

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis

Gizelly Gomes da Cruz

**ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS EM
ÁREAS DE FLORESTA DE EUCALIPTOS DA REGIÃO DE
ITAMARANDIBA – MG**

Diamantina

2018

Gizelly Gomes da Cruz

**ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS EM
ÁREAS DE FLORESTA DE EUCALIPTOS DA REGIÃO DE
ITAMARANDIBA – MG**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

Diamantina

2018

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nathalia Machado Laponez Maia, CRB6 – 3002.

C957i

Cruz, Gizelly Gomes da

Isolamento de micro-organismos celulolíticos em áreas de floresta de eucaliptos da região de Itamarandiba-MG / Gizelly Gomes da Cruz. – Diamantina, 2018.

83 p. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Dr. Marcelo Luiz de Laia.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

1. Bioetanol. 2. Micro-organismos. 3. Eucalipto. 4. Biocombustíveis.
I. Laia, Marcelo Luiz de. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 662.88

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG

www.ufvjm.edu.br

prppg@ufvjm.edu.br



ATA DE DEFESA DE MESTRADO DE GIZELLY GOMES DA CRUZ ELABORADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA.

A Comissão Examinadora da Dissertação de MESTRADO da pós-graduanda GIZELLY GOMES DA CRUZ do Mestrado em Biocombustíveis, nível de MESTRADO, área de concentração: Processos químicos e bioquímicos, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, instalou-se no dia 27 de Março do ano de 2018, às 14:00, nas dependências da UFVJM, para abertura dos trabalhos e arguição da candidata. A Comissão Examinadora foi composta pelos Professores Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia - Orientador (UFVJM), Prof.ª Dr.ª Amanda Gonçalves Guimarães (UFVJM) e Prof. Dr. Jose Barbosa dos Santos (UFVJM). Iniciou-se a sessão com a apresentação dos componentes da Comissão Examinadora e leitura dos artigos 55 a 60 do Capítulo XV do Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação Stricto Sensu/UFVJM e passou-se a palavra à candidata para apresentação de sua Dissertação intitulada "Isolamento de micro-organismos celulolíticos em áreas de floresta de eucaliptos da região de Itamarandiba-MG". Após a apresentação oral, a candidata foi arguida pela referida Comissão, obtendo o seguinte resultado:

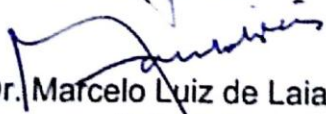
- Aprovada sem ressalvas
- Aprovada com ressalvas
- Reprovada

Em caso de aprovação, a candidata fará jus ao título de MAGISTER SCIENTIAE EM BIOCOMBUSTÍVEIS, pela UFVJM, após a entrega da versão final da dissertação, com as devidas correções, à Secretaria dos Programas de Pós-Graduação.

DIAMANTINA, 27 de Março do ano de 2018, às 14:00


Prof.ª Dr.ª Amanda Gonçalves Guimarães - UFVJM


Prof. Dr. Jose Barbosa dos Santos - UFVJM


Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia - UFVJM
Orientador

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, sem ele, nada seria. A minha família, que tanto amo. Tudo que sou hoje devo a vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por trilhar meus caminhos, me abençoando dia a dia.

Aos meus pais Jarbas e Rosi, minha irmã Grazielle, pelo amor incondicional e nunca terem medido esforços para me proporcionar o melhor. Ao meu esposo Renato, pelo companheirismo, amor e por nunca me deixar desistir.

Vocês são parte fundamental da minha vida, meu exemplo, minha força, meu porto seguro. Sou eternamente grata por tudo que sou e por tudo que consegui conquistar. Em todos os momentos vocês estiveram presentes, me dando força para continuar a batalha, que nos momentos de ausência, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Essa vitória também é de vocês que sonharam esse sonho comigo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia, pela paciência, ensinamentos e por ter contribuído em meu crescimento profissional.

Aos colegas e amigos do LGBF da UFVJM, pelo carinho e atenção durante essa caminhada e aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado contribuir com este trabalho, meu muito obrigado!

Aos meus amados familiares e finalmente, a todos que me ajudaram direta ou indiretamente durante essa jornada, **MUITO OBRIGADA** a todos vocês.

"Lembre-se de que você mesmo é o melhor secretário de sua tarefa, o mais eficiente propagandista de seus ideais, a mais clara demonstração de seus princípios, o mais alto padrão do ensino superior que seu espírito abraça e a mensagem viva das elevadas noções que você transmite aos outros. Não se esqueça, igualmente, de que o maior inimigo de suas realizações mais nobres, a completa ou incompleta negação do idealismo sublime que você apregoa, a nota discordante da sinfonia do bem que pretende executar, o arquiteto de suas aflições e o destruidor de suas oportunidades de elevação - é você mesmo".

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A introdução de biomassa na cadeia produtiva de biocombustíveis como fonte renovável, vem aumentando gradativamente, para reduzir os impactos ambientais e a dependência do carvão mineral e do petróleo. No entanto, para garantir a viabilidade econômica do processo de conversão de biomassa em combustível, é fundamental reduzir o custo da etapa de hidrólise da biomassa. O uso de micro-organismos para a hidrólise e para a conversão de celulose em etanol tem chamado a atenção de empresas que atuam no desenvolvimento de enzimas, em especial o complexo celulase. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo selecionar micro-organismos potenciais produtores de celulases. Para isso, amostras de solos e serapilheira sob floresta de eucalipto em diferentes idades de plantio foram coletadas e submetidas ao isolamento de micro-organismos em meio de cultura seletivo. Escolheu-se solos em áreas de cultivo de eucalipto devido o objetivo ser selecionar micro-organismos que atuem, especificamente, em madeira de eucalipto. Foram isolados 870 micro-organismos para análises com o método de descoloração de vermelho congo. 336 fungos filamentosos, 8 bactérias e 3 leveduras foram selecionados com capacidade de sintetizar enzimas celulolíticas. Destes, 163 foram avaliados como bons produtores de celulases, devido apresentarem índices enzimáticos superior a 2,5. Destaca-se que os isolados 25-50, 1-74 e 1-75 apresentaram elevados índices enzimáticos: 24,0; 22,0 e 20,0, respectivamente. A partir desses dados, esses isolados podem ser estudados molecularmente e o gene envolvido na produção dessa enzima ser caracterizado e clonado. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a importância da prospecção de novas linhagens de micro-organismos produtores de celulases. De maneira geral, pode-se concluir que é possível a utilização de técnicas de *screening* para selecionar linhagens de um extenso banco de isolados. A metodologia de isolamento e cultivo proporcionou a obtenção de 348 isolados celulolíticos, sendo possível selecionar vários deles pelas altas produções enzimáticas observadas durante as análises.

Palavras-chaves: biocombustíveis, bioetanol, eucalipto e micro-organismos.

ABSTRACT

The introduction of biomass in the biofuels production chain as a renewable source has been gradually increasing to reduce environmental impacts and dependence on coal and oil. However, to ensure the economic viability of the biomass conversion process into fuel, it is critical to reduce the cost of the biomass hydrolysis step. The use of microorganisms for the hydrolysis and conversion of cellulose into ethanol has attracted the attention of companies involved in the development of enzymes, especially the cellulase complex. Therefore, the present work aimed to select potential micro-organisms producing cellulases. For this, samples of soils and litter under eucalyptus forest at different planting ages were collected and submitted to the isolation of microorganisms in selective culture medium. Soils were selected in areas of eucalyptus cultivation due to the objective being to select microorganisms that specifically act on eucalyptus wood. 870 microorganisms were isolated for analysis with the congo red discoloration method. 336 filamentous fungi, 8 bacteria and 3 yeasts were selected with the ability to synthesize cellulolytic enzymes. Of these, 163 were evaluated as good producers of cellulases, due to their enzymatic indexes higher than 2.5. It is noteworthy that isolates 25-50, 1-74 and 1-75 showed high enzymatic indices: 24.0; 22.0 and 20.0, respectively. From these data, these isolates can be molecularly studied and the gene involved in the production of that enzyme is characterized and cloned. The results obtained in the present work show the importance of the prospection of new lines of microorganisms producing cellulases. In general, it can be concluded that it is possible to use screening techniques to select strains from an extensive database of isolates. The isolation and cultivation methodology allowed the obtaining of 348 cellulolytic isolates, being possible to select several of them due to the high enzymatic productions observed during the analyzes.

Keywords: biofuels, bioethanol, eucalyptus and microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura recalcitrante de biomassas lignocelulósicas e apresentação das frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina	25
Figura 2- Estrutura química da celulose de matérias lignocelulósicos	26
Figura 3- Componentes estruturais encontrados na hemicelulose	27
Figura 4- Estrutura da lignina	28
Figura 5: Ação das endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidase na degradação da celulose.....	29
Figura 6- Representação esquemática da ação catalítica da celulase sobre celulose gerando glicose.....	30
Figura 7- Fluxograma demonstrando as etapas de coleta de materiais, cultivo de micro-organismos, isolamento, triagem, seleção e criação do banco de micro-organismos com potencial enzimático.....	39
Figura 8- Esquema do experimento qualitativo.....	42
Figura 9- Placa de meio CMC sólido revelada com vermelho Congo 0,5%	45
Figura 10- Aspecto morfológico de três isolados produtores de celulases. A: Levedura, B: Bactéria e C: Fungo filamentoso	51
Figura 11- Índice de produção de células por isolados em amostra de solo de 1 ano.....	52
Figura 12- Índice de produção de células por isolados em amostra de solo de 3 anos.....	53
Figura 13- Índice de produção de células por isolados em amostra de solo de 5 anos.....	54
Figura 14- Índice de produção de células por isolados em amostra de solo de 7 anos.....	54
Figura 15- Índice de produção de células por isolados em amostra de solo de 13 anos.....	55
Figura 16- Índice de produção de células por isolados em amostra de solo de 16 anos.....	56
Figura 17- Índice de produção de células por isolados em amostra de solo de 25 anos.....	56
Figura 18- Índice de produção de células por isolados em amostra de solo de 32 ano.....	57
Figura 19- Índice de produção de células por isolados em amostra de serapilheira.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais micro-organismos produtores de enzimas lignocelulolíticas	36
Tabela 2- Amostras de solos utilizadas para isolamento dos micro-organismos estudados	42
Tabela 3- Componentes químicos utilizados no preparo do meio de cultivo para isolamento dos micro-organismos estudados.....	43
Tabela 4- Sistema utilizado para identificação dos micro-organismos isolados.....	45
Tabela 5- Quantidade total de micro-organismos isolados por idade das florestas e a quantidade de micro-organismos que apresentaram halo de degradação para teste qualitativo com vermelho congo.....	48

LISTA DE SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

BOD - Biochemical Oxygen Demand

CMC - Carboximetilcelulose

FES - Fermentação em Estado Sólido

IE - Índice enzimático

LGBF - Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

LISTA DE ABREVIATURAS

Atm. - Atmosfera

CBHs. - Celobiohidrolases

cm. - centímetro(s)

EGase. - EG Endoglucanase

ExGase. - Exoglucanase

FSm - Fermentação Submersa

g. - Gramas

h - Hora(s)

L. - Litro

Mg. - Miligrama

MG - Minas Gerais

Min. - Minuto(s)

mL. - Mililitro

mm, - Milímetro

mol. - Massa molar

NaCl - Cloreto de sódio

Nm. - Nanômetro

µL. - Microlitro

°C. - Graus Celcios

ANEXO

ANEXO A - Valores dos índices enzimáticos (IE) de produção de celulasas pelos isolados analisados.....	72
---	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 <i>Objetivo geral</i>	30
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	30
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	31
3.1 Biomassa.....	32
3.1 Enzimas Celulolíticas.....	36
3.1.1 Celulases.....	37
3.1.1.1 Endoglucanases.....	38
3.1.1.2 Exoglucanases.....	39
3.1.1.3 β -glicosidases.....	39
3.2 Micro-organismos Produtores de Celulases.....	40
3.3 Isolamento de micro-organismos.....	42
3.5 Aplicações biotecnológicas de Celulases.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Local de coleta.....	46
4.2 Coletas das amostras.....	47
4.3 Cultivo e isolamento de micro-organismos produtores de celulase.....	47
4.4 Atividade enzimática quantitativa.....	48
4.5 Determinação do índice enzimático (IE).....	49
4.6 Identificação dos micro-organismos isolados a partir das amostras de solos e serapilheira.....	50
4.7 Criação do banco de micro-organismos.....	51
4.8 Análises estatísticas dos dados.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52

5.1 Isolamento e avaliação da atividade celulolítica mediante descoloração com o vermelho congo.....	52
5.2 Identificação dos micro-organismos isolados a partir das amostras de solos e serapilheira.....	55
5.3 Atividade enzimática quantitativa.....	56
6. CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO A.....	74

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o mundo enfrenta o progressivo esgotamento de suas reservas de energia, principalmente aquelas com base nos recursos não renováveis. Desse modo, um dos maiores desafios para a sociedade é atender a crescente demanda de combustíveis para processos industriais, transportes e domiciliar de forma sustentável.

