 15 e 30 minutos à temperatura de 121°C.

3.13.2 Tratamento químico

Os resíduos de arroz e trigo, 1 g de cascas ou palhas, foram tratados em Erlenmeyers contendo 100 mL de NaOH 1N e 1 g das cascas ou palhas, em banho-maria à temperatura de 90°C durante 5 horas. Em seguida o álcali foi removido através de sucessivas lavagens com água destilada morna, o meio foi neutralizado e os resíduos ficaram imersos durante 24 horas. Após esse período retirou-se a água e acrescentou-se meio mineral Buschnell-Hass.

3.14 DEGRADAÇÃO DOS RESÍDUOS AGRÍCOLAS PELOS ISOLADOS BL16 E BL20

3.14.1 Curva de crescimento

O crescimento foi observado em meios preparados com palha de arroz, palha de trigo e cascas de arroz em meio mineral Buschnell-Hass (Apêndice 6). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral.

Colocou-se 1 grama dos resíduos picados, moídos ou tratados com álcali em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de meio mineral e autoclavados durante 15 ou 30 minutos à temperatura de 121°C. O pré-inóculo foi preparado conforme item 3.5, com inóculo inicial de 10^5 U.F.C/ mL. Os Erlenmeyers foram incubados a

30°C, entre 7 e 14 dias com agitação de 125 rpm e alíquotas foram retiradas esporadicamente para verificação do crescimento dos microrganismos, produção de celulasas e liberação de açúcares redutores. Os ensaios foram realizados conforme descrito nos itens 3.6, 3.8.2 e 3.13.2 respectivamente.

3.14.2 Determinação de açúcares redutores

A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do Ácido Dinitrosalicílico - DNS (Chaplin, 1996). A sensibilidade do método é de 0,3 a 30 mM de glicose.

O reagente utilizado no ensaio é composto de 0,25 g de ácido dinitrosalicílico, 75 g de tartarato de sódio e potássio dissolvidos em 50 mL de solução NaOH 2 M. Em seguida a solução foi diluída até 250 mL.

Foi coletada uma amostra do cultivo, centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi adicionada em tubos de ensaio contendo 1mL de solução DNS, e aquecida durante 10 minutos em banho-maria a uma temperatura de 100°C. Os tubos foram resfriados em temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 570 nm. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão feita com glicose em 10 concentrações diferentes, entre 1µg e 500 µg / µL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA

Microrganismos foram isolados em amostras de solo e ambientes aquáticos da região amazônica. Entre os 87 isolados previamente testados para detecção de atividade enzimática (Heck, 2001), foram selecionados dois bacilos gram-negativos que apresentaram maior atividade específica para celulase. As linhagens utilizadas no trabalho foram denominadas de BL16 e BL20.

Essas bactérias produziram largas zonas incolores em ágar contendo CMC corado com vermelho Congo, que é uma característica de atividade celulolítica.

Os isolados foram capazes de crescer em meios de cultura contendo CMC ou celulose como única fonte de carbono.

4.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DOS ISOLADOS BL16 E BL20

4.2.1 Características morfológicas

Pelo método de coloração de Gram, para verificação da morfologia e coloração celular, observamos células na forma de bastonetes gram-negativos, isolados ou dispostos na forma de estreptobacilos (FIGURA 3a e 3b). O tamanho das células em cultivos com até 48 horas foi observado. As células do isolado BL16 apresentaram entre 2 e 3 μm de comprimento e 1,5 μm de largura enquanto as células da bactéria BL20 apresentaram entre 2 e 4 μm de comprimento por 1,5 μm de largura.

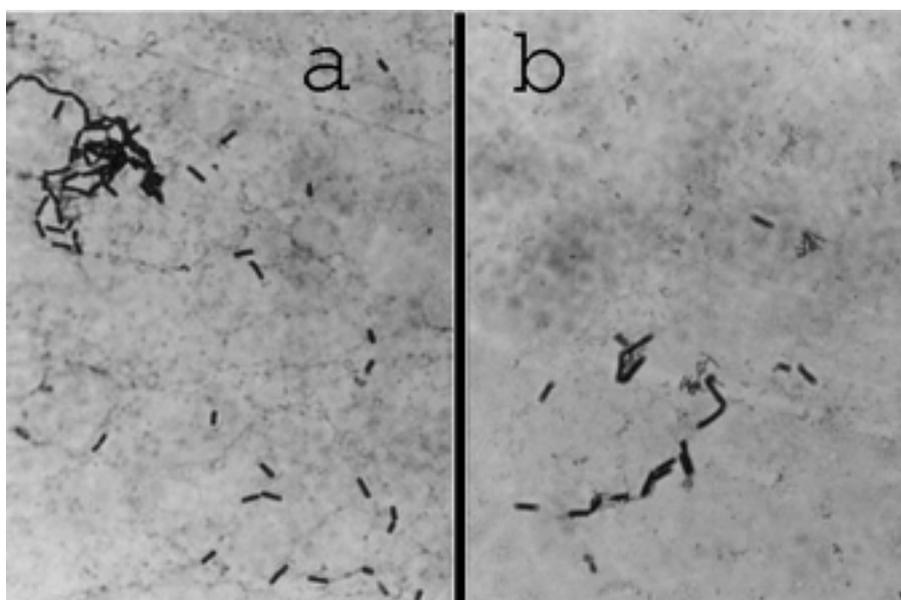


FIGURA 3. Morfologia das células dos isolados BL16 (a) e BL20 (b).

Os isolados BL16 e BL20 cresceram bem quando submetidos à condições de aerobiose e microaerofilia. Em aerobiose as colônias apresentaram coloração branca, forma circular, superfície lisa e brilhante e bordos irregulares, que pode ser observado na FIGURA 4 após crescimento em ágar nutriente. Colônias com

crescimento de 24 horas em ágar nutriente apresentaram entre 0,5 e 2 mm de diâmetro.

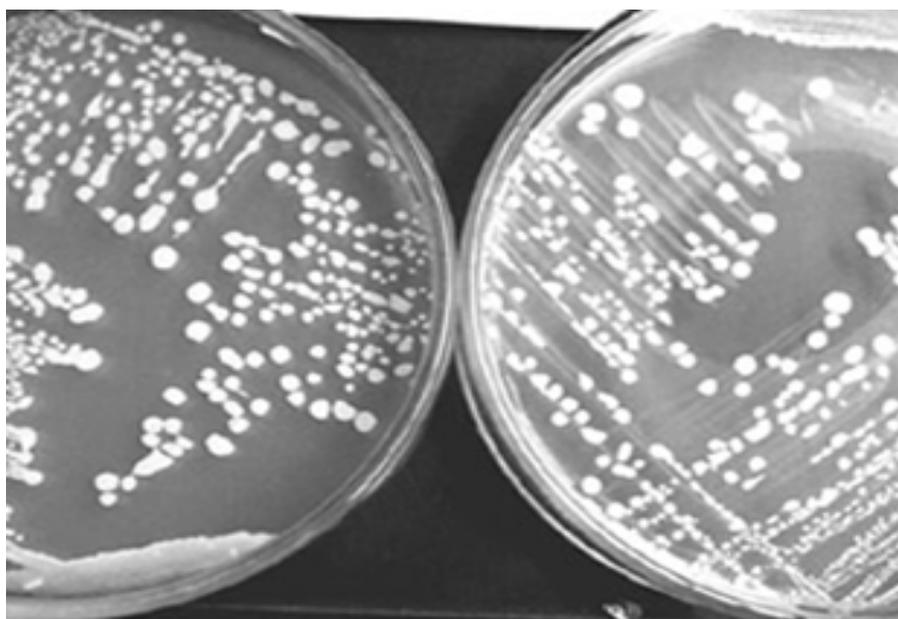


FIGURA 4. Morfologia das colônias dos isolados BL16 e BL20 em ágar Nutriente após 24 horas de incubação. Crescimento em condições aeróbias.

Algumas alterações na morfologia das colônias foram observadas em cultivos em ágar Mueller-Hinton, BHI e LB (FIGURA 5). Nessas culturas as colônias jovens apresentaram superfície lisa e brilhante e, colônias com maior crescimento adquiriram a forma membranosa e opaca.

O maior crescimento apresentado pelos isolados nesses cultivos, pode ter ocorrido devido a maior concentração de nutrientes presentes no meio, mais especificamente peptona e extrato de levedura.

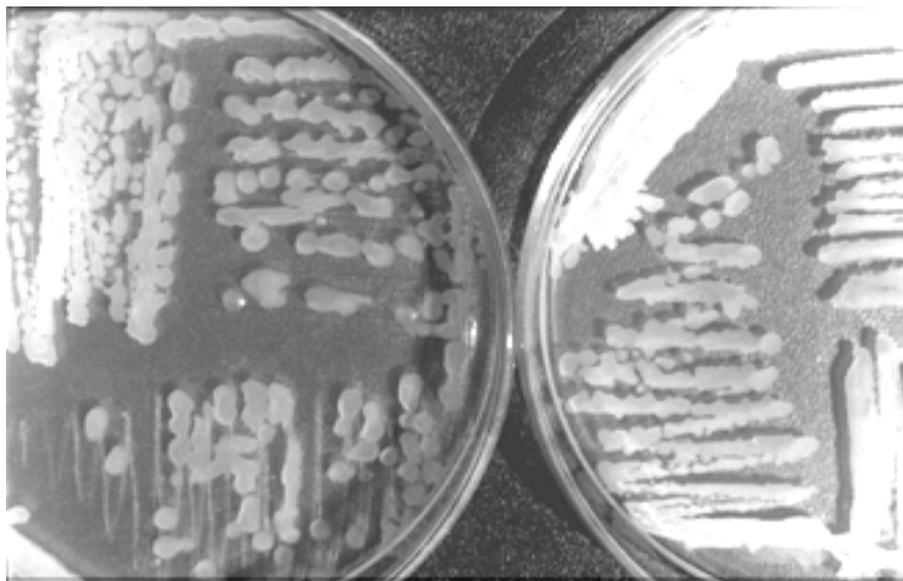


FIGURA 5. Morfologia das colônias dos isolados BL16 e BL20 em ágar LB após 24 horas de incubação. Crescimento em aerobiose.

Em condições microaerófilas observou-se colônias esbranquiçadas, membranosas, irregulares e contendo largas vesículas quando semeados em ágar Mueller-Hinton modificado (0,5% extrato de levedura, 0,5% extrato de malte, 1% NaCl, 1% glicose e 0,16% de púrpura de bromocresol). O corante púrpura de bromocresol foi utilizado como indicador da utilização de glicose pelos microrganismos (FIGURA 6). Os resultados indicaram que não houve utilização da glicose.

Os isolados BL16 e BL20 não apresentaram crescimento em anaerobiose.

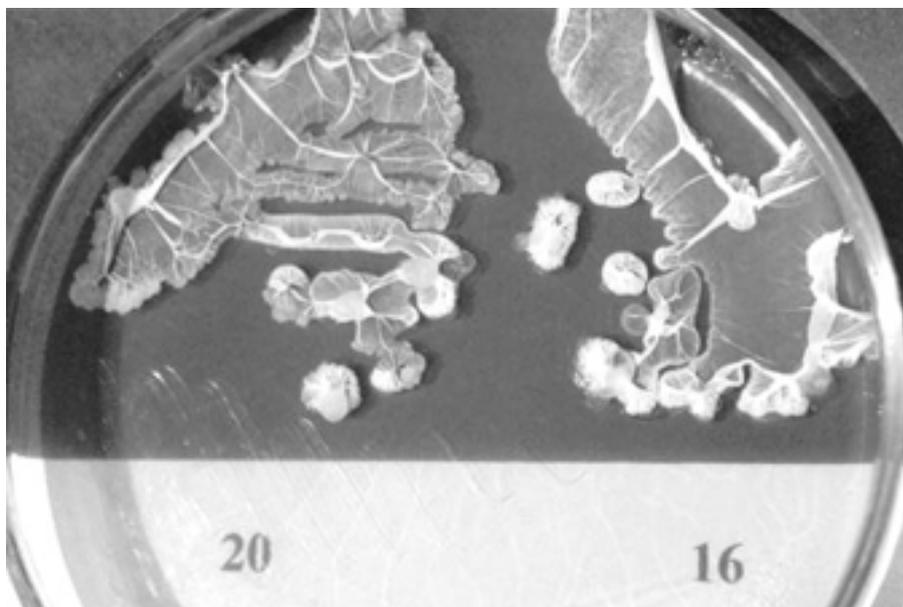


FIGURA 6. Morfologia das colônias dos isolados BL16 e BL20 em ágar Mueller-Hinton modificado após 24 horas de incubação. Crescimento em microaerofilia.

4.2.2 Características bioquímicas

Os resultados obtidos a partir de diferentes testes bioquímicos, das características de crescimento, morfologia das células e morfologia das colônias, foram utilizados para estudos taxonômicos das bactérias.

Os isolados apresentaram características fisiológicas idênticas, diferenciando-se apenas com relação a motilidade, que mostrou-se negativa no isolado BL16 e positiva no isolado BL20. Com base em todos os resultados e de

acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Holt, 1986), os isolados foram classificados no grupo das bactérias gram-negativas não-fermentadoras. As provas bioquímicas e seus resultados estão listados na TABELA 2.

Os microrganismos BL16 e BL20 foram dispostos na Classe Scotobacteria, embora os testes não tenham permitido a classificação dos isolados em gênero ou espécie. Novos estudos estão sendo conduzidos em busca da identificação, embora exista a probabilidade dos isolados pertencerem a espécies ainda não descritas.

Recentes estudos com espécies isoladas em solos amazônicos, a partir de sequências de RNA ribossomal, revelaram que nenhuma das sequências, um total de 98, havia sido descrita anteriormente (Bonerman e Triplett, 1997).

Segundo Eveleigh (1995), estima-se que 1 grama de solo de uma floresta decídua norueguesa contenha entre 4 e 5000 espécies de bactérias, sendo que o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1989, possui 4000 espécies descritas. Números equivalentes são estimados em outros biomas e sítios ecológicos.

TABELA 2. Características morfológicas e bioquímicas dos microrganismos BL16 e BL20.

Características	BL16	BL20
Crescimento em aerobiose	Positivo	Positivo
Crescimento em microaerofilia	Positivo	Positivo
Crescimento em anaerobiose	Negativo	Negativo
Hemólise	Positivo	Positivo
Hemoaglutinação	Positivo	Positivo

Motilidade	Negativo	Positivo
Oxidase	Positivo	Positivo
Catalase	Positivo	Positivo
DNase	Negativo	
Negativo		
Lipase	Positivo	Positivo
Amilase	Positivo	Positivo
Gelatinase	Positivo	Positivo
Urease	Negativo	Negativo
Oxidação/Fermentação	Negativo	Negativo
Prova de vermelho-metil	Negativo	Negativo
Prova de Voges-Proskauer	Positivo	Positivo
Citrato	Negativo	Negativo
Lisina	Positivo	Positivo
Ornitina	Negativo	Negativo
Indol	Negativo	Negativo
Redução de nitrato	Positivo	Positivo
TSI	Ácido/	Ácido/ Não produzem
H ₂ S		
Sacarose	Positivo	Positivo
Lactose	Negativo	Negativo
Maltose	Negativo	Negativo
Manitol	Negativo	Negativo
Inositol	Negativo	Negativo

Sorbitol	Negativo	Negativo
Malonato	Negativo	Negativo
Salicina	Negativo	Negativo

4.2.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade dos isolados BL16 e BL20 a diferentes agentes antimicrobianos foi testada. Os resultados obtidos, apresentados na TABELA 3, mostraram um padrão de comportamento similar, visto que ambas as linhagens foram resistentes apenas aos β -lactâmicos Penicilina e Ampicilina, e à Novobiocina. A inativação desses quimioterápicos pode ser um fator indicativo da produção de β -lactamases.

