

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

Bioprospecção de micro-organismos do solo degradadores de celulose

Yohana Melania López Hernández

Pelotas, 2016

Yohana Melania López Hernández

Bioprospecção de micro-organismos do solo degradadores de celulose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovanna Gamaro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Anelise Vicentini Kuss

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

H557b Hernández, Yohana Melania López

Bioprospecção de micro-organismos do solo
degradadores de celulose / Yohana Melania López
Hernández ; Giovana Duzzo Gamaro, orientadora ; Anelise
Vicentini Kuss, coorientadora. — Pelotas, 2016.

63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de
Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos,
Universidade Federal de Pelotas, 2016.

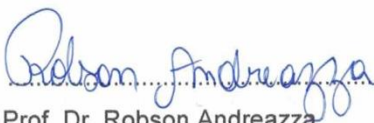
1. Micro-organismos celulolíticos. 2. Enzimas
celulolíticas. 3. Endoglucanase. 4. Exoglucanase. 5. Solo. I.
Gamaro, Giovana Duzzo, orient. II. Kuss, Anelise Vicentini,
coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Patricia da Silva Nascente



Prof. Dr. Robson Andreazza



Prof^a.Dr^a. Giovanna Duzzo Gamaro
(Orientadora)

A meus pais e toda minha família porque sempre serão o mais importante para mim sem importar onde eu esteja. ¡Amo muito vocês!

Dedicado à memória de Hector de Jesús Hernández Torres, porque sempre viverás dentro de cada um de nós.

Agradecimentos

A Deus, por me permitir culminar com sucesso esta etapa importante da minha vida.

A minha grande família, meus pais Delio e Luz Elena, minhas irmãs Yaritza e Marcela e as minhas sobrinhas lindas Tiffany, Guadalupe e Dulce Maria por serem minha fortaleza e apoio incondicional durante tudo o meu processo de formação acadêmico e pessoal, porque são a parte mais importante da minha vida e aqueles a quem eu amo com todo o meu coração.

A toda minha família em geral, meus avós Aurelio e Melania, meus tios, minha tia, meus primos porque seu apoio sempre esteve presente.

O Edgar Huayra por ser meu melhor amigo, meu colega de estudo, meu maior apoio e por ser uma das pessoas mais importantes para mim.

A minha Co-orientadora Anelise Vicentini Kuss por ter confiado em mim, pela paciência e por ter me brindado seu apoio e conhecimento durante estes anos de formação.

A Greice Schwanke por ser uma grande amiga e uma colega de laboratório muito querida.

A minhas demais colegas de laboratório, a Angelita, a Elisa, a Malu e a Paola pelo auxílio durante meu trabalho e pela amizade.

A Roberta Manica pela ajuda e apoio no meu trabalho, porque sem você não teria sido possível.

A minha Orientadora Giovana Gamaro pela paciência e apoio.

A meus amigos colombianos e estrangeiros aqui em Pelotas, porque eles foram um grande apoio.

À Universidade Federal de Pelotas e a CAPES pela bolsa para viabilizar minha formação no Brasil.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da UFPel, pela oportunidade de me formar pessoal e profissionalmente.

E a todas as pessoas que se tornaram parte da minha vida aqui em Pelotas e que de algum modo contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

— A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.||

(Arthur Schopenhauer)

Resumo

LÓPEZ H, Y.M. **Bioprospecção de micro-organismos degradadores de celulose do solo**. 2016. 64f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A importância dos micro-organismos do solo dependem de cada uma das atividades que eles desenvolvem no ambiente e pelo tanto suas funções dependem dessa diversidade bacteriana. Dentro deste grupo de micro-organismos estão as bactérias degradadoras de celulose, que usam um complexo enzimático de três tipos de enzimas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases responsáveis pela degradação da matéria orgânica. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e caracterização através da atividade enzimática de bactérias degradadoras de celulose provenientes de diversos tipos de solo. As amostras do solo foram coletadas da floresta amazônica, agroecossistemas familiares sob o sistema de integração Lavoura-Pecuária e em campo aberto rural, nas cidades de Belém do Pará (Estado de Pará), Arroio do Padre e Canguçu (Estado de Rio Grande do Sul) no Brasil e levadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental, Instituto de Biologia/UFPel. Foram obtidos 10 isolados de bactérias. A análise para a verificação da degradação de celulose foi feita pelo método do papel filtro Whatman N°1 e meio Luria-Bertani em placa. Na análise da produção enzimática extracelular o substrato usado foi Papel Filtro Whatman N°1 para a β -1,4 exoglucanase e carboximetilcelulose para a β -1,4 endoglucanase. Além, foram feitas as análises de biomassa microbiana. Os resultados mostraram que os isolados mais efetivos na degradação de celulose tendo como substrato papel filtro Whatman N°1 e carboximetilcelulose, foram as bactérias BC5 e a BC2 respectivamente. Na atividade enzimática β -1,4 endoglucanase foi a BC5 e para β -1,4 exoglucanase foi a BC8, enquanto para a produção de biomassa microbiana o melhor resultado foi para a bactéria BC9. Os resultados indicaram que entre as diferentes espécies de bactérias oriundas de diferentes localidades apresentam diferenças significativas quando comparadas em cada um das análises e, portanto, pode estar associado aos diferentes tipos de ecossistemas e características tanto bioquímicas, como também ambientais em cada tipo de solo, apresentando mecanismos distintos relacionados diretamente com a degradação de celulose. Assim, estes micro-organismos apresentam potenciais para serem usados em diversos processos biotecnológicos e de biorremediação na degradação da celulose.

Palavras-chave: micro-organismos celulolíticos, enzimas celulolíticas, micro-organismos do solo, exoglucanase, endoglucanase.

Abstract

LÓPEZ H, Y.M. **Bioprospecting degrading microorganisms of soil cellulose.** 2016. 64p. Dissertation (Masters in Biochemistry and Bioprospecting) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Center for Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

The importance of soil micro-organisms depend on each of the activities they develop into the environment and so that their functions depend bacterial diversity. Within this group of microorganisms is the cellulose degrading bacteria, using an enzyme complex of three types of enzymes endoglucanases, exoglucanases, and β -glucosidases responsible for the degradation of organic matter. The objective of this work was the isolation and characterization through enzymatic activity of cellulose degrading bacteria from different types of soil. Soil samples were coletasdas the Amazon forest, family agro-ecosystems under the Crop-Livestock integration system and rural open field, in the cities of Belém do Pará (State of Pará), Arroio do Padre and Canguçu (State of Rio Grande do Sul) in Brazil and taken to the Environmental Microbiology Laboratory, Institute of Biology / UFPel. 10 bacterial isolates were obtained. The analysis for the verification of cellulose degradation was made by the filter paper method Whatman No. 1 and Luria-Bertani plate. In the analysis of extracellular enzyme production the substrate used was Whatman filter paper # 1 for β -1,4 exoglucanase and carboxymethylcellulose for β -1,4 endoglucanase. In addition, they made the analysis of microbial biomass. The results showed that the most effective isolated in cellulose degradation as substrate No.1 Whatman filter paper and carboxymethylcellulose were the BC5 bacterial and BC2 respectively. In the β -1,4-endoglucanase enzymatic activity was BC5 and β -1,4-exoglucanase was BC8, while for the production of microbial biomass the best result was for the BC9 bacteria. The results indicated that among different species of bacteria from different locations differ significantly compared in each of the tests, and therefore may be associated with different types of both biochemical ecosystems and characteristics, as well as environmental conditions in each type of soil, presenting distinct mechanisms directly related to cellulose degradation. Thus, these microorganisms have potential for use in many biotechnological processes and bioremediation in the degradation of cellulose.

Keywords: cellulolytic microorganisms, enzymes, soil microorganisms, exoglucanase, endoglucanase.

Lista de figuras

Figura 1	Estrutura da celulose.....	20
Figura 2	Esquema da hidrólise da celulose amorfa e microcristalina por sistemas de celulase.....	24
Figura 3	Posições de ligações intra e intermoleculares das moléculas de glicose.....	25
Figura 4	Estrutura cristalina da celulose. Representação das pontes de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra).....	26
Figura 5	Representação das regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose	26

Artigo

Figura 1	Atividade da celulase através do halo de degradação do substrato CMC 1 BC1, 2 BC2, 3 BC3, 4 BC4, 5 BC5, 6 BC6, 7 BC7, 8 BC8, 9 BC9, 10 BC10.....	42
Figura 2	Biomassa microbiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de isolados de bactérias celulolíticas em função dos tempos de avaliação.....	43
Figura 3	Atividade de glicose-celobiose (UI mL^{-1}) a partir de β -1,4 exoglucanase de isolados de bactérias celulolíticas (BC1 a BC6) em função do tempo de avaliação (horas) e da dose de enzima.....	46
Figura 4	Atividade de glicose-celobiose (UI mL^{-1}) a partir de β -1,4 exoglucanase de isolados de bactérias celulolíticas (BC7 a BC10) em função do tempo de avaliação (horas) e da dose de enzima	47

	(mL).....	
Figura 5	Atividade da β -1,4 exoglucanase de acordo com a dose e tempo ótimos para a maior atividade em cada isolado.....	47
Figura 6	Atividade de glicose-celobiose (UI mL ⁻¹) a partir de β -1,4 endoglucanase de isolados de bactérias celulolíticas (BC1 a BC6) em função do tempo de avaliação (horas) e da dose de enzima (mL).....	49
Figura 7	Atividade de glicose-celobiose (UI mL ⁻¹) a partir de β -1,4 endoglucanase de isolados de bactérias celulolíticas (BC7 a BC10) em função do tempo de avaliação (horas) e da dose de enzima (mL).....	50
Figura 8	Atividade da β -1,4 exoglucanase de acordo com a dose e tempo ótimos para a maior atividade em cada isolado.....	50

Lista de tabelas

Artigo

Tabela 1	Caracterização morfológica das bactérias degradadoras de celulose.....	39
Tabela 2	Degradação de papel filtro (mg) de isolados de bactérias celulolíticas.....	40
Tabela 3	Diâmetro da colônia e do halo (mm) e índice enzimático de isolados de bactérias celulolíticas.....	41
Tabela 4	Biomassa microbiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de isolados de bactérias celulolíticas.....	43
Tabela 5	Valores de ajuste ao modelo de regressão de bactérias celulolíticas.....	45
Tabela 6	Valores de ajuste ao modelo de regressão de bactérias celulolíticas.....	48

Lista de Abreviaturas

AMF	Arbuscular Mycorrizhal Fungi
BCA	Biological Control Agents
CMC	Carboximetilcelulose
$C_6H_{10}O_5$	Molécula da glicose
CO_2	Dióxido de carbono
EC 3.2.1.2.1	1,4- α -D-glucanomaltohydrolase
EC 3.2.1.4	4-(1.3, 1.4)- β -D-glucano 4-glucanohidrolase
EC 3.2.1.9.1	4- β -D-glucanocellobiohydrolase
HEC	Hidroximetil celulose
N_2	Nitrogênio
O_2	Oxigênio
OH	Hidroxila
PGPM	Microorganisms Promoters of Plant Growth
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

Sumario

1 Introdução.....	15
2 Referencial teórico.....	17
2.1 Interações microbianas no solo.....	17
2.2 Bioprospecção de micro-organismos do solo.....	18
2.2.1 Produção de enzimas.....	19
2.2.2 Biorremediação.....	19
2.3 Micro-organismos degradadores de celulose.....	20
2.3.1 Hemicelulose.....	21
2.3.2 Lignina.....	22
2.4 Sistemas enzimáticos da celulose.....	23
2.4.1 Endo β -endoglucanases.....	23
2.4.2 Exo β -glucanases.....	24
2.4.3 β -glucosidase.....	24
2.5 Aplicações potenciais das bactérias degradadoras de celulose.....	27
2.5.1 Indústria de alimentos.....	27
2.5.2 Indústria do papel.....	27
2.5.3 Indústria de detergentes.....	28
2.5.4 Biocombustíveis.....	28
2.5.5 Biomedicina.....	29

3 Objetivos.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.1.2 Objetivos específicos.....	30
4 Artigo.....	31
5 Conclusão.....	55
6 Perspectivas.....	56
7 Referências.....	57

1. Introdução

O solo como habitat é considerado um sistema heterogêneo, descontínuo e estruturado, formado por diversos micro habitats. Micro habitats são locais particulares onde células, populações ou comunidades microbianas são encontradas, cujas características físicas, e químicas influenciam seu comportamento, que, ao mesmo tempo, também interagem no ambiente desse local (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). É um recurso natural vital para o funcionamento do ecossistema terrestre e apresentam um balanço entre os fatores físicos, químicos e biológicos. Os principais componentes do solo incluem minerais inorgânicos, partículas de areia, argila, formas estáveis de matéria orgânica, insetos, bactérias, fungos, mamíferos e gases como O_2 , CO_2 , N_2 (SALAMONE, 2011).

Quando um habitat é complexo e dinâmico, as características dos organismos com metabolismos diferentes poderão interagir, promovendo um estado de equilíbrio dinâmico relacionado com as necessidades essenciais para a sobrevivência, tendo como resultado condições ideais para uma biodiversidade altamente elevada. Mas essas características constituem a principal barreira para a introdução de tecnologias de manejo biológico, estudos populacionais, e manejo da informação genética. É por isto que o solo é considerado uma "caixa preta", ao ser estudado, pois é necessário identificar componentes abióticos e bióticos, além da interação entre eles e a participação nos diversos processos do solo incluídos nos ciclos biogeoquímicos (JACKSON, 2003).

