

**Isolamento de bactérias
com habilidade hidrolítica
da biomassa em sistema
de compostagem**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 70

Isolamento de bactérias com habilidade hidrolítica da biomassa em sistema de compostagem

Flávia Hermelina da Rocha Santos
Beatriz Miranda da Silva
Marlei de Souza Vicente
Veronica Massena Reis
Luis Henrique de Barros Soares

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme

Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

Revisão de texto: Ederson Jesus, Bruno José Rodrigues Alves,

Marco Antonio de Almeida Leal

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Felipe Ferreira

1ª edição

1ª impressão (2010): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

ISOLAMENTO de bactérias com habilidade hidrolítica da biomassa em sistema de compostagem. / Flávia Hermelina da Rocha Santos, et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 19 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 70).

ISSN 1676-6709

1. Celulolíticos. 2. Biodegradação. 3. Enzimas. I.

Santos, Flávia Hermelina da Rocha. II. Silva, Beatriz Miranda da.

3. Vicente, Marlei de Souza. IV. Reis, Veronica Massena. V.

Soares, Luis Henrique Barros. VI. Embrapa Agrobiologia. VII. Série.

631.86 CDD 23 ed.

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Isolamento dos microrganismos	9
Identificação de atividade celulolítica	9
Teste comparativo da formação de halo	10
Determinação da atividade enzimática	10
Determinação dos açúcares redutores	10
Cultivo sobre capim-elefante	10
Resultados e Discussão	11
Conclusão	16
Agradecimentos	16
Referências Bibliográficas	17

Isolamento de bactérias com habilidade hidrolítica da biomassa em sistema de compostagem

Flávia Hermelina da Rocha Santos¹

Beatriz Miranda da Silva²

Marlei de Souza Vicente³

Veronica Massena Reis⁴

Luis Henrique de Barros Soares⁴

Resumo

Os sistemas orgânicos de compostagem são uma tecnologia barata e eficiente para reciclagem de biomassa, transformando material vegetal em produtos úteis para a agricultura. Diversos grupos de microrganismos atuam degradando os compostos da biomassa até sua estabilização. Neste trabalho isolou-se um grupo de bactérias capazes de produzir complexos de enzimas celulolíticas, ou seja, capazes de degradar a celulose presente no material lignocelulolítico da compostagem. Esta característica foi avaliada comparativamente através de testes de formação de halo de degradação. A hidrólise da hemicelulose também foi avaliada nestes isolados. Foram identificados treze isolados bacterianos aparentemente distintos, com base na morfologia das colônias. Estes foram cultivados em meio mineral contendo capim-elefante como única fonte de carbono, e foram capazes de degradar parte da biomassa vegetal, produzindo enzimas hidrolíticas em até 10 dias de cultivo.

¹ Acadêmica do curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bolsista de Iniciação científica PIBIC/CNPq/Embrapa Agrobiologia.

² Acadêmica do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

³ Analista, Embrapa Agrobiologia.

⁴ Pesquisador, Embrapa Agrobiologia.

Isolation of bacteria with the ability to promote biomass hydrolysis in a composting system

Abstract

Organic composting systems are cheap and efficient technologies for biomass recycling. They are useful procedures for the transformation of plant materials into profitable products intended for plant nutrition. Several groups of environmental microorganisms can degrade the main compounds of biomass to their complete stabilization. This work was conducted in order to isolate a group of lignocellulolytic bacteria capable of producing enzyme complexes for degrading plant material into these composts. This feature was estimated with halo degradation tests. The hydrolysis of hemicellulose was also assessed in these isolates. Based on colony morphology, it was obtained a group of thirteen distinct bacterial isolates. These bacteria were grown in mineral medium containing elephant grass as the sole carbon source, and they were compared as for the ability to partially degrade plant biomass, producing hydrolytic enzymes in up to 10 days of cultivation.

Keywords: cellulolytic; biodegradation; enzymes.