TABELA 3. Teste de suscetibilidade a antibióticos dos microrganismos BL16 e BL20. *

Antibiótico	CB16 (mm)	CB20 (mm)
Amicacina	28 (S)	30 (S)
Ampicilina	20 (R)	13(R)
Azitromicina	26 (S)	30 (S)
Cefaclor	38 (S)	40 (S)
Cefalotina	30 (S)	29 (S)
Cloranfenicol	22 (S)	22 (S)

Gentamicina	20 (S)	20 (S)
Netilmicina	30 (S)	26 (S)
Norfloxacin	25 (S)	22 (S)
Novobiocina	17 (R)	15 (R)
Oxacilina	20 (I)	20 (I)
Penicilina	20 (R)	19 (R)
Estreptomicina	17 (S)	19 (S)
Sulfatometoxazol	32 (S)	30 (S)
Tetraciclina	28 (S)	28 (S)
Vancomicina	20 (S)	20 (S)

* As zonas de inibição estão representadas por R, resistente; I, intermediário e S, suscetível.

4.2.4 Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas

Acompanhando o crescimento dos isolados BL16 e BL20 em placas de ágar nutriente incubadas em diferentes temperaturas, observou-se que não houve crescimento dos microrganismos nas temperaturas de 4°C e 55°C ao final de 24 horas de cultivo. A determinação das unidades formadoras de colônia por mL foi determinada nas temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C e 45°C, a partir de pré-inóculo preparado conforme item 3.5. A determinação do número de colônias indicou crescimento de aproximadamente 10^7 U.F.C./mL para o ambos isolados.

4.2.5 Determinação da temperatura ótima de crescimento

O crescimento dos isolados BL16 e BL20 foi acompanhado em meio LB, pela leitura da densidade ótica (600 nm), nas temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C e 45°C, paralelo a isso, os meios de cultivo tiveram os valores de pH ajustados em 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0.

Observou-se que ao final de 48 horas de cultivo houve crescimento dos microrganismos em meios com ajuste de pH entre 6,0 e 9,0 e quando incubados nas temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C e 45°C.

As curvas de crescimento dos isolados BL16 e BL20 mostraram-se similares nas temperaturas de 25°C (FIGURA 7 e 8) e 30°C (FIGURA 9 e 10), com menor crescimento a 45°C (FIGURA 11) e crescimento ótimo a 37°C (FIGURA 12 e 13).

Os resultados obtidos mostraram-se coerentes tratando-se de bactérias provenientes da floresta amazônica onde as temperaturas médias são elevadas o ano todo, em torno de 26-27°C, indo a máxima absoluta de 39°C e mínima de 22°C, o que faz seu clima constantemente quente (Gash *et al.*, 1996; Rizzini e Filho, 1988). O menor crescimento à 45°C e ausência de crescimento a 55°C reinteram que as espécies trabalhadas são mesófilas, condição esperada em microrganismos presentes no ambiente.

Acompanhando as curvas de crescimento dos isolados BL16 e BL20, foi possível observar que ambos encontram-se na fase lag de crescimento até 8-10 horas de cultivo. A partir deste ponto inicia-se a fase exponencial de crescimento a qual

estende-se até 20-24 horas de cultivo, quando então os microrganismos entram na fase estacionária.

4.2.6 Observação do pH ótimo de crescimento

Entre os diferentes valores de pH testados verificou-se crescimento dos isolados BL16 e BL20 em culturas com pH neutro à alcalino.

Segundo Alexander (1982) em ambientes com pH neutro ou alcalino vários microrganismos são capazes de crescer e de produzir enzimas celulolíticas, enquanto que em ambientes com pH ácido ocorre predomínio de fungos celulolíticos. Foram descritas espécies de *Vibrio* produtores de celulasas, que quando testados em culturas puras apresentaram pH ótimo de crescimento entre 7.1 e 7.6.

Ambas bactérias cresceram bem em meios de cultivo com pH inicial entre 6,0 e 8,0 apresentando crescimento ótimo em pH 7,0. Foi observado menor crescimento em pH 9,0 e nenhum crescimento em meios de cultivo com pH inicial de 5,0 e 10,0. O efeito do pH no crescimento da BL16 pode ser observado nas FIGURAS 7, 9, 11 e 12 e da BL20 nas FIGURAS 8, 10, 11 e 13.

No decorrer do crescimento dos isolados BL16 e BL20 constatamos a alcalinização do meio de cultivo. Este resultado deve-se ao fato destas bactérias serem proteolíticas e, durante o processo de desaminação das proteínas e aminoácidos excretarem amônia para o meio.

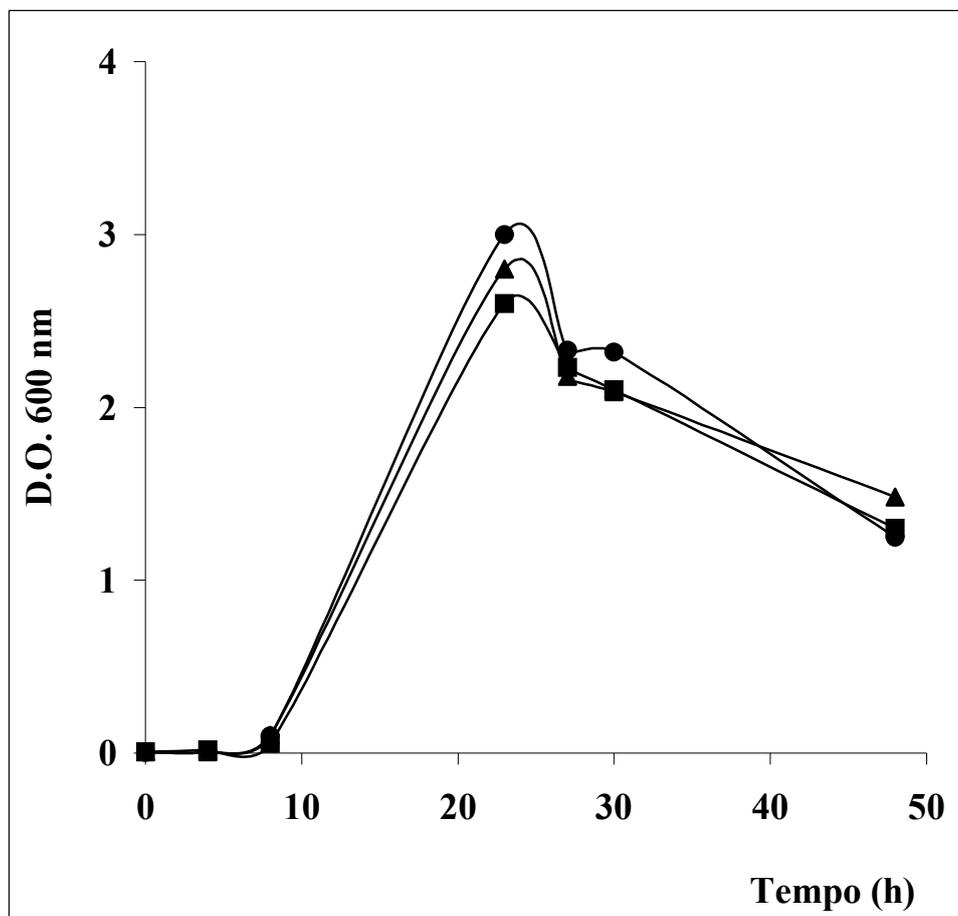


FIGURA 7. Curva de crescimento do isolado BL16 durante 48 horas de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 6,0 (λ), 7,0 (ν) e 8,0 (σ). Temperatura de incubação de 25°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

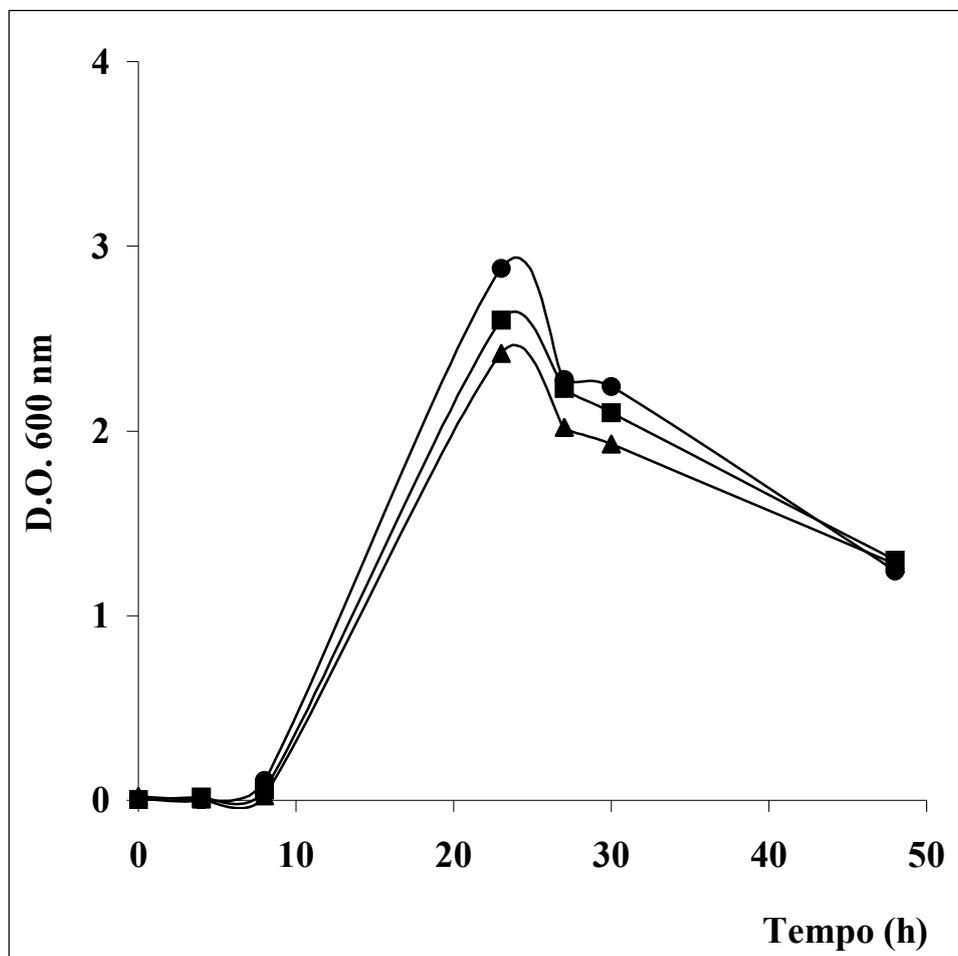


FIGURA 8. Curva de crescimento do isolado BL20 durante 48 horas de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 6,0 (λ), 7,0 (ν) e 8,0 (σ). Temperatura de incubação de 25°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

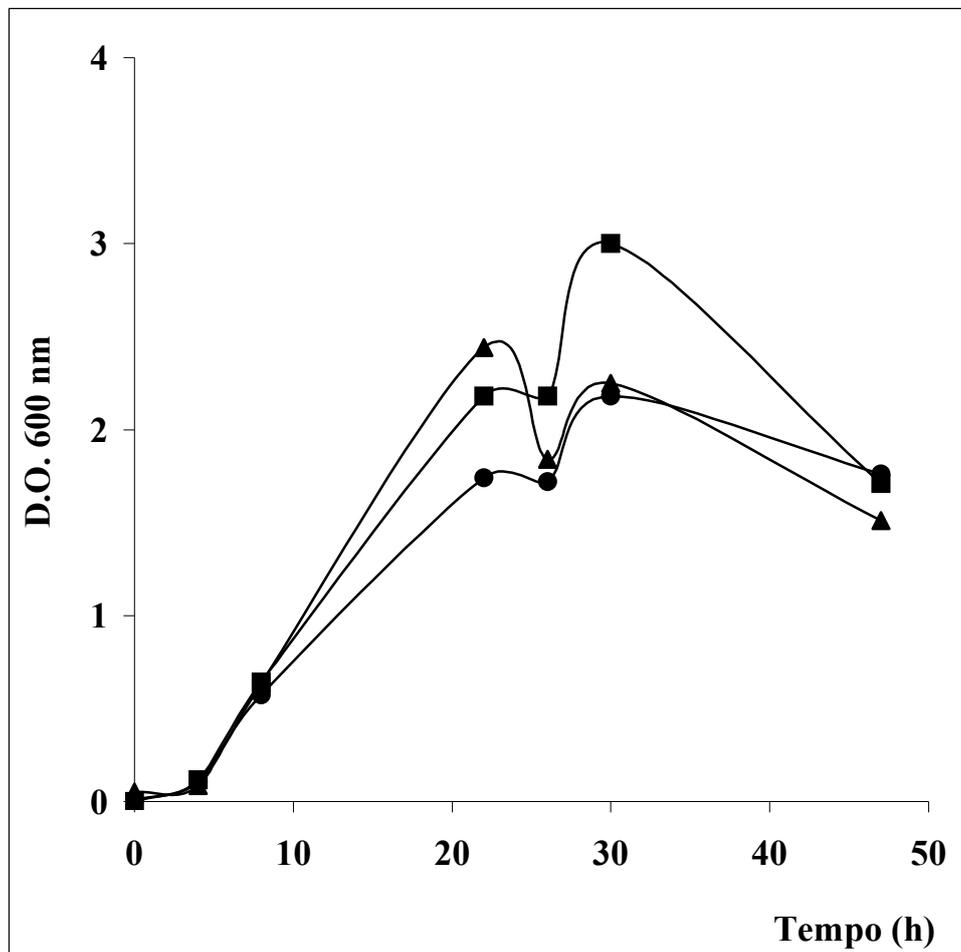


FIGURA 9. Curva de crescimento do microrganismo BL16 durante 48 horas de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 6,0 (λ), 7,0 (ν) e 8,0 (σ). Incubação à 30°C durante 48 horas. Os resultados representam a média de duas determinações.

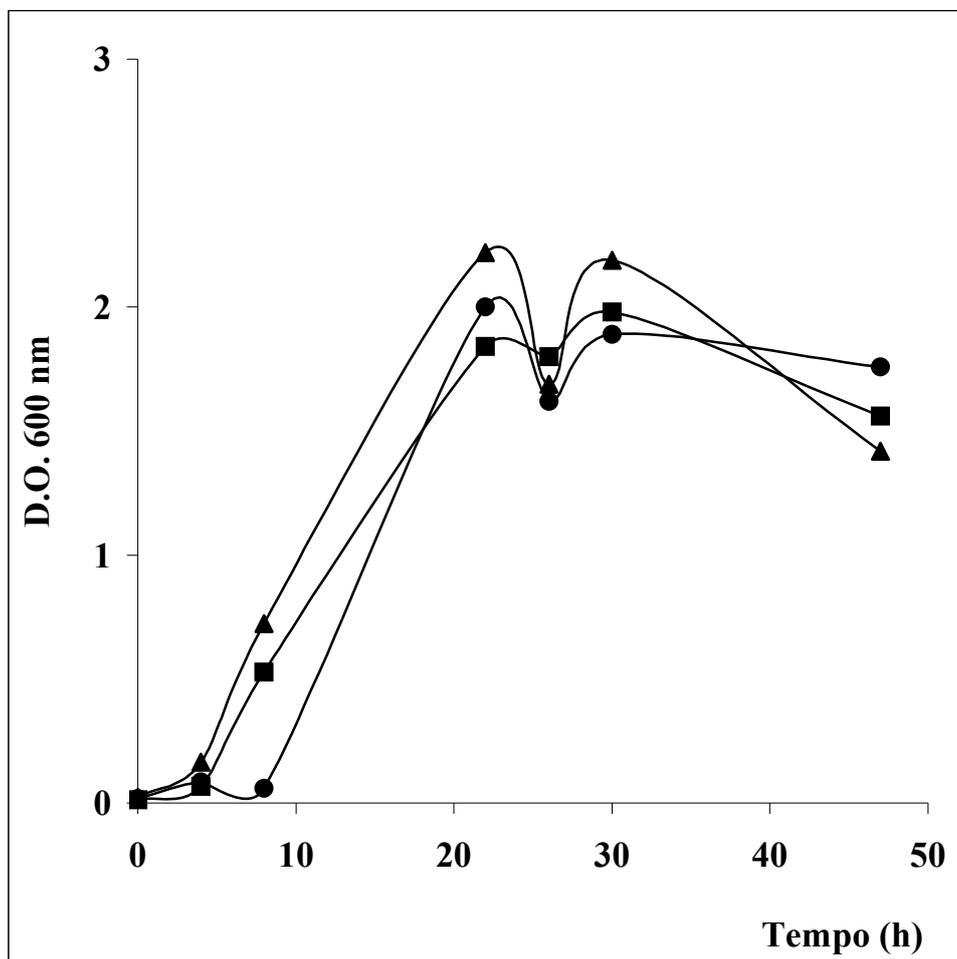


FIGURA 10. Curva de crescimento do microrganismo BL20 durante 48 horas de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 6,0 (λ), 7,0 (ν) e 8,0 (σ). Incubação à 30°C durante 48 horas. Os resultados representam a média de duas determinações.