Os biocombustíveis se tornam interessantes na matriz energética sustentável por serem provenientes de materiais agroindustriais, além de contribuir no aproveitamento de resíduos descartados pelas indústrias. Isso acarreta no aumento do interesse comercial em desenvolver tecnologias para a produção de combustíveis a partir de fontes renováveis

O biocombustível produzido a partir de material lignocelulósico, o bioetanol de segunda geração, vem sendo usado mundialmente como fonte de açúcares fermentáveis para produção de etanol. A produção de energia baseada na biomassa lignocelulósica é uma importante rota que tem o objetivo de redução do impacto ambiental e consequentemente a dependência pelo petróleo.

Um dos grandes desafios para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é contornar as barreiras físicas e químicas causadas pela forte associação dos componentes da biomassa, os quais dificultam a hidrólise da celulose e hemicelulose a açúcares fermentáveis.

Várias estratégias de pré-tratamento estão sendo empregadas para a conversão dessa biomassa, as quais podem ser barreiras físicas, químicas ou biológicas, ou uma combinação delas. O pré-tratamento tem como objetivo alterar a estrutura lignocelulósica, facilitando assim a ação das enzimas.

O uso da biotecnologia de conversão de celulose em etanol tem chamado a atenção de empresas que atuam no desenvolvimento de enzimas, em especial o complexo celulasas. A busca por novas fontes de enzimas capazes de somar para este processo é de grande interesse industrial, uma vez que essas enzimas são um fator limitante para a ampliação da tecnologia de produção do bioetanol devido a seu alto custo.

Uma atenção particular deve ser dada à microbiota existente no território brasileiro, uma vez que esta pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes micro-organismos, tornando-se importantes para as interações ambientais e em futuras aplicações biotecnológicas, como a produção de enzimas que atuam,

principalmente, nos dois primeiros processos da produção de etanol celulósico: pré-tratamento e hidrólise do material vegetal.

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo selecionar micro-organismos de solo florestais potencialmente produtores de celulases, especificamente para madeira de eucalipto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolamento de micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas de interesse biológico.

2.2 Objetivos específicos

- Coleta de amostras de solo e serrapilheira;
- Cultivo de micro-organismos a partir de amostras de solo e de serapilheira sob florestas de eucaliptos em diferentes idades de desenvolvimento;
- Seleção das colônias de interesse;
- Análise quantitativa dos isolados com potencial para produção de enzimas celulolíticas;
- Determinação do índice enzimático;
- Criação do banco de isolados de micro-organismos com potencial para produção de enzimas de interesse biotecnológico.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

O progressivo esgotamento de reservas de energia, principalmente aquelas com base nos recursos não renováveis, tem chamado atenção de vários setores de pesquisas devido a crescente demanda de combustíveis de petróleo e os impactos causados gerados pelos mesmos. Desse modo, um dos maiores desafios para a sociedade é atender a crescente demanda de combustíveis para processos industriais, transportes e domiciliar de forma sustentável (GAURAV *et al.*, 2017).

O abastecimento do petróleo e o impacto negativo dos combustíveis fósseis no aumento da geração de gases poluentes liberados na atmosfera e mudanças climáticas têm pressionado a sociedade a encontrar alternativas limpas e renováveis para a produção de combustíveis e obtenção de energia devido ao progressivo esgotamento dos recursos não renováveis de combustíveis. (SANCHEZ; CADORNA, 2008).

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidos pelos materiais como palha, cascas, bagaços, farelos, os quais podem ser originados de cereais, legumes, frutas, além dos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; CASTRO,PEREIRA, 2010).

O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar através da fermentação direta dos mostos açucarados é chamado de etanol de primeira geração. Durante sua produção, uma grande quantidade de biomassa residual é gerada, sendo aproveitada em manutenções e geração de energia térmica. Entretanto, esse resíduo pode ser utilizado na produção de etanol, o que chamamos de segunda geração, por meio da hidrólise e fermentação do material contido na biomassa, obtendo-se um maior aproveitamento deste resíduo (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2009).

A biomassa lignocelulósica é rica em celulose, hemicelulose e lignina, sendo a remoção da lignina essencial para que haja a hidrólise dos polissacarídeos, em seus monossacarídeos correspondentes, que serão fermentados a etanol de segunda geração. Essa hidrólise é realizada por hidrolases conhecidas como celulasas (FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017). Na natureza, a biomassa é degradada com o auxílio de diversos micro-organismos, principalmente fungos e bactérias, que produzem as enzimas necessárias a esta finalidade. Para utilização industrial dos resíduos lignocelulosicos é necessário a passar pelo processo de hidrólise, etapa que pode ser realizada por ação de

enzimas, produzidas por micro-organismos, gerando subprodutos rentáveis (SOCCOL *et al.*, 1994).

A conversão da biomassa lignocelulósica em glicose é a etapa crucial na conversão desse em outros produtos e bioetanol. A procura por novos micro-organismos que produzam enzimas capazes de realizar a hidrólise de madeira é objetivo de diversos grupos de pesquisas (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Essa conversão tem se apresentado bastante eficiente e vantajosa visando à adequada e bioconversão de lignocelulose em seus componentes fermentáveis.

3.1 Biomassa

O desenvolvimento agroindustrial gera, diariamente, toneladas de resíduos sólidos que, muitas vezes, acarretam problemas ambientais. Muitos desses passivos ambientais são materiais lignocelulósicos. Além disso, uma das maiores fonte de energia renovável do mundo é a madeira, composta por até 80% de celulose e hemicelulose, além de uma parte de lignina (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

O uso de resíduos como matéria-prima em processos biotecnológicos diminui o impacto sobre o meio ambiente, além de promover a agregação de valor econômico aos resíduos subutilizados (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; BINOD; SINDHU PANDEY, 2016). Esse tipo de biomassa é constituído por três principais frações poliméricas: celulose (40-50%), hemicelulose (30-40%) e lignina (8-10%). Uma fração menor composta de pectina se encontra associada a essas outras três por meio de ligações covalentes e não covalentes (Figura 1) (BINOD; SINDHU; PANDEY, 2016). Esses constituintes podem ser convertidos a diversos produtos com maior valor agregado como etanol, proteínas, ácidos orgânicos e aminoácidos, entre outros.

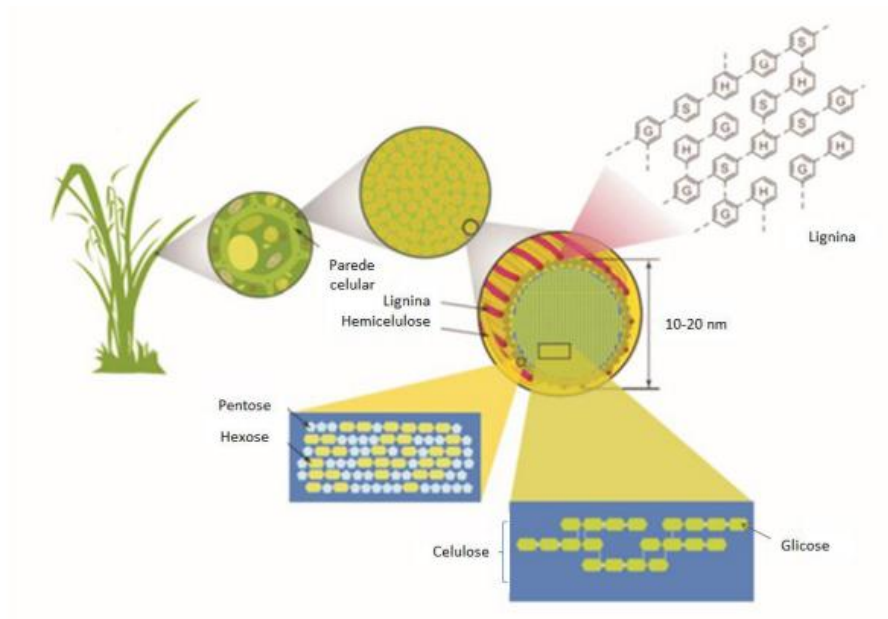


Figura1: Estrutura recalcitrante de biomassa lignocelulósica e apresentação das frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina (adaptado de RUBIN, 2008).

A celulose forma um esqueleto que é cercado por hemicelulose e por lignina, a qual confere certa rigidez. Por estarem todas intimamente associadas entre si e devido o caráter heterogêneo das partículas que compõem a biomassa, esta têm um caráter recalcitrante à hidrólise (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; ROGALINSKI; INGRAIN; BRUNNER, 2008; CAGNON *et al.*, 2009). Logo, para o aproveitamento destes materiais torna-se necessário o uso de processos de decomposição dos compostos lignocelulósicos, os quais envolvem o uso de produtos químicos ou o uso de complexos enzimáticos, que causam a hidrólise da celulose e hemicelulose.

A celulose é um dos maiores constituintes dos vegetais, cerca de 40 a 50%. É o principal polissacarídeo estrutural das paredes de células vegetais, consistindo na matéria mais abundante da natureza. Realiza um papel exclusivamente estrutural nas plantas, atribuindo na célula proteção osmótica e resistência mecânica (YOON *et al.*, 2014). É um polímero linear, podendo conter até 15.000 monômeros de D-glicose unidos por ligações β -1-4 glicosídicas (Figura 2). As ligações de pontes de hidrogênio resultam na formação de fibrilas que se associam formando as fibras de celulose. Aproximadamente 30 moléculas individuais de celulose são agrupadas em unidades maiores denominadas fibrilas elementares, que por sua vez são empacotadas novamente formando microfibrilas e estas,

por fim, constituem as fibras de celulose (JORGENSEN; KRITENSEN; FELBY, 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

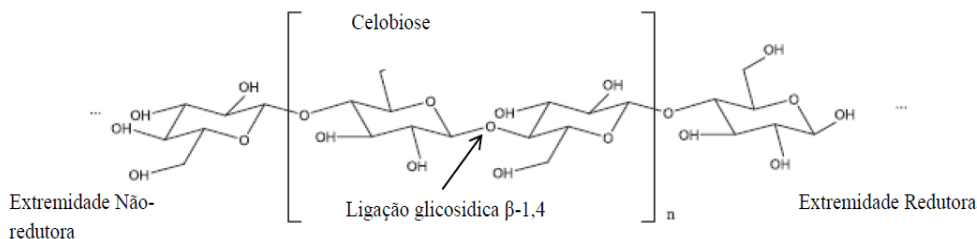


Figura 2: Estrutura química da celulose de matérias lignocelulósicas (adaptado de ZANGH & LYND, 2004)

A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glicose, cujo carbono não está livre, é chamada de extremidade redutora, que é hidrolisável mais facilmente, que pode ser facilmente hidratada e mais acessível às enzimas. Já a outra extremidade é conhecida como não redutora, que torna a celulose insolúvel e mais resistente à ação enzimática (LYND; BASKARAN; CASTEN, 2001).