No caso dos micro-organismos degradadores de celulose, são responsáveis pela degradação da biomassa da matéria orgânica do planeta. As características fundamentais de utilização de celulose microbiana são examinadas em níveis

sucessivamente mais altos de agregação englobando a estrutura e composição de biomassa celulósica, diversidade taxonômica, sistemas de enzimas celulase, biologia molecular de enzimas celulolíticas, fisiologia de micro-organismos celulolíticos, aspectos ecológicos das comunidades degradantes em fatores limitantes na natureza. A base metodológica para estudar a utilização de celulose microbiana é considerada em relação à quantificação de células e enzimas na presença de substratos sólidos, na descrição quantitativa de hidrólise da celulose em relação as enzimas, as taxas de hidrólise enzimática, utilização bioenergética da celulose microbiana, estudos cinéticos na utilização de celulose microbiana em comparação à cinética de substratos solúveis (SALAMONE, 2011).

Deste modo, dentre os grupos de micro-organismos, as bactérias degradadoras de celulose apresentam uma grande importância e um alto diferencial em quanto ao seu papel na natureza degradando a matéria orgânica, tendo em conta que as condições e características físicas, químicas, biológicas, bioquímicas e ecológicas, variam para cada espécie de acordo com seu lugar de origem. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar bactérias degradadoras de celulose avaliando seu potencial no análise das atividades enzimáticas caracterizando os isolados obtidos.

2. Revisão bibliográfica

Interações microbianas no solo

Existe uma ampla variedade de inter-relações entre espécies de micro-organismos nos ecossistemas, tais como sinérgicas, antagônicas, de competição física e bioquímica, moduladas por múltiplos e complexos fatores bióticos e abióticos. A rizosfera é um dos principais sítios onde se localizam micro-organismos funcionais, que são aqueles que desenvolvem alguma função biológica como fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fosfatos, promotores de crescimento vegetal, biocontroladores e espécies patogênicas, os quais competem por espaço e por nutrientes (FOSSE, 2014).

Estas inter-relações entre micro-organismos compreendem a interação solo-planta-micro-organismos-ambiente e impactam, de forma direta, o crescimento e o desenvolvimento das espécies vegetais. Micro-organismos rizosféricos, como os Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Pseudomonas*, usualmente, são catalogados como Biological Control Agents (BCA) e Microorganisms Promoters of Plant Growth (PGPM).

Os micro-organismos raras vezes são encontrados na natureza como culturas puras e a maioria dos ambientes naturais caracterizam-se por uma grande diversidade de espécies microbianas que interagem de maneira complexa (MALAKAR, 2003; WIMPENNY, 1995). O crescimento de um micro-organismo como uma cultura pura pode ser substancialmente diferente do seu crescimento em uma cultura mista, devido às interações microbianas que ocorrem nos diferentes habitats (PIN, 1998). Tais interações podem ser sinérgicas ou antagônicas na natureza, resultando na proliferação melhorada ou inibida. As interações antagônicas (interações antimicrobianas) são de particular interesse na microbiologia dos alimentos, por exemplo, já que podem ser utilizadas para controlar o nível de micro-organismos patogênicos nos produtos alimentícios. Interações sinérgicas são de grande interesse para obtenção de metabólitos ou produção de enzimas específicas.

As interações entre as populações de bactérias dentro de uma comunidade dependem das condições ambientais, e sob diferentes condições ambientais da mesma população podem ocorrer diferentes relações. As interações positivas entre populações melhoram a capacidade destas de interagir, para sobreviver dentro da comunidade em um habitat particular, às vezes permitindo a inteiras a coexistência em um habitat onde individualmente não poderiam existir sozinhos (ASOODEH, 2010; TATSINKOU, 2013).

Bioprospecção de micro-organismos do solo

Bioprospecção é a busca sistemática de usos sustentáveis e com fins comerciais dos elementos genéticos e bioquímicos da biodiversidade, por isso, os micro-organismos do solo representam uma grande diversidade populacional, taxonômica, evolutiva, genética e ecológica, as quais podem ser aproveitadas em diversos processos. O solo ao ser considerado um habitat dinâmico deve de apresentar uma qualidade para o cumprimento do seu papel fundamental no ambiente terrestre, mantendo o balanço entre a produção e o consumo de dióxido de carbono na biosfera (SALAMONE 2010).

A maior parte das etapas dos ciclos biogeoquímicos tem lugar no solo. A atividade microbiana do solo da conta das reações bioquímicas que acontecem dentro deste complexo e heterogêneo sistema. As trocas nas taxas de circulação do carbono e dos nutrientes minerais no solo como consequência das interações entre plantas e outros organismos envolvem modificações na estrutura e no funcionamento de suas comunidades bióticas. Em um ecossistema, uma rápida resposta dos processos microbianos e da estrutura das comunidades às alterações físicas químicas e biológicas constitui um aspecto central da qualidade do solo.

As mudanças na estrutura das comunidades microbianas em sistemas perturbados geralmente estão associadas a emissões de gases, como efeito estufa (CO_2 , NO, N_2O) e a perda do nitrogênio por lixiviação (JACKSON, 2003).

Segundo Doran, Zeiss nos 2000, o manejo agrícola convencional, que inclui o uso excessivo de maquinaria, incrementando a erosão do solo e a concentração do dióxido de carbono indica que a grande quantidade de biomassa e matéria orgânica

acumulada dos processos industriais e não industriais depende dos baixos rendimentos de degradação realizada pelos micro-organismos. No entanto, essas grandes quantidades de biomassa, matéria orgânica e os micro-organismos (enzimas, metabólitos, liberação de energia) do solo podem ser aproveitados com manejo sustentável, eficiência no uso do recurso e projetos vinculados às tecnologias limpas renováveis. Alguns deles estão descritos abaixo.

Produção de enzimas

A produção ótima de uma enzima microbiana depende da natureza da cepa envolvida, assim como dos diversos parâmetros ambientais, tais como temperatura, pH, substrato, e nutrientes. Portanto, a melhora da produção microbiana de enzimas implica na otimização destes fatores ambientais. A melhora de cepas microbianas por manipulação genética é outro meio pelo qual pode aumentar o rendimento da produção, especialmente em escala industrial. No entanto, a maioria dos métodos para otimizar os fatores bióticos desvincula a produção de enzimas com as interações microbianas.

Biorremediação

Micro-organismos heterotróficos são componentes chaves para a mobilidade de materiais e decomposição de matéria orgânica. A utilização de bactérias na degradação de materiais (químicos, biológicos) tem sido considerada de grande importância para estudos onde são examinados os efeitos tóxicos e funções de metais em populações microbianas, onde os fatores ambientais afetam a toxicidade e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência do metal em micro-organismos. Os micro-organismos controlam a transformação de metais através de diversos mecanismos, incluindo oxidação, redução, metilação, dimetilação, formação de complexos e absorção.

Micro-organismos degradadores de celulose

A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza, sintetizado principalmente pelas plantas, alguns animais e um grande número de micro-

organismos (CASTRO et al., 2011). Este composto está formado por monômeros de glicose ligados por ligações glicosídicas β -1,4 e tem como fórmula química $C_6H_{10}O_5$. Ela forma parte das estruturas das matrizes celulares nas plantas, em alguns fungos e algumas algas (Figura 1) e a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática são afetadas pela estrutura natural dos materiais celulósicos, onde a celulose encontra-se associada a outras moléculas como a lignina e hemicelulose, com uma conformação capilar, uma ordem molecular variável e forte cristalinidade. Assim, cada complexo celulósico é composto por uma variedade de enzimas com diferentes particularidades e modos de ação, que atuam em sinergismo para a degradação da celulose (BÉGUIN, 1990).

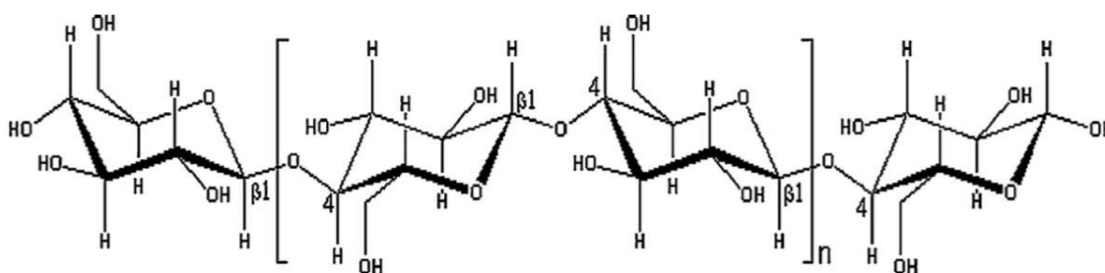


Figura 1- Estrutura da celulose.
Fonte: Béguin, 1990.

As celulasas são sintetizadas por uma grande variedade de bactérias e fungos (STUTZERBERGER, 1972). Os fungos filamentosos são responsáveis pela maior parte da hidrólise da celulose na natureza, devido à eficiência e diversidade em seus sistemas celulolíticos e suas vantagens adaptativas (RAMOS; FORCHIASSIN, 1996). As espécies de fungos celulolíticos mais estudados pertencem ao gênero *Trichoderma*, considerado um dos melhores produtores de enzimas, embora espécies de *Aspergillus* (BASTAWDE, 1992), *Cladosporium* (ABRHA; GASHE, 1992), *Fusarium* (MURALI, 1994), *Penicillium* (KESKARR, 1992), *Neurospora crassa* (YAZDI et al., 1990), são consideradas eficientes na degradação da celulose.

Micro-organismos aeróbicos, como *Trichoderma reesei*, segregam uma combinação de endoglucanases e celobiohidrolases, as quais atacam o substrato individualmente por sinergismo. Pelo contrário, micro-organismos anaeróbicos como

Clostridium cellulovorans, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium Josui*, e *Clostridium thermocellum*, produzem complexos multienzimáticos extracelulares que têm uma alta atividade, degradando a celulose cristalina (OHARA et al., 2000). Ao estudar as enzimas celulolíticas que são utilizadas naturalmente pelos fungos e bactérias para degradar a celulose, observa-se que a hidrólise (degradação) deste polímero é muito complexa. Por tanto, a investigação de estruturas e funções destas enzimas são importantes para conhecer com mais detalhes os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de degradação da celulose.

Hemicelulose

Em contraste a celulose (polímero formado apenas por glicose), a hemicelulose é um polímero formado por D-xilose, D-galactose, D-glicose, D-manose e L-arabinose (CHANDEL, 2007). As cadeias de hemicelulose podem ser constituídas por uma ou mais unidades de monossacarídeos. A sua natureza química varia, nas plantas, de acordo com o tecido vegetal e com a espécie a que pertence, na madeira, por exemplo, ela participa entre 20 e 30% do total da composição, enquanto que, nas gramíneas, estes valores podem variar de 20 a 40% (SJOSTROM, 1992).

A hemicelulose compreende um grupo heterogêneo de polissacarídeos amorfos e de baixo peso molecular em relação à celulose. Sua cadeia é formada por açúcares curtos, lineares e altamente ramificados, que se ligam firmemente entre si e as superfícies das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via ponte de hidrogênio, em uma rede complexa (CARVALHO, 2005). Sua estrutura é mais parecida com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior a lignificação. Sua estrutura de ramificações e cadeias laterais interage facilmente com a celulose dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

Lignina

A lignina é um dos constituintes da parede celular de todas as plantas vasculares, ela é um composto heterogêneo, de alto peso molecular e estrutura irregular (HOFRICHTER, 2002; ONNERUD, 2002). É considerada uma macromolécula constituída de unidades de fenilpropano, apresenta uma

conformação tridimensional e amorfa, e representa de 20 a 30% do total dos lignocelulósicos. Além disso, é um dos biopolímeros mais abundantes da biosfera (AZEVEDO, 2004).

Embora haja uma estreita associação entre a celulose, hemicelulose e a lignina, estes compostos não estão uniformemente distribuídos na parede celular das plantas. Esta parede celular é composta de diferentes camadas, que diferem de acordo com a estrutura e a composição química. Basicamente, a celulose forma um esqueleto que é formado por substâncias estruturais (hemicelulose) e envoltórias (lignina).

A lignina tem a função biológica de fornecer suporte estrutural à parede celular das plantas, pois a parede celular lignificada pode ser vista como um complexo com microfibrilas de celulose e hemicelulose, além de conferir resistência ao material lignocelulósico impedindo os ataques microbianos (ONNERUD, 2002; LEE, 2003). Sendo assim a lignina é o principal obstáculo ao ataque enzimática da fibra.

A lignina é formada por um complexo polímero-fenólico, encontrada como um componente da parede celular e não é facilmente degradada pelas enzimas geralmente encontradas na natureza (VAN SOEST, 1994). Contudo, para utilizar estes materiais lignocelulósicos em processos biológicos é necessário deslignificar o material para liberar celulose e hemicelulose, que em seguida despolimeriza os polímeros de carboidrato e libera os açúcares que são utilizados na fermentação (POLONEN, 2000). Esta degradação permite que as enzimas hidrolíticas, como as celulasas, atuem nessas fontes de carbono.

Sistema enzimático da celulose

A celulosa com uma estimativa de velocidade de síntese de 4×10^{10} tns/ano (BÉGUIN, 1990), constitui uma abundante fonte de carbono que é usada por micro-organismos. Todos estes micro-organismos podem degradar celulose através do seu complexo sistema enzimático, composto por uma grande variedade de enzimas com diferentes especificidades e modos de ação.

As enzimas foram classificadas em três componentes maiores mostrados na Figura 1 (LADISCH, 1983; POURQUIE, 1985).

Endo β -endoglucanases

As 4-(1.3; 1.4)- β -D-glucano 4-glucanohidrolase (EC 3.2.1.4) rompem os enlaces β -glucosídicos de forma aleatória no interior das moléculas de celulose, produzindo novos sítios de ataque para as exoglucanases. Como resultado, tem uma rápida diminuição no comprimento das cadeias.

Exo β -glucanases

As 4- β -D-glucan cellobiohydrolase (EC 3.2.1.9.1) atacam gradualmente as moléculas de celulose dos terminais não redutores liberando subunidades de celubiose.