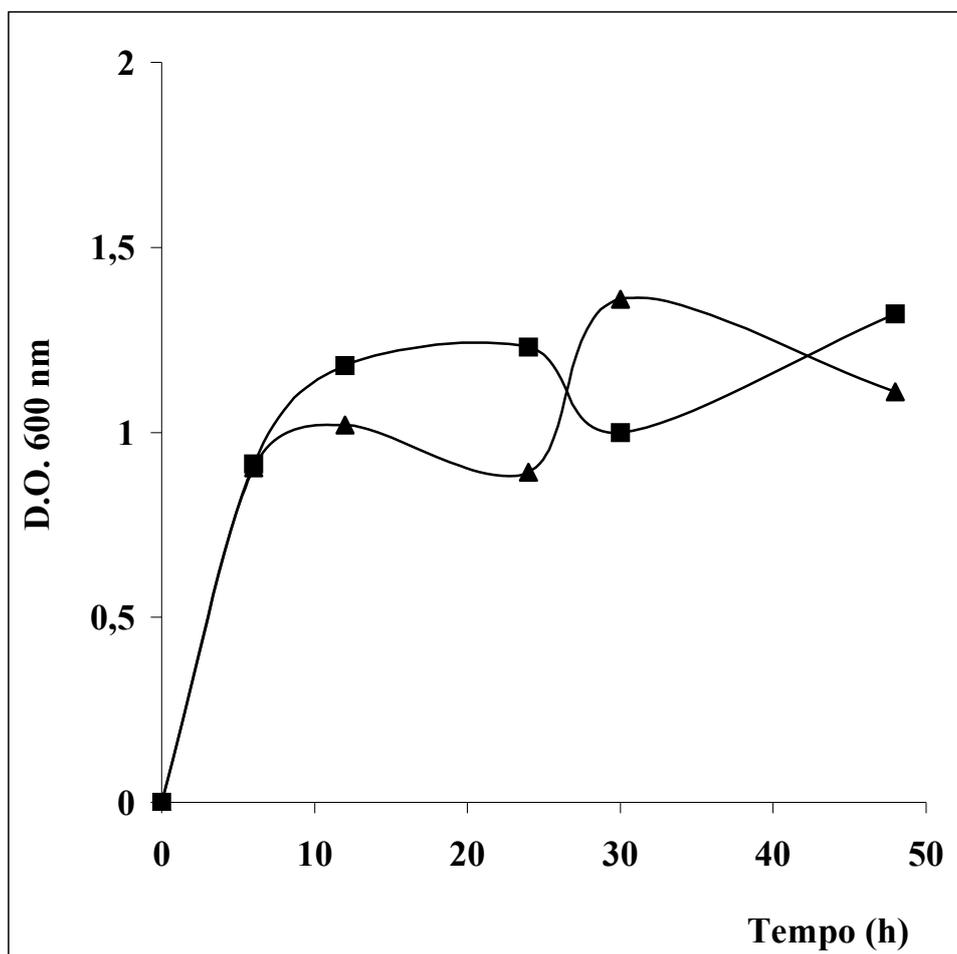


FIGURA 11. Curva de crescimento dos microrganismos BL16 (σ) e BL20 (v), realizada em meio LB com pH 7,0. Temperatura de incubação de 45°C durante 48 horas de cultivo. Os resultados representam a média de duas determinações.

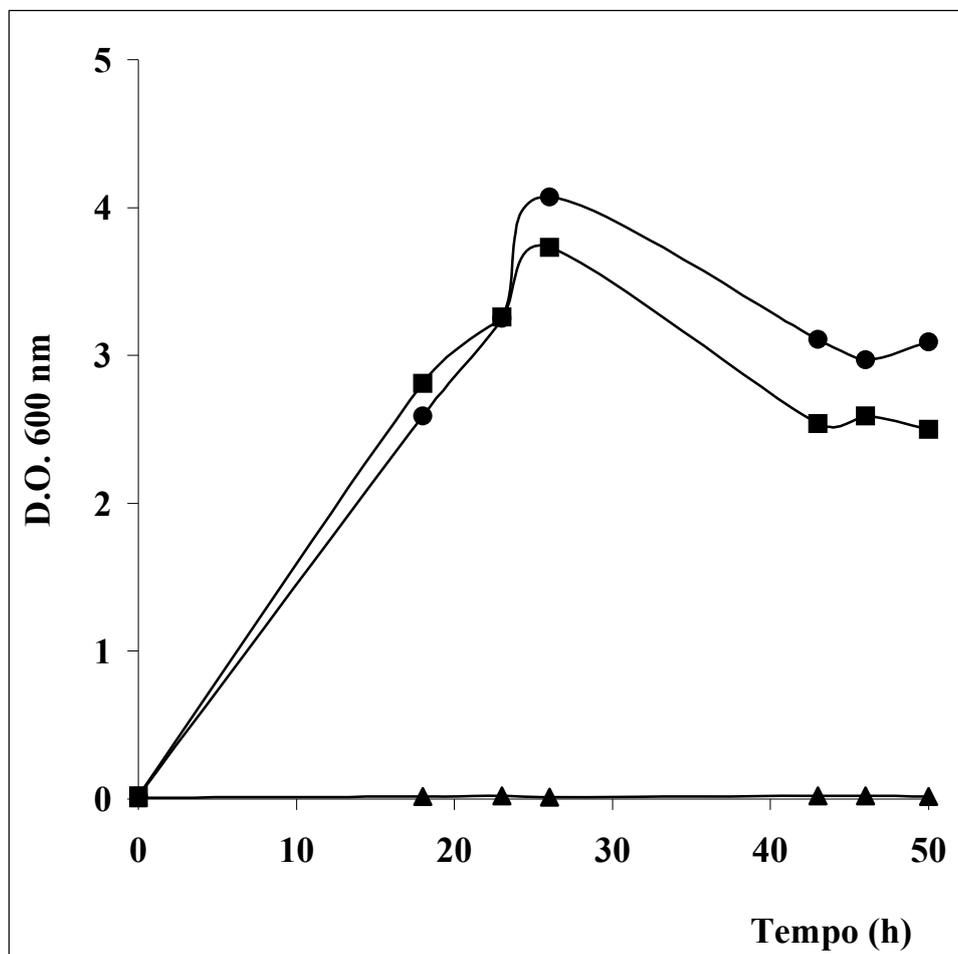


FIGURA 12. Curva de crescimento do microrganismo BL16 durante 48 horas de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 5,0 (σ), 6,0 (λ) e 7,0 (v). Temperatura de incubação de 37°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

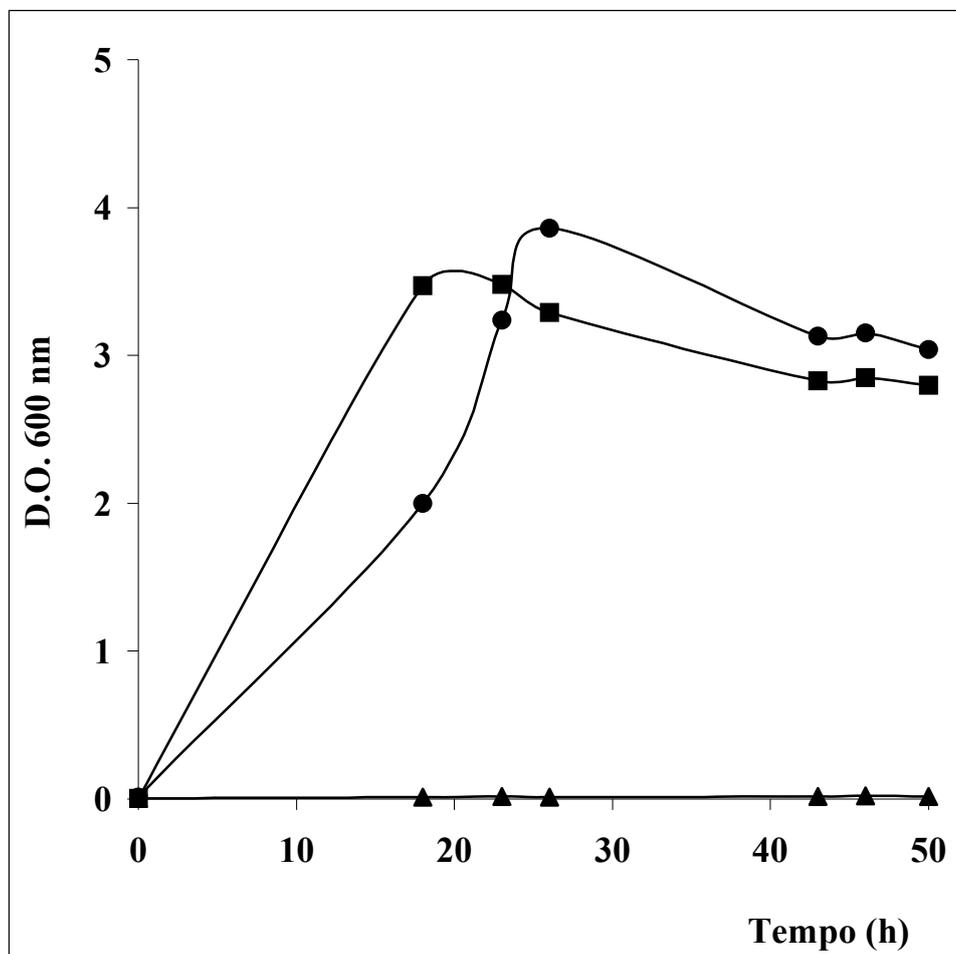


FIGURA 13. Curva de crescimento do microrganismo BL20 durante 48 horas de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 5,0 (σ), 6,0 (λ) e 7,0 (ν). Temperatura de incubação de 37°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

4.2.7 Crescimento em meio mineral com diferentes fontes de carbono

Acompanhou-se o crescimento dos isolados BL16 e BL20 em meio mineral Bushnell Hass adicionado de 1% de manose, glicose, sacarose, lactose ou galactose como única fonte de carbono.

O crescimento foi acompanhado pela retirada de alíquotas em tempos regulares para leitura da densidade ótica e contagem do número de células viáveis e, indicou bom crescimento dos isolados nos cultivos enriquecidos com manose, glicose e sacarose. Ao final de 24 horas, as bactérias haviam entrado na fase estacionária. Nos meios de cultivo que continham galactose como fonte de carbono observou-se pouco crescimento. Todos os resultados observados, foram similares para ambos isolados BL16 e BL20. Os resultados obtidos em cultivos com a bactéria BL20 podem ser analisados na FIGURA 14.

Uma nova curva de crescimento em meio mineral contendo galactose foi acompanhada, e em paralelo foram preparados meios de cultivo enriquecidos com lactose

Observamos que ao final de 100 horas de cultivo houve crescimento rápido quando adicionado lactose no meio, entretanto, os cultivos enriquecidos com galactose caracterizaram-se novamente pelo crescimento lento de ambos microrganismos, visto que apenas ao final de 70 horas estes atingiram o mesmo crescimento alcançado em cultivos enriquecidos com manose, sacarose, glicose ou lactose (FIGURA 15).

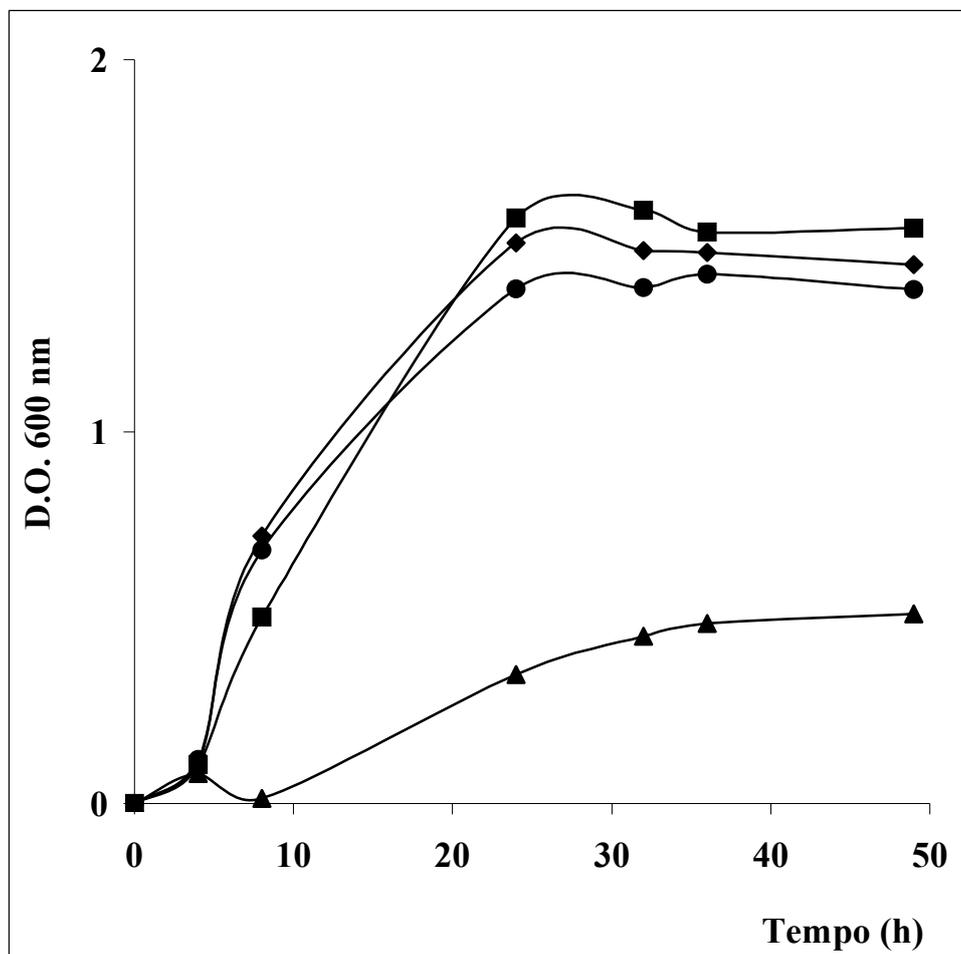


FIGURA 14. Curva de crescimento do microrganismo BL20 em meio mineral Buschnell-Hass enriquecido com manose (ν), sacarose (υ), glicose (λ) e galactose (σ) durante 48 horas de cultivo. Temperatura de incubação de 30°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