Introdução

Os materiais de origem vegetal são constituídos essencialmente por celulose, hemicelulose e lignina, configurando as chamadas fibras vegetais, a principal fonte de matéria orgânica do planeta. Aproximadamente 500 milhões de toneladas de resíduo agroindustrial lignocelulósico são gerados todos os anos, sendo que a maior parte permanece sem nenhuma utilização específica (SAHA, 2003).

As fibras polissacarídicas são a celulose, totalmente insolúvel, e as hemiceluloses, com baixa solubilidade. A celulose, polímero orgânico renovável mais abundante do planeta, é composta por unidades de glicose na forma piranosídica, unidas em ligações do tipo β -1,4, o que a torna não digerível por qualquer animal superior. No tecido vegetal as moléculas de celulose estão alinhadas em união formando microfibrilas, e a estabilidade desta estrutura ordenada resulta na sua insolubilidade e resistência (KAMIDE, 2005). Aproximadamente 50% dos tecidos vegetais é celulose sendo que hemicelulose e lignina correspondem a 23% e 25%, respectivamente. A fibra de celulose possui regiões mais cristalinas e outras mais amorfas, e sua quebra na natureza se dá pela ação sinérgica de vários grupos de enzimas hidrolíticas produzidas por microrganismos: endo-celulases (como a endo- β -1,4-glicohidrolase, EC 3.2.1.4) que podem atuar nas regiões relaxadas da fibra ou nas regiões mais cristalinas; e exo-celulases, que atuam nas extremidades redutoras e liberam pequenos sacarídios, como a exocelobiohidrolase (EC 3.2.1.74) e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que atuam sobre celobiose liberando duas unidades de glicose. Microrganismos que excretam enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas no ambiente em que habitam, desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de reciclar o carbono decompondo resíduos lignocelulósicos (ZHANG e LYND, 2004).

Visto que se observa um aumento da produção agrícola em sistemas orgânicos, e uma disponibilidade crescente destes subprodutos agroindustriais, e mesmo urbanos, cresce o interesse pela maior compreensão e utilização dos processos de compostagem visando,

principalmente, à obtenção de fertilizantes orgânicos, estáveis, passíveis de serem utilizados como condicionadores de solo e como fonte orgânica de nitrogênio e outros nutrientes. Desse modo, é crescente o interesse pela compostagem no país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, bem como a demanda por técnicas de compostagem adaptadas às condições de clima, mercado, disponibilidade de matéria-prima e características sócio-econômicas das diferentes regiões do país. Ampliando a compreensão sobre o processo será possível definir as características da matéria-prima que influenciam de modo geral a qualidade do produto final (LEAL, 2006).

As celulases são intensamente demandadas na indústria de detergentes domésticos e no setor têxtil especializado, para melhorar a suavidade, branquidão e refinamento de tecidos, e no processo de 'stonagem' (IBRAHIM e EL-DIVANY, 2007).

Inúmeras aplicações importantes podem ser atribuídas ao processo de compostagem e seus produtos, incluindo a estabilização de materiais orgânicos, a redução ou eliminação de organismos indesejáveis, substâncias tóxicas e poluidoras, aumentarem a disponibilidade ou concentração dos nutrientes, condicionamento do solo, e agregar valor a subprodutos das atividades agropecuárias e industriais, entre outros. Embora alguns eucariotos como os fungos da podridão branca e parda sejam capazes de degradar estes materiais na natureza, algumas bactérias tem demonstrado alta capacidade hidrolítica e melhor facilidade de serem posteriormente inseridas em programas de desenvolvimento de bioprocessos em escala industrial (JORGENSEN et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi de isolar bactérias com habilidade em degradar material vegetal, visando sua utilização futura no aprimoramento de processos que buscam promover, otimizar ou acelerar a bioconversão de materiais lignocelulolíticos para aplicações diretamente no campo e em nível industrial, no desenvolvimento de uma gama de produtos de interesse como biocombustíveis, enzimas e biocompostos (SAHA, 2003; TENDERDY e SZAKACS, 2003).