β -glucosidases

As 1,4- α -D-Glucan maltohydrolase (EC 3.2.1.2.1) hidroliza a celubiose e celudextrinas de baixo peso molecular em glicose. As moléculas de celulose tem forte tendência para formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias justapostas de glicose, fazendo-as impenetráveis à água e, portanto, insolúveis, originando fibras compactas e que constituem a parede celular dos vegetais como mostra na Figura 3 (DELATORRE, 2010).

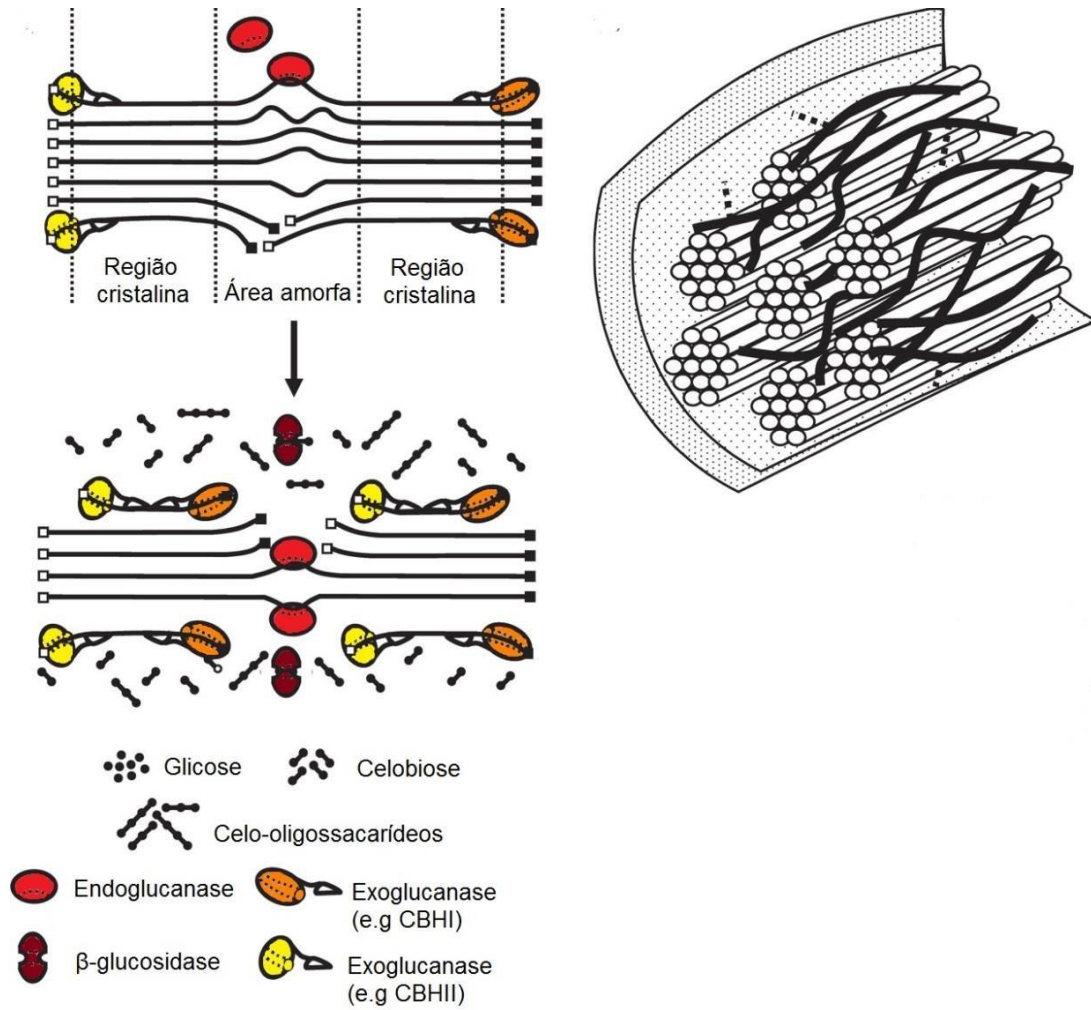


Figura 2 - Esquema hidrólise da celulose amorfa e microcristalina por sistemas de celulase.
Adaptado de Van, W.H et al., 2011.

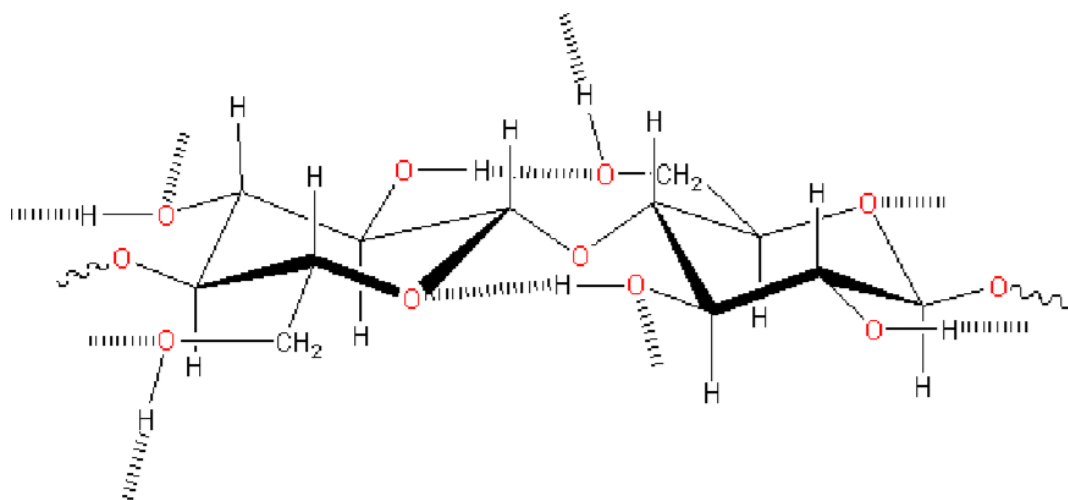


Figura 3 - Posições de ligações intra e intermoleculares das moléculas de glicose.
Fonte: Vilches, 2002.

Em resumo as enzimas do complexo celulolítico as β -endoglucanases ou β -1,4-D-glucanglucanohidrolases, hidrolisam aleatoriamente as ligações β -glucosídicas no interior das moléculas de celulose, com uma rápida diminuição nas cadeias carbônicas e um lento aumento nos grupos redutores. Como complemento, as β -exoglucanases ou β -1,4-D-glucan-celobio hidrolases e atuam nos extremos terminais da celulose previamente fragmentada, liberando subunidades de celubiose. E as enzimas β -glucosidases ou celubiasas são degradadas em moléculas de glucose livre (FAN; LEE, 1980). A diferença de substratos para os estudos destas enzimas dependem das afinidades químicas e bioquímicas onde o melhor substrato para a medição da atividade de endoglucanase é um derivado solúvel de celulose (CMC). Para as exoglucanases onde sua ação é limitada os substratos devem ser substitutos de celulose como CMC e hidroximetilcelulose (HEC).

Os grupos hidroxila (OH) são os responsáveis pelo comportamento físico e químico da celulose, sendo capazes de formar dois tipos de pontes de hidrogênio, em função de seu posicionamento na unidade glicosídica. Existem ligações de hidrogênio entre os grupos OH de unidades adjacentes da mesma molécula de celulose (intermoleculares) e ocorrem ligações entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose (intramoleculares). Os feixes de cadeias moleculares são unidos por pontes de hidrogênio (forças de Van der Waals) como é mostrado na Figura 4. Os feixes das moléculas de celulose se agregam na forma de micro fibrilas nas quais regiões altamente compactadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas), onde as fibras apresentam maior distância uma das outras (Figura 5). Estas estruturas cristalinas fazem com que as enzimas e até mesmo moléculas pequenas, como a da água, não consigam penetrá-la. Por outro lado, as fibras de celulose apresentam falhas onde é encontrado micro poros, que permitem tanto o acesso de moléculas de água, quanto ao ataque enzimático (LYND, 2002).

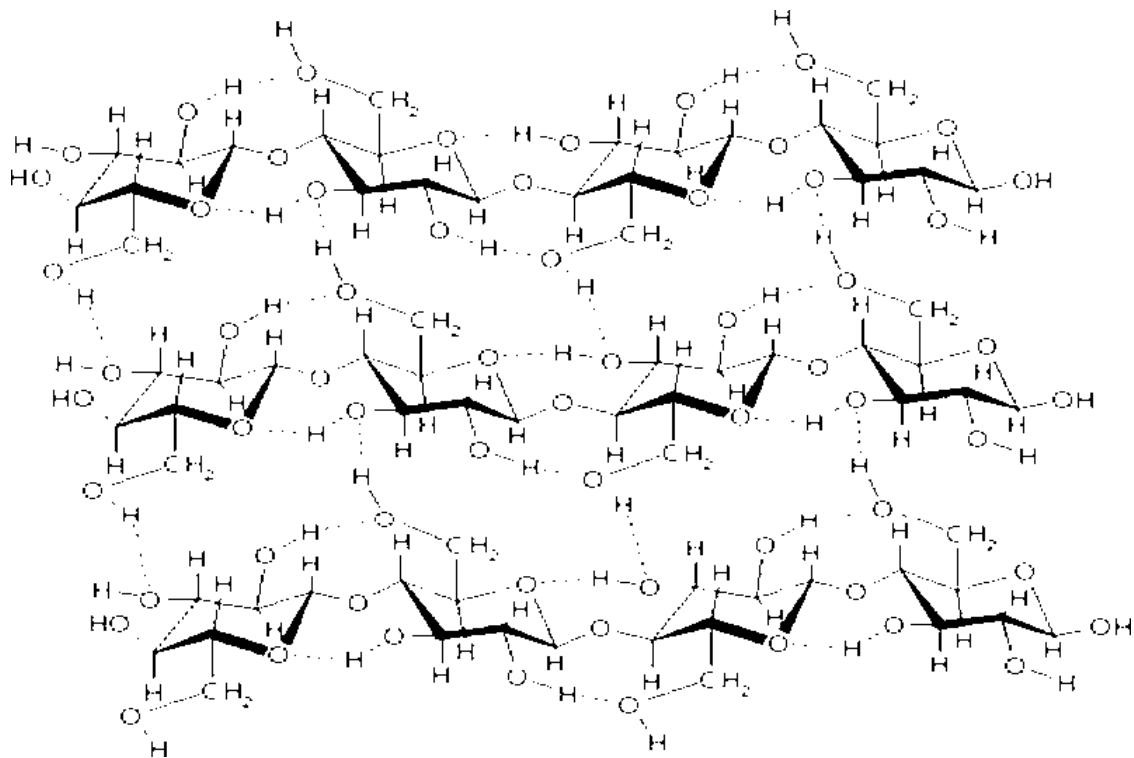


Figura 4 - Estrutura cristalina da celulose. Representação das pontes de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra). Adaptado de Radford, et al. 1996.



Figura 5 - Representação das regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose. Adaptado de Vilches, 2002.

Aplicações potenciais das bactérias degradadoras de celulose

Indústria de alimentos

Na indústria alimentícia, as celulasas são usadas em vários processos, principalmente, na extração de componentes do chá verde, proteína de soja. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja, do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (ORBEG, 1981).

Existe uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulolítico, buscando açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala (PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). O uso de celulasas para este fim tem como entrave o custo de produção, que pode ser superado utilizando organismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) para a produção das enzimas e a necessidade de produzir enzimas mais eficientes (SUN; CHENG, 2002). A expectativa é de que o mercado de celulasas seja superior a 400 milhões de dólares por ano com a possível utilização das enzimas na hidrólise de palha de milho nos Estados Unidos da América para a produção de etanol de biomassa (PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

As celulasas são usadas em rações animais monogástricas e ruminantes. Nos animais monogástricos elas atuam em conjunto com as xilanases, na hidrólise de polissacarídeos não amiláveis (BHAT; BHAT, 1997). Já nos ruminantes, a utilização de celulasas em conjunto com pectinases e hemicelulasas, vêm da necessidade de aumentar a digestão das plantas forrageiras, base da alimentação dos animais, e assim poder incrementar a qualidade e digestibilidade da ração (BHAT, 2000).

Indústria do papel

Na indústria de polpa e papel, as celulasas estão presentes na fabricação de papel reciclado, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação de folhas de papel (BHAT; BHAT, 1997; LIMA, AUQRONE; BORZANI; SCHMIDELL, 2001).

Indústria de detergentes

Na indústria de detergentes apresentam um espectro de ação e de utilização bastante amplo, havendo, conseqüentemente, necessidade de especialização das formulações. A principal vantagem da formulação de detergentes que contenha enzimas é a substituição de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e que provocam o desgaste de materiais e de instrumentos. O uso diversificado das enzimas deve-se à sua característica de atuar como biocatalisadores especializados.

Os principais tipos de enzimas utilizadas nessa indústria incluem: a) amilases degradam amido e outros glicídios de carboidratos; b) proteases- degradam ligações peptídicas; c) lipases-degradam lipídeos; d) celulases- degradam celulose. Neste grupo, as celulases se destacam por degradar o tecido das roupas que contém algodão. O efeito nesse caso é a remoção de fibrilas de celulose que com o tempo passam a aparecer como penugem no exterior da fibra principal (BON, 1995).

Biocombustíveis

É o termo que se refere a qualquer tipo de combustível derivado de biomassa é uma fonte renovável de energia, ao contrário de outros recursos naturais, como petróleo, carvão e combustíveis nucleares. Embora se possa falar de muitos tipos de biocombustíveis, por causa da importância do seu volume, da aplicação e de produção. Existem basicamente dois: o bioetanol e biodiesel. Acredita-se que pode substituir mais combustíveis fósseis tradicionais, em virtude da sua baixa ou nula característica de degradação ambiental e renovação. Bioetanol, etanol ou biomassa, pode ser obtido a partir de milho, cana de açúcar beterraba e outras fontes através de processos de fermentação enzimáticas dos seus açúcares. Uma vez que a composição de celulose é muito rica em açúcar é muito útil para a produção de álcoois a partir da fermentação de celulose, componente estrutural principal de materiais vegetais (GARCIA & TRIÑANES, 2006).