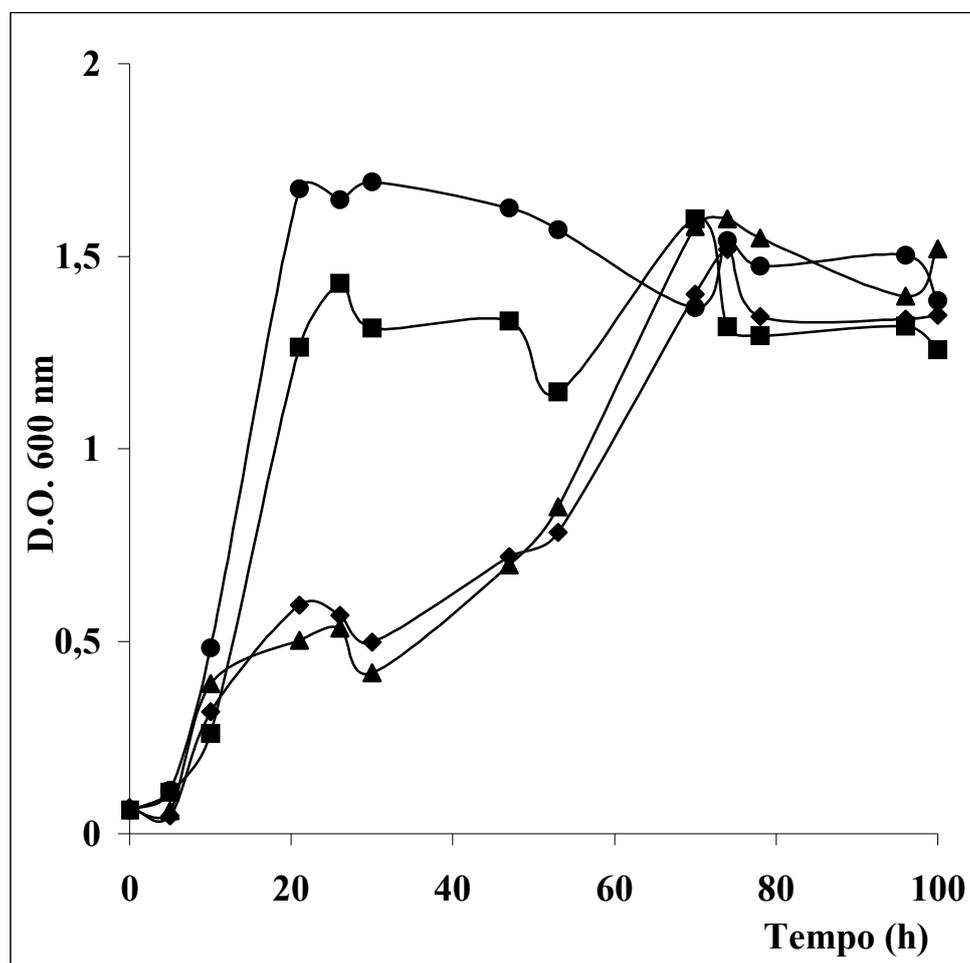


FIGURA 15. Curva de crescimento dos isolados em meio mineral Buschnell-Hass enriquecido galactose, BL16 (σ) e BL20 (ν) e com lactose, BL16 (λ) BL20 (ν) durante 100 horas de cultivo. Temperatura de incubação de 30°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.3.1 Determinação da atividade de celobiohidrolase e β -glicosidase

Atividades de β -glicosidase e celobiohidrolase foram monitoradas no sobrenadante das culturas. O ensaio enzimático, realizado a partir dos substratos específicos p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo e p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo, determinou a liberação do p-nitrofenol posteriormente detectado em leitura em espectrofotômetro 405 nm.

A atividade de celobiohidrolase foi detectada somente no sobrenadante das culturas da BL20. Atividade de β -glicosidase não foi detectada.

Resultados positivos de atividade associada às celulases poderiam sugerir a presença de enzimas unidas a membrana. Se considerarmos a possibilidade destes microrganismos serem originários de ambientes aquáticos, a presença de enzimas de membrana pode ser uma característica adaptativa destes microrganismos visando minimizar a distância de difusão do produto e a probabilidade deste ser perdido para outros microrganismos (Eveleigh *et al.*, 1995; Moo Young, 1994).

Existe a possibilidade dos isolados BL16 e BL20 produzirem endoglucanases que também apresentem atividade de exoglucanases, não sendo detectadas em substratos sintéticos. *Clostridium thermocellum* possui alta atividade de β -glicosidase, mas apresenta baixa afinidade por celobiose ou p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (Ait *et al.*, 1982).

A ausência de atividade de β -glicosidase em ambos isolados confirma a observação de que muitas bactérias não produzem β -glicosidases, utilizam fosforilases na degradação da celobiose. Celobioses e celo-oligossacarídeos menores ao entrar na célula são metabolizados por fosforilases específicas (Mawadza *et al.*, 2000; Singh e Hayashi, 1995; Robson e Chambliss, 1989).

4.3.2 Atividade de CMCase em meio LB com pH modificado com incubação em diferentes temperaturas

O efeito do pH e temperatura na produção de celulases foi pesquisado. A produção de carboximetilcelulase (CMCase) pelos isolados BL16 e BL20 foi acompanhada em meio LB nas temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C e 45°C. Paralelo a isso, os meios de cultura tiveram os valores de pH ajustados em 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0.

Atividade enzimática foi detectada quando os isolados foram crescidos em meios de cultura com ajuste de pH entre 6,0 e 9,0 e quando incubados nas temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C e 45°C.

As curvas de atividade enzimática obtidas após crescimento da BL16 e BL20 nas condições descritas anteriormente, mostraram-se similares e com menor atividade enzimática a 25°C (FIGURA 16 e 17) e 37°C (FIGURA 20 e 21) para ambos isolados após 24 horas de cultivo. Atividade máxima de CMCase foi observada quando ambos microrganismos foram cultivados a 30°C (FIGURA 18 e 19) após 24 horas de cultivo. Os microrganismos, quando incubados à 45°C apresentaram menor crescimento, a produção de enzimas ocorreu de forma mais lenta e gradual, e a atividade máxima foi alcançada somente ao final de 48 horas de cultivo (FIGURA 22).

O pH ótimo para produção de celulases pelas bactérias BL16 e BL20 foi similar e entre 6,0 e 9,0. Não foi detectada atividade enzimática em meios de cultura com pH inicial de 5,0 e 10,0, concomitante a ausência de crescimento dos isolados nas mesmas condições de cultivo.

Constatou-se que houve maior liberação de enzimas celulolíticas até 24 horas de cultivo, quando os microrganismos entraram na fase estacionária. Em muitos casos, esse comportamento deve-se ao fato das celulases estarem altamente fixadas ao substrato celulósico, sendo detectadas no meio de cultura somente com o término da fase exponencial. Celulases produzidas por bactérias aeróbias, tais como espécies de *Cellulomonas*, foram descritas apresentando esse comportamento característico (Singh e Hayashi, 1995; Moo Young 1994).

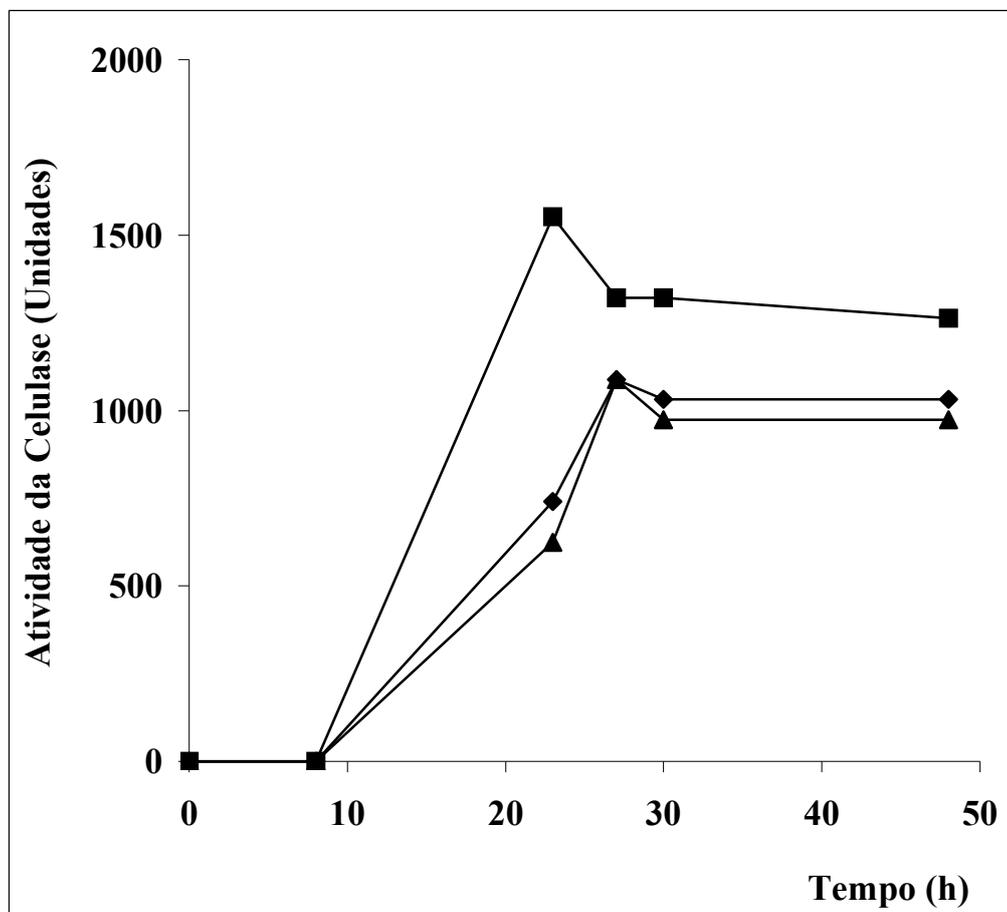


FIGURA 16. Produção de carboximetilcelulase pelo isolado BL16 durante 48 de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 6,0 (v), 7,0 (■) e 8,0 (σ) com temperatura de incubação de 25°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

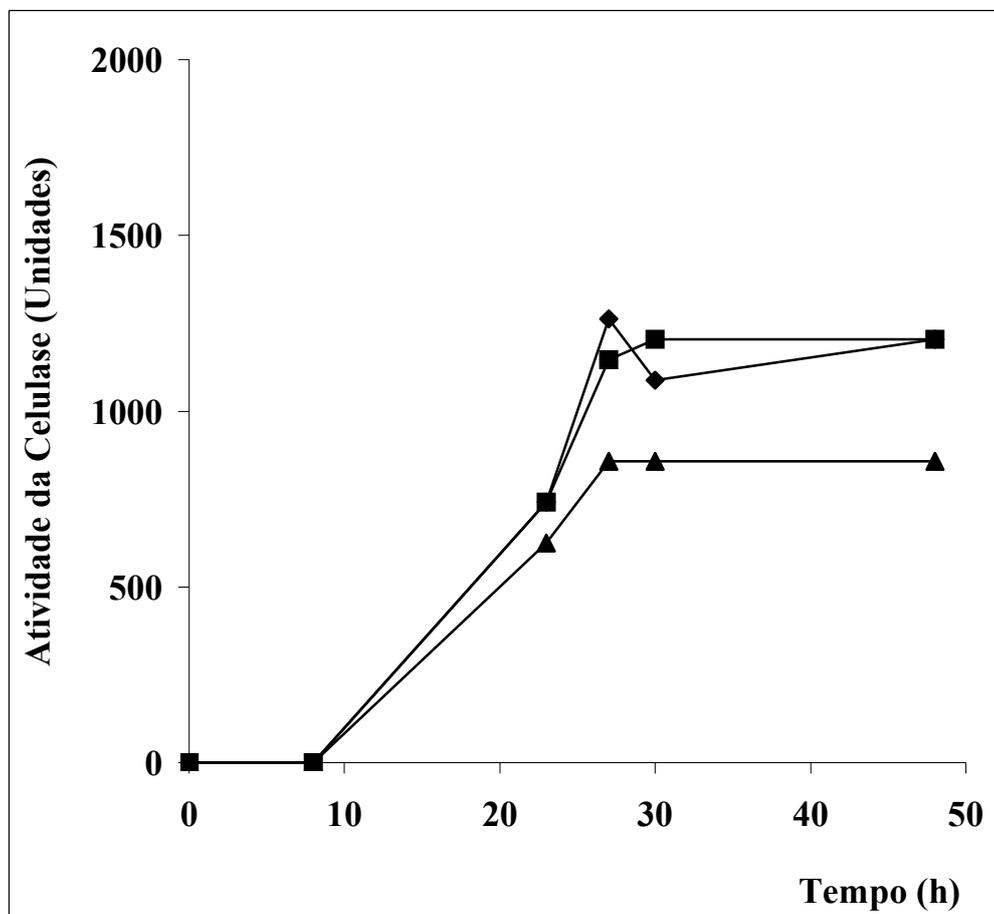


FIGURA 17. Produção de carboximetilcelulase pelo isolado BL20 durante 48 de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 6,0 (∇), 7,0 (\blacksquare) e 8,0 (σ) com temperatura de incubação de 25°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

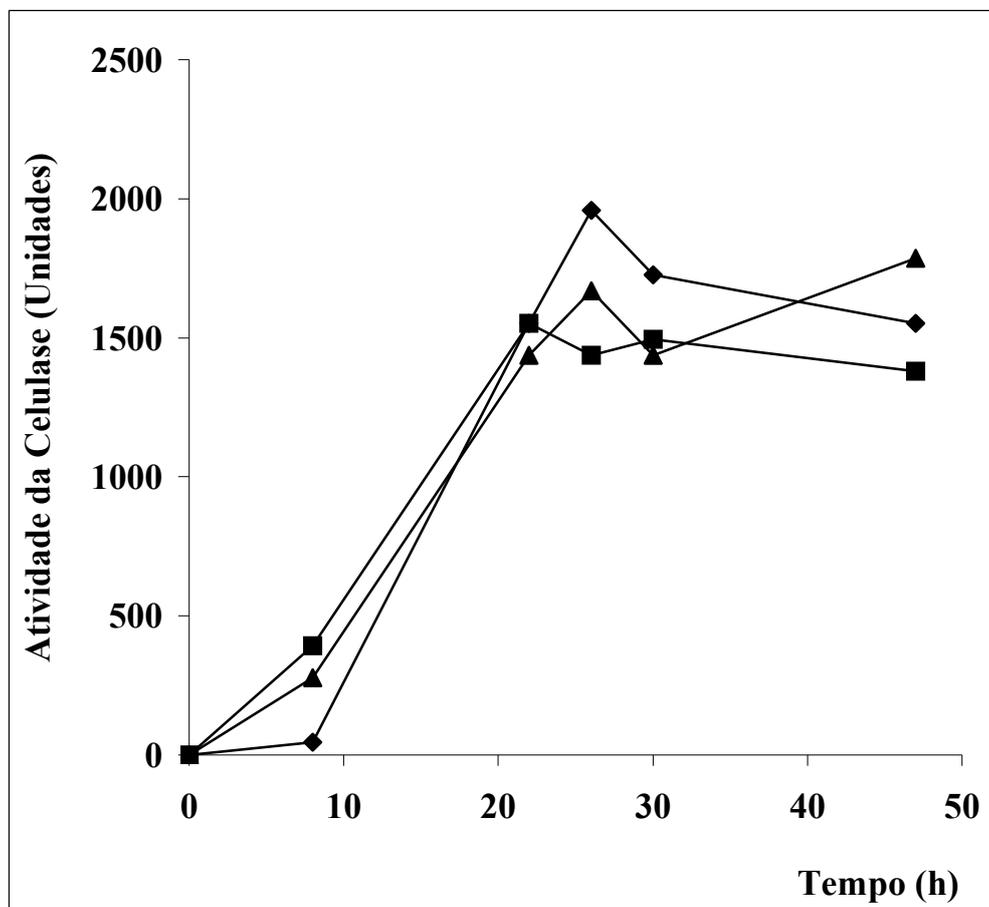


FIGURA 18. Produção de carboximetilcelulase pelo isolado BL16 durante 48 de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 6,0 (\blacktriangle), 7,0 (\blacksquare) e 8,0 (\blacklozenge) com temperatura de incubação de 30°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