A celulose é quimicamente simples, constituindo-se basicamente de glicose, mas sua forma cristalina, muito rígida, é um dos materiais mais resistentes encontrado na natureza (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005).

A hemicelulose (figura 3) é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza, representando cerca de 20 a 40% da biomassa lignocelulósica. Presente na lamela média das células vegetais é constituída por uma classe heterogênea de polímeros, que podem conter monossacarídeos, como D-xilose, e outras subunidades, como D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose e ácidos urônicos (Figura 3) (POLIZELI, *et al.*, 2005).

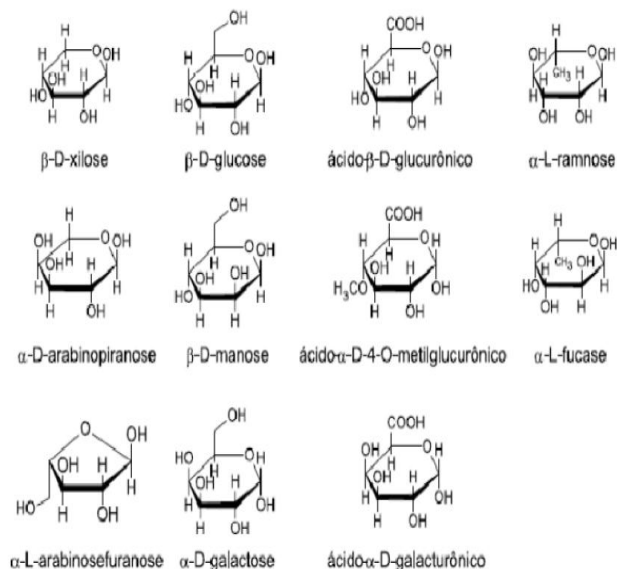


Figura 3: Componentes estruturais encontrados na hemicelulose (SJOSTROM & ALÉN, 1999).

A composição da hemicelulose varia segundo os diversos grupos de plantas e tipos de células. Sua estrutura hemicelulósica e diferentes conformações se dão a variedade de ligações e ramificações, bem como a presença das diferentes bases monoméricas (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008). A cadeia principal pode ser constituída de uma só unidade, como a xilana, ou duas ou mais unidades, como as glucomanas e arabinogalactanas (SJOSTROM & ALÉN, 1999).

A hemicelulose é ligada a celulose por pontes de hidrogênio e também por ligações covalentes e não covalentes com a lignina e outros polímeros. Sua estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas e é mais suscetível à hidrólise química (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008). São quimicamente muito variáveis e sua hidrólise resulta na formação de uma variedade de pentoses, hexoses e ácidos (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005).

Por sua vez, a lignina constitui 10 a 20% da fração não polissacarídica mais abundante presente nos materiais lignocelulósicos. Está associada à celulose e hemicelulose, conferindo à planta rigidez, impermeabilidade e resistência dos tecidos vegetais ao ataque microbiológico e mecânico. Atua como material ligante na parede celular e preenche, juntamente com a hemicelulose e pectina, os espaços entre as fibras de celulose, diminuindo a elasticidade da parede celular e reduzindo a passagem de água pelas paredes celulares (RAVE *et al.*, 2001). Sua estrutura não uniforme, complexa, com massa molar elevada é formada pela polimerização de unidades de fenil propano interligadas por

ligações covalentes simples de carbono e do tipo éter, caracterizadas por possuírem um anel aromático com diferentes substituintes (Figura 4) (BOER *et al.*, 2007; BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

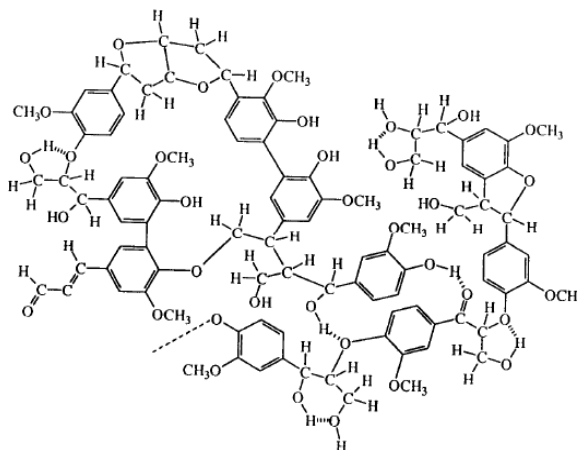


Figura 4: Estrutura da lignina (BOER *et al.*, 2007)

3.1 Enzimas Celulolíticas

As enzimas são moléculas proteicas, especializadas em catalisar reações biológicas. Possuem importantes propriedades catalíticas, como alta conversão, alto grau de especificidade na transformação de substrato a produto e elevada atividade em condições ambientais moderadas, aceleram notavelmente as velocidades das reações químicas, e dentre outras funções, são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores, como polissacarídeos em oligossacarídeos ou monossacarídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2004). São divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANTOS, 2007).

As celulasas têm despertado um maior interesse industrial devido a sua ação lignocelulolítica. Constituem um complexo capaz de atuar em materiais celulósicos promovendo sua hidrólise, são enzimas biocatalisadoras altamente específicas que atuam em conjunto para a liberação de açúcares, a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

3.1.1 Celulases

As celulases constituem um complexo capaz de degradar a estrutura de materiais celulósicos, devido a grande especificidade e eficiência catalítica encontradas nesse grupo de enzimas (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Este sistema enzimático é constituído por um conjunto de hidrolases glicosídicas que são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, sendo divididas em três grandes grupos: as endo- β -1,4-glucanases ou endonucleases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exo- β -1,4-glucanase ou celobiohidrolases, ou apenas exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e as β -glucosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Esses três tipos de enzimas atuam de forma sinérgica na hidrólise de celulose (Figura 5) (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

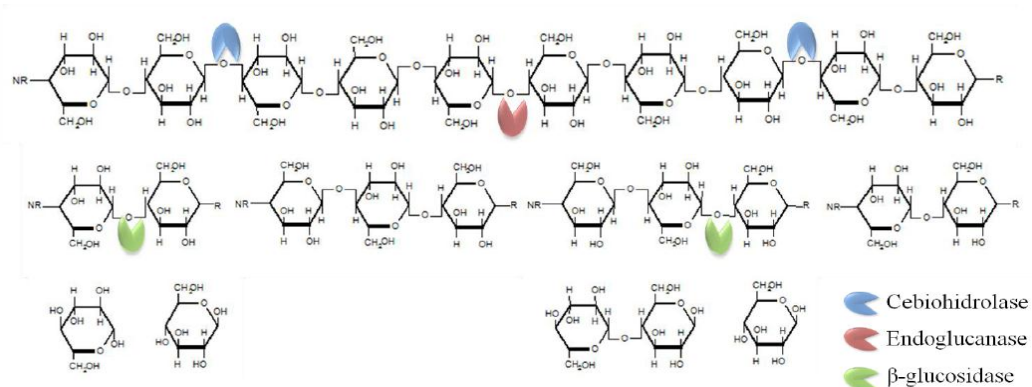


Figura 5: Ação das endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidase na degradação da celulose (SANTOS, 2012; adaptado de WATANABE & TOKUDA, 2010).

Estas enzimas agem da seguinte maneira: as celobiohidrolases atuam na terminação da cadeia e liberam celobiose como produto principal; as endoglucanases atuam aleatoriamente ao longo da cadeia produzindo novos sítios de ataque para as celobiohidrolases; e as β -glucosidases finalizam o processo através da hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos à glicose (Figura 6) (ZANDONÁ FILHO, 2001).

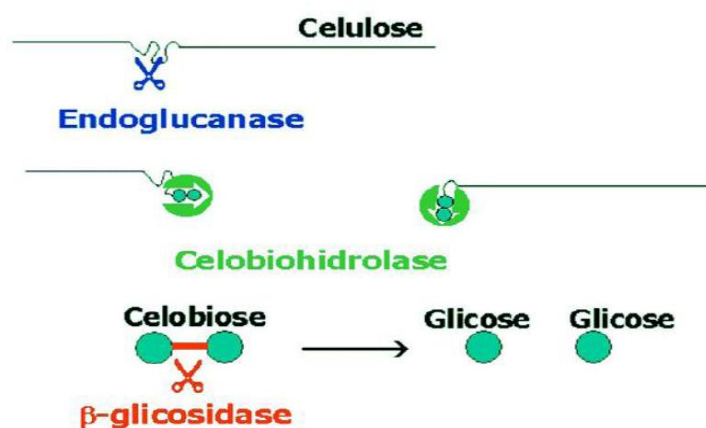


Figura 6: Representação esquemática da ação catalítica da celulase sobre celulose gerando glicose (VILELA, 2013).

Essas enzimas podendo ser aplicadas em diversos ramos, como, nas indústrias alimentícias, na produção de detergentes, de polpa e papel, gestão de resíduos, extração e clarificação de sucos, na produção de cerveja e vinhos, na alimentação animal e indústria têxtil (BHAT, 2000). Mais recentemente, essas enzimas têm sido utilizadas na sacarificação de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol (BHAT e BHAT, 1997).

As enzimas do complexo celulolítico são centrais para a transformação da biomassa e produção de etanol e bioprodutos. No entanto, as celulases são enzimas de custo relativamente alto. Logo, uma significativa redução no custo de sua produção torna-se um fator importante comercialmente (FACCHINI, 2010).

3.1.1.1 Endoglucanases

As endoglucanases são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose, a qual acontece aleatoriamente às regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica. O rompimento das ligações β -1,4 na região central da molécula, libera açúcares e oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, logo, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (LYND *et al.* 2002). Estas enzimas são fundamentais para a rápida solubilização do polímero celulósico devido à sua fragmentação em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES; EGYHAZI; RÉCZEY, 2004; ZHANG; LYND, 2004).

A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas, devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (CAO; TAN, 2002; ZHANG; HIMMEL; MIELLEZ, 2006).

3.1.1.2 Exoglucanases

O grupo das exoglucanases (ExG) é constituído pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs). São enzimas que possuem estratégia de hidrólise da fibra celulásica, sendo capazes de liberar glicose diretamente do polímero (LYND *et al.*, 2002; CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Atuam sobre os oligossacarídeos gerados pela quebra das endoglucanases, fundamentais para a hidrólise cristalina, atua de forma branda e gradual para diminuir o grau de polimerização. Atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose e celotriose que consistem em moléculas com duas ou três unidades de glicose (CAO; TAN, 2002).

As CBHs participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, promovendo o aumento na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases (ZHANG; LYND, 2004). Podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. Essas enzimas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância à atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as β -glicosidases (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

3.1.1.3 β -glicosidases

As enzimas β -glicosidases, conhecidas também como celobiasas, possuem propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND *et al.*, 2002), diminuindo assim a inibição das celulases, endoglucanases e exoglucanases, devido a presença deste dímero (PETROVA; BAKALOVA; KOLEV, 2002), além de aumentar o rendimento total dos açúcares fermentescíveis. Assim as β -glicosidases retiram esse efeito inibitório, conseqüentemente as celulases são produzidas por micro-organismos. Tal como as celobiohidrolases, também podem sofrer inibição por seu produto de hidrólise (AWAFO, 1997; LYND *et al.*, 2002).

De acordo com Ghose (1987) a atividade desta enzima pode ser determinada usando celobiose, uma vez que esta não é hidrolisada por endoglucanases e exoglucanases. A alta concentração de glicose obtida nos processos de hidrólise celulolítica da biomassa é uma tarefa desafiadora devido à baixa concentração de β -glucosidase em micro-organismos naturais.

3.2 Micro-organismos Produtores de Celulases

Os micro-organismos são encontrados em uma extensa variedade de ambientes e exercem importantes papéis na natureza. Este grupo caracteriza-se por serem totalmente heterogêneo e em termos de habitat, são encontrados em toda biosfera, capazes de colonizar com sucesso todos os nichos ecológicos, tanto na superfície, como no mar e subsolo (RODRIGUES, 2008).