Biomedicina

Baseados nas propriedades da celulose bacteriana diversos pesquisadores investigam sua utilização como scaffold para vasos sanguíneos artificiais. Recentemente, diversos grupos de pesquisa estudaram a utilização da celulose

bacteriana principalmente de *Gluconacetobacte rxylinus* (anteriormente *Acetobacte rxylinum*) (NGUYEN; GIDLEY; DYKES, 2008) para aplicações biomédicas. Entre essas aplicações, podem ser incluídas: substituto temporário de pele para recuperação de ferimentos e queimaduras (CIECHAŃSKA, 2004) cirurgias de restituição da laringe (DE SOUZA et al., 2011) produção de vasos sanguíneos artificiais (KLEMM et al., 2001), biomaterial para córnea (WANG et al., 2010), cartilagem artificial (SVENSSON et al., 2005), sistema para liberação de fármacos, recuperação de nervos, recuperação de gengiva, recuperação da dura-máter, revestimento de stents, válvulas cardíacas, uretra, prótese artificial e material de regeneração óssea (CZAJA et al., 2006). Estudos de biocompatibilidade da celulose bacteriana in vivo, utilizando modelos animais, têm demonstrado sua excelente capacidade de integração com o tecido lesado, sem a presença de processos inflamatórios agudos nem rejeição em longo prazo. Devido à sua estrutura única de rede tridimensional de nanofibras, sua capacidade de retenção de água elevada, uma elevada resistência mecânica e excelente biocompatibilidade, a celulose bacteriana vem sendo amplamente utilizada na engenharia de tecidos.

Por tanto, a importância de estudar a diversidade de micro-organismos degradadores de celulose isoladas do solo e principalmente bactérias, é o fato de conhecer, analisar e avaliar o amplo espectro das enzimas celulolíticas e como elas diferem entre espécies. Assim, o conhecimento destes micro-organismos e seus modos de ação tornam-se fundamental para definir as possíveis aplicações. Embora as características entre micro-organismos do solo sejam diferentes elas precisam ser estudadas de forma precisa para entender a cinética enzimática, assim como velocidades de reação, degradação de substratos, e fatores de crescimento bacteriano.

3. Objetivos

Objetivo geral

Isolar e caracterizar bactérias do solo degradadoras de celulose oriundas das cidades de Canguçu e Arroio do Padre no Estado Rio Grande do Sul e Belém do Pará no Estado de Pará, Brasil.

Objetivos específicos

- Isolar e selecionar bactérias degradadoras de celulose oriundas de diferentes tipos de solo pertencentes às cidades de Canguçu e Arroio do Padre no Estado Rio Grande do Sul e Belém do Pará no Estado de Pará;
- Verificar a velocidade de produção de biomassa microbiana;
- Quantificar a atividade enzimática extracelular de Exoglucanases e Endoglucanases produzidas por bactérias degradadoras de celulose;
- Quantificar a degradação de celulose realizada por bactérias degradadoras de celulose;
- Selecionar os melhores isolados na produção enzimática determinando seus potenciais para uso biotecnológico.

4. Artigo

O artigo intitulado Bioprospecção de bactérias do solo degradadoras de celulose conforme as normas da Revista World Journal Microbiology and Biotechnology, Ciências Biológicas II B2 e fator de impacto de 1,779

BIOPROSPECTION OF CELLULOSE-DECOMPOSERS SOIL BACTERIA

Yohana Melania López Hernández ¹; Anelise Vicentini Kuss²; Greice Hartwig Schwanke Peil³; Andrés Felipe Gil Rave⁴; José Pablo Villarreal Villarreal⁵; Giovana Duzzo Gamaro⁶

¹ **Pelotas Federal University, Biology Institute – Microbiology and Parasitology Department. Capão do Leão University Campus, without number 96010-900. Capão do Leão, RS – Brasil. Telephone: (53) 81544738. yohanalopez6@gmail.com**

² **Pelotas Federal University, Biology Institute – Microbiology and Parasitology Department. Capão do Leão University Campus, without number 96010-900. Capão do Leão, RS – Brasil. Telephone: (53) 32757619. anelisevk@gmail.com**

³ **Pelotas Federal University, Biology Institute – Microbiology and Parasitology Department. Capão do Leão University Campus, without number 96010-900. Capão do Leão, RS – Brasil. schwanke.greice@gmail.com**

⁴ **Pelotas Federal University, Biology Institute – Microbiology and Parasitology Department. Capão do Leão University Campus, without number 96010-900. Capão do Leão, RS – Brasil. pipe.biologia@gmail.com**

⁵ **Pelotas Federal University, Biology Institute – Microbiology and Parasitology Department. Capão do Leão University Campus, without number 96010-900. Capão do Leão, RS – Brasil. pablov_v@hotmail.com**

⁶ **Pelotas Federal University, Chemistry and Geoscience Institute. Biochemistry Department. Capão do Leão University Campus, without number. Jardim América. Postal code: 354. Telephone: (53) 32757355. ggamaro@yahoo.com.br**

Abstract

Soil microorganisms have a high bacterial biodiversity and an important group is the cellulose-decomposers bacteria, which through their endoglucanases, exoglucanases and β -glycosidases enzymatic complexes are responsible for the planet organic biomass degradation. Therefore to understand and apply their potentials in the biotechnology area, is necessary to know their biologic, biochemical and environmental characteristics and proprieties of the microorganisms involved in these degradation processes. In this sense, the aim of this work was the isolation and characterization through the enzymatic activity of cellulose-decomposers bacteria of diverse soil types from the cities of Canguçu and Arroio do Padre, situated in the state of Rio Grande do Sul and also from the city of Belem, situated in the state of Pará. Ten bacteria isolates where obtained. The cellulose degradation analysis verification was made by the Whatman N°1 filter paper and by the Luria-Bertani medium using the plate method. In the extracellular enzymatic production analysis, the substrate used was the Whatman N°1 filter paper for the β -1,4 exoglucanase and carboxymethyl cellulose for the β -1,4 endoglucanase. Also the microbial biomass analysis was made. The results showed that, the most effective cellulose degradation isolates having as substrates; the Whatman N°1 filter paper and the carboxymethyl cellulose, were; the BC5 and the BC2 bacteria respectively. In the endoglucanase β -1,4 enzymatic activity was the BC5 and for the β -1,4 exoglucanase was the BC8, meanwhile for the microbial biomass production, the best result was for the BC9 isolate bacteria. The results showed that between the different bacteria species from the different locals, significant differences were presented, when each of the analysis were compared and therefore this can be associated to the different types of ecosystems and to the biochemical and environmental characteristics in each type of soil, having different mechanisms directly related with the cellulose degradation. Therefore, these microorganisms have a potential use in diverse biotechnological and bioremediation cellulose degradation processes.

Key-words: cellulolytic microorganisms, cellulolytic enzymes, endoglucanase, exoglucanase, soil.

Introduction

The cellulose is a linear polysaccharide of glucose residuals with β -1, 4- glycosidic bonds. Among natural materials is the most abundant biopolymer and it can be hydrolyzed by the enzyme denominated cellulase, found as a multi-enzymatic complex where the final product result is the glucose. In nature, these process represent the highest source of carbon in the soil (LYNCH, 1981), having a wide variety of microorganisms, such as fungi and bacteria able to produce cellulase.

Although, bacteria has a high potential in allowing a better separation of the lignin from the cellulose, having the genres; *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Streptomyces* and *Actinomycetales*, as the better known (LYND, 2002) and (PERÉZ, 2002), employing; cellulases, laccases and extracellular peroxidases. In laboratory conditions, cotton and filter paper and other types of substrates inducers, are the ones commonly used to stimulate the exo-glycosidases enzyme production and also for the total cellulolytic complex activity measurement (ROBSON, 1989). For each bacterial species, the cellulose degradation can be related with the genetic feature and the specie's biochemical characteristics, related with the soil physicochemical properties, ecological and environmental factors, from the place of origin (PERÉZ, 2002).

Its abundant availability becomes a raw attractive material for the production of a lot of important industrial products, through cheapest process and favorable ecological (GUPTA, 2012). In first place there is a residual degradation and pollution reduction of the environment. In second place, due to its large scale applicability, it can be used in industrial processes, such as the production of biofuels, the bioethanol (EKEPERIGIN, 2007)(VAITHANOMSAT, 2009), the agriculture management of vegetal residuals (LU, 2004) and the fermentation and bioremediation processes. Therefore the aim of this research was the soil's bacteria cellulose-decomposers characterization and comparison from the cities of Canguçu and Arroio do Padre from the state of Rio Grande do Sul and the city of Belém do Pará from the state of Pará, in Brazil.

Materials and methods

Obtainment of the bacterial isolates

Sample origin

The soil samples were obtained from different cities belonging to the states of Pará and Rio Grande do Sul, Brazil, comparing the cellulose degradation differences for each isolate of each local place. The soil samples from Belém do Pará (Pará) were collected from the Amazon rainforest, from Arroio do Padre (Rio Grande do Sul) were collected from the familiar agro ecosystems, under the Lavoura-Pecuária integration and from Canguçu (Rio Grande do Sul) were collected from a rural open field. The soil was collected from soil layers (0,00-0,20cm of deep) cutting shovel, conditioned in plastic bags and taken to the Environmental Microbiology Laboratory in the Biology Institute/UFPel for further analysis (Embrapa, 2011). For each positive isolate, the initials (BC) were named, for the cellulolytic bacteria.

Experimental design

The experimental design used was completely randomized design, with three repetitions for all the dependent variables. For the filter paper degradation variable, the experiment was arranged in a unifactorial scheme, the treatment factor tested were; the cellulolytic bacteria isolates (BC1 to BC10, beyond the controls, 1 and 2). For the colony diameter, the inhibition halo and the enzymatic index, the unifactorial scheme was adapted, the tested treatment factor was the cellulolytic bacteria isolates (BC1 to BC10).

For the microbial biomass variable, the bifactorial scheme was adapted. The treatment factor A tested the cellulolytic bacterial isolates (BC1 to BC10, beyond the controls) and, the factor B tested the evaluation times (0, 6, 12, 18, 24 and 30 hours). In the glucose-cellobiose's variable activity, the experiment was arranged in a bifactorial scheme. The factor of treatment A tested the evaluation times (0, 6, 12, 18, 24 and 30 hours), and the factor B tested the doses (0,1, 0,4 and 07 mL), that comparison was realized for separated, for both the β -1,4-exoglucanase and the β -1,4-endoglucanase, for each cellulolytic bacterial isolate.

Isolated method and morphologic characterization

For each bacterial isolate, 1 g of each soil sample was weighted and collocated in jars containing saline solution (0,85%). The solutions were agitated in a (Orbital Shaker Warmnest) shaker for 1 hour at 120 rpm and after that, the serial dilution was performed.

Posteriorly, aliquots of 100 μL were inoculated in the plates containing Luria-Bertani (0,2 % of CMC) solid media and they were incubated at 30 °C for 24 hours. Were considered as positive, the colonies that formed a clear zone around (degradation halo). The bacterial cells were stored at -6 °C, using a glycerol solution at (10 %) as cryoprotectant. Each of the positive colonies was morphological characterized in appearance and arranged using the Gram staining method.

Cellulose's degradation analysis

Cellulose's degradation determination with filter paper

For each isolate, a bacterial inoculum with a concentration of 10^8 UFC mL^{-1} was prepared, indirectly quantified by optic density at O.D_{600} , incubated under agitation of 100rpm at 37 °C in mineral medium (2,5 g of NaNO_3 ; 2 g of KH_2PO_4 ; 0,2 g of MgSO_4 ; 0,2 g of NaCl ; 0,1 g of $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 6,8-7,2) containing (Whatman Filter Paper N°1) filter paper as the only cellulose source and using as negative control an saline solution inoculum. The filter paper's patronization was made cutting tapes in size of 1x6 cm and 12,5 mg in weigh, each jar contained the inoculum and the negative control. After ten days of incubation, each sample was taken for dry and for weighing of the filter paper. The results were shown in mg (GUPTA, 2012).

Proof of the cellulose's degradation in solid medium

For the potential cellulose's degradation confirmation, the bacteria were incubated in plates containing Luria-Bertani medium, supplemented with 0,2 % of CMC. After three days of incubation at 30 °C, the plates were immersed in *Lugol's solution* (1 mg mL^{-1}) for 3 minutes, according with the Ramesh's method et al 2008. The solution was then washed with NaCl 1M (REINHOLD-HUREK et al., 1993). The positive isolates cellulose's degradation potential was evaluated qualitatively, estimating the enzymatic index (I.E) calculation: $(\text{Colony Diameter} + \text{halo Diameter}) / \text{Colony Diameter}$.

Extracellular Enzymatic Production

For the extracellular enzymatic quantification 1 mL of bacterial concentration (10^8 UFC mL^{-1}) of each one of the eleven bacterial isolates obtained was used and collocated in 3 mL of

liquid Luria-Bertani medium supplemented with CMC 10%. The tubes were incubated at 28 °C in constant agitation at 130 rpm in a (Orbital Shaker Waemnest) shaker for the extracellular enzymatic quantification analysis, aliquots of 2 mL for each tube were removed in intervals of 6 hours during 24 hours and collocated in microtubes for further centrifugation (refrigerated digital micro processed centrifuge CT-15000R) at 6.000 rpm. After the centrifugation each microtube of each isolate was separated in different microtubes containing the supernatant and the *pellet* respectively (MIKÁN; CASTELLANOS, 2004).

β-1,4 exoglucanase's activity

For each bacterial isolate, 800 µL of the supernatant, 12,5 mg of the Whatman N°1 filter paper, 200 µL of the sodium acetate tampon solution 0,6 M with pH 6,0 were collocated in microtubes and incubated at 50 °C for 50 minutes (RAMÍREZ; COHA, 2003).