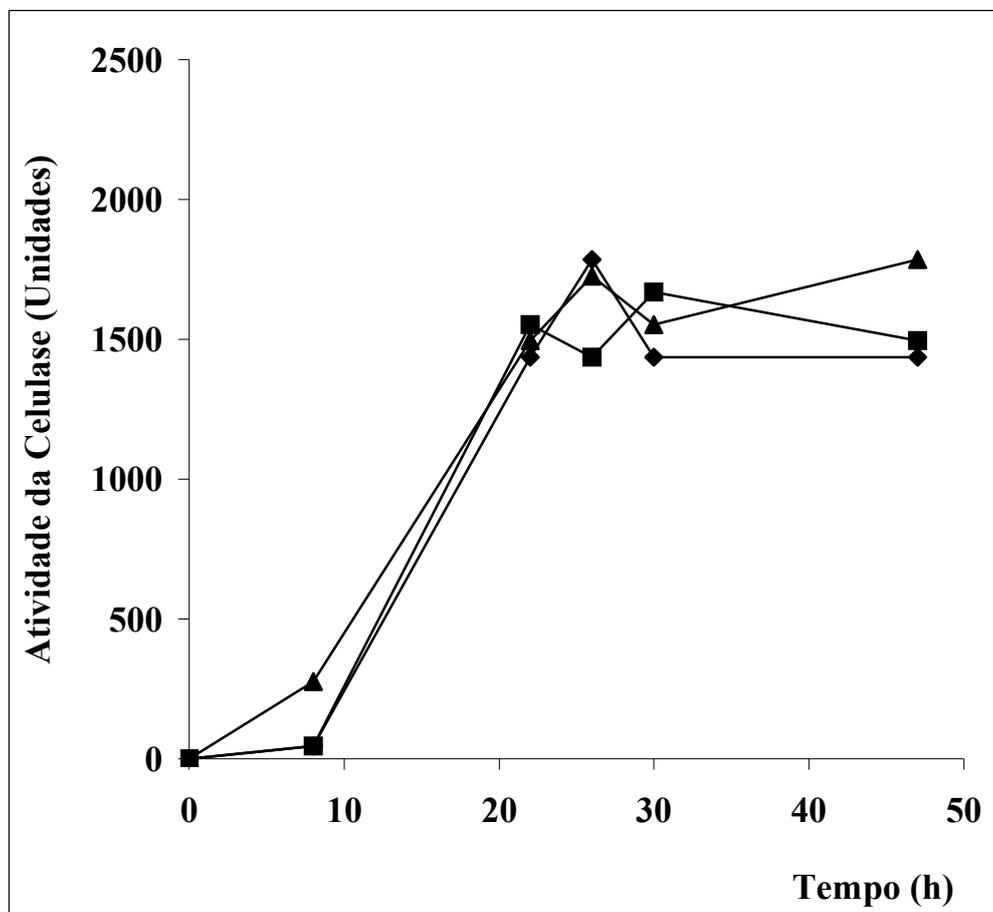


FIGURA 19. Produção de carboximetilcelulase pelo isolado BL20 durante 48 de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 6,0 (Δ), 7,0 (\blacksquare) e 8,0 (\diamond) com temperatura de incubação de 30°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

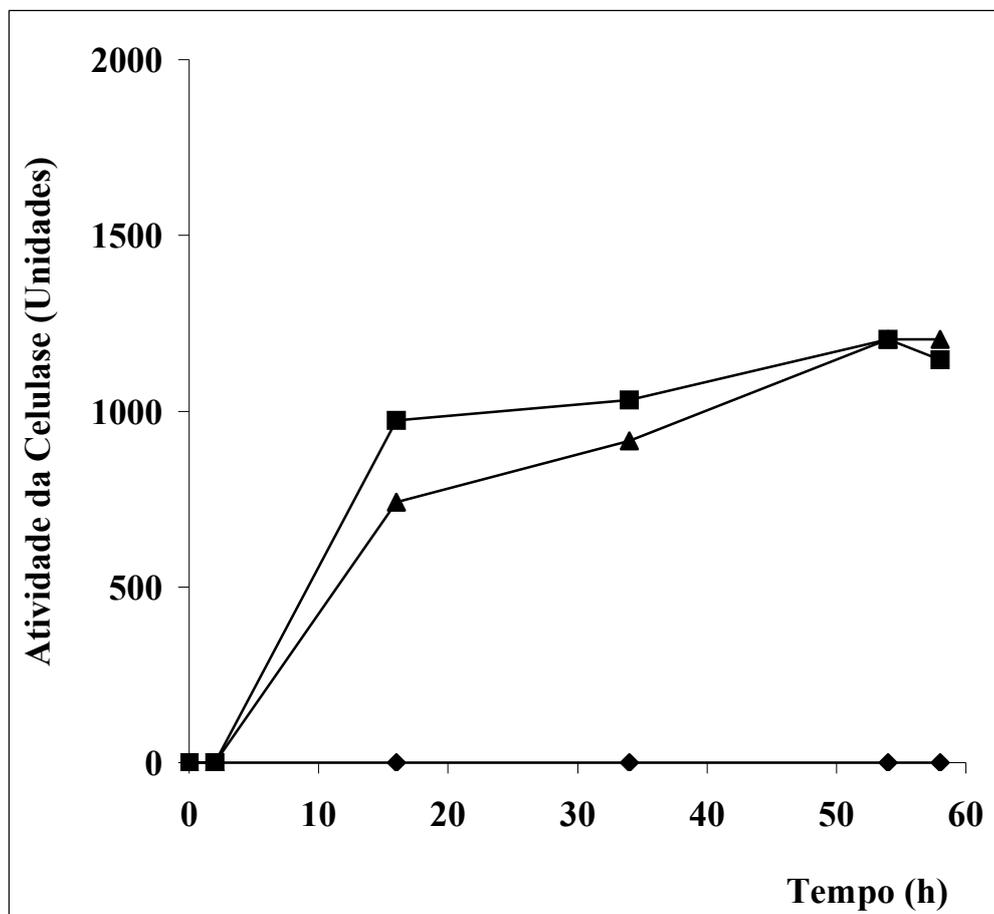


FIGURA 20. Produção de carboximetilcelulase pelo isolado BL16 durante 48 de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 5,0 (Δ), 6,0 (\blacksquare) e 7,0 (\bullet) com temperatura de incubação de 37°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

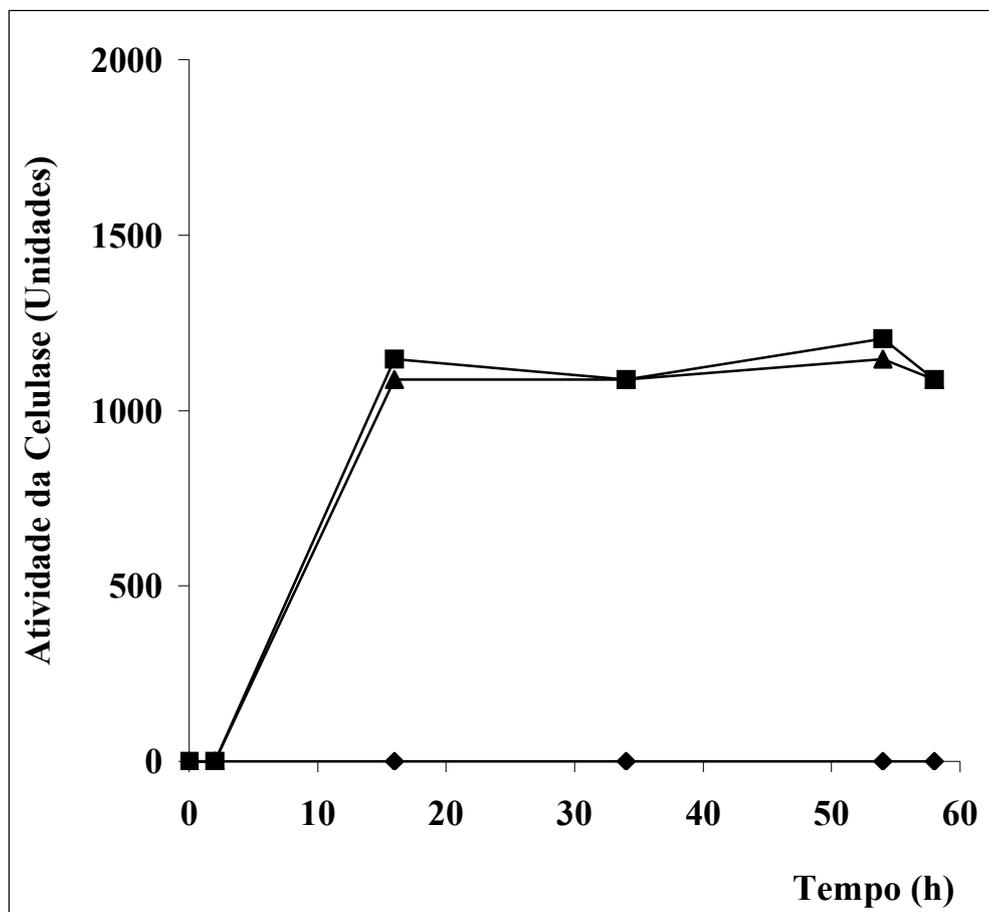


FIGURA 21. Produção de carboximetilcelulase pelo isolado BL20 durante 48 de cultivo em meio LB com ajuste de pH em 5,0 (Δ), 6,0 (\blacksquare) e 7,0 (\diamond) e temperatura de incubação de 37°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

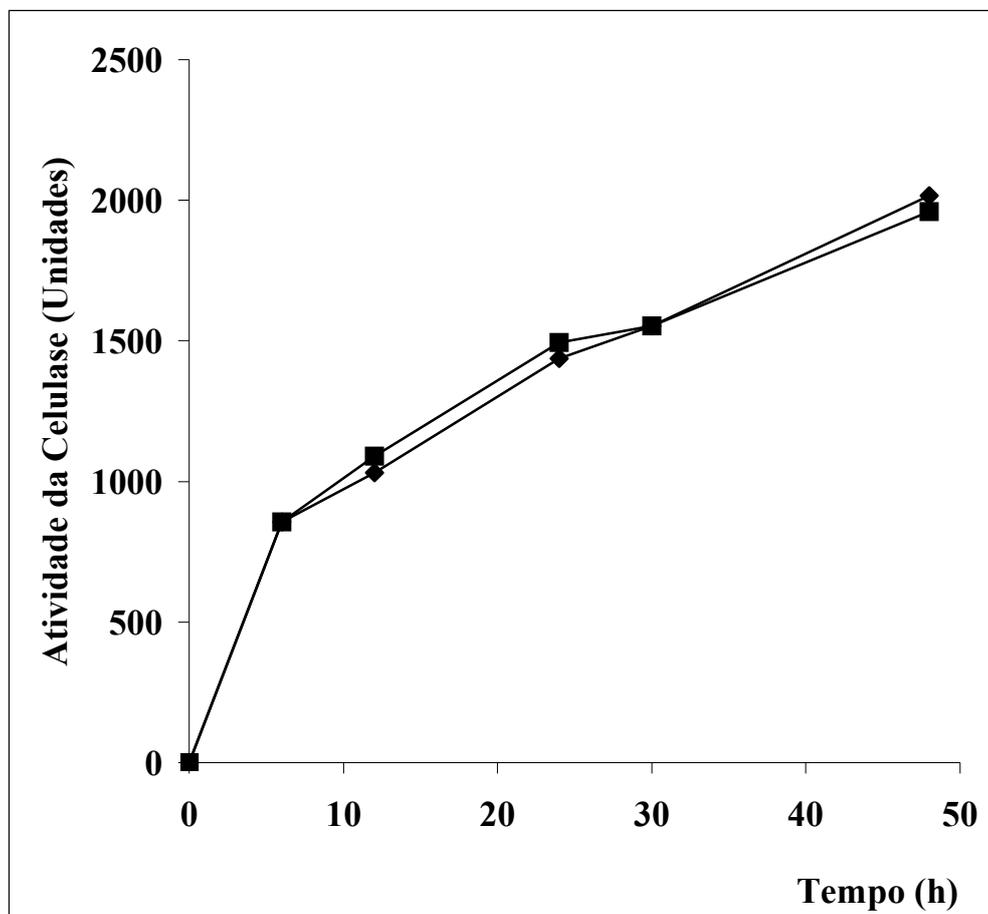


FIGURA 22. Produção de carboximetilcelulase pelos isolados BL16 (v) e BL20 (v), durante 48 de cultivo em meio LB com pH 7,0. Temperatura de incubação de 45°C. Os resultados representam a média de duas determinações.

4.3.3 Atividade de CMCase em meio mineral com diferentes fontes de carbono

O crescimento dos microrganismos BL16 e BL20 foi constatado quando estes foram cultivados em meio mineral Buschnell-Hass (Apêndice 6) contendo manose, lactose, galactose, sacarose ou glicose como única fonte de carbono.

Entretanto, a produção de carboximetilcelulase pelos isolados não foi detectada nos meios de cultivo acrescidos de manose, glicose e sacarose. Em meio contendo lactose a BL20 não apresentou atividade enzimática enquanto a BL16 obteve atividade máxima de 500 unidades em 20 horas de cultivo. Pouca atividade de CMCase foi observada nos cultivos enriquecidos com galactose, tanto para BL16 quanto para BL20.

O efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento de microrganismos foi observado por alguns autores. Jin Cai *et al.* (1999) observou o crescimento de *Volvariella volvacea* em diferentes fontes de carbono, e os resultados indicaram bom crescimento do microrganismo em culturas suplementadas com celobiose, galactose, glicose, lactose, manose e maltose, porém, nos mesmos cultivos não foi detectado atividade de endoglucanase e celobiohidrolase.

Existe a possibilidade das enzimas não detectadas no sobrenadante estarem ligadas à célula ou ao substrato. Segundo Moo Young (1994) esta é presumivelmente a razão pelo qual os mais vigorosos microrganismos celulolíticos como *Cytophaga* sp. e *Bacillus succinogenes* produzam pouca celulose detectável.

4.3.4 Atividade de CMCase em meio LB acrescido de carboidratos

A atividade enzimática foi observada após 48 horas de incubação de ambos isolados em meio LB acrescido de 0,5 % dos açúcares: celobiose, celulose, lactose,

glicose, carboximetilcelulose, metil-glicopirranose, galactose, sacarose, manose, maltose, arabinose e amido. O controle utilizado foi o meio LB.

O sobrenadante foi obtido por centrifugação e inoculado em placas de CMC que foram coradas e analisadas quanto a formação de halos incolores, indicativos de atividade celulolítica.

A utilização de diferentes fontes de carbono para o crescimento bacteriano, resultou em diferentes níveis de produção da enzima pelos isolados.

Segundo Singh e Hayashi (1995), Moo Young (1994) e Persson *et al.* (1991) os melhores indutores do complexo enzimático são celulose, celobiose e lactose, entretanto são necessárias em altas concentrações. Maior produção de carboximetilcelulase (CMCase) foi observada quando foi adicionado celobiose, celulose ou manose no meio, quando comparado ao controle realizado em meio LB (FIGURA 23).

As enzimas celulolíticas são normalmente induzidas na presença de celulose e inibidas na presença de glicose, entretanto, não foi observado menor produção de enzimas pela BL16 e BL20 em cultivos contendo glicose, provavelmente porque a concentração de glicose no meio tenha sido insuficiente para causar inibição.