Material e Métodos

O trabalho foi realizado na sua maior parte nos Laboratórios de Microbiologia de Gramíneas e Bioprocessos, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica (RJ).

Isolamento dos microrganismos

O substrato utilizado para compostagem foi preparado com aparas de grama de jardim (principalmente *Axonopus* sp.) e resíduos não triturados resultantes da poda de uma cerca viva de sabiá (*Mimosa caesalpineafolia*). Estes componentes foram obtidos na área residencial do Bairro Ecologia, em Seropédica (RJ). O material foi misturado na proporção aproximada de 1:1 (v/v), e agrupado em uma pilha aberta, diretamente sobre o solo, com volume de aproximadamente 1 m³. Após 4 meses, em repouso, transcorrida a fase termofílica do processo, realizou-se uma amostragem na região central interna do material, aproximadamente 10 cm de profundidade, retirando-se aproximadamente 20 g. Esta amostra foi cuidadosamente submetida à extração em solução salina estéril, à temperatura ambiente, durante 1 h em mesa agitadora a 100 rpm. Posteriormente, alíquotas foram plaqueadas em meio básico sólido contendo solução mineral e carboximetilcelulose (CMC), mais o inibidor fúngico cicloheximida na concentração de 10 µg·mL⁻¹, adaptado de Pointing (1999). O processo de repicagens foi repetido até o isolamento de colônias individuais, baseando-se na análise visual.

Identificação de atividade celulolítica

As culturas isoladas foram crescidas em placas contendo meio CMC, e foram coradas com uma solução de Vermelho do Congo 1% por 10 minutos e descoradas com NaCl 0,5% até o aparecimento de halo indicativo de degradação. O contraste de cor foi realizado com ácido acético 0,1 M (WOOD, 1981). Para cada microrganismo estabeleceu-se um índice de hidrólise, que é a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o tamanho da colônia, em milímetros. As colônias e seus respectivos halos foram medidos com um paquímetro digital (Stewart-Macdonald, EUA) e o valor médio de quatro leituras foi usado para comparar a atividade hidrolítica dos isolados.

Teste comparativo da formação de halo

Os mesmos isolados utilizados no teste anterior foram crescidos em duplicata, e o teste do iodo de Gram foi também utilizado para determinar a formação de halo de degradação (KASANA et al., 2008). Os testes de Gram foram realizados no Laboratório da Coleção de Culturas Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia (EMBRAPA, 2009).

Determinação da atividade enzimática

A atividade celulolítica total (endo- mais exo-celulolítica) foi determinada pela técnica do papel-filtro (FPase), no qual a amostra é incubada com tiras de papel filtro Watman nº 1 cuja composição são fibras de celulose insolúvel (GHOSE, 1987). As amostras foram equilibradas em tampão Citrato de sódio 50 mM em pH 4,8, e a seguir incubadas com o substrato por 30 min. a 50°C. A reação foi finalizada pela adição de 1,0 mL do reagente DNSA (ver a seguir). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A atividade de xilanase foi determinada pela técnica de Bailey et al. (1992). As amostras foram incubadas em duplicata, juntamente com uma suspensão de xilana a 1% durante 30 minutos a 50°C. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pela técnica do DNSA, descrita a seguir.

Determinação dos açúcares redutores

Os açúcares redutores liberados nas condições dos métodos apresentados acima foram quantificados pela técnica espectrofotométrica do ácido dinitrosalicílico (DNSA), utilizando-se uma solução de D-glicose ou D-xilose como padrão (MILLER, 1960). Uma unidade de atividade enzimática foi estabelecida como a quantidade de enzima capaz de formar 1,0 mol de glicose, por minuto, nas condições descritas.