β-1,4 endoglucanase's activity

For each bacterial isolate, 200 µL of the supernatant, 875 µL of CMC (1 %) and 25 µL of the sodium acetate tampon solution (1,0 M with pH 6,0) were collocated in microtubes and incubated at 50 °C for 50 minutes (RAMÍREZ; COHA, 2003).

Microbial biomass determination and sugar reducers

Microbial biomass was determined by the *pellet* drying and weighting of each bacterial isolate. The sugar reducers liberation was determined by the Somogyi-Nelson's method (SOMOGYI, 1952; NELSON, 1994) using a spectofotometer (Model IL-227 Kasuaki) at an O.D of 665nm. The activity results were expressed in UI mL⁻¹, considering the free enzyme quantity of 1 µM glicose min⁻¹, a unit (RAMÍREZ; COHA, 2003).

Statistical analysis

The data obtained was analyzed for normality using the Shapiro's Wilk test; the homoscedasticity using the Hartley test; and, the independence residuals by the graphic analysis. Later, the data was submitted to variance analysis through the F test ($p \leq 0,05$). Showing statistical significance, the cellulolytic bacteria isolates effects were compared by the Tukey test ($p \leq 0,05$); the controls were evaluated by the Dunnett test ($p \leq 0,05$); and, the evaluation times, by the quadratic polynomial regression model ($p \leq 0,05$), as it follows: $y = y_0 + ax + bx^2$, were: y = variable response; y_0 = response variable corresponding to the minimum

point curve ; a = estimated highest value for the response variable; b = curve's declivity; x = evaluation time (hours). The time and doses comparison was realized by the multiple regression models, using the surface regression response procedure (PROC RSREG), with examination of the linear effects, quadratic and linear interactions of the independent variables (FREUND; LITTELL, 1991). The model's selection was based on the: (a) residue; (b) p value ($p \leq 0,05$); (c) standard deviation; and (d) R^2 and R^2_{adj} . Then, the polynomial equation of the second order to the response's variables data was adjusted: $y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$, where y is the variable response; x_i, x_j are the entrance variables, that influenced the response variable y ; β_0 is the interception; β_i is the linear effect; β_{ii} is the quadratic effect and β_{ij} is the interaction between x_i and x_j . The additional rotational canonical analysis to the surface response was applied for optimization, in which the variables levels (x_1 , time; x_2 , dose) (inside the experimental interval) were determined to obtain the response of each dependent variable studied. The function's optimization responses, constitutes in the function response traduction (y_k), from the origin towards the stationary points (x_0). The function response was maximized when all the roots obtained negative values and was minimum when all the roots obtained positive values. If any of the roots presented positive and other negatives values, a saddle point was characterized (MYERS, 1971; KHURI; CORNELL, 1989).

Results and discussion

Bacterial isolates

Ten positive bacterial isolates from the three cities in two states of Brazil were obtained for the cellulose's degradation evaluation. As result, the bacterial isolates BC1, BC2, BC9 and BC10 were obtained from the rural open field of Canguçu, in the state of Rio Grande do Sul. Four isolates BC3, BC4, BC5, BC7 from the Amazon rainforest in Belém do Pará, state of Pará. And the two isolates; BC6, BC8 from the familiar agro ecosystem, under the integration system Lavoura-Pecuária in Arroio do Padre, state of Rio Grande do Sul. From the ten bacterial isolates, only four (BC1, BC3, BC7, BC9) belongs to Gram positive bacteria and six (BC2, BC4, BC5, BC6, BC8, BC10) belongs to Gram negative bacteria (Table 1).

Table 1

Morphologic characterization of the degradative cellulose bacteria.

Bacteria	Gram stain	Bacteria morphology
BC1	Positive	Coco bacillus
BC2	Negative	Cocos
BC3	Positive	Coco bacillus
BC4	Negative	Cocos
BC5	Negative	Cocos
BC6	Negative	Cocos
BC7	Positive	Coco bacillus
BC8	Negative	Cocos
BC9	Positive	Cocos
BC10	Negative	Coco bacillus

Cellulose degradation analysis

Cellulose degradation determination

For the filter paper's degradation variable, the significance difference only occurred for the native BC5 bacteria from the Amazonia rainforest. When each isolate was compared with the control 1 (dry weight), a difference in relation to the BC5 occurred, showing a higher percentage degradation with a value of 10,72%, were probably the production of extracellular enzymes was more elevated. However, referring to control 2, there were no differences in all the isolates.

In general, the ten bacteria presented weights too closed in relation to the dried filter paper used as control 1 and the weight in control 2 filter paper, this can be associated to the low extracellular protein free production in the liquid medium, directly affecting the paper's degradation. Low percentages were identified as they were compared with the weight, for the dried filter paper as in the liquid medium containing saline solution as inoculum (Table 2).

Table 2

Filter paper's degradation of the cellulolytic bacteria isolates.

Bacteria	Degradation percentage (%)
BC1	3,6 ^{1/} ns ^β
BC2	3,6 ns ^β
BC3	0 ns ^β
BC4	7,14 ns ^β
BC5	10,71 * ^β
BC6	7,15 ns ^β
BC7	3,6 ns ^β
BC8	0 ns ^β
BC9	0 ns ^β
BC10	0 ns ^β

^{1/} Averages ($\pm$ Standard error) accompanied by the same letter does not differ between them by the Tuckey test ($p \leq 0,05$) comparing the cellulolytic bacteria isolates. * and ^{ns} Significance and no significance, respectively, in relation to control 1 (dry weight) by the Dunnet test ($p \leq 0,05$). ^β No significance in relation to control 2 by the Dunnet test ($p \leq 0,05$).

Confirmation of the cellulose's degradation in solid medium

The cellulose's degradation confirmation was obtained from ten bacteria comparing the colony diameter, the bacteria with the highest development were CB6 with 6,55mm and CB92, with 45 mm. However, the highest cellulose's degradation halo's diameter was for the CB6, with an average of 7, 85 mm.

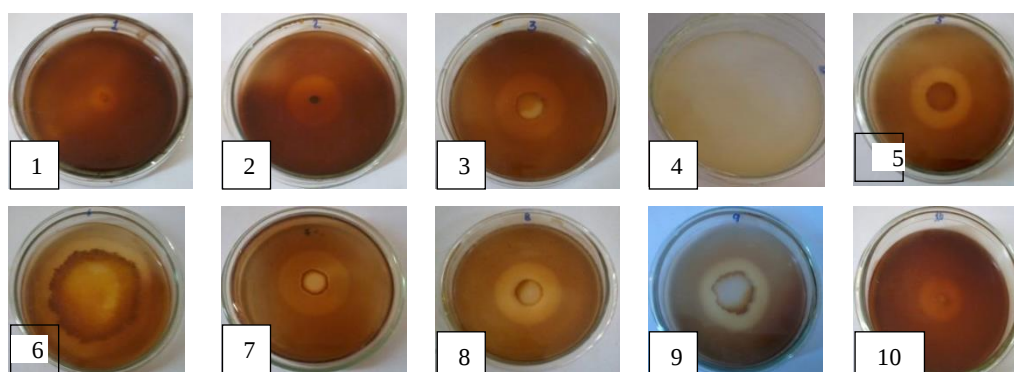
The method for the extracellular enzymes evaluation with solid medium, determined a direct relation between the halo's size and the microorganisms degradative capacity; therefore it suggests that the enzyme's index $\geq 2, 0$ mm allows the consideration of a microorganism as an enzyme potential producer in solid medium (LEALEM; GASHE, 1994). Nine bacteria showed enzymatic indexes highest than $\geq 2,0$, they were considered as extracellular enzyme potential producers (Table 3). The BC4 isolate didn't showed colony growth and therefore, do not developed a degradation halo (Figure 1).

Table 3

Colony diameter (mm), degradation halo (mm) and cellulolytic bacteria enzymatic index.

Bacteria	Colony diameter (mm)	Halo's diameter (mm)	Enzymatic Index (IE)
BC1	0,65±0,12 de ^{1/}	1,55±0,10 d	3,55±0,33 b
BC2	0,97±0,35 cde	3,35±0,25 c	5,33±0,90 a
BC3	1,87±0,08 bc	4,10±0,04 bc	3,20±0,08 b
BC4	0,00±0,00 e	0,00±0,00 e	0,00±0,00 c
BC5	1,75±0,18 bc	3,80±0,08 bc	3,25±0,25 b
BC6	6,55±0,16 a	7,85±0,09 a	2,20±0,03 b
BC7	1,80±0,40 bc	4,25±0,25 b	3,68±0,48 ab
BC8	1,62±0,02 bcd	3,92±0,02 bc	3,42±0,04 b
BC9	2,45±0,14 b	4,42±0,05 b	2,82±0,10 b
BC10	1,55±0,28 bcd	3,35±0,43 c	3,23±0,14 b

^{1/} Average (± standard error) accompanied by the same letter do not differed between them using the Tuckey's test ($p \leq 0,05$).

**Fig. 1**

Cellulose's activity through the substrate's degradation halo (CMC).

1 BC1, 2 BC2, 3 BC3, 4 BC4, 5 BC5, 6 BC6, 7 BC7, 8 BC8, 9 BC9, 10 BC10.

Extracellular enzymatic production

β-1,4-exoglucanase's activity

The glucose-cellobiose's activity data from the β-1,4 exoglucanase activity obtained from all the cellulolytic bacteria isolates adequately adjusted to the established regression model (Table 5). During the optimization process for this variable, the

auxiliary equations roots were positive and negative in their magnitudes, indicating that the stationary point was a saddle point for all the isolates (Figure 2). For the BC10 isolate, the function response was maximal, all the roots obtained negative values and the predicted value in the maximal stationary point was of 84,69 U mL⁻¹ of glucose-cellobiose with 35,3 hours and 0,88 mL (Figure 2 and 4).

Table 4

Cellulolytic bacteria regression model adjusted values.

Bacteria	Value F	<i>p</i> -value	R ²	R ² adj
BC1	90,48	<i>p</i> = 0,004	0,85	0,82
BC2	6,99	<i>p</i> = 0,003	0,74	0,72
BC3	67,02	<i>p</i> = 0,0001	0,89	0,88
BC4	40,03	<i>p</i> = 0,001	0,83	0,80
BC5	43,48	<i>p</i> < 0,0001	0,60	0,59
BC6	46,98	<i>p</i> < 0,0001	0,65	0,62
BC7	9,57	<i>p</i> = 0,01	0,69	0,67
BC8	63,56	<i>p</i> < 0,0001	0,90	0,88
BC9	4,78	<i>p</i> = 0,01	0,68	0,66
BC10	36,56	<i>p</i> < 0,0001	0,86	0,84

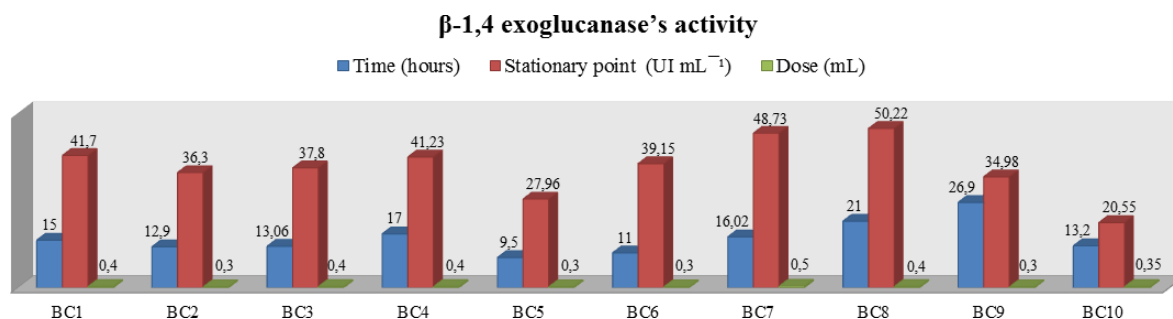


Fig. 2

β-1,4 exoglucanase's activity according to the best dose, best time and highest activity for each isolate.

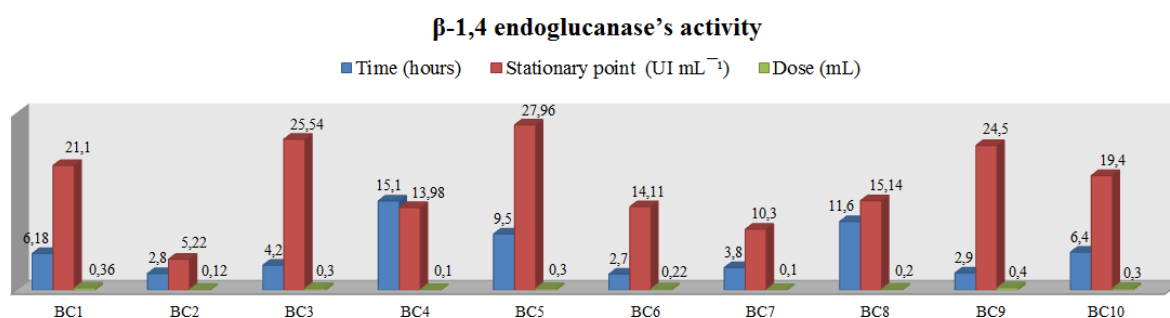
β-1,4-endoglucanase's activity

The glucose-cellobiose's activity data from the β-1,4 endoglucanase activity in all cellulolytic bacteria isolates, adjusted adequately to the regression model shown in Table 5, also the roots from the equations were positive and negative in their magnitudes (Figure 3).

Table 5

Adjusted values to the cellulolytic bacteria regression model.