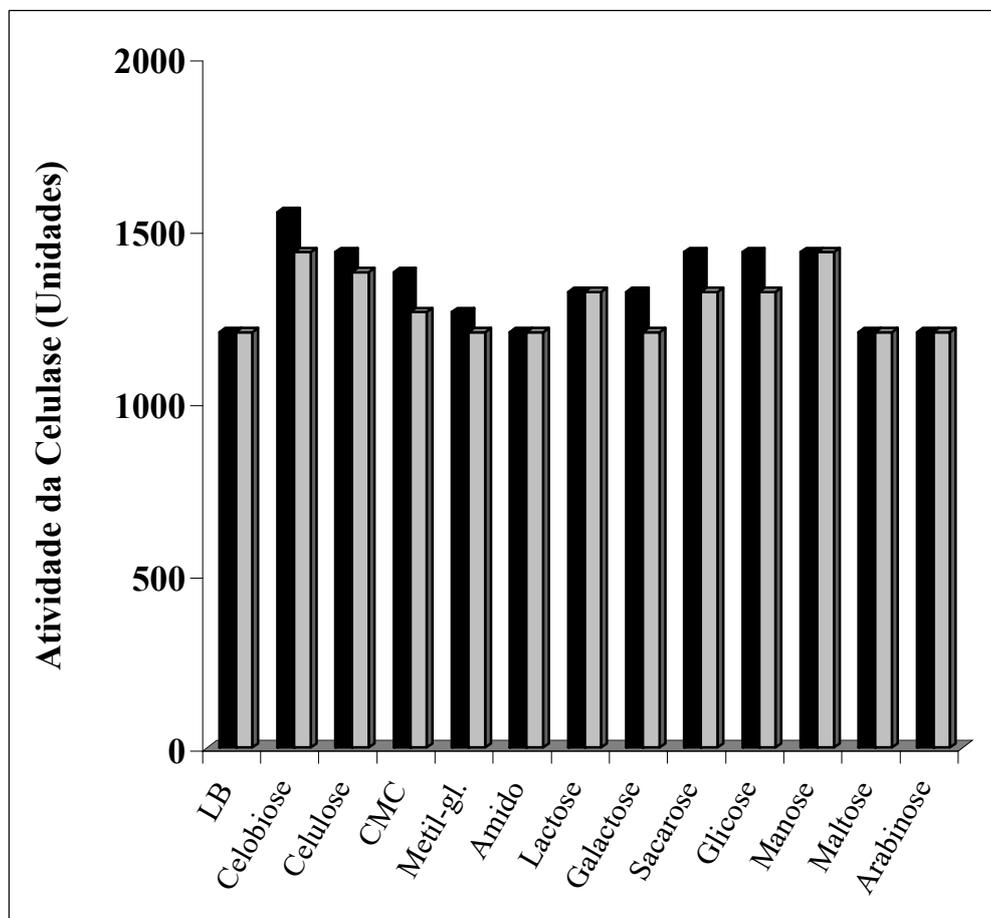


FIGURA 23. Produção de carboximetilcelulase pelos isolados BL16 (v) e BL20 (v) em caldo LB enriquecido com diferentes fontes de carbono, incubados a 30°C durante 48 horas a 125 rpm. As barras representam a média de duas determinações.

4.3.5 Atividade de CMCase em placas contendo 0,1% de CMC com diferentes valores de pH e incubadas em diferentes temperaturas

A hidrólise de carboximetilcelulose em placas contendo 0,1% de CMC foi observada em tratamentos onde o pH foi ajustado em 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0 e as placas incubadas nas temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C e 45°C.

As bactérias foram cultivadas em meio LB durante 24 horas, tempo apropriado para obtenção de sobrenadante com atividade. Amostras de 80 µL do sobrenadante foram inoculadas nas placas de CMC com pH modificado e incubadas durante 16 horas nas temperaturas citadas. Ao término do período de incubação os halos foram medidos.

Observou-se aumento progressivo na hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) pelos isolados BL16 (FIGURA 24) e BL20, paralelo ao aumento da temperatura de incubação. A taxa de hidrólise de CMC foi similar para ambos isolados.

Atividade máxima de carboximetilcelulase foi observada quando as placas foram incubadas a 37°C e 45°C e tiveram seu pH ajustado entre 5,0 e 8,0. Menor taxa de hidrólise foi observada em placas incubadas a 25°C na faixa de pH entre 5,0 e 10,0.

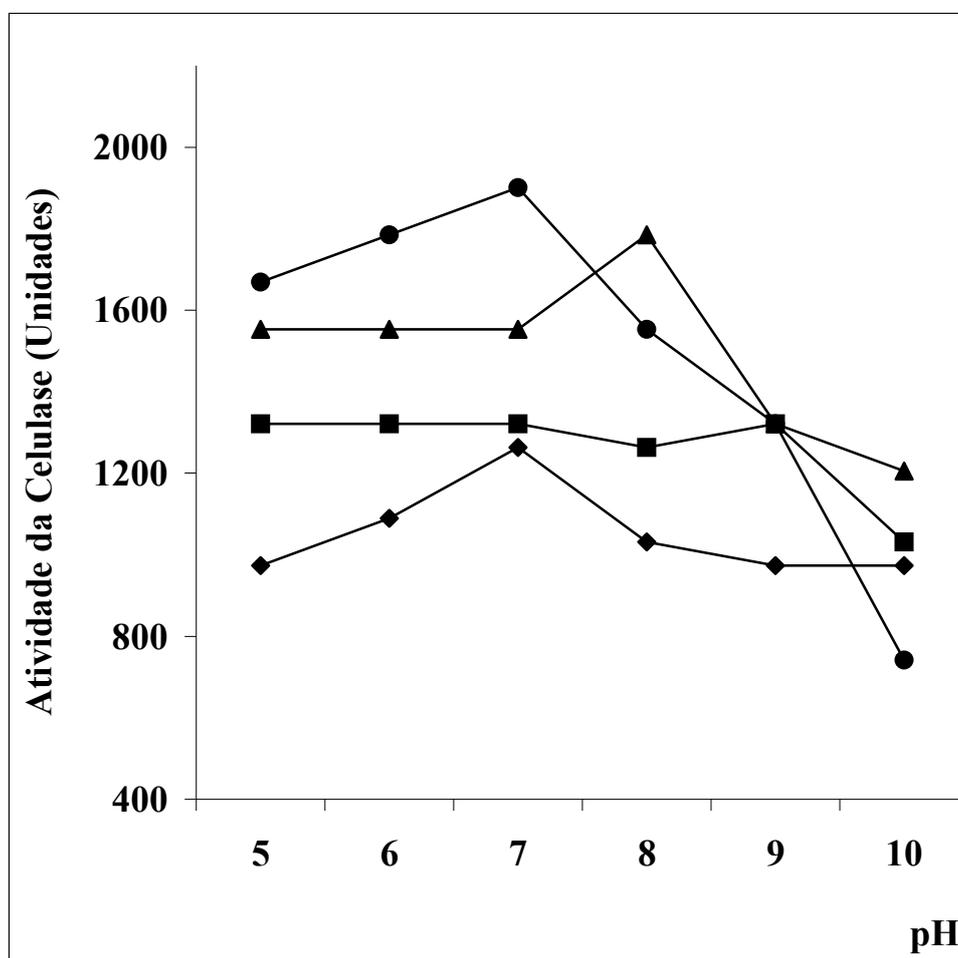


FIGURA 24. Produção de carboximetilcelulase pelo isolado BL16 após 24 de crescimento em meio LB. O sobrenadante foi inoculado em placas contendo CMC com ajuste de pH entre 5 e 10 e incubados nas temperaturas de 25°C (v), 30°C (v), 37°C (σ), 45°C (λ). Os resultados representam a média de dois experimentos.

4.3.6 Avaliação do crescimento e atividade enzimática em diferentes concentrações de cloreto de sódio

O crescimento da BL16 e BL20 e a produção de carboximetilcelulase (CMCase), foram acompanhados em meio LB contendo diferentes concentrações de NaCl. O sobrenadante obtido por centrifugação foi utilizado para análise enzimática pelo método do vermelho congo.

O crescimento dos microrganismos foi constatado nas diferentes concentrações de NaCl testadas. A atividade de CMCase caracterizou-se pela diminuição proporcional da atividade enzimática a partir do aumento da concentração de cloreto de sódio no meio (FIGURA 25).

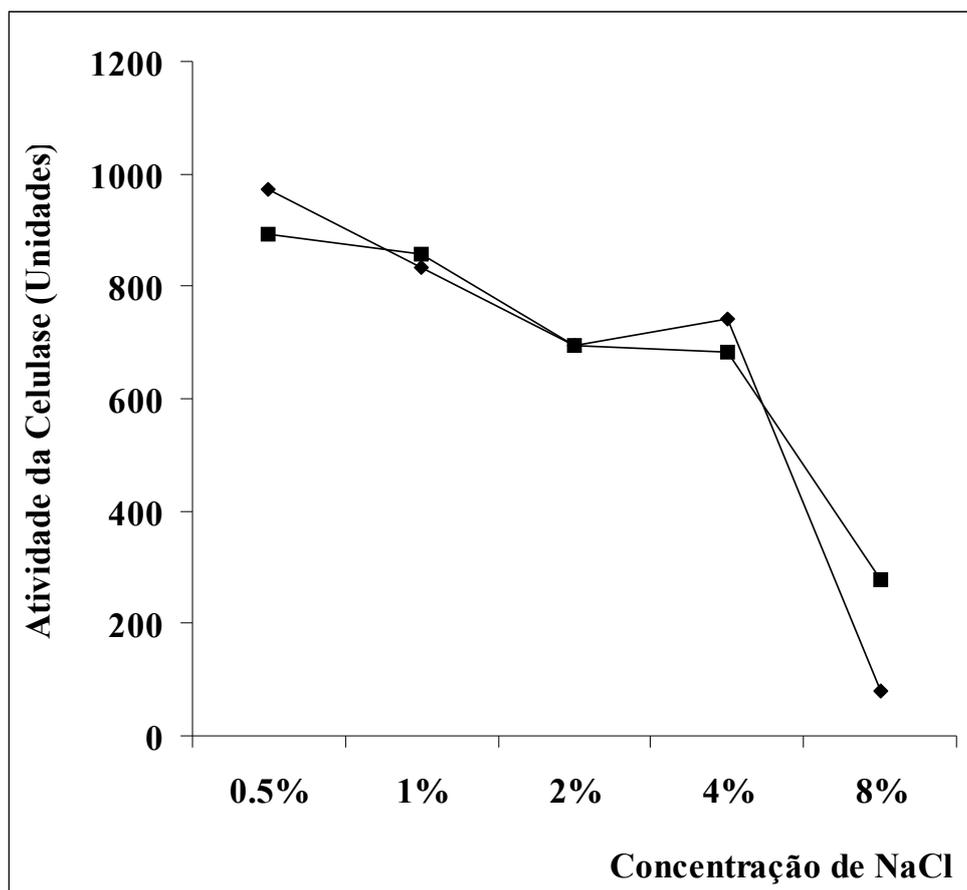


FIGURA 25. Produção de carboximetilcelulase pelos isolados BL16 e BL20 em meio LB contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Incubação a 30°C durante 24 horas. Os resultados representam a média de duas determinações.

4.4 DEGRADAÇÃO DOS RESÍDUOS AGRÍCOLAS PELAS BACTÉRIAS AMAZÔNICAS

Os resíduos de arroz e trigo foram submetidos a diferentes métodos de pré-tratamento e incubados com os microrganismos BL16 e BL20. A quantidade de celulases produzidas e açúcares redutores liberados durante a hidrólise dos substratos foi monitorada. O meio de cultivo foi preparado com 1% de resíduos em meio mineral Buschnell-Hass (Apêndice 6) e tiveram o pH ajustado em 7,0.

Inicialmente, a palha de trigo picada foi pré-tratada com NaOH 1N à 90°C durante 5 horas e, os resultados observados indicaram pouca liberação de açúcares redutores e produção de enzimas celulolíticas pelos microrganismos. O crescimento alcançado pelos microrganismos após 15 dias de cultivo foi de aproximadamente 10^6 U.F.C /mL, a partir de um inóculo inicial de 10^5 U.F.C /mL. A atividade enzimática, foi sempre inferior a 200 unidades.

Embora tratamentos com álcali para lignocelulósicos sejam amplamente descritos, não foram efetivos para melhorar a degradação quando aplicados em palha de trigo e incubados com os isolados BL16 e BL20. Sabe-se que a eficácia de pré-tratamentos químicos varia significativamente de acordo com o resíduo utilizado. Segundo Ryu (1989), a degradabilidade da palha de trigo pode ser aumentada em até 31% após métodos de tratamentos químicos, enquanto o bagaço de cana-de-açúcar após as mesmas condições de tratamento pode aumentar sua degradabilidade em 57%.

Em novo experimento, palha de arroz, palha de trigo e cascas de arroz, foram moídas e incubadas com os microrganismos BL16 e BL20. Pré-tratamentos com

químicos não foram utilizados, visto que os resultados obtidos indicaram baixa produção de celulases.

O efeito de pré-tratamentos na hidrólise da palha de arroz, cascas de arroz e palha de trigo pela BL16 e BL20, indicaram os tratamentos físicos como mais eficazes. Maior concentração de açúcares redutores foi observada em cultivos com a BL16, embora a BL20 tenha obtido melhores resultados na hidrólise da palha de arroz. Atividade enzimática máxima foi observada durante o crescimento dos microrganismos na palha de arroz. A liberação de açúcares redutores e produção de enzimas celulolíticas nos substratos celulósicos podem ser observados na TABELA 4.

TABELA 4. Indução de celulases em meio com substratos celulósicos.

	Palha de trigo	Palha de arroz	Casca de arroz
<i>Hidrólise por BL16</i>			
Celulase (Unidades)	110	450	160
Açúcar redutor ($\mu\text{g/mL}$)	50	25	12
<i>Hidrólise por BL20</i>			
Celulase (Unidades)	160	500	150
Açúcar redutor ($\mu\text{g/mL}$)	20	35	0

Valores determinados em 50 horas de cultivo

Os resultados indicaram que tratamentos físicos para materiais celulósicos foram efetivos na aceleração de sua sacarificação pelas celulases bacterianas BL16 e

BL20. A atividade de celulase foi maior quando os resíduos agrícolas foram fisicamente tratados (FIGURA 26 e 27). Processos de moagem para materiais celulósicos, descritos por Ryu (1989), mostraram-se eficazes na diminuição da cristalinidade e no grau de polimerização na molécula de celulose.

Os microrganismos BL16 e BL20 não foram efetivos na degradação dos resíduos agrícolas com a finalidade de obter-se açúcares fermentáveis. Entretanto, foram capazes de crescer e produzir enzimas em meio mínimo mineral contendo 1 % de material vegetal rico em celulose. Os microrganismos não apresentaram crescimento quando cultivados em meio mínimo mineral contendo celulose purificada como única fonte de carbono, entretanto quando monossacarídeos ou dissacarídeos foram adicionados no meio, crescimento vigoroso foi observado. Sabe-se que muitos microrganismos não crescem bem em meios contendo celulose purificada como única fonte de carbono, no entanto, em substratos vegetais estéreis, os mesmos microrganismos utilizam vigorosamente o polissacarídeo. A adição de compostos orgânicos prontamente metabolizáveis, igualmente aceleram a decomposição da celulose (Alexander,1982).

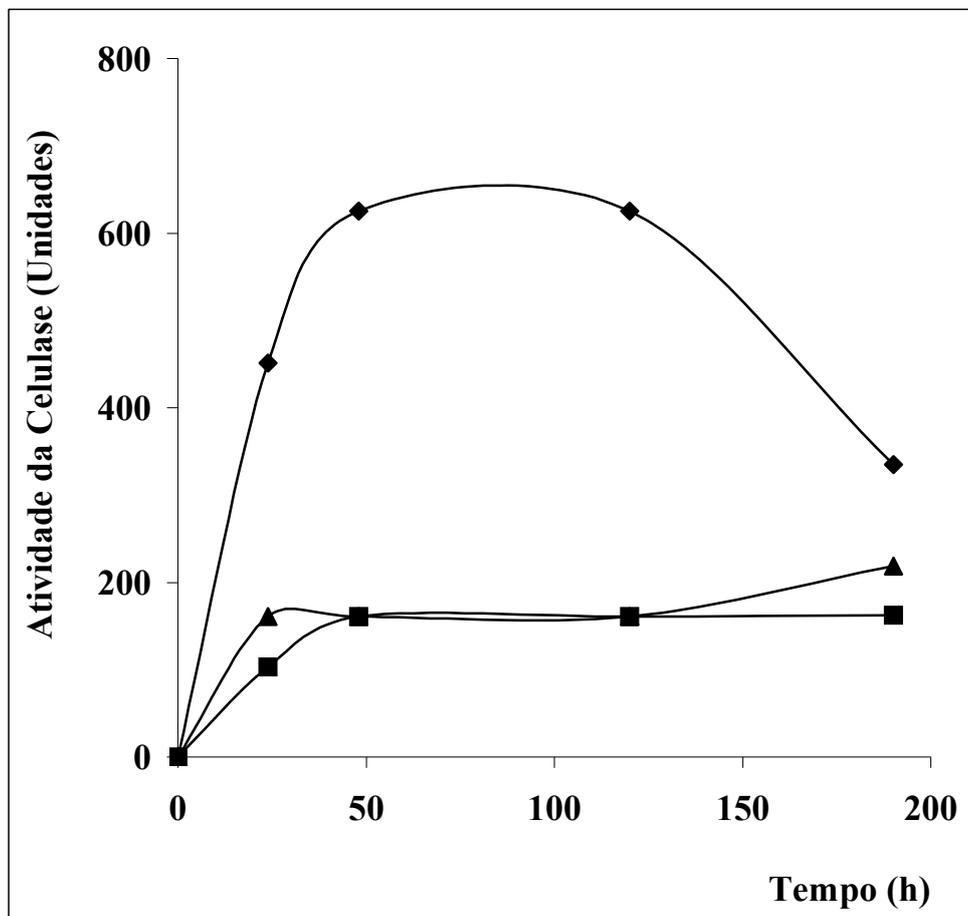


FIGURA 26. Produção de carboximetilcelulase pela bactéria BL16 a partir de palha de arroz (v), palha de trigo (v) e cascas de arroz (σ), em meio mineral Buschnell-Hass incubado à 30°C.