Cultivo sobre capim-elefante

As bactérias selecionadas foram crescidas em frascos com 200 mL de meio líquido, contendo solução mineral mínima e uma suspensão de 10% ou 20% de capim-elefante a 30°C, em incubadora com agitação orbital

durante uma semana ou até 10 dias. O inóculo foi preparado em meio LB, e foi adicionado na razão de 5% do volume final. O capim-elefante da variedade Cameroon foi obtido na Área Experimental da Embrapa Agrobiologia (Terraço, Seropédica, RJ), em dois cortes realizados em julho de 2010, e picado em um triturador de forragem. Este material foi secado durante 3 dias, quando a umidade manteve-se ao redor de 10%, e após foi moído em moinho tipo Wiley e armazenado em sacolas plásticas até o uso.

Resultados e Discussão

O isolamento dos microrganismos celulolíticos do processo de compostagem identificou 13 isolados aparentemente distintos no que diz respeito à morfologia do crescimento em colônias. Nos testes em placa (Fig. 1) verificou-se a formação de um halo de degradação em torno das colônias das bactérias, indicando a atividade hidrolítica das mesmas. Estes isolados estão sendo identificados na Embrapa Agrobiologia. Na Tab. 1 temos os índices de hidrólise para os isolados após 24 e 48h de incubação a 30°C, e a reação do isolado quanto ao teste de Gram.

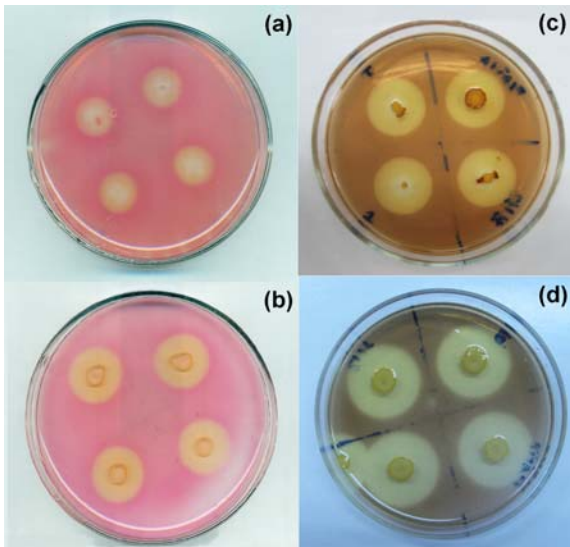


Fig. 1. Teste de formação de halo em placas de Petri com meio mineral contendo carboximetilcelulose como única fonte de carbono. **(a)** Teste do Vermelho Congo, isolado J, após 24h de cultivo; **(b)** Teste VC, isolado N, 48h; **(c)** Teste do Iodo de Gram, isolado J, 24h de cultivo; **(d)** Teste IG, isolado B, 48h.

Tabela 1. Isolados com atividade celulolítica avaliados quanto ao índice de hidrólise pelo método do Vermelho Congo e Iodo de Gram, após crescimento por 24 e 48 horas em meio sólido contendo carboximetilcelulose.

Isolados	Teste Verm. Congo		Teste do Iodo		Teste de Gram
	IH24	IH48	IH24	IH48	
A	1,03 (0,029)	1,01 (0,015)	1,04 (0,019)	1,03 (0,020)	+
B	1,03 (0,031)	n.d. -	1,09 (0,062)	2,97 (0,192)	-
C	1,01 (0,010)	1,02 (0,041)	1,06 (0,018)	1,05 (0,043)	+
D	1,55 (0,236)	1,01 (0,010)	1,04 (0,058)	1,04 (0,019)	-
E	1,00 (0,004)	1,00 (0,002)	1,09 (0,030)	1,10 (0,014)	+
F	1,03 (0,041)	1,00 (0,046)	1,03 (0,022)	1,01 (0,058)	-
G	1,00 (0,001)	1,01 (0,010)	1,14 (0,131)	1,04 (0,044)	+
H	1,04 (0,036)	1,03 (0,024)	1,10 (0,035)	1,00 (0,044)	+
I	1,00 (0,003)	1,04 (0,037)	1,02 (0,027)	1,03 (0,022)	+
J	1,58 (0,032)	1,28 (0,099)	2,48 (0,095)	2,33 (0,097)	+
L	1,01 (0,011)	n.d. -	1,01 (0,049)	2,23 (0,084)	+
M	1,00 (0,001)	1,04 (0,047)	1,07 (0,042)	1,06 (0,022)	+
N	2,12 (0,101)	2,69 (0,059)	1,02 (0,014)	1,00 (0,001)	+