Bacteria	Value F	<i>p</i> -value	R ²	R ² adj
BC1	7,08	<i>p</i> = 0,003	0,74	0,72
BC2	12,48	<i>p</i> = 0,0002	0,84	0,81
BC3	76,83	<i>p</i> = 0,0001	0,87	0,85
BC4	6,76	<i>p</i> = 0,003	0,74	0,73
BC5	3,35	<i>p</i> = 0,04	0,60	0,59
BC6	4,17	<i>p</i> = 0,02	0,63	0,60
BC7	9,57	<i>p</i> = 0,03	0,65	0,62
BC8	6,72	<i>p</i> = 0,003	0,74	0,72
BC9	5,96	<i>p</i> = 0,01	0,68	0,66
BC10	41,65	<i>p</i> < 0,0001	0,88	0,87

**Fig. 3**

β-1,4 endoglucanase's activity according with the best dose, best time and highest activity for each isolate.

Microbial biomass

The microbial biomass analysis results demonstrated significance in the interaction between the treatment isolates bacteria factors and the evaluation times ($F = 34,55$; $p < 0,0001$). In the isolate's comparison inside each time, significance differences were shown in the hour six of the evaluation time, the bacteria BC8 differed from the others with a highest average, followed by the BC10 and BC4 bacteria. While in the 12 hour of the evaluation period, the BC4 bacteria differed from the others, followed by the BC5 and BC8 bacteria. In both the 18 and 24 hours of the evaluation period, the BC2 bacteria was characterized by a higher average, but in the 18 hours differed only from the BC1 and BC7, and in the 24 hours presented difference in relation to all the others isolates. In the 30 hours, the BC8 presented a

higher average, differing from the others. Significance differences were shown for all the isolates in relation to the controls in the 12, 24 and 30 hours of the evaluation time (Table 6). The microbial biomass data adequately adjusted to the regression quadratic polynomial model only for the isolates BC1 ($F = 7,7461$ and $p = 0,0111$), BC2 ($F = 6,7476$ and $p = 0,0162$), BC6 ($F = 10,7765$ and $p = 0,0041$), BC8 ($F = 6,1425$ and $p = 0,0208$) and BC9 ($F = 45,2735$ and $p < 0,0001$) (Figure 4).

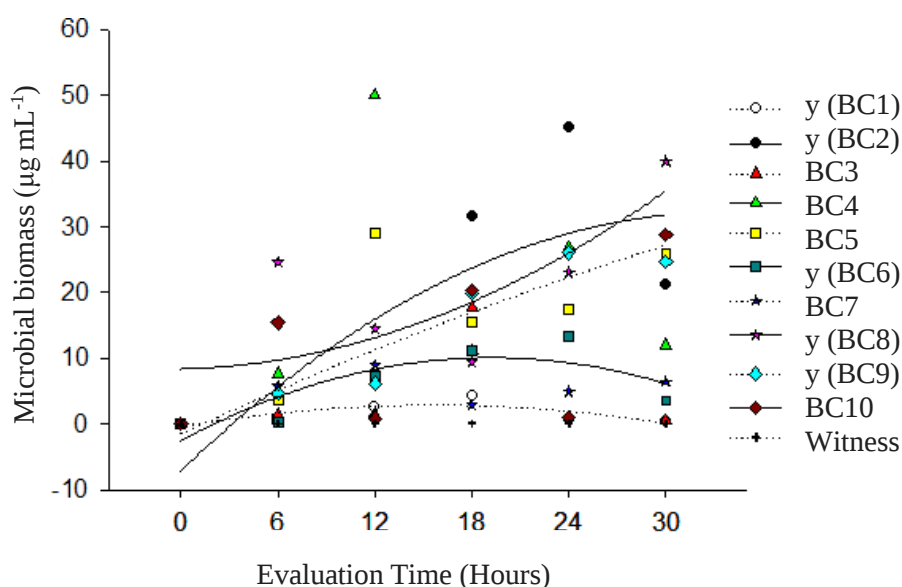


Fig. 4

Cellulolytic bacterial microbial biomass ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in function of the evaluation time (hours).

Increases are shown in the biomass values of 81,4; 122,0; 122,0 e 81,4% respectively for 12, 18, 24 and 30 hour periods for the BC1 bacteria, when compared at six hours of evaluation time. In the BC2 and BC6 bacteria at 18 hours, the increases were superiors to 150% when compared at six hours of evaluation. Initially in the BC8, the lowest increases percentages being of 36,7 and 95,3% for 12 and 18 hours respectively were verified, when compared at 6 hours. While the BC9 obtained 120,6% of increase for the 12 hour period of evaluation time, when compared at 6 hour of evaluation.

Discussion

Cellulose's degradation determination

The study of bacteria able to degrade cellulose can depend of several factors that influence the action mechanisms of the multienzymatic complex inside each specie. From the studying bacteria analysis of a macerated intestine of organisms with cellulose alimentation revealed that this can be more efficient, the analysis showed that the maximum and minimum rates of the filter paper's degradation were of 65,7 and of 55 %, respectively, estimated in the third day of incubation of 8 isolates (GUPTA, 2012). The documented result by Lu et al. (2004), demonstrated that the detected cellulose's degradation in four groups of mixed cultures varied between 19,4 to 26,3 %. Similar results in the paper's degradation rates varied of 31 to 60 % after 10 days in mixed bacteria population by the gravimetric procedure (BICHET-HEBE, 1999). These results differed from this work considering that for the 10 days of incubation, the Whatman filter paper's degradation did not exceeded the 10%, however they become comparative to the work by Silva et al. (2012), where it was demonstrated that after only 100 days of incubation of the filter paper, there was a loss of the cellulose's total mass, when the soil's isolates were evaluated with vinasse. There by the analysis from these cellulose's enzymatic hydrolysis mechanisms, were from some aerobic bacteria that are bonded to the cells or to the substrate, where they can produce extracellular enzymes with different adherence ways in different substrate's configurations, meaning that a microorganism's population can adopt distinct strategies in the enzymatic production, like for example, the anaerobic and aerobic degradation relation, this symbiotic association may increase or not the degradation's efficacy (CUNHA-SANTINHO, 2003).

The results from this study for the cellulose degradation's verification in solid medium, were similar to the enzymatic index of 1,38 to 2,33IE and 0,15 to -1,37IE in the agriculture soil's cellulolytic aerobic bacteria and florestal soil, respectively (HATAMI et al. 2008), also they are comparative with the results of four bacteria EF1, RU3, RU4, RA2 isolated from *Macrotermes gilvus intestine*, being a termite specie. It was shown from the strain's cellulolytic activity that RA2 had the highest enzymatic index of 2,5 and the RU3 isolate the lowest of 0,75 (FERBIYANTO, 2015). In the other hand, Araújo et al. (2015) studying 21 actinobacteria strains from the Parque Nacional de Ubajara, in the state of Ceará, verified that the inhibition halo diameters of the studied actinobacteria strains varied from 3,75 to 31,75, meanwhile the enzymatic index varied from 1,18 in the UB-03-R1 strain to 6,90 in the UB-05-R1 strain. These values can be compared with the evaluation of eight bacteria, obtained from four different invertebrates (termites, snail, caterpillar, and other). The reported

enzymatic index varied between 9 and 9,81E and the degradation halo diameters were between 45 and 50mm (GUPTA, 2012) differing from this study results.

The analysis made for the exoglucanase enzyme showed different stationary points for each bacteria. Specific activities of the proteins from the production of β -1,4 exoglucanase by the *Streptomyces* sp 7CMC10 strain was of 2,61UI mg^{-1} in 72 hours (RAMIREZ; COHA, 2003). Santos et al. (2013), analyzed agro industrial residuals through fermentative process, which they obtained that the β -1,4 endoglucanase reach the index of 9,32U mL^{-1} . However, *Streptomyces* sp cultivated in peptone contained solution and 1,0% of Tween 80 in crystal cellulose (GEORGE, 2001), when cultivated it in paper powder containing medium with cellulose, yeast extract and Tween 80, showed a peak of 23 U mL^{-1} , meanwhile cultivated in wheat bran was of 8,5 U mL^{-1} . The enzymatic activities in the diverse microorganism's enzymatic complex are regulated by diverse environmental factors such as; the temperature, pH and salinity (VINOGRADOVA.; KUSHNIR, 2003), which can be involved with physicochemical factors in the soil and the genetic characteristics of the specie.

A similar study made by Ramirez and Cocha (2003) with *Streptomyces* sp. 7CMC10 and 11CMC1 strains, showed that the highest values for the two strains were of 20,14UI mg^{-1} and 9,55UI mg^{-1} , respectively, corresponding to proteins related to endoglucanases with activities in 72 hours period. Results of 6 analyzed types of industrial celulases (Youtell, RCconc, Lerkam, Yishui, R-10, and Sinopharm) shown that the enzymes activities vary in the glucose release and that the highest values were for 7,7UI/mL Sinopharm up to 69.90UI/mL Youtell (Yu, 2016) which are similar in the analysis of some bacteria of this work. In the cellulolytic enzymes study, the substrate's specificity and the specie's detailed knowledge can lead to more specific results, because the cellulase is a system that includes the endoglucanases, exoglucanases and β -D glycosidases that act hydrolyzing the crystal cellulose in a joint way (MULLINGS, 1985; CRIQUET et al., 2002; HELBERT et al., 2003; EVELEIGH et al., 2009; FARNET et al., 2010; DASHTBAN et al., 2010) which sometimes cannot be identified in inaccurate analysis.

The microbial biomass production process depends to the total reproductive capacity of the bacteria cells, which cannot be maintained for a long period of time. This is why the microbial population turns limited by the essential nutrient scarcity, or when an unfavorable ionic equilibrium develops (pH) or by the environmental toxic substances accumulation. Actinobacteria *Streptomyces* sp. 3 presented activity in the 116 hour period and only had

endoglucanase and cellobiase activity (Figure 3B). It is worth mentioning that the actinobacteria *Streptomyces* sp. 3 have moderate biomass growth before the 116 hour period, which can be related to the substrate degrade activity, not detected by the used methods.

When a constant mortality rate is established the culture begins to die exponentially, until finally sterility occurs. But, after most all of the cells had died, the mortality rate can show a decline marked by the fact that small number of cells continue to survive. The continuing growth in the nearby hours of this small survivors population can be attributed by the nutrients availability from cells that die and slowly decomposes, increasing again the population during the evaluation time.

Conclusion

The isolated cellulolytic bacteria from different soil types presented different cellulose's degradation index and efficiency, when compared with their realized enzymatic index in plates and the analysis of each one of the enzymes involved in the cellulose enzymatic complex. The most effectives isolates of each analysis were the BC5 for the Whatman filter paper's degradation, the BC2 in the enzymatic index analysis, the BC9 in the microbial biomass analysis, the BC8 in the β -1,4 exoglucanase's enzymatic activity, the BC5 in the β -1,4 endoglucanase's enzymatic activity.

Acknowledgments

To the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) program, to the Biochemistry and Bio prospection postgraduate program at the Federal University of Pelotas, Brazil and to the Environmental Microbiology Laboratory IB/DEMP/UFPel.

References

Araújo silva VM, Esteves de britto F, Alves K, Da Silva, MR. Miranda M, Silveira SC. (2015). Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido. Revista brasileira de geografia física, 08, pp.560-572.

- Bichet-hebe AM, Pourcher I, Sutra C, Comel G, Moguedet. Detection of a whitening fluorescent agent as an indicator of white paper biodegradation: a new approach to study the kinetics of cellulose hydrolysis by mixed cultures. (1999). *Journal of microbiological methods*, 37, 2, pp.101-109
- Criquet S. (2002). Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. *J. Microbiol. Methods*, 50, pp.165-173.
- Dashtban M, Maki M, Leung KT, Mao C, Qin W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 30, pp. 302–309.
- Dos Santos TC, Filho GA, Honório Rocha TJ, Ferreira AS, Diniz GA, Franco M. (2013). Produção e quantificação de celulasas por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais scientia agraria paranaensis - sap mal. *Cdo. Rondon*, 12, 2, pp.115-123.
- Ekeperigin M. (2007). Preliminary studies of cellulase production by *acinetobacter anitratus* and *branhamella* sp. *African journal of biotechnology*. 6, 1, pp.28-33.
- Eveleigh DE, Mandels M, Andreotti R, Roche C. (2009). Measurement of saccharifying cellulase. *biotechnol.biofuels*, 2, pp. 1–8.
- Farnet AM, Qasemian I, Guiral D, Ferre E. (2010). A modified method based on arsenomolybdate complex to quantify cellulase activities: application to litters. *Pedobiologia*, 53, pp. 159–160.
- Ferbiyanto A, Rusmana I, Raffiudin R. (2015). Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut of worker *macrotermes gilvus*. *Hayati journal of biosciences*.
- Freund RJ, Littell RC. (1991). *Sas system for regression*. Sas institute inc., north carolina, usa, pp. 127-150.
- George SP, Ahmad A, Rao MB. (2001) Studies on carboxymethyl cellulose reduced by an alkalothermophilic actinomycete. *bioresource technology*, 77, pp.171-175, 2001.
- Gupta PK. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International journal of microbiology*, 1-5.
- Hatami S, Aliakhsni HA, Besharati H, Salehrastin N, Afrousheh M, Jahromi ZY, (2008). Investigation of aerobic cellulolytic bacteria in some of north forest and farming soils. *The american-eurasian journal of agricultural & environmental sciences*, 5, pp. 713–716.
- Helbert W, Chanzy H, Husum TL, Schlein M, Ernst S. (2003). Fluorescent cellulose microfibrils as substrate for the detection of cellulase activity. *biomacromolecules*, 4, pp. 481–487.