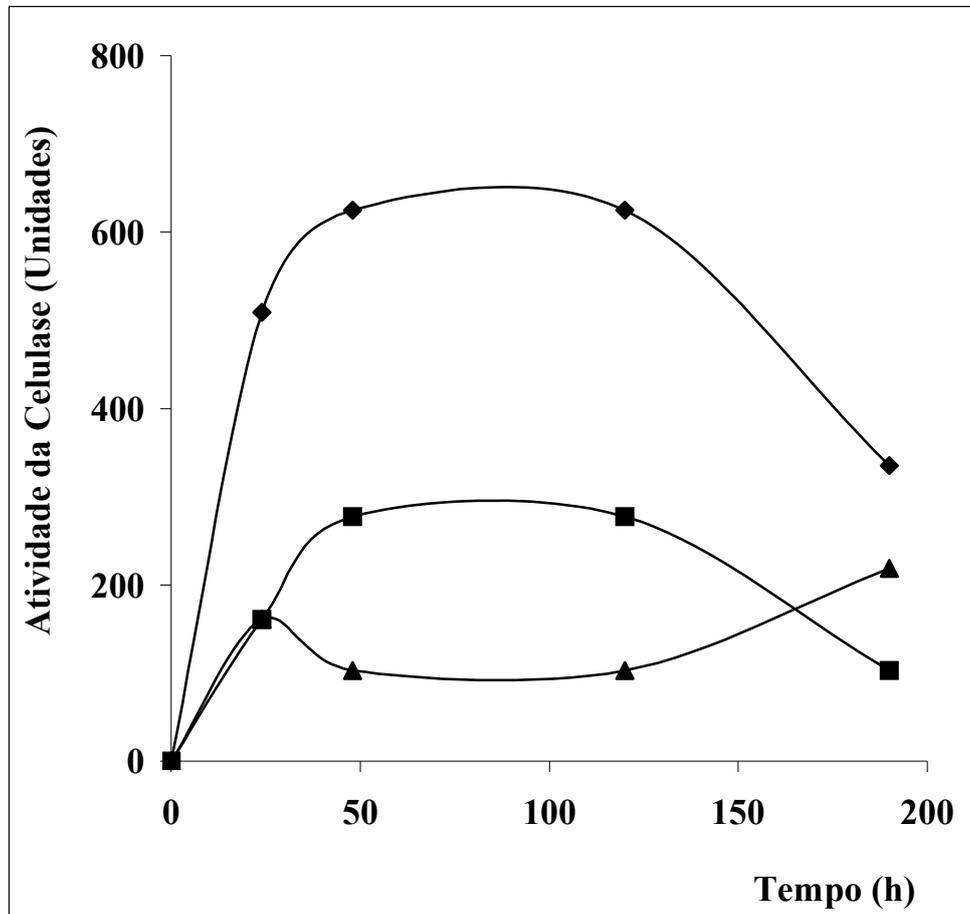


FIGURA 27. Produção de carboximetilcelulase pela bactéria BL20 a partir de palha de arroz (v), palha de trigo (v) e cascas de arroz (σ), em meio mineral Buschnell-Hass incubado à 30°C.

5. CONCLUSÕES

Entre os 87 microrganismos isolados na região amazônica, dois foram selecionados por apresentarem atividade celulolítica. Os microrganismos foram classificados na Classe Scotobacteria. Novos estudos estão sendo realizados na busca da identificação dos isolados, apesar de existir a possibilidade de tratarem-se de microrganismos não descritos anteriormente.

Os microrganismos BL16 e BL20 apresentam ampla diversidade metabólica e atividade enzimática no intervalo de pH entre 6,0 e 9,0 e temperatura de 25°C à 45°C. A produção de carboximetilcelulase pelos isolados ocorreu até 24 horas de cultivo, quando os microrganismos entraram na fase estacionária.

O crescimento dos isolados em meio mínimo mineral suplementado com carboidratos foi constatado em cultivos contendo glicose, manose, sacarose, galactose, celobiose e lactose, entretanto, em cultivos enriquecidos com celulose não foi observado crescimento.

Os isolados BL16 e BL20 foram capazes de utilizar materiais celulósicos como fonte de carbono para o crescimento e produção de enzimas celulolíticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2001: Anuário da Agricultura Brasileira. Brasília : Argos, 2002.

AIT, N.; CREUZET, N.; CATTANEO, J. Properties of β -glucosidases purified from *Clostridium thermocellum*. **Journal of General Microbiology**, New York, v. 128, p.569-577, 1982.

AKIN, D.E.; RIGSBY, L.L.; SETHURAMAN, A.; MORRISON, W.H.; GAMBLE, G.R.; ERIKSSON, K.E. Alterations in Structure, Chemistry, and Biodegradability of Grass Lignocellulose Treated with the White Rot Fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1591-1598, 1995.

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. Jonh Willey & Sons, New York, Second Edition, 1982.

ASIEGBU, F.O.; PATERSON, A.; SMITH, J.E. The effects of co-fungal cultures and supplementation with carbohydrate adjuncts on lignin biodegradation and substrate digestibility. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 273-279, 1996.

BAHL, O.P.; AGRAWAL, M.L. Glycosidases of *Aspergillus niger*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 244, p. 2970-2978, 1969.

BAYER, E.A.; SHIMON, L.J.W.; SHOHAM, Y.; LAMED, R. Cellulosomes-Structure and Ultrastructure. **Journal of Structural Biology**, Duluth, Minn, v. 124, p. 221-234, 1998.

BELAICH, J.P.; TARDIF, C.; BELAICH, A.; GAUDIN, C. The Cellulolytic System of *Clostridium cellulolyticum*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 57, p. 3-14, 1997.

BERG, L. R. **Introductory Botany**. Florida : Saunders College, 1997.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P. **Introdução à Química de Alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p. 2647-2653, 1997.

BOWES, B.G. **A Color Atlas of Plant Structure**. Ames, New York : Iowa State University, 1996.

BRONNENMEIER, K.; KERN, A.; LIEBL, W.; STAUDENBAUER, W. Purification of *Thermotoga maritima* Enzymes for the Degradation of Cellulosic Materials. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1399-1407, 1995.

CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; ALFANI, F. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Water-Immiscible Solvent Systems. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 672, p.318-322, 1992.

CARDER, J.K. Detection and Quantitation of Cellulases by Congo Red Staining of Substrates in a Cup-plate Diffusion Assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v.153, p.75-79, 1986.

CHAHAL, P.S.; CHAHAL, D.S.; ANDREE, G. Cellulase Production Profile of *Trichoderma reesei* on Different Cellulosic Substrates at Various pH Levels. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 74, p.126-128, 1992.

CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. (Eds.) **Carbohydrate Analysis**, Oxford: IRL Press, 1986. p. 1-3.

CHEN, S.; WAYMAN, M. Cellulase Production Induced by Carbon Sources Derived from Waste Newspaper. **Process Biochemistry**, London, v. 26, p. 93-100, 1991.

DA SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; Gomes, E. Pectinase, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Boletim SBCTA**. Campinas, v. 31, p. 249-260, 1997.

ERIKSSON, K.E.; JOHNSRUD, S.C.; VALLANDER, L. Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulvurentum*. **Archives Microbiology**, Washington, v.135, p. 161-168, 1983.

EVELEIGH, D.E.; BOK, J.D.; EL-DORRY, H.; EL-GOGARY, S.; ELLISTON, K.; GOYAL, A.; WALDRON, C.; WRIGHT, R.; WU Y.M. Cellulase Lessons Revealed Through the Microbe's Perspective. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 51/52, p. 169-177, 1995.

GAL, L.; PAGES, S.; GAUDIN, C.; BELAICH, A.; REVERBEL-LEROY, C.; TARDIF, C.; BELAICH, J. Characterization of the Cellulolytic Complex

(Cellulossome) Produced by *Clostridium cellulolyticum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p. 903-909, 1997.

GASH, J H.C.; NOBRE, C.A.; ROBERTS, J.M.; VICTORIA, R.L. **Amazonian Deforestation and Climate**. New York : John Wiley & Sons, 1996. p. 188-209.

GEIMBA, M. P.; RIFFEL, A.; AGOSTINI, V.; BRANDELLI, A. Characterisation of cellulose-hydrolysing enzymes from the fungus *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 1849-1854, 1999.

GONÇALVES, M.B.F.; SACCOL, A.G.F. **Alimentação animal com resíduo de arroz**. Santa Maria, RS : Agropecuária LP, 1995. 73 p.

GUERRA, A.F.; SILVA, D.B.; RODRIGUES, G.C. **Trigo para abastecimento familiar**. Brasília, DF : EMBRAPA, 1996. p.176

HECK, J.X.. **Aproveitamento de um resíduo industrial fibroso de soja para o desenvolvimento de um processo de cultivo semi-sólido**. 2001. 86f. Mestrado (Dissertação) – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

HOLT, J.G. (Ed). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v.1 e v.2.

JIN CAI, Y.; CHAPMAN, S.J.; BUSWELL, J.; CHANG, S.T. Production and Distribution of Endoglucanase, Cellobiohydrolase, and β -Glucosidase Components of the Cellulolytic System of *Volvoriella volvacea*, the Edible Straw Mushroom. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p. 553-559, 1999.

KIM, H.; AHN, D.H.; JUNG, K.H.; PACK, M.Y. Adsorption of *Bacillus subtilis* endo- β -1,4-glucanase to cellulosic materials. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Philadelphia, v. 41, p. 665-677, 1997.

KORENAGA, T.; FUJII, S. Separation and Enzymatic Saccharification of Cellulose from Wakame. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 13, p. 865-871, 2000.

KUBICEK, C.; BOLZLBAUER, U.M.; KOVACS, W.; MACH, R.L.; KUHL, K.; LIECKFELDT, E.; BORNER, T.; SAMUELS, G.J. Cellulase Formation by Species of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and of *Hypocrea* spp. With Anamorphs Referable sect. *Longibrachiatum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.20, p. 105-114, 1996.

LEE, D.; YU, A.H.C.; WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. Evaluation of the Enzymatic Susceptibility of Cellulosic Substrates Using Specific Hydrolysis Rates and Enzyme Adsorption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 45/46, p. 407-415, 1994.

LEE, S.S.; HA, J.K.; CHENG, K.J. Relative Contributions of Bacteria, Protozoa, and Fungi to In Vitro Degradation of Orchard Grass Cell Walls and Their Interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3807-3813, 2000.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of Saccharifying Cellulase. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 6, p.21-23, 1976.

MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B. Purification and Characterization of Cellulases Produced by Two *Bacillus* Strains. **Journal of Biotechnology**; Amsterdam, v.83, p.177-187, 2000.

MICROBIOLOGY System:Zone Diameter Interpretative Chart. Cockeysville, USA : Becton & Dickinson CO., 1995.

MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**: The Principles, Applications & Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. London : Pergamon, 1994. v.4, p. 835-845.

MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**. The Principles, Applications & Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. London: Pergamon., 1994 v. 3, p. 344-357.

NANDA, M.; BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Localization and Release Mechanism of Cellulases in *Trichoderma reesei* QM 9414. **Biotechnology Letters**, Rew, v. 4, p. 633-638, 1984.

OHMIYA, K.; SAKKA, K.; KARITA, S.; KIMURA, T. Structure of Cellulases and Their Applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, London, v. 14. p. 365-414. 1997.

OOSHIMA, H.; ASO, K.; HARANO, Y. Microwave Treatment of Cellulosic Materials for Their Enzymatic Hydrolysis. **Biotechnology Letters**, Rew, v.6, p. 289-294, 1984.

PEARCE, P.D.; BAUCHOP, T. Glycosidases of the Rumen Anaerobic Fungus *Neocallimastix frontalis* Grown on Cellulosic Substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1265-1269, 1985.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HAGERDAL, B. Fungal Cellulolytic Enzyme Production: A Review. **Biochemistry**, London, v. 26, p. 65-74, 1991.

PRASERTSAN, P.; DOELLE, H.W. Nutrient optimization for cellulase biosynthesis by a newly isolated *Cellulomonas* sp. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 3, p. 33-44, 1987.

REYES, M.P.; CORONA, F.G. The bifunctional enzyme chitosanase-cellulase produced by the gram-negative microorganism *Myxobacter* sp. AL-1 is Highly similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases. **Archives Microbiology**, Washington, v.168, p.321-327, 1997.

ROBSON, L.M.; CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme Microbiology Technology**, Surrey, v. 11, p. 626-644, 1989.

ROLLE, R. S. Review: Enzyme Applications for Agro-Processing in Development Countries: An Inventory of Current and Potential Applications. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, p. 611-619, 1998.

RYU, D.D.Y. Enhancement of Nutritional Value of Cellulosic Feed Resources by Pretreatment and Bioconversion. In: FAO-USA. **Biotechnology for Livestock Production**, New York : Plenum, 1989. p.223-243.

RYU, D.D.Y.; LEE, S.B.; TASSINARI, T.; MACY, C. Effects of compression milling on cellulose structure and hydrolysis kinetics. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v.24, p. 1047-1067, 1982.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4th. Ed. San Diego, California : Wadsworth Publishing, 1992.

SANGSEETHONG, K.; MEUNIER-GODDIK, L.; TANTASUCHARIT, U.; LIAW, E.T.; PENNER, M.H. Rationale for particle size effect on rates of enzymatic saccharification of microcrystalline cellulose. **Journal of Food Biochemistry**, Trumbull, v.22, p. 321-330, 1998.

SCOTT, T.C.; COSGROVE, C.L.; COON, C.L.; KENNEY, J.A.; SCOTT, C.D. Use of Cellulase from *Pseudomonas Fluorescens* for the Hydrolysis of Waste Paper in a Attrition Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.51/52, p.537-543, 1995.

SELINGER, L.B.; FORSBERG, C.W.; CHENG, K.J. The Rumen: A Unique Source of Enzymes for Enhancing Livestock Production. **Anaerobe**, London, v.2, p. 263-284, 1996.

SEWALT, V.J.H.; GLASSER, W.G.; BEAUCHEMIN, K.A. Lignin Impact on Fiber Degradation. 3. Reversal of Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Chemical Modification of Lignin and by Additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 1823-1828, 1997.

SHEWALE, J.G.; SADANA, J.C. Cellulase and β -glucosidase production by a basidiomycetes species. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 1204-1216, 1978.

SILVA, M.V. **A Cultura do Arroz**. 2. Ed. [S.l.] : Clássica, 1987.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial Cellulases: Protein Architecture, Molecular Properties and biosyntheses. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, Califórnia, v.40, p.1-44, 1995.

SMRITI, G.G.S.; Purification and characterization of a cellulase from *Catharanthus roseus* stems. **Phytochemistry**, New York, v. 52, p. 7-13, 1999.

SPEEDING, C.R.W.; WALSINGHAM, J.M.; HOXEY, A.M. **Biological Efficiency in Agriculture**. [S.l. : s.n.], 1981.

STAHLBERG, J.; JOHANSSON, G.; PETERSSON, G. *Trichoderma reesei* has no true exo-cellulase: all intact and truncated cellulases produce new reducing end groups on cellulose. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1157, p. 107-113, 1993.