Observa-se uma predominância de Gram positivos (10 isolados) sobre Gram negativos (3 isolados). Em geral, o índice de hidrólise se mantém pouco variável de um dia para o outro, principalmente com o teste do Vermelho Congo. Neste teste fica bastante evidente, para a maioria dos isolados, que o índice de hidrólise se estabiliza ou mesmo se reduz ligeiramente ao longo do tempo. Isto pode ser explicado pelo fato de que o crescimento da colônia é maior do que a produção de celulases. De fato, visto que as enzimas celulolíticas excretadas pelas células na colônia não devem perder sua atividade nas condições de incubação, os sacarídeos resultantes desta digestão são suficientes para suprir as necessidades nutricionais. Assim, os microrganismos produzem uma grande quantidade de celulases extracelulares logo no início do crescimento da colônia, e reduzem sua excreção ao longo do tempo, enquanto que a própria colônia continua se desenvolvendo. Para os isolados B e L, no teste do Iodo de Gram, o IH foi maior após 48 h. Isto pode ter sido o resultado de uma produção aumentada de enzimas, crescente com o tempo de incubação e o aumento

das colônias, ou mesmo da maior habilidade de difusão destas enzimas na matriz de Agar solidificado. Esta última situação pode estar relacionada à presença de enzimas de baixo peso molecular. Este comportamento é observado tanto para compostos químicos que atuam como inibidores da atividade enzimática quanto para enzimas avaliadas (JUNG e KIM, 2006).

Estes dois testes foram utilizados para verificar se existe alguma correlação direta entre si na expressão indicativa da eficiência de hidrólise. Kasana et al. (2008) propõem o uso do método com iodo de Gram como alternativa ao tradicionalmente usado, com Vermelho Congo, pois afirmam que o primeiro é mais rápido e sensível. Os resultados obtidos deste trabalho não permitem assegurar qualquer relação entre os dois métodos, porém pode-se afirmar que o contraste de cor é mais visível no método com iodo de Gram, o que facilita a medição mais precisa de halos e colônias.

Na segunda etapa, o capim-elefante foi usado como fonte de carbono nos cultivos com as bactérias isoladas, por ser uma gramínea bem adaptada às mais diversas condições edafoclimáticas brasileiras, por sua habilidade de produzir grande quantidade de biomassa, e por sua característica de obter uma parcela de sua demanda de nitrogênio pela fixação biológica realizada por bactérias endofíticas.

O crescimento dos microrganismos em meio de cultura contendo capim-elefante a 10% estimulou a produção de enzimas celulolíticas por alguns isolados. Como pode ser observado na Fig. 2, o comportamento dos isolados que melhor produziram enzimas que hidrolizaram a biomassa é semelhante no que diz respeito à produção de celulases, ou seja, ocorre um pico de atividade ao redor de 4-5 dias, porém a atividade é variável, com outros momentos de produção. Isto é comum para todas as enzimas do complexo hemicelulolítico, onde o produto da reação de uma enzima tipo endocelulase, favorece a maior atuação de exocelulases pela maior exposição de extremidades redutoras passíveis de hidrólise. Para todos os isolados testados o padrão de expressão enzimático foi semelhante. Além disso, como o produto possui composição variada, a digestão parcial da fibra de celulose expõe a hemicelulose e vice-versa, fazendo com que ocorram variações ao longo do processo (SAHA, 2003).