Os ecossistemas microbianos possuem uma grande variedade de organismos de importância industrial na produção de enzimas hidrolíticas, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes (SINGHANIA *et al.*, 2010). A utilização desses organismos desperta grande interesse de estudo por não necessitarem de grandes espaços para seu crescimento, possuem um crescimento rápido em condições favoráveis, conseguem degradar e crescer em diversos substratos, como em resíduos industriais, os quais podem ser aproveitados desde que se escolha o micro-organismo apropriado ou adaptado para a finalidade esperada, e podem ser manipulados geneticamente para a obtenção de mutantes desejados (BRAVO *et al.*, 2000).

Existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulases, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, diversos substratos como algodão, papel de filtro, carboximetilcelulose (CMC) e resíduos agrícolas vêm sendo utilizados para induzir a atividade do complexo lignocelulolítico (AGUIAR; MENEZES, 2000).

Os micro-organismos que produzem de enzimas celulolíticas são, principalmente, consumidores de carboidratos e geralmente incapazes de utilizar proteínas ou lipídeos como fontes de energia para o seu crescimento. Alguns micro-organismos apresentam uma grande capacidade de secretar grandes quantidades de proteína extracelular, sendo estes os mais adequados para a produção de níveis elevados de celulases e xilanases (SANTOS *et al.*, 2012). Essas enzimas podem ser produzidas por uma grande gama de micro-

organismos (Tabela 1) que incluem: os fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sporotrichum*; as leveduras, como as do gênero *Trichosporium* e *Cryptococcus*; e as bactérias, como as do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*. Os Actinomicetos do tipo *Streptomyces* também são micro-organismos que produzem enzimas lignocelulolíticas (LYND *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2012).

Tabela 1: Principais micro-organismos produtores de enzimas lignocelulolíticas.

Grupo	Gênero	Espécie	Grupo	Gênero	Espécie
Fungos filamentosos	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	Bactérias e Actinomicetos	<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulolyticus</i>
		<i>A. nidulans</i>		<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i>
		<i>A. oryzae</i>			<i>B. subtilis</i>
		<i>A. terreus</i>		<i>Clostridium</i>	<i>C. acetobutylicum</i>
		<i>A. phoenicis</i>			<i>C. thremocellum</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>		<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulosa</i>
		<i>F. oxysporum</i>		<i>Rhodothermus</i>	<i>R. marinus</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i>		<i>Cellulomas</i>	<i>C. fimi</i>
		<i>H. grisea</i>			<i>C. bioazotea</i>
	<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>			<i>C. uda</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i>		<i>Streptomyces</i>	<i>S. drozdawiczii</i>
		<i>P. decumbans</i>			<i>S. lividans</i>
		<i>P. janthinellum</i>		<i>Thermononospora</i>	<i>T. fusca</i>
		<i>P. kloecheri</i>			<i>T. curvata</i>
		<i>P. pinophilum</i>		<i>Cryptococcus</i>	<i>C. humicola</i>
		<i>P. purpurogenum</i>			<i>C. globosum</i>
	<i>P. occitanis</i>	<i>C. albidus</i>			
	<i>Sporotrichum</i>	<i>S. pulverulentum</i>		Leveduras	<i>T. mycotoximevorance</i>
		<i>S. thermophile</i>			<i>T. laibachii</i>
	<i>Thermoascus</i>	<i>T. aurantiacus</i>		<i>Trichosporon</i>	<i>T. moniliiforme</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i>				
	<i>T. lignorum</i>				
	<i>T. longibrachiatum</i>				
	<i>T. reesei</i>				

Fonte: Santos, 2012

Dentre os micro-organismos citados anteriormente (Tabela 1), os fungos filamentosos são os mais utilizados. Isso se deve as propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas que permitem seu crescimento em substratos sólidos e sua bioconversão, aumentando assim a capacidade de hidrólise por estes micro-organismos (SOCCOL *et al.*, 1994). Encontrados em grande quantidade no meio ambiente, possuem um rápido desenvolvimento, baixo custo de cultivo, além de várias possibilidades de manipulação genética, o que tem destacado a importância de pesquisas que visam à hidrólise enzimática da celulose em grande escala (OLIVEIRA, 2007; CASTRO; PEREIRA JR, 2010; HANSEN *et al.*, 2015).

Dos diversos gêneros de fungos filamentos produtores de celulases e xilanases, podemos destacar o *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* como os principais alvos de pesquisa biotecnológica. O gênero *Aspergillus* é extensamente utilizado em processos biotecnológicos devido à grande produção de enzimas extracelulares comercialmente importantes. Este gênero possui cerca de 200 espécies comumente isoladas do solo, materiais em decomposição, ar e também de vários outros ambientes (GUARRO; GENNÉ; STCHIGEL, 1999). A produção de diversas enzimas por membros do gênero *Aspergillus* é descrita na literatura, como amilases celulases e xilanases (SILVA, 2008).

O gênero *Trichoderma* são fungos saprófitos encontrados em todos os solos e poucos apresentam atividade patogênica para o homem. Utilizados no controle biológico de doenças de solo e raiz em plantas de interesse econômico, além da produção de celulases e xilanases. Para produção de enzimas celulolíticas, destaca-se a espécie *Trichoderma reesei*, micro-organismo extensivamente estudado (LINO, 2012).

O gênero *Penicillium* é composto por mais de 150 espécies, são grandes produtoras de metabólitos secundários, sendo considerado um dos mais importantes no reino dos fungos em relação a benefícios à humanidade. Diversas espécies são utilizadas industrialmente para a produção de medicamentos. Algumas espécies deste gênero são grandes produtoras de enzimas hidrolíticas que agem sobre componentes da parede celular vegetal, podendo apresentar alta produção de celulases e xilanases (MATOS, 2012).

3.3 Isolamento de micro-organismos

O isolamento e as técnicas de *screening* de micro-organismos produtores de celulases são imprescindíveis para atender a demanda por novas enzimas e o aumento de suas aplicações biotecnológicas. O método qualitativo como *screening* de micro-organismos produtores de celulases em placas com agar, é um processo útil e fácil (KASANA *et al.*, 2008).

Esta técnica para isolamento de fungos é muito utilizada para avaliar a habilidade de crescimento dos micro-organismos em meios de cultura como, por exemplo, meios acidificados (COLLA *et al.*, 2008). Baseia-se na solubilização seguida por uma reação enzimática que dá origem a uma zona de identificação, como um halo formado a partir da degradação do substrato cromogênico. Também chamada de indireta, o que significa que a indicação da presença de determinada substância é dada pela detecção de alguma atividade

específica, como por exemplo, a detecção de uma atividade enzimática via reação colorimétrica ou fluorimétrica (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

A seleção indireta pode ser realizada a partir de testes feitos com corantes, como o Vermelho Congo (3,3'-(4,4'-Bifenildiilbisazo) bis- (4-amino-1-naftalinsulfonato)- de dissódio – Número CAS: 573-58-0) (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Desse modo, em trabalhos de Ruegger e Tauke-Tornisielo (2004) avaliaram a atividade de celulases através do *screening* de 80 linhagens de fungos isolados do solo em uma estação ecológica. Primeiramente, os fungos foram avaliados em placa de Petri com a técnica do corante vermelho Congo, verificando-se que 64 linhagens apresentaram halo de hidrólise. Posteriormente, essas linhagens foram avaliadas quanto à produção de enzimas hidrolases.

Portanto, estudos utilizando *screening* de micro-organismos são de suma importância para a viabilidade de todos os processos envolvidos na produção de um complexo enzimático, neste caso especificamente das celulases.

3.4 Fermentação em Estado Sólido na Produção de Celulases

O crescimento e a utilização da celulose por micro-organismos para a produção de celulases podem se dar por meio da fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (Fsm). A principal diferenciação desses dois processos se dá pelo teor de água presente no meio reacional (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). No entanto, o crescimento de fungos filamentosos produtores de celulases ocorre naturalmente em condições similares à (FES) (SINGHANIA *et al.*, 2010).

A FES para a produção de celulases é uma tecnologia com custo eficaz, devido a sua semelhança com o meio ambiente natural, produção de altas concentrações de celulases e devido às condições da fermentação (CEN; XIA, 1999).

Segundo Singhanian e colaboradores (2010), os maiores rendimentos para a produção de celulases por *Trichoderma reesei* foram encontrados em FES. A comparação da produção de celulases entre fermentação submersa e em estado sólido tem apontado que há uma diminuição de 10 vezes nos gastos de produção quando o uso da FES é empregado.

A FES para a produção de enzimas industriais pode ser estimada como uma tecnologia futura para a produção comercial de celulases, considerando o baixo custo de

entrada e a habilidade em utilizar naturalmente fontes disponíveis de celulose como substrato (SINGHANIA *et al.*, 2010).

3.5 Aplicações biotecnológicas de Celulases

As celulases têm mostrado um grande potencial biotecnológico, devido as suas diversas finalidades, como degradação de materiais lignocelulósicos. Devido sua capacidade de modificar a fibra de celulose de forma controlada, melhorando a qualidade dos tecidos, além de serem utilizadas para tingimento e acabamento, as celulases são muito empregadas na indústria têxtil (VILELA, 2013). Permitem a remoção de pequenas fibrilas do tecido, conferindo assim brilho e macies. Quando utilizadas na alimentação de ruminantes, aumentam o valor nutritivo do alimento, pois hidrolisam polissacarídeos presentes na parede dos vegetais (BATH, 2000).

Na indústria de vinhos, essas enzimas atuam da maceração da pele da uva, facilita a filtração e atuam na clarificação da bebida e no melhoramento da estabilidade do vinho. Na indústria da cerveja ocorrem durante a maltagem e a fermentação. Na indústria do papel são usadas com diferentes finalidades, quando o papel é produzido e auxiliam no branqueamento deste, o que faz com que o papel branco tenha cor diferente do reciclado (BATH, 2000; VILELA, 2013).

Já na indústria de biocombustíveis as celulases estão presentes durante a hidrólise da celulose. A bioconversão da celulose em etanol envolve etapas como a sacarificação, que é a hidrólise de celulose e hemicelulose em monossacarídeos, e a etapa de fermentação, que é realizada por micro-organismos fermentadores (TURNER *et al.*, 2007). A hidrólise libera açúcares e ajuda na fermentação e produção de etanol.

A utilização de resíduos lignocelulósicos para conversão em açúcares utilizados como fonte de energia vem sendo empregado por diversas empresas. Essa utilização partiu da necessidade de se reduzir os custos de produção e aumentar a eficiência nos processos que necessitavam da utilização de enzimas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do presente estudo se deu através da coleta de amostras de solos e material vegetal no campo em propriedade da empresa Aperam Bioenergia localizada no município de Itamarandiba e experimentos laboratoriais realizadas no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), localizado no Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Diamantina, MG. As etapas de desenvolvimento deste trabalho poderão ser visualizadas no fluxograma da Figura 7.

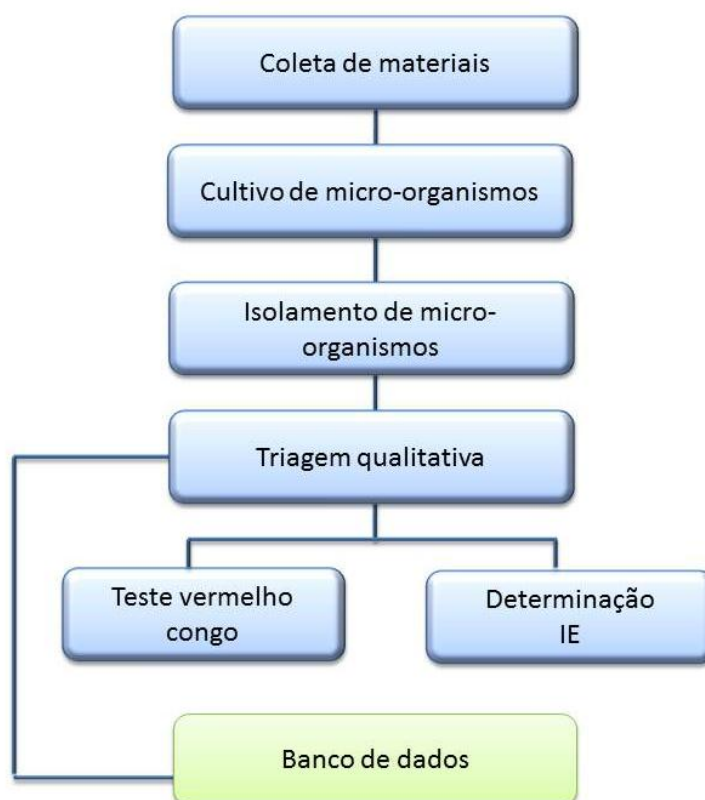


Figura 7 - Fluxograma demonstrando a implantação do experimento desde a coleta de micro-organismos até a identificação daqueles com potencial enzimático.