STOTZKY, G.; BOLLAG, J.M. **Soil Biochemistry**. New York : [s.n.], 1996. v.9

VARES, T.; KALSI, M.; HATAKKA, A.; Lignin Peroxidases, Manganese and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3515-3520, 1995.

VIEIRA, N.R.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A Cultura do Arroz no Brasil**. Brasília : EMBRAPA, 1999.

WOOD, T. M.; BHAT, K. Methods for Measuring Cellulase Activities. **Methods in Enzymology**, New York, v. 160, p.87-107, 1984.

ZHOU, S.; INGRAM, L. Synergistic Hydrolysis of Carboxymethyl Cellulose and Acid-Swollen Cellulose by Two Endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, p.5676-5682, 2000.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1

Ágar LB (Luria Broth)

Reagentes	g / L
Peptona Bacteriológica	10
Extrato de Levedura	5
NaCl	10
Ágar	15

Dissolver em 1 litro de água destilada.

Ágar Celulose

Reagentes	g / L
Celulose	1
Carboximetilcelulose	1
Glicose	5
Ágar	15

Dissolver em 1 L de água de destilada.

Ágar Cérebro Coração (BHI)

Reagentes	g / L
Infusão de cérebro bovino	12,5
Infusão de coração bovino	5
Peptona	10
Glicose	2
Cloreto de sódio	5
Fosfato disódico	2,5
Ágar	15

Dissolver 37 g em 1 L de água destilada.

Ágar Nutriente

Reagentes	g / L
Peptona	5
Extrato de carne	1
Extrato de levedura	2
Ágar	15

Dissolver 8 g em 1 L de água destilada.

Ágar CMC para o teste do Vermelho Congo

Reagentes	g / L
Carboximetilcelulose (CMC)	1
Ágar	15

Dissolver em 1 L de tampão fosfato 0,1M e pH ajustado para 6,0.

APÊNDICE 6

Meio Mineral Buschnell-Hass

Reagentes	g / L
MgSO ₄	0,2
CaCl ₂	0,02
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
NH ₄ NO ₃	1,0
FeCl ₂ .6H ₂ O	0,05

Dissolver em 1 L de água destilada.

Solução Vermelho Congo

Reagente	g / L
Vermelho Congo	1

Dissolver em 1 L de água destilada.

PBS

Reagentes	g / L
$\text{Na}_2\text{H PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	3,046
$\text{Na H}_2 \text{ PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,207
NaCl	8,766

Dissolver em 1 L de água destilada.

Tampão Fosfato 0,1 M

Reagentes	g / L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$	4,47
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	25,81
NaN_3	0,2

Dissolver em 1 L de água destilada e ajustar o pH em 6,0.

Tampão Citrato 0,25 M

Reagentes	g / L
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$	73,5

Dissolver em 1 L de água destilada e ajustar o pH em 5,0.

Solução Carbonato/Bicarbonato

Reagentes	g / L
NaHCO ₃	42
Na ₂ CO ₃	53

Dissolver em 1 L de água destilada e ajustar o pH em 10,0.

Ácido Dinitrosalicílico

Reagentes	g / 250 mL
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	0,25
Tartarato de sódio e potássio	75

Dissolver em 50 mL de solução aquosa NaOH 2 M.

Diluir a solução resultante com água destilada até completar 250 mL.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN, D.E.; RIGSBY, L.L.; SETHURAMAN, A.; MORRISON, W.H.; GAMBLE, G.R.; ERIKSSON, K.E. Alterations in Structure, Chemistry, and Biodegradability of Grass Lignocellulose Treated with the White Rot Fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 1591-1598, 1995.

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. Jonh Willey & Sons, New York, Second Edition, 1982.

ASIEGBU, F.O.; PATERSON, A.; SMITH, J.E. The effects of co-fungal cultures and supplementation with carbohydrate adjuncts on lignin biodegradation and substrate digestibility. **World Journal of Microbiology & Biotecnology**. v. 12, p. 273-279, 1996.

BAHL, O.P.; AGRAWAL, M.L. Glycosidases of *Aspergillus niger*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 244, p. 2970-2978, 1969.

BAYER, E.A.; SHIMON, L.J.W.; SHOHAM, Y.; LAMED, R. Cellulosomes- Structure and Ultrastructure. **Journal of Structural Biology**. v. 124, p. 221-234, 1998.

BELAICH, J.P.; TARDIF, C.; BELAICH, A.; GAUDIN, C. The Cellulolytic System of *Clostridium cellulolyticum*. **Journal of Biotechnology**. v.57, p. 3-14, 1997.

BERG, L.R.; **Introductory Botany**. Saunders College Publishing. Florida. 1997.

BLAIR,, B.G.; ANDERSOS, K.L. Cellulose-inducible Ultrastructural Protuberances and Cellulose-affinity Proteins of *Eubacterium cellulosolvens*. **Anaerobe**. v. 5, p. 547-554,1999.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P. **Introdução à Química de Alimentos**. Varela 2ª edição. São Paulo, 1992

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, p. 2647-2653, 1997.

BOWES, B.G. **A Color Atlas of Plant Structure**. Iowa State University Press. Ames. New York, 1996.

BRONNENMEIER, K.; KERN, A.; LIEBL, W.; STAUDENBAUER, W. Purification of *Thermotoga maritima* Enzymes for the Degradation of Cellulosic Materials. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 1399-1407, 1995.

CANTARELA, M.; CANTARELA, L.; GALLIFUOCO, A.; ALFANI, F. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Water-Immiscible Solvent Systems. **Annals New York Academy of Sciences**. v. 672, p.318-322, 1992.

CARDER, J.K. Detection and quantitation of Cellulases by Congo Red Staining of Substrates in a Cup-plate Diffusion Assay. **Anal Biochem**. v. 153, p.75-79, 1986.

CAVAZZONI, V.; MANZONI, M. Extracelular Cellulolytic Complex from *Morchella conica*: Production and Purification.

CHAHAL, P.S.; CHAHAL, D.S.; ANDREE, G. Cellulase Production Profile of *Trichoderma reesei* on Different Cellulosic Substrates at Various pH Levels. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Osaka, v. 74, p.126-128, 1992.

CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. (Eds.) **Carbohydrate Analysis**. Oxford: IRL Press, 1986. p. 1-3.

CHEN, S.; WAYMAN, M. Cellulase Production Induced by Carbon Sources Derived from Waste Newspaper. **Process Biochemistry**. v. 26, p. 93-100, 1991.

DA SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; Gomes, E. Pectinase, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Bol. SBCTA**. Campinas, v. 31, p. 249-260, 1997.

DICKINSON, B. Microbiology System. **Zone Diameter Interpretative Chart..** Becton Dickinson CO. Cockeysville, USA, 1995.

ERIKSSON, K.E.; JOHNSRUD, S.C.; VALLANDER, L. Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulvurulentum*. **Arch Microbiology**. v.135, p. 161-168, 1983.

EVELEIGH, D.E.; BOK, J.D.; EL-DORRY, H.; EL-GOGARY, S.; ELLISTON, K.; GOYAL, A.; WALDRON, C.; WRIGHT, R.; WU Y.M. Cellulase Lessons Revealed Through the Microbe's Perspective. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 51/52, p. 169-177, 1995.

GAL, L.; PAGES, S.; GAUDIN, C.; BELAICH, A.; REVERBEL-LEROY, C.; TARDIF, C.; BELAICH, J. Characterization of the Cellulolytic Complex (Cellulosome) Produced by *Clostridium cellulolyticum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, p. 903-909, 1997.

Garret *et al.*, 1979

GASH, J H.C.; NOBRE, C.A.; ROBERTS, J.M.; VICTORIA, R.L. **Amazonian Deforestation and Climate**. John Wiley & Sons, New York, p. 188-209, 1996.

GEIMBA, M. P.; RIFFEL, A.; AGOSTINI, V.; BRANDELLI, A. Characterisation of cellulose-hydrolysing enzymes from the fungus *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, p. 1849-1854, 1999.

(Gonçalves e Saccol, 1995).

GUERRA, A.F.; SILVA, D.B.; RODRIGUES, G.C. **Trigo para abastecimento familiar**. EMBRAPA. Brasília, DF. p.176, 1996.

HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E. Enzymatic Production of Reducing Sugars from Corn Cobs. **Lebensm. Wiss. U. Technology**. v. 34, p. 140-142, 2001.

HECK, J.H. **Aproveitamento de um resíduo industrial fibroso de soja para o desenvolvimento de um processo de cultivo semi-sólido**. Porto Alegre, 2001.

HOLT, J.G. (Ed). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v.1 e v.2.

KIM, H.; AHN, D.H.; JUNG, K.H.; PACK, M.Y. Adsorption of *Bacillus subtilis* endo- β -1,4-glucanase to cellulosic materials. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 41, p. 665-677, 1997.

KORENAGA, T.; FUJII, S. Separation and Enzymatic Saccharification of Cellulose from Wakame. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 13, p. 865-871, 2000.

KUBICEK, C.; BOLZLBAUER, U.M.; KOVACS, W.; MACH, R.L.; KUHL, K.; LIECKFELDT, E.; BORNER, T.; SAMUELS, G.J. Cellulase Formation by Species of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and of *Hypocrea* spp. With Anamorphs Referable sect. *Longibrachiatum*. **Fungal Genetics and Biology**. v.20, p. 105-114, 1996.

LEE, D.; YU, A.H.C.; WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. Evaluation of the Enzymatic Susceptibility of Cellulosic Substrates Using Specific Hydrolysis Rates and Enzyme Adsorption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 45/46, p. 407-415, 1994.

LEE, S.S.; HA, J.K.; CHENG, K.J. Relative Contributions of Bacteria, Protozoa, and Fungi to In Vitro Degradation of Orchard Grass Cell Walls and Their Interactions. **Applied and Environmental microbiology**. v. 66, p. 3807-3813, 2000.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of Saccharifying Cellulase. **Biotechnology & Bioengineering**. New York, v. 6, p.21-23, 1976.

MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B. Purification and Characterization of Cellulases Produced by Two *Bacillus* Strains. **Journal of Biotechnology**. v.83, p.177-187, 2000.

MICARD, V.; RENARD, C.M.G.C.; THIBAUT, J.F. Influence of Pretreatments on Enzymic Degradation of a Cellulose-rich Residue from Sugar-beet Pulp. p. 284-291, 1996.

MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology. The Principles, Applications & Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**. Volume IV. Editora Pergamon. London, p. 835-845, 1994.

MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology. The Principles, Applications & Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**. Volume III. Editora Pergamon. London, p. 344-357, 1994.

MUNDSTOCK, C.M. **Cultivo dos cereais de estação fria**. Porto Alegre, RS, 1983.

NANDA, M.; BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Localization and Release Mechanism of Cellulases in *Trichoderma reesei* QM 9414. **Biotechnology Letters**. v. 4, p. 633-638, 1984.

OHMIYA, K.; SAKKA, K.; KARITA, S.; KIMURA, T. Structure of Cellulases and Their Applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** . v. 14. p. 365-414. 1997.

OOSHIMA, H.; ASO, K.; HARANO, Y. Microwave Treatment of Cellulosic Materials for Their Enzymatic Hydrolysis. **Biotechnology Letters**. v.6, p. 289-294, 1984.

PEARCE, P.D.; BAUCHOP, T. Glycosidases of the Rumen Anaerobic Fungus *Neocallimastix frontalis* Grown on Cellulosic Substrates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 49, p. 1265-1269, 1985.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HAGERDAL, B. Fungal Cellulolytic Enzyme Production: A Review. **Biochemistry**. Londres, v. 26, p. 65-74, 1991.

PRASERTSAN, P.; DOELLE, H.W. Nutrient optimization for cellulase biosynthesis by a newly isolated *Cellulomonas* sp. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. Oxford, v. 3, p. 33-44, 1987.

REYES E CORONA, 1997

ROBSON, L.M.; CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme Microbiology Technology**. Surrey, v. 11, p. 626-644, 1989.

ROLLE, R. S. Review: Enzyme Applications for Agro-Processing in Development Countries: Na Inventory of Current and Potential Applications. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 14, p. 611-619, 1998.

RYU, D.D.Y. Enhancement of Nutritional Value of Cellulosic Feed Resources by Pretreatment and Bioconversion. In **Biotechnology for Livestock Production**. Ed by Food and Agriculture Organization of the United States, Plenum, New York, p.223-243, 1989.

RYU, D.D.Y.; LEE, S.B.; TASSINARI, T.; MACY, C. Effects of compression milling on cellulose structure and hydrolysis kinetics. **Biotechnology & Bioengineering**. v.24, p. 1047-1067, 1982.

SCOTT, T.C.; COSGROVE, C.L.; COON, C.L.; KENNEY, J.A.; SCOTT, C.D. Use of Cellulase from *Pseudomonas Fluorescens* for the Hydrolysis of Waste Paper in an Attrition Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.51/52, p.537-543, 1995.

STAHLBERG, J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. Trichoderma reesei has no true exo-cellulase: all intact and truncated cellulases produce new reducing end groups on cellulose. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1157, p. 107-113, 1993.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Fourth Edition. Wadsworth Publishing Company. California. 1992.

SANGSEETHONG, K.; MEUNIER-GODDIK, L.; TANTASUCHARIT, U.; LIAW, E.T.; PENNER, M.H. Rationale for particle size effect on rates of enzymatic saccharification of microcrystalline cellulose. **Journal of Food and Biochemistry**. v.22, p. 321-330, 1998.

SELINGER, L.B.; FORSBERG, C.W.; CHENG, K.J. The Rumen: A Unique Source of Enzymes for Enhancing Livestock Production. **Anaerobe**.1996

SEWALT, V.J.H.; GLASSER, W.G.; BEAUCHEMIN, K.A. Lignin Impact on Fiber Degradation. 3. Reversal of Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Chemical Modification of Lignin and by Additives. **Journal Agric. Food Chem**. v. 45, p. 1823-1828, 1997.

SHEWALE, J.G.; SADANA, J.C. Cellulase and β -glucosidase production by a basidiomycetes species. **Canadian Journal Microbiology**. Ottawa, v. 24, p. 1204-1216, 1978.

SILVA, M.V. **A Cultura do Arroz**. Clássica Editora. 2ª Edição. 1987.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial Cellulases: Protein Architecture, Molecular Properties and biosyntheses. **Advances in Applied Microbiology**. v. 40, p. 1-44, 1995.

SMRITI, G.G.S.; Purification and characterization of a cellulase from *Catharanthus roseus* stems. **Phytochemistry**. v. 52, p. 7-13, 1999.

SPEDDING, C.R.W.; WALSINGHAM, J.M.; HOXEY, A.M. **Biological Efficiency in Agriculture**. England. 1981.

STAHLBERG, J.; JOHANSSON, G.; PETERSSON, G. *Trichoderma reesei* has no true exo-cellulase: all intact and truncated cellulases produce new reducing end groups on cellulose. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1157, p. 107-113, 1993.

STOTZKY, G.; BOLLAG, J.M. **Soil Biochemistry**. Volume 9. New York. 1996.

VARES, T.; KALSI, M.; HATAKKA, A.; Lignin Peroxidases, Manganese and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 3515-3520, 1995.

VIEIRA, N.R.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A Cultura do Arroz no Brasil**. EMBRAPA, 1999.

WALKER, L.P. Multiplicity in cellulase type, function and cooperation. **Cornell Nutrition Conference**. p. 155-161, 1994.

WOOD, T.M.;BHAT, K. Methods for Measuring Cellulase Activities. **Methods in Enzymology**. v. 160, p.87-107, 1984.

YI JIN CAI, S.J.C.; BUSWELL, J.; CHANG, S.T. Production and Distribution of Endoglucanase, Cellobiohydrolase, and β -Glucosidase Components of the Cellulolytic System of *Volvariella volvacea*, the Edible Straw Mushroom. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, p. 553-559, 1999.

ZHOU, S. INGRAM, L. Synergistic Hydrolysis of Carboxymethyl Cellulose and Acid-Swollen Cellulose by Two Endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. **Journal of Bacteriology**. v.182, p.5676-5682, 2000.

_____, **Agrianual 2001: anuário da Agricultura Brasileira**. Editora Argos. 2002.