Os isolados E e B foram os que produziram as maiores quantidades de unidades de atividade enzimática, quando a concentração de substrato passou para 20%, destacando-se dos demais que, contudo, ainda assim foram capazes de hidrolizar parte da biomassa presente nas condições descritas (Fig. 3). Nem todos os isolados foram capazes de crescer nesta concentração de substrato lignocelulósico. A máxima atividade para celulase foi de 0,84 U/mL, obtida aos 5 dias, e de 0,62 U/mL aos 6 dias para xilanase, para os seis melhores isolados testados. Muitos trabalhos tem sido realizados a respeito da produção de celulases e outras enzimas que hidrolisam biomassa, principalmente com fungos (SKOMAROWSKY et al., 2005) que são reconhecidamente bons degradadores de biomassa. Adsul et al. (2007) obtiveram até 3,4 U/mL de linhagens mutantes de *Penicillium jantinelium*, duas vezes maior que a selvagem. Bactérias geralmente não produzem todo complexo hidrolítico, e frequentemente são deficientes na hidrólise de algum componente da biomassa (TSENG et al., 2002). Todavia são mais fáceis de cultivar pois os parâmetros de reologia e transferência de massa em cultivos submersos são menos problemáticos que para os fungos, que ainda por cima se desenvolvem em estruturas filamentosas (HECK et al., 2005).

Uma questão extremamente importante na hidrólise de biomassa é a sua necessidade de pré-tratamento, principalmente quando se deseja altos índices de extração e aproveitamento dos polissacarídeos em processos de produção de biocombustíveis (SZENGYEL et al., 2000). Neste trabalho o capim-elefante não passou por nenhum pré-tratamento visando a modificação estrutural de suas fibras. No momento, busca-se aperfeiçoar as condições de meio de cultura, principalmente o condicionamento do capim-elefante, tempo e temperatura de cultivo para se determinar as condições ótimas de crescimento e máxima expressão da atividade celulolítica. Cabe ressaltar que o tempo para se atingir estes resultados deve ser compatível com os processos industriais desenvolvidos para fungos, que são reconhecidamente os organismos que mais produzem esse grupo de enzimas na natureza.

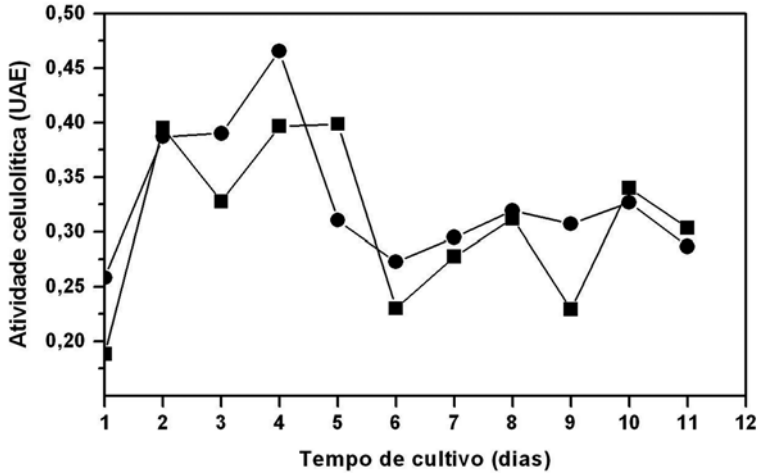


Fig. 2. Curva de produção de celulase para os isolados B (■) e C (●) em meio contendo capim-elefante a 10% (p/v). Cultivo realizado em incubadora "shaker" a 30°C e 150 rpm.