4.1 Local de coleta

O experimento ocorreu em propriedade da empresa Aperam Bioenergia localizada no município de Itamarandiba, Minas Gerais. O clima da região é definido como tropical

de altitude, com duas estações bem definidas, A temperatura média da região é de 21,2°C, e a umidade relativa do ar média anual varia entre 60 a 70%. O índice pluviométrico médio anual é de 1.132 mm. O solo da região é classificado como argiloso amarelo típico textura arenosa/média fase relevo plano, e a tipologia florestal predominante é o cerrado (SOARES, 2016).

4.2 Coletas das amostras

A microbiota estudada foi isolada a partir da coleta de nove amostras compostas, sendo, oito amostras de solos e uma amostra de material vegetal em decomposição (Tabela 2). Cada amostra composta foi constituída por seis sub amostras, coletadas a profundidade de 20 centímetros (cm). As amostras de solo foram extraídas com o auxílio de uma sonda, acondicionadas em sacos plásticos, catalogadas, transportadas ao laboratório e conservadas em temperatura ambiente até o início do experimento.

Tabela 2. Identificação das amostras de solos utilizadas para isolamento dos microorganismos estudados. O número corresponde a idade das florestas de eucaliptos.

Idade da floresta	Característica	Identificação
1 ano	Talhão 166 – Pomar clonal	1-
3 anos	Talhão 146 – Pomar clonal	3-
5 anos	Talhão 260 – Pomar clonal	5-
7 anos	Talhão 596 – Pomar de sementes	7-
13 anos	Talhão 190 – Pomar clonal	13-
16 anos	Talhão 167 – Pomar clonal	16-
25 anos	Talhão 661 – Pomar de sementes	25-
32 anos	Talhão 616 – Pomar de sementes	32-
32 anos	Talhão 616 – Serrapilheira	Serrapilheira-

4.3 Cultivo e isolamento de micro-organismos produtores de celulase

Para o cultivo dos micro-organismos, aproximadamente 5 g de amostra de solo foi pesada em balança analítica e misturada em 500 mL de água destilada, em seguida submetida à homogeneização. A suspensão foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos para decantação, após esta etapa, alíquotas de 50 µL desta mistura foram plaqueadas por espalhamento em superfície em placas de Petri, com auxílio de alça de

Drigalski, em meio de cultura contendo Carboximetilcelulose (CMC) (Tabela 3) como principal fonte de carbono. Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas em BOD (SL 200/334 SOLAB®) a 28° C por 96 horas, com monitoramento diário.

O meio de cultura foi preparado a partir da mistura dos componentes descritos na Tabela 3, com pH 6,0, seguido de esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos (min) a 1 atm.

Tabela 3: Componentes químicos utilizados no preparo do meio de cultivo para isolamento dos micro-organismos estudados.

Componentes	Quantidade
MgSO₄ . 7H₂O	0,2 g / L
KH₂PO₄	0,4 g / L
K₂HPO₄	0,1 g / L
NaCl	0,1 g / L
Extrato de levedura	0,4 g / L
CMC	10 g / L
Ágar	15 g / L
Água destilada	1000 mL

MgSO₄.7H₂O = Sulfato de magnésio hepta hidratado; KH₂PO₄ = Fosfato de potássio Monobásico; K₂HPO₄ = Fosfato de potássio Dibásico; NaCl = Cloreto de Sódio; CMC = Carboximetilcelulose.

As colônias obtidas após o crescimento inicial foram posteriormente repicadas para novas placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, a qual foi submetida ao teste de vermelho congo para verificar a formação de halo de degradação de celulose.

As colônias que foram positivas para o teste, observado a formação do halo de degradação, foram repicadas isoladamente em novas placas, em triplicata, e novamente incubadas a 28°C por 96 h. Posteriormente realizou-se novamente o teste com o vermelho congo.

4.4 Atividade enzimática quantitativa

Para a determinação do potencial enzimático das colônias analisadas, utilizou-se o método quantitativo que consiste em cultivar os micro-organismos em meio específico (Tabela 3) para a produção de celulasas e posteriormente avaliar o halo produzido.

Após o período de incubação, as placas foram coradas com aproximadamente 2 mL de solução de reagente vermelho Congo 0,5% por 20 min. Posteriormente, a solução de vermelho congo foi descartada e aproximadamente 2 mL de solução de NaCl 0,9% 2 mol. L⁻¹ foi adicionada e aguardados 20 min. para possibilitar a verificação dos halos de degradação de celulose. Os resultados positivos foram baseados na formação de halo claro ao redor das colônias (BAHARUDDIN et al., 2010) (Figura 8). Após a coloração, foram medidos os diâmetros dos halos formados pela degradação da celulose (mm) com o auxílio de um paquímetro (NOGUEIRA & CAVALCANTI, 1996). Todas as análises foram feitas em triplicatas.

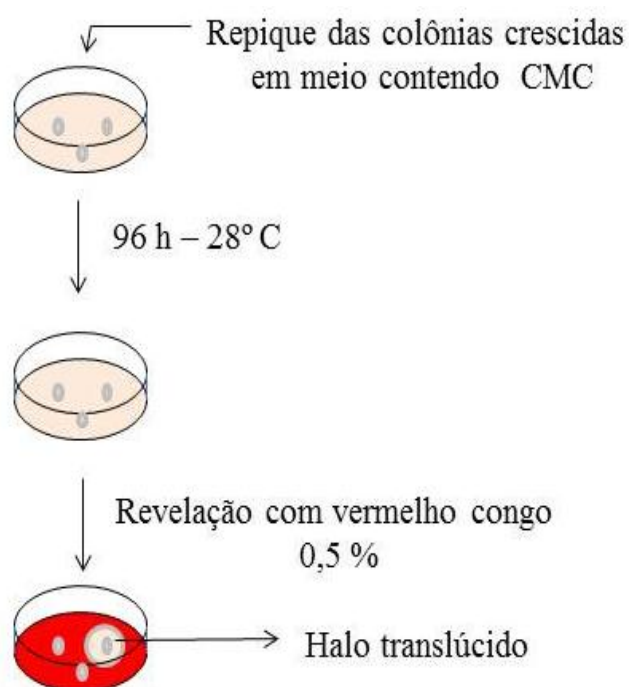


Figura 8: Fluxograma da etapa de avaliação para determinação do potencial enzimático das colônias analisadas. O halo translúcido ao redor da colônia foram classificados como positivo para o teste.

4.5 Determinação do índice enzimático (IE)

O (IE) foi calculado para cada micro-organismo por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia expressa como índice enzimático de atividade (IE) (HANKIN E ANAGNOSTAKIS, 1975; STAMFORD;

ARAÚJO; STAMFORD, 1998). Os índices enzimáticos foram calculados a partir da equação (1):

$$\text{Índice Enzimático (IE)} = \frac{\text{Diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{Diâmetro da colônia}} \quad (\text{Eq. 1})$$

As colônias que apresentaram uma relação diâmetro do halo de hidrólise em relação ao diâmetro da colônia maior que 2,50 (IE \geq 2,50) foram consideradas como potenciais produtoras de celulases (OLIVEIRA *et al.*, 2004; PEIXOTO, 2006; LOPES *et al.*, 2009).

Os isolados foram identificados recebendo um primeiro número, que corresponde a idade da floresta, seguido de outro número, que corresponde ao número do isolado (tabela 4), exemplo; 1-1 = Solo de idade 1 ano e isolado número 1; 3-30= solo de idade de 3 anos e isolado número 30.

Tabela 4. Sistema utilizado para identificação dos micro-organismos isolados.

Idade da floresta	Identificação solo 1º número	Colônia isolada 2º número
1 ano	1-	1-1 (1º colônia isolada)
1 ano	1-	1-2 (2º colônia isolada)
3 anos	3-	3-1 (1º colônia isolada)
3 anos	3-	3-2 (2º colônia isolada)
.	.	.
.	.	.
.	.	.
Serrapilheira	Serrapilheira-	Serrapilheira-3 (3º colônia isolada)

4.6 Identificação dos micro-organismos isolados a partir das amostras de solos e serapilheira.

Todos os isolados de bactérias forma agrupados pela técnica de Gram. O método consistiu inicialmente no esfregão de uma pequena porção das culturas bacterianas em uma lâmina que, em seguida, foram flambadas, com o objetivo de fixar as amostras à lâmina. O procedimento foi realizado segundo a série de reagentes: cristal violeta (1min), água destilada, lugol (1 min), água destilada, lavagem rápida álcool-acetona, água destilada, fucsina (30 s) e última lavagem com água destilada e observada ao microscópio

óptico com aumento de 400 e 1000X, suas imagens registradas por meio de câmera acoplada ao microscópio.

Para os isolados de leveduras, foram realizadas análises em microscópio óptico. O método consistiu inicialmente no esfregaço de uma pequena porção das culturas em uma lâmina que, em seguida, foram flambadas, com o objetivo de fixar as amostras que foram coradas com lactofenol azul e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 e 1000X e suas imagens registradas por meio de câmera acoplada ao microscópio.

4.7 Criação do banco de micro-organismos

Os micro-organismos que apresentaram halos de degradação foram selecionados como potenciais produtores de celulases e foram armazenados no banco de culturas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), no Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), localizado no *Campus JK*, Diamantina-MG para trabalhos futuros.

Para preservação a frio, pequenos disco de aproximadamente 2 mm contendo os isolados foram retirados das colônias e transferidos para tubos de polipropileno de 1,5 ml. Os tubos foram armazenados em geladeira.

Para a preservação a baixa temperatura em glicerol, pequenos discos de aproximadamente 2 mm contendo os isolados foram retirados das colônias e transferidos para tubos de polipropileno de 1,5 ml estéreis. Após, pipetou-se uma alíquota de 1000 µl glicerol 30% em tubos de polipropileno, homogeneizou-se e armazenou-se os tubos em ultrafreezer a -80°C.

4.8 Análises estatísticas dos dados

Para análises dos dados foram submetidos à análise, sendo as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade, de modo que os experimentos foram sempre realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e avaliação da atividade celulolítica mediante descoloração com o vermelho congo

No presente estudo, foram analisados 870 isolados de micro-organismos a partir das amostras de solo e de serapilheira obtidas em áreas de plantio de florestas de eucalipto. Dentre os isolados avaliados, 348 (40 %) foram positivos para a produção de celulasas, ou seja, apresentaram halo de degradação (tabela 6).

Tabela 5: Quantidade total de micro-organismos isolados por idade das florestas e a quantidade de micro-organismos que apresentaram halo de degradação para teste qualitativo com vermelho congo.

Identificação da amostra	Quantidade de micro-organismos cultivados	Quantidade de micro-organismos com presença de halo de degradação	Porcentagem
1 ano – 1	86	37	43,02%
3 anos – 3	56	34	60,71%
5 anos – 5	112	33	29,46%
7 anos – 7	112	50	44,64%
13 anos – 13	112	51	45,53%
16 anos – 16	112	38	33,92%
25 anos – 25	112	30	26,78%
32 anos – 32	112	34	30,35%
Serrapilheira	56	41	73,21%
Total	870	348	40%

A zona mais clara observada ao redor da colônia em forma de halo translúcido corresponde à ação enzimática do complexo enzimático sobre o substrato celulose (Figura 9). O halo de hidrólise, bem como o diâmetro da colônia, apresentou variação entre os isolados analisados, o que demonstra haver diferenças quanto à produção de enzimas celulasas por estes isolados.