- Kasana RS, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr microbiol*, 57, pp.503-507.
- Khuri IJ, Cornell JA. (1989). *Response surfaces: designs and analyses*, marcel dekker, new York.
- Lu WJ, Wang HT, Yang ZJ, Wang ZC, Nie YF. (2006). isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *journal of general and applied microbiology*, 51, 6, pp. 353–360.
- Lu WJ, Wang HT, Nie YF, Wang ZC, Huang DY, Qiu X, Chen JC. (2004). Effect of inoculating flower stalks and vegetable waste with ligno-cellulolytic microorganisms on the composting process. *Journal of environmental science and health*. 39, 5-6, pp.871-887.
- Lynch JS, Slater JH, Bennett JH, Sarper SHT. (1981). Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. *Journal of general microbiology* 127, pp.231-236.
- Lynd LW, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, pp.506-577.
- Mikán J, Castellanos D. (2004). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 4(1), pp.58-71.
- Mullings R. (2005). Measurement of saccharification by cellulases. *enzyme microb. technol.*, 7, pp. 586–591.
- Myers RH. (1971). *Response surface methodology*, allyn and bacon, boston.
- Nelson NA. (1994). Photometric adaptation of somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, pp.375-380.
- Peréz J, Muñoz JD, Rubia T, Martínez J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5, pp.53–63.
- Robson L, Cambliss HC. (1989). Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and microbial technology* 11, pp.626-644.
- Pratima G, Kalpana S, Avinash S. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International journal of microbiology*, pp.1-5.
- Ramírez P, Coha JM. (2013). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetes termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista peruana de biología* 10(1), pp.67-77.
- Reinhold-hurek B. (1993) Cloning, expression in *escherichia coli* and characterization of cellulolytic enzymes *azocarcus* sp. A root-nodule diazotroph. *Journal of bacteriology*, 175, pp.7056-7065.

Silva AN, Da Silva AP, Batista SB, Hardoim EI. (2012). Análise quali-quantitativa de bactérias com atividades enzimáticas celulolíticas e proteolíticas isoladas de solo adicionado de vinhaça. *Revista de biologia e ciências da terra*, 12.

Vaithanomsat PC. (2009). Bioethanol production from enzymatically saccharified sunflower stalks using steam explosion as pretreatment,. *Proceedings of world academy of science, engineering and technology*, vol. 37, pp.140-143.

Vinogradova SP, Kushnir SN. Biosynthesis of hydrolytic enzymes during cocultivation of macro- and micromycetes. *appl. Biochem. Microbiol*, 39, pp.573-575.

Xu X, Liu Y, Cui Y, Cheng Q, Zhang Z, Lu JH, Meng Q, Teng I, Ren X. (2016). Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay. saudi journal of biological sciences, 23, 1, pp.s93-s98.

Anexo 1

Atividade enzimática dos isolados para a enzima β -1-4 exoglucanase

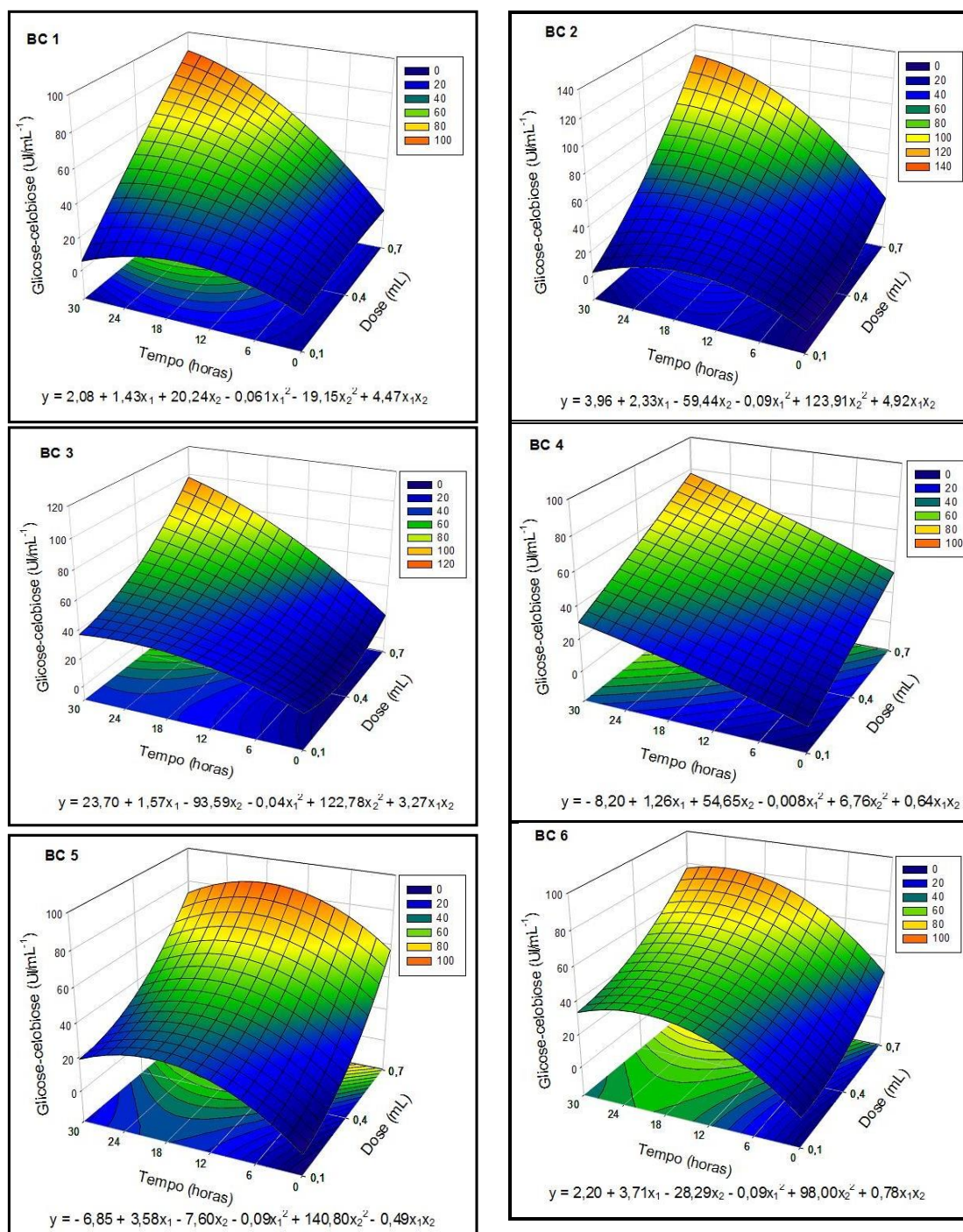


Figura 1 - Glycose-cellobiose's (UI mL⁻¹) activity from the β -1,4 exoglucanase of cellulolytic bacteria isolates (BC1 to BC6) according to the evaluation time (hours) and to the enzyme dose.

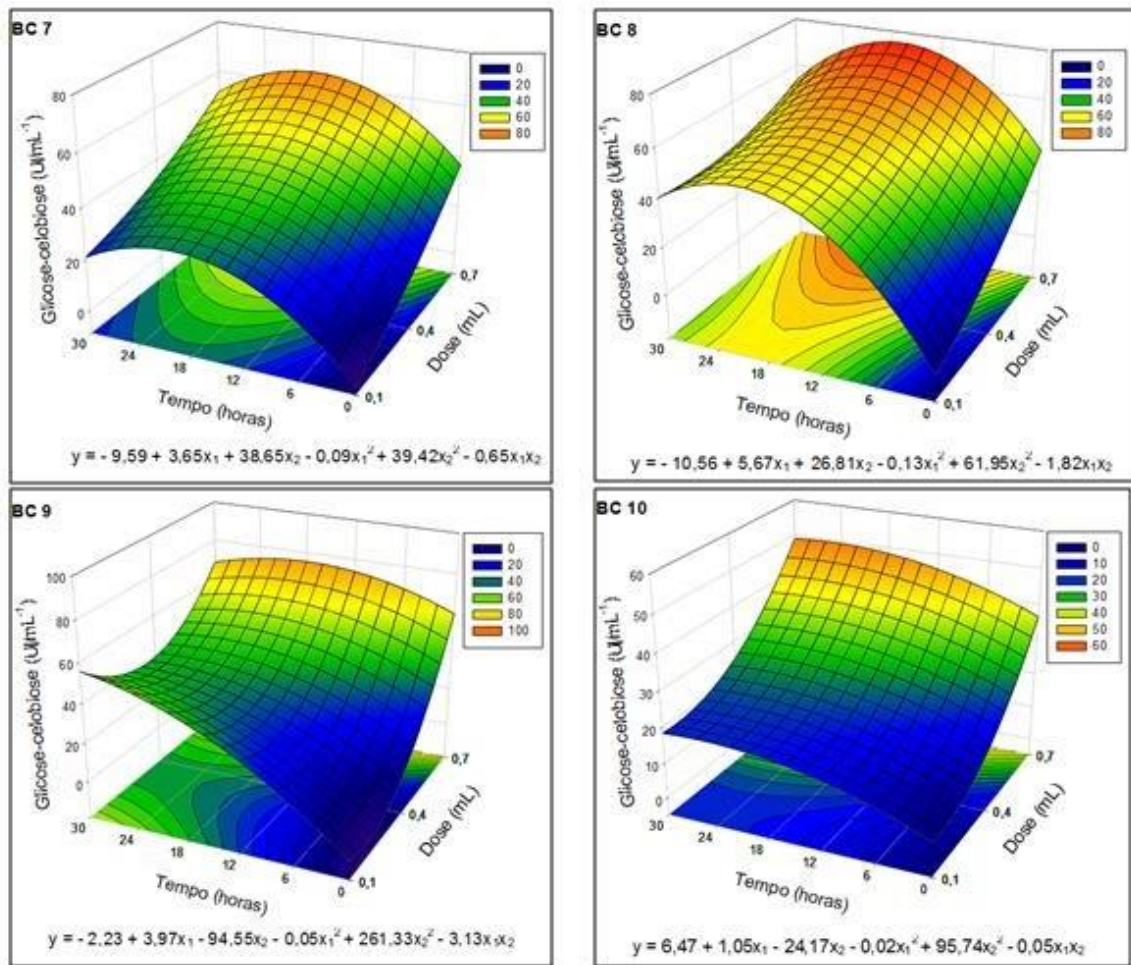


Figura 2 - Glycose-cellobiose's (U mL⁻¹) activity from the β-1,4 exoglucanase of cellulolytic bacteria isolates

Anexo 2

Atividade enzimática para a enzima β -1,4 endoglucanase

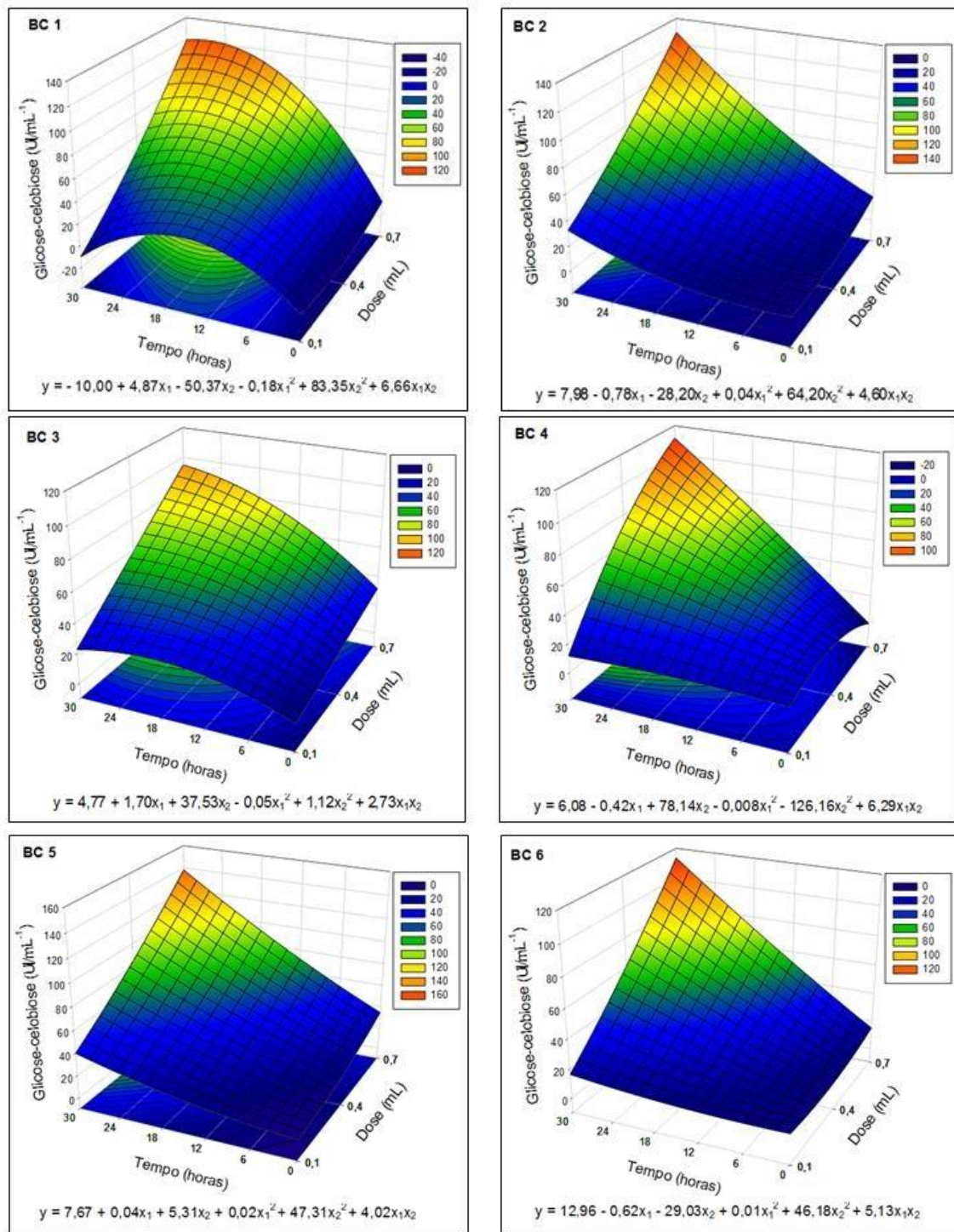


Figura 3 - Glycose-cellobiose's (U mL⁻¹) activity from the β -1,4 endoglucanase of cellulolytic bacteria isolates (BC1 to BC6) according to the evaluation time (hours) and to the enzyme dose.