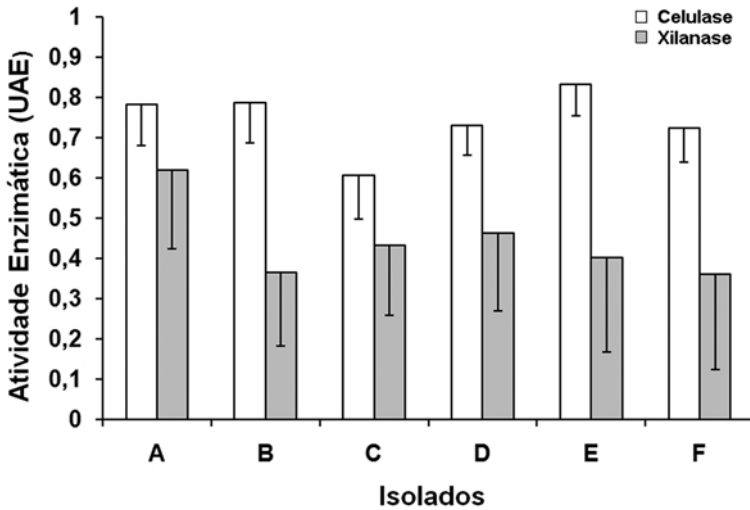


Fig. 3. Atividade celulolítica (5 dias) e xilanolítica (6 dias) dos isolados que melhor produziram quantitativamente estas enzimas (metodologia descrita acima). Cultivos realizados a 30°C sob agitação a 120 rpm, com 20% (p/v) de capim-elefante.

Conclusão

O processo de compostagem pode ser fonte para o isolamento de bactérias que apresentam atividade celulolítica expressiva. Mesmo com a obtenção de treze isolados, sua habilidade hidrolítica é variável. A seleção destes microrganismos pode levar ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos específicos para acelerar o processo de biocompostagem. Porém, mesmo isolados com baixa atividade nas condições testadas podem apresentar melhor desempenho em processos alternativos, em condições diferentes das que foram testadas neste trabalho. A variação dos meios de crescimento, temperatura e proporção de substrato também podem conduzir a diferentes níveis de expressão de enzimas hidrolíticas, como observado para as duas concentrações de capim elefante.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a Faperj pelo apoio financeiro ao trabalho.

Referências Bibliográficas

ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; VARMA, A. J.; GOKHALE, D. V. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1467-1476, 2007.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-70, 1992.

EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Procedimento operacional padrão: coloração de Gram**. Seropédica, 2009.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 108, p. 41-65, 2007.

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

HECK, J. X.; SOARES, L. H. B.; AYUB, M. A. Z. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 417-423, 2005.

IBRAHIM, A. S. S.; EL-DIWANY, A. I. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 1, p. 473-478, 2007.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 5, p.14-24, 2007.

JUNG, K-H.; KIM, H. J. Development of an agar diffusion method to measure elastase inhibition activity using elastin-congo red. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p.1320-1324, 2006.

KAMIDE, K. **Cellulose and Cellulose derivatives**. Amsterdam: Elsevier, 2005. 380 p.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.

LEAL, M. A. B. **Produção e eficiência agrônômica de compostos obtidos com palhada de gramínea e leguminosa para o cultivo de hortaliças orgânicas**. 2006.133 p. Tese (Doutorado), Agronomia - Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

MILLER, G. L. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1960.

POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, p. 17-33, 1999.

SAHA, B. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SKOMAROVSKY, A. A.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SOLOV'EVA, I. V.; BUBNOVA, T. V.; KONDRATEVA, E. G.; SINITSYN, A. P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma fungi*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, p. 182-184, 2005.

SZENGYEL, Z.; ZACCHI, G.; VARGA, A.; RECZEY, K. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 using steam-pretreated spruce. Hydrolytic potential of cellulases on different substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 679-69, 2000.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 169-179, 2003.

TSENG, M. -J.; YAP, M. -N.; RATANAKHANOKCHAI, K.; KYU, K. L.; CHEB, S. -T. Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 590-595, 2002.

WOOD, P. J. The use of dye-polysaccharide interactions in β -d-glucanase assay. **Carbohydrate Research**, v. 94, p. C19-C23, 1981.

ZHANG, Y. -H. P.; LYND, L. R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

Embrapa

Agrobiologia

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**