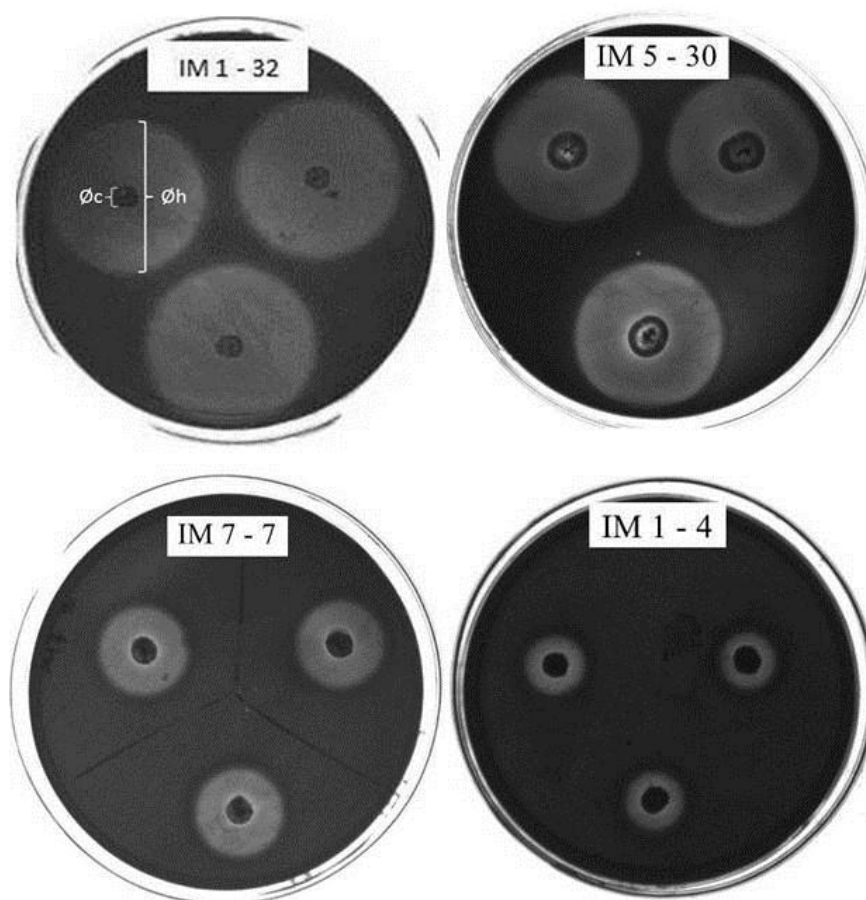


Figura 9: Halo de degradação da CMC de algumas colônias de micro-organismos. \varnothing_c = diâmetro da colônia (mm); \varnothing_h = diâmetro do halo (mm).

A formação de halos em meios sólidos com CMC resulta da quebra do CMC em fragmentos menores, aos quais o vermelho Congo não se liga. Quando a superfície das placas, onde está o meio de cultura com CMC, é lavada com NaCl, o vermelho Congo é removido destas regiões, gerando o halo translúcido e indicando ter havido a degradação da celulose (WOODWARD; WISEMAN, 1982). Neste teste, apenas a atividade das enzimas endoglucanases pode ser analisada. O vermelho congo apresenta forte afinidade pelas ligações β 1-4 (polissacarídeos), ligados em unidade D- Glucopiranosil, fornecendo a base para um ensaio visível para detecção de colônias produtoras de celulase (TEATHER; WOOD, 1982).

O isolamento de micro-organismos com elevado potencial de produção de celulases é um importante passo para desenvolvimento de novas enzimas e suas aplicações biotecnológicas. O screening de micro-organismos produtores de celulase em placas de Petri com ágar é um processo que permite selecionarmos isolados em um extenso banco, e a seleção indireta pode ser realizada a partir de testes feitos com corantes. Sendo um deles o Vermelho Congo (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004 e CASTRO; PEREIRA, 2010).

Ruegger e Tauke-Tornisielo (2004), avaliaram a capacidade celulolítica de 80 linhagens de fungos isolados do solo de uma estação ecológica em São Paulo. Eles calcularam o índice enzimático em substrato cuja fonte de carbono também era CMC. Bortolazzo (2005) avaliou 46 isolados em meio CMC 1% corados com corante vermelho Congo e observou a formação de halo em 15 isolados, com IE variando de 0,99 a 1,40. A formação do halo em meio contendo CMC de seu devido a quebra do CMC em fragmentos menores ao qual o vermelho congo não se liga. Hargreaves (2008) selecionou 15 fungos a partir do isolamento em meio CMC e analisou-os quanto à produção de celulase em ensaio de difusão enzimática.

O método de atividade em placa foi eficiente para a seleção de micro-organismos observados em estudos de Pereira (2013) que isolou pelo método de atividade em placa de Petri, 11 fungos celulolíticos a partir de amostras de solo do Bioma Cerrado, em vários meios de cultivos, utilizando como fonte de carbono Avicel e CMC. Ao final, foram selecionados 4 isolados por apresentarem os maiores índices de produção de celulases. O método diminuiu o tempo de investigação para identificar os isolados de fungos celulolíticos.

Goldbeck (2013) isolou 390 cepas de leveduras selvagens e apenas 16 executaram hidrólise de celulose, também verificada pela presença do halo de degradação ao redor das colônias. Entre estas 16 cepas, 5 se destacaram por apresentarem altos níveis de atividade enzimática.

O meio de cultura CMC é citado como o substrato mais adequado para estudo de atividade enzimática de celulases em meio de cultura sólido. As amostras avaliadas utilizando o CMC como principal fonte de carbono mostram que obteve-se sucesso no isolamento de micro-organismos envolvidos na degradação da celulose a partir de amostras de solo coletados sobre florestas de eucalipto em diferentes idades de plantio.

5.2 Identificação dos micro-organismos isolados a partir das amostras de solos e serapilheira.

Utilizando características macroscópicas e microscópicas, foram isoladas um total de 336 fungos filamentosos, 4 leveduras e 8 bactérias. Na figura 10 são representados aspectos morfológicos de isolados analisados.

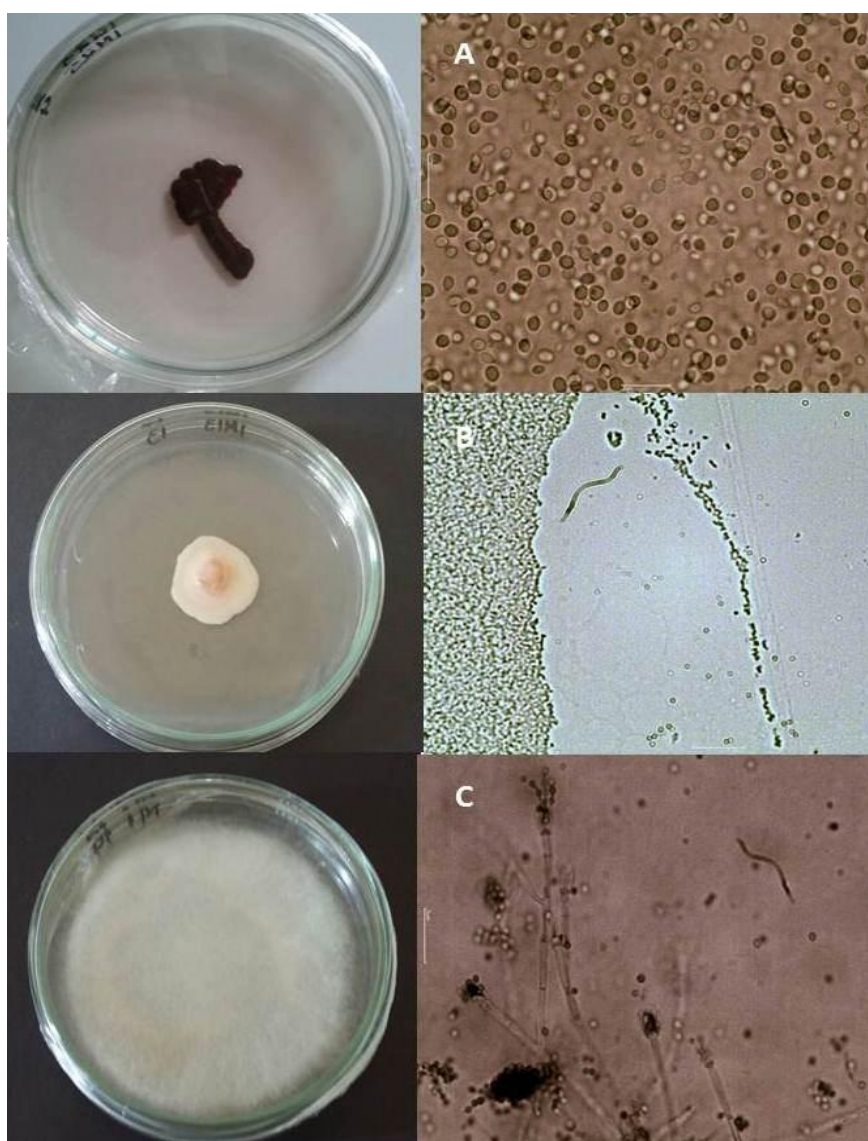


Figura 10: Aspecto morfológico de isolados produtores de celulases. A: Levedura, B: Bactéria e C: Fungo filamentosos.

5.3 Atividade enzimática quantitativa

O diâmetro do halo de hidrólise é útil como um auxiliar para selecionar linhagens com altos níveis de atividade de degradação de polissacarídeos (TEN *et al.*, 2004). Logo, os estudos publicados previamente corroboram os resultados obtidos neste estudo. Alguns estudos realizados para selecionar micro-organismos com potencial celulolítico utilizando o corante vermelho Congo observam a formação do halo de hidrólise, porém não realizaram o cálculo dos índices enzimáticos.

Os valores de índices enzimáticos calculados por meio dos halos de degradação observados nos isolados oriundos das amostras de solos e serapilheira podem ser visto no anexo A, (Tabela 5) que apresenta o cálculo dos índices enzimáticos, para os 348 isolados analisados, obtidos após o cultivo das colônias em meio contendo CMC como principal fonte de carbono, após 96 h de incubação à 28° C em estufa BOD (SL 200/334 SOLAB®). Os dados foram submetidos à análise, sendo as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade.

Com base nos valores do IE de cada um dos grupos estatisticamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, é possível observar que as médias de IE variaram de 1,00 a 24,00, sendo a média geral igual a 3,59 e a mediana igual a 2,60.

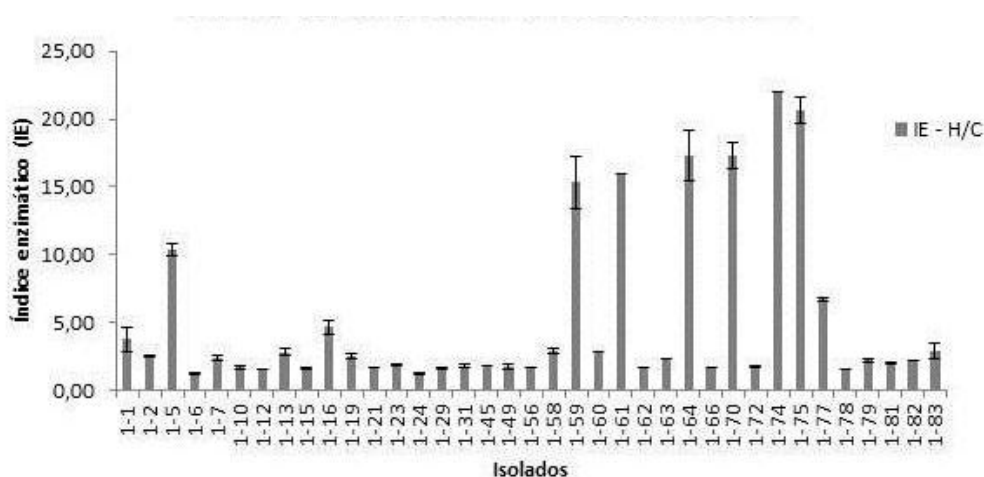


Figura 11: Índice de produção de celulasas por isolados em amostra de floresta de 1 ano.