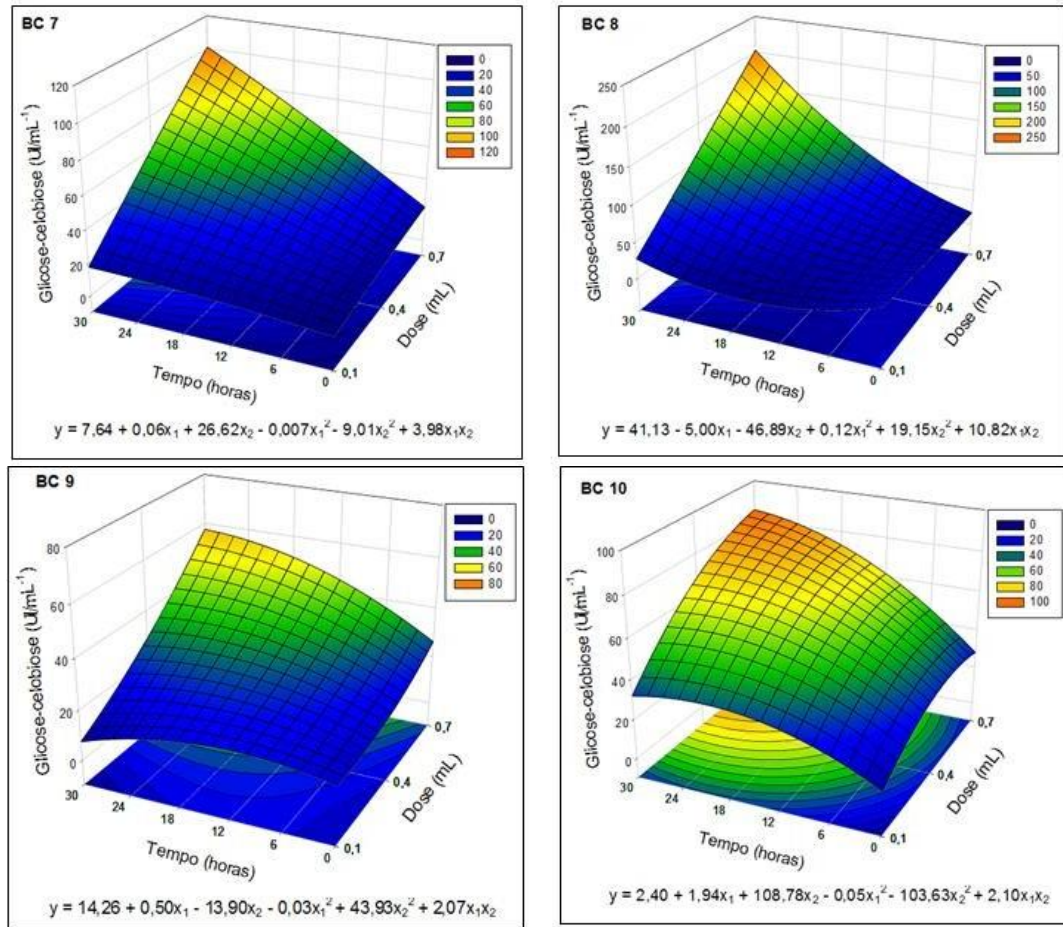


Figura 4 - Glycose-cellobiose's (U mL⁻¹) activity from the β-1,4 endoglucanase of cellulolytic bacteria isolates (BC7 to BC10) according to the evaluation time (hours) and to the enzyme dose.

5. Conclusão

Neste contexto, os trabalhos que privilegiem a identificação, isolamento e análises de atividade enzimática como foi apresentado, permitem sugerir micro-organismos eficientes para desenvolver pesquisas em torno a processos de Biorremediação e a utilização dos mesmos para processos onde é requerida a utilização de enzimas ao nível biotecnológico; proporcionando eficiência e diminuição da contaminação pela utilização dos próprios micro-organismos e seus produtos.

6. Perspectivas

Desenvolver trabalhos in vitro que estejam envolvidos na avaliação da degradação de celulosa em substratos específicos para cada isolado bacteriano.

Realizar a identificação dos isolados bacterianos através de técnicas moleculares.

Referencias

- ASOODEH, J. C. A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic *Bacillus* sp. *Ferdowsicus* isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: purification and biochemical characterization, **Inter. J. Biol. Macromol** 46, 289-297, 2010.
- ABRHA, B.; GASHE, B. Cellulase prouction and activity in a species of *Cladosporium*. **World J. Microbiol. and Biotech.** 8, 164-166, 1992.
- AZEVEDO, J. **Genética de fungos, Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia, cap 5.** 2004. (pp. 173-214). Caxias do Sul: Educs, Cap. 5.
- BASTAWDE, K. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. **World J. Microbiol. and Biotech.** 8, 4549, 1992.
- BÉGUIN, P. Molecular Biology of cellulose degradation. **Annu. Rev. Microbiol.** 44, 219-248, 1990.
- BHAT, M.; HAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology advances**, New York, v.15 3/4, 583-620, 1997.
- BIRSAN, C., P. Mechanisms of cellulases and xylanases. **Biochem. Soc. Trans.** 26, 156-160, 1998.
- C. PIN, J. B. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms, **Int. J. Food Microbiol.** 41, 59-72, 1998.
- CARVALHO, G. M. Estudos do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. **Revista Analítica**, 14, 54-57, 2005.
- CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.L.; CARO, G.; MONDRAGON, I.; GANÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate polymers** 84 (1), 96-102, 2011.
- CHANDEL, A. E. Economics and environmental impacts of bioethanol production technologies: an appraisal.p. **Biotechnology and Molecular Biology Review, Nairobi**, v. 2, 14-32, 2007.

- CHANDEL, A.K.; ES, C.; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M.L.; RAO, L.V.; RAVINDRAS, P. Economics and environmental impacts of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Nairobi, v. 2, 14-32, 2007.
- CIECHAŃSKA, D. Multifunctional Bacterial Cellulose/Chitosan Composite Materials for Medical Applications. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 12, n. 4, 48, 2004.
- CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZA, A.; BIELECKIA, S.; BROWN, M.R. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, 145-151, 2006.
- DE SOUZA, F.C.; OLIVAL-COSTA, H.; SILVA, L.; PONTES, P.; PENTEADO, L.C.L. Bacterial Cellulose as Laryngeal Medialization Material: An Experimental Study. **Journal of Voice**, v. 25, n. 6, 765-769, 2011.
- E.A, P. C. **Soil Microbiology and Biochemistry**. 1996. San Diego, CA: Academic Press Inc.
- EKEPERIGIN, M. M. Preliminary studies of cellulase production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella* sp. **African Journal of Biotechnology**, vol. 6, no. 1, 28-33, 2007.
- FAN, L.T.; LEE, Y. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose in enzymatic hydrolysis. **Biotech. and Bioeng.** 22, 177-199, 1980.
- FOSSE, B. F. Microbial interactions for enhancement of α -amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* 04BBA15 and *Lactobacillus fermentum* 04BBA19. **Biotechnology reports**, 4, 99-106, 2014.
- GARCIA, J.; TRIÑANES, P. **Biocombustiveis: Bioetanol e Biodisel**. 2006. Universidad Santiago de Compostela, Galiza, España.
- GUPTA, P. K. Isolation of cellulose-Degrading bacteria and determination of their cellulolytic potencial. **International Journal of Microbiology** v., 1-5, 2012.
- GYANESHWAR, P.; NARESH, G.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, 245, 83-93, 2002.
- HENRISSAT, B.; T. T. TEERI.; R. A. J. **A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants**. **FEBS Lett.** 425, 352-354, 1998.
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)., p. **Enzyme and Microbial Technology**. New York, v. 30, 454-466, 2002.

J.W.T. WIMPENNY, L. L. Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions, *Int. J. Food Microbiol.* 28, 299-315, 1995.

JACKSON LE, C. F. **Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality.** *Geoderma* 2003; 114: 305-17. *Geoderma* , 305-17.

KASANA, RC.; 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. *Curr Microbiol*, 57, 503-507, 2008.

KESKARr, S. Cellulase Production from *Penicillium janthinellum*. *World J. Microbiol. and Biotech.*, 534-535, 1992.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, v. 26, n. 9, 1561-1603, 2001.

LADISCH, M. L. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb Technol.* 5, 82-102, 1983.

LEE, K. M. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 102, 261-268, 2003.

LIMA, U.; AUQRONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnología industrial**, V.3, 3ª edição. Edgar Bulcher LTDA, 2001.

LOGAN, B. E. *Nat. Rev Microbiol.* 375, 2009.

LU, W. J. Effect of inoculating flower stalks and vegetable waste with lignocellulolytic microorganisms on the composting process. *Journal of Environmental Science and Health*, Part B, vol. 39 no. 5-6, 871-887, 2004.

LYNCH, J. S. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. *Journal of General Microbiology* 127, 231-236, 1981.

LYND, L. W. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66 , 506-577, 2002.

MALAKAR, G. B. Relevance of Microbial interactions to predictive microbiology, *Int. J. Food Microbiol.* 84, 263-272, 2003.

MIKÁN, J.; CASTELLANOS, D. Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 4(1), 58-71, 2004.

MURALI, H. Cellulolytic activity of four *Fusarium* spp. *World J. Microbiol. and Biotech.* 10, 487, 1994.

NGUYEN, V. T.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiology*, v. 25, n. 3, 471-478, 2008.

ONNERUD, H. Z. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation. **The Plant Cell, Rockville**, v. 14, 1953-1962, 2002.

ORBEG, P. **Los estudios sobre la producción de celulasa a partir de paja anual raigrás por *Trichoderma reesei*** . 1981. Oregon: Dissertação de mestrado, Universidad Estatal de Oregon.

PERCIVAL ZHANG, Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances** v,24, New York, 452-481, 2002.

PERÉZ, J.J.D. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.**, 5 , 53-63, 2002.

POLONEN, I. **Preservation efficiency of formic acid and benzoic acid in the ensiling of slaughterhouse by-products and their subsequent metabolism in farmed fur animals. Helsink: Faculty of Agriculture and forestry of the University of Helsink.** 2000. Academic dissertation Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsink. 63p.

POURQUIE, J. V.P. **Conversión de compuestos lignocelulósicos por hidrólisis enzimática y fermentación acetona butanol.** *Biotecnología*. 2ª .ed. 583-601, 1985.

RAGHU, K. M. Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. **Journal of applied bacteriology**, 29, 582-586, 1996.

RAMÍREZ, P.; COHA, J.M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetes termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología* 10(1), 67-77, 2003.

RAMOS, A.M.; FORCHIASSIN, F. Producción de endoglucanasa en cuatro especies del género *Saccobolus*. **Rev.Argentina de Microbiología**. 28, 55-62, 1996.

RAMOS, L. The Chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, 863-871, 2003.

REINHOLD-HUREK, B. Cloning, Expression in *Escherichia coli* and characterization of cellulolytic enzymes *Azoarcus* sp. A rootin-vading diazotroph. **Journal of Bacteriology** v 175, 7056 - 7065, 1993.

RIFKIN, J. **The Hydrogen Economy, Tarcher/Putnam.** New York, Estados Unidos, 2002.

ROBSON, L.; CHAMBLISS, GH. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology** 11, 626-644, 1989.

SALAMONE, I. E. Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. **Revista Argentina de Microbiología** 43, 1-3, 2011.

SHENOY, V. K. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. **Biotechnol. Adv.** 23, 501-513, 2005.

SJOSTROM, C. **Durability and sustainable use of building materials. In: Sustainable use of materials.** J.W. Llewellyn & H. Davies editors. London: BRE/RILEM, 1992.

SOMAYEH, S.; TABARSA, T.; ASHORI.; SHAKERI, A.; GOLALIPOUR, M. Bacterial synthesized cellulose nanofibers, effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate polymers**, 1187-1191, 2011.

STUTZERBERGER, F.J. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata* : Nutritional requirements for cellulase production. **Appl. Microbiol.** 24 (1), 77-82, 1972.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials forethanol production: a review. **Bioresource techonology**, Oxford, v.83, 1-11, 2002.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG, M. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, 419-431, 2005

TATSINKOU, F. T. **Application of Lactobacillus fermentum 04BBA19 for simultaneous production of thermostable α -amylase and lactic acid, in Kongo.** In: **Lactic Acid Bacteria.** 2013. R & D for Food, Health and Livestock Purposes, (pp. 633-658). Intech, Rijeka, Croat: J. Intech Open Science.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends Biotechnol.** 15, 160-167, 1997.

TENDER, L. M.; REIMERS, C. E.; STECHER, H. A.; HOLMES, D. E.; BOND, D. R.; LOWY, D. A. **Nat. Biotechnol.** 20, 821, 2002.

VAITHANOMSAT, P. C. Bioethanol production from enzymatically saccharified sunflower stalks using steam explosion as pretreatment,. **Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology**, vol. 37, 140-143, 2009.

VAN SOEST, P. **Nutritional ecology of the ruminant.** Ithaca: Cornell University Press, 476, 1994.

VAN, W.H La próxima generación de tecnologías de etanol celulósico y su contribución a una Africa sostenible. **Interface Focus**, 196-211, 2011.

WANG, C.; WANG, C.; CEN, L.; YIN, S.; LIU, Q.; LIU, W.; CAO, Y.; CUI L. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, 621-630, 2010.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annu. Rev. Microbiol.** 50, 183-212, 1996.

WRIGHT, J.D; WIMAN, C.E.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, 75-90, 1998.

YAZDI, M.T.; WOODWARD JR.; RADFORD A .The cellulose complex of *Neurospora crassa* : activity, stability and release. **Journal General Microbiol.** 136, 1313-1319, 1990.

ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. **Anal. Biochem.** 236, 302-308, 1996.