Na Figura 11, pode-se observar os valores de índices de produção de celulasas pelos isolados do grupo 1 (amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas

estavam com um ano de idade). Dos 86 isolados, apenas 37 foram positivos para o teste com vermelho congo, um total de 43,02%. Os IE variaram de 1,23 a 22,0, destes, destacamos os isolados 1 – 74, 1 – 75, 1 – 64, 1 – 70, 1 – 61, 1 – 59 e 1 – 5 que apresentaram índices de produção superiores a 10,0, sendo o grupo com maiores valores de IE por isolados, sendo constituído de 2 bactérias (+), 2 leveduras e 33 fungos filamentosos.

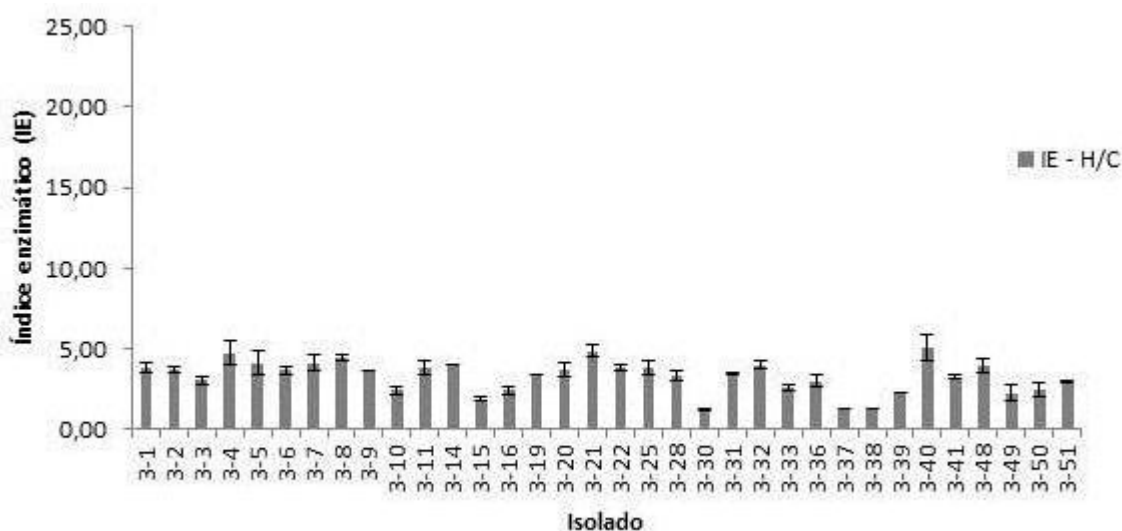


Figura 12: Índice de produção de celulasas por isolados em amostra de floresta de 3 anos.

Na Figura 12, pode-se observar os valores de índices de produção de celulasas pelos isolados do grupo 2 (amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com três anos de idade). Pode-se observar que dos 56 isolados analisados, 34 foram positivos para o teste de vermelho congo, um total de 60,71%. Destes, mais de 79% apresentaram relação de $IE \geq 2,5$, com IE variando de 1,20 a 5,03. Constituído apenas de fungos filamentosos, destaca-se nesse grupo os isolados 3 – 40, 3 – 21, 3 – 4, que apresentaram índices de produção acima de 4,0.

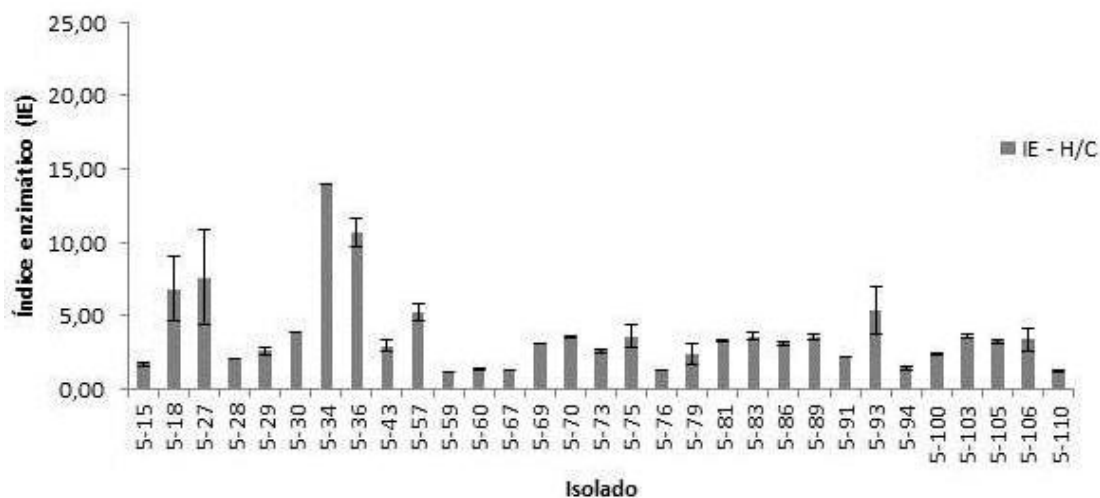


Figura 13: Índice de produção de celulasas por isolados em amostra de floresta de 5 anos.

Na Figura 13, pode-se observar os valores de índices de produção de celulasas pelos isolados do grupo 3 (amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com 5 anos de idade), pode-se observar que dos 112 isolados, 31 foram positivos para o teste com vermelho congo, um total de 29,46%. Mais de 64% dos isolados apresentaram relação de $IE \geq 2,5$. Constituído apenas de fungos filamentosos, destacamos neste grupo os isolados 5 – 34, 5 – 36 apresentaram índices de produção superiores a 10.

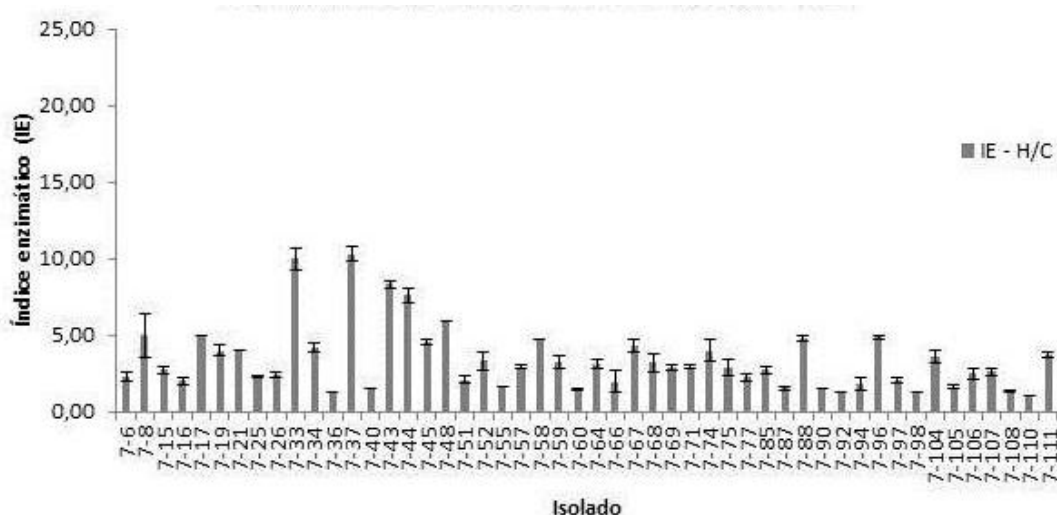


Figura 14: Índice de produção de celulasas por isolados em amostra de floresta de 7 anos.

Na Figura 14, pode-se observar os valores de índices de produção de celulases pelos isolados do grupo 4 (amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com sete anos de idade). Pode-se observar que dos 112 isolados analisados, 50 foram positivos para o teste com vermelho congo, com índices enzimáticos variando de 1,5 a 10,33. Neste grupo, constituído de 2 bactérias (-), 1 levedura e 47 fungos filamentosos, 30 isolados apresentaram relação de $IE \geq 2,5$, com destaque para os isolados 7 – 37 e 7 – 33 que apresentaram $IE \geq 10$.

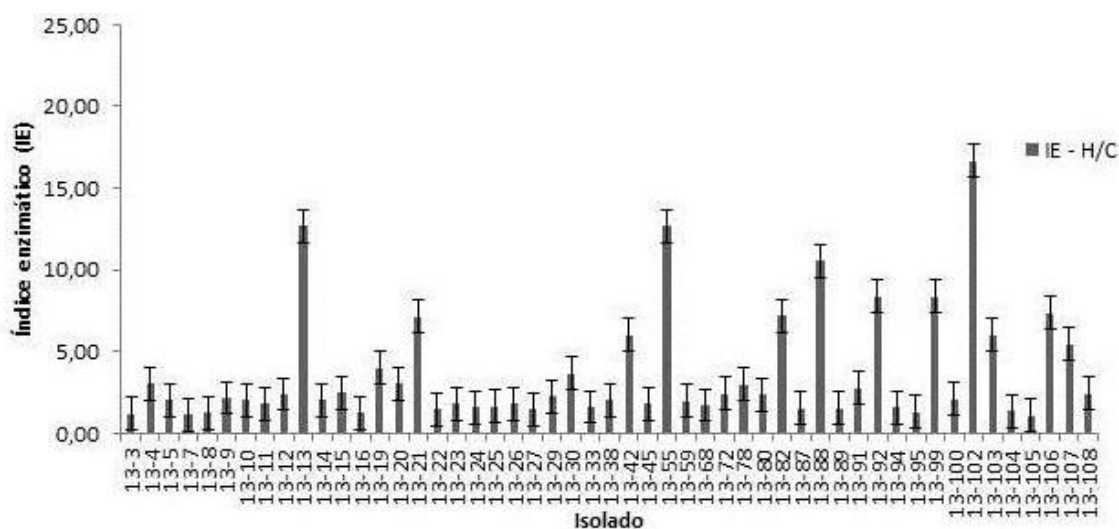


Figura 15: Índice de produção de celulases por isolados em amostra de floresta de 13 anos.

Na Figura 15, pode-se observar os valores de índices de produção de celulases pelos isolados do grupo 5 (amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com treze anos de idade). Pode-se observar que dos 112 isolados analisados, 51 foram positivos para o teste com vermelho congo, um total de 45,53%. Destes, 18 isolados, apresentaram relação de $IE \geq 2,5$. Destaca-se neste grupo constituído de 1 bactéria (-) e 50 fungos filamentosos, os isolados 13 – 102, 13 – 13, 13 – 55, 13 – 88, 13 – 92 e 13 – 99 que apresentaram índices de produção superiores a 8,0.

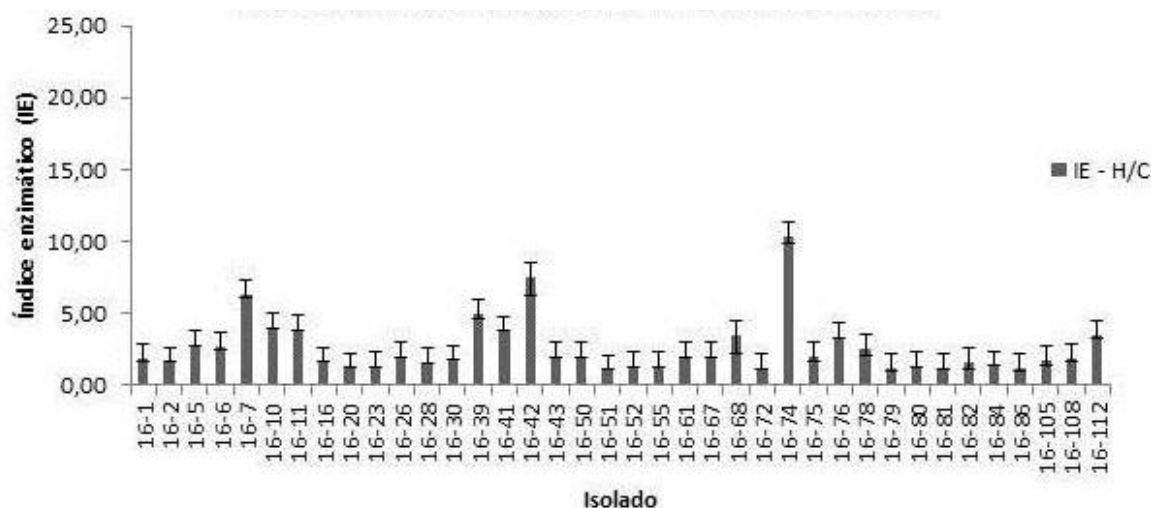


Figura 16: Índice de produção de celulases por isolados em amostra de floresta de 16 anos

Na Figura 15, pode-se observar os valores de índices de produção de celulases pelos isolados do grupo 6 (amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com quinze anos de idade). Resultado similar foi encontrado quando se analisou amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com 16 anos de idade. Nesta situação, pode-se observar que dos 112 isolados analisados, 38 foram positivos para o teste com vermelho congo, 33,93%. Neste grupo constituído apenas de fungos filamentosos, 13 isolados apresentaram relação de $IE \geq 2,5$. Destaca-se os isolados 16 – 74 e 16 – 42 que apresentaram índices de produção superiores a 7, sendo o grupo com menores valores de IE por isolados.

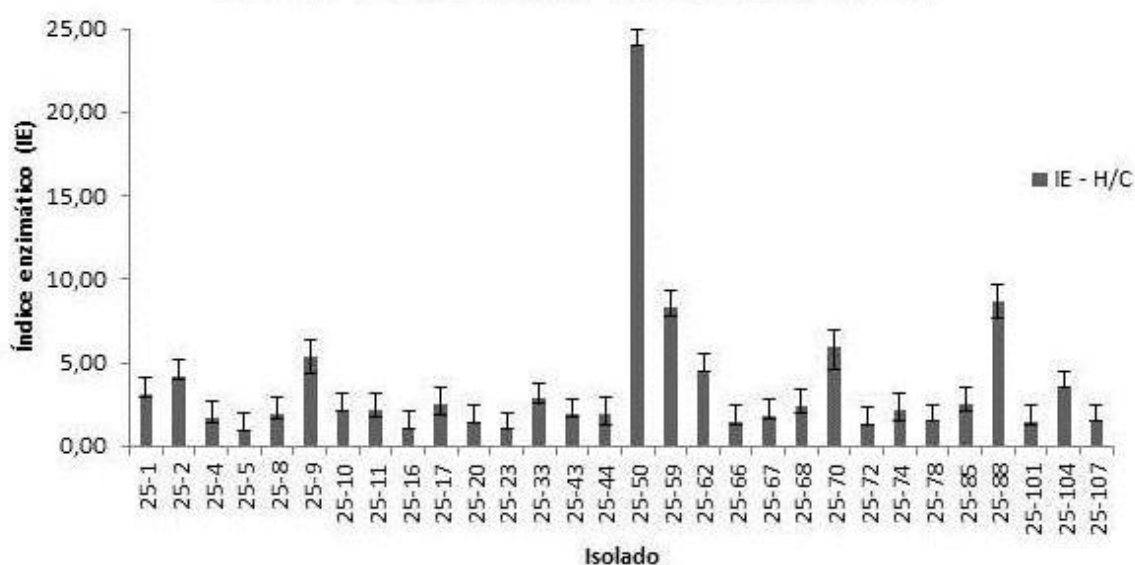


Figura 17: Índice de produção de celulases por isolados em amostra de floresta de 25 anos.

Na Figura 17, pode-se observar os valores de índices de produção de celulases pelos isolados do grupo 7 (amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com vinte e cinco anos de idade). Pode-se observar que dos 112 isolados analisados, apenas 30 foram positivos para o teste com vermelho congo, um total de 26,79%. Neste grupo, constituído de 2 bactérias e 28 fungos filamentosos, destaca-se o isolado 25 – 50 que apresentou o maior IE 24,00, seguido dos isolados 25 – 88 e 25 – 59 com $IE \geq 8$.

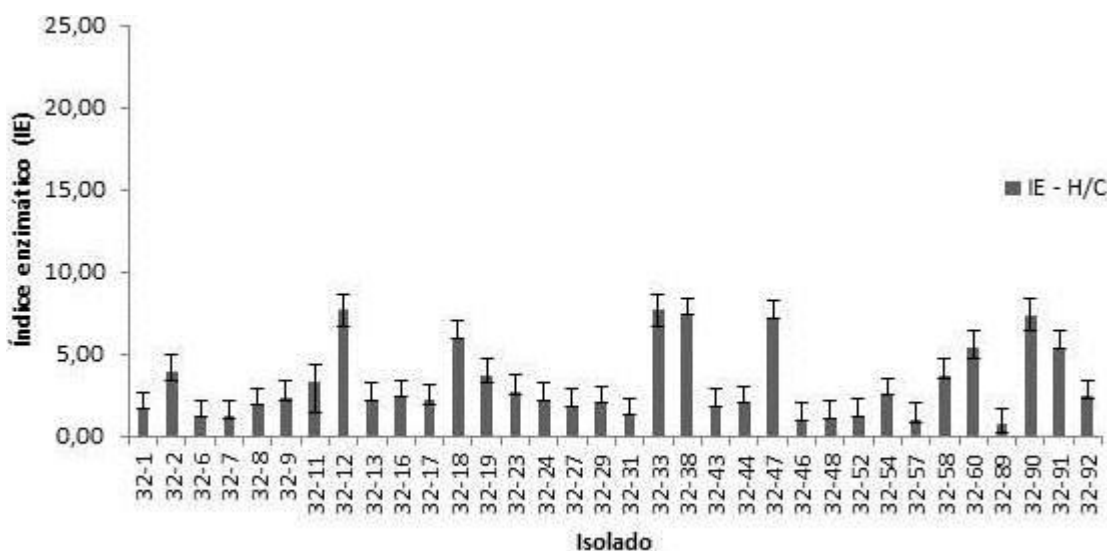


Figura 18: Índice de produção de celulases por isolados em amostra de floresta de 32 anos.

Na Figura 18, pode-se observar os valores de índices de produção de celulases pelos isolados do grupo 8 (amostra de solo coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com trinta e dois anos de idade). Pode-se observar que dos 112 isolados analisados, 34 foram positivos para o teste com vermelho congo, um total de 30,36%. Destes, 14 isolados apresentaram relação de $IE \geq 2,5$. Neste grupo, destacam-se os isolados 32 – 12, 32 – 33, 32 – 32, 32- 106 e 32 – 90 por apresentaram índices de produção $IE \geq 7$. Composto de 2 bactérias (-), 1 levedura e 31 fungos filamentosos os IE variaram de 1,14 a 7,33.

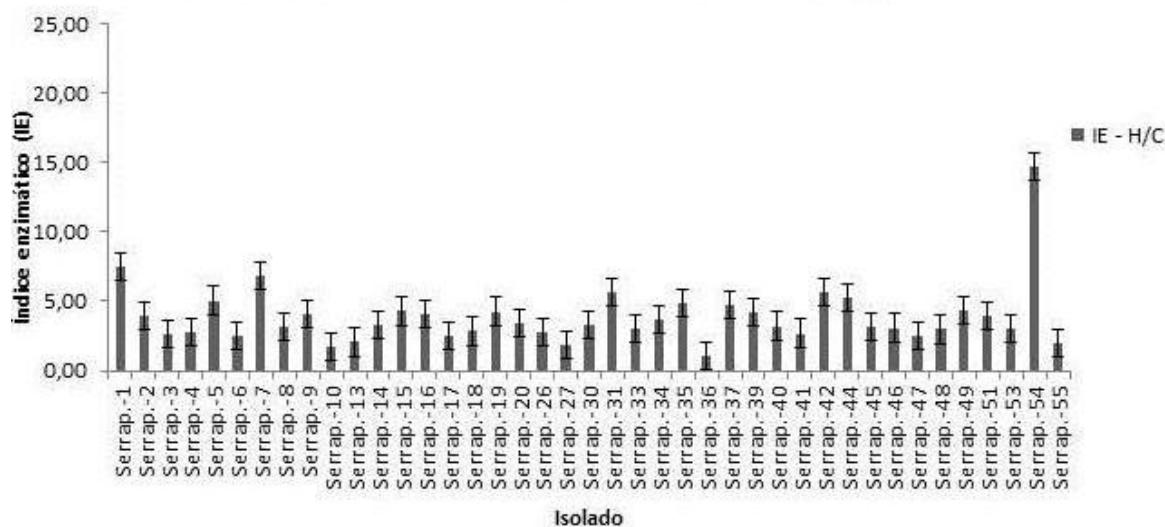


Figura 19: Índice de produção de celulasas por isolados em amostra de serrapilheira.

Na Figura 19, pode-se observar os valores de índices de produção de celulasas pelos isolados do grupo 9 (amostra de serrapilheira coletada em florestas de eucalipto cujas plantas estavam com trinta e dois anos de idade). Finalmente, a amostra de serrapilheira pode-se observar que dos 56 isolados analisados, 41 foram positivos para o teste de vermelho congo, um total de 73,21%. Destes, 35 isolados apresentaram relação de $IE \geq 2,5$. O grupo composto apenas por fungos destaca-se por apresentar uma maior quantidade de isolados com $IE \geq 2,5$, entretanto somente o isolado Serrapilheira 54 – 50 que apresentou o maior índice de produção $IE \geq 14$, os demais mantiveram médias variando de 1,01 a 7,44.

Conforme os resultados, pode-se observar que os isolados testados apresentam uma variação quanto ao potencial de produção de enzimas celulolíticas, uma vez que os valores de índices enzimáticos variaram entre 1,0 e 24,0. Dentre os 348 isolados com valores celulolíticos, 53,16% (185) apresentaram índices enzimáticos maior ou igual a 2,5. Os outros 46,84% (163) apresentaram índices inferiores a 2,5. Diversos autores reportam que um $IE \geq 2,5$ para um dado micro-organismo confere a este isolado ser um bom produtor de enzimas celulolíticas (PEIXOTO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2009). Cabe ressaltar que a quantidade de isolados analisados e a quantidade de isolados com IE maior que 2,5 obtidos neste estudo foi maior do que aqueles, geralmente, encontrados na literatura consultada.

Os índices enzimáticos que foram encontrados neste estudo foram satisfatórios, haja vista ter-se encontrado índices de hidrólise quase 10 vezes ($IE = 24$) maiores que o padrão (2,5) reportado como recomendado para se considerar um micro-organismo como

um bom produtor de enzimas em meio sólido. O índice enzimático pode ser utilizado como uma medida simples e rápida para selecionar linhagens com potencial para a produção de enzimas celulolíticas tanto de um grupo dentro da mesma espécie quanto entre espécies diferentes.

Estabelecendo os índices enzimáticos, observou-se que algumas colônias com pouco crescimento, apresentaram os maiores índices enzimáticos. Os isolados que apresentaram os maiores índices de atividade enzimática ($IAE_{25-50} = 24$ e $IAE_{1-75} = 22$) apresentam diâmetro de colônias iguais a 0,50 mm e índice enzimático 24 e 22 respectivamente. Em contra partida, o isolado 25-5 apresentou diâmetro de colônia 22,67 mm e índice enzimático menor que 1,0.

Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) também relataram algo semelhante. A linhagem de *Penicillium herquei* apresentou índice enzimático 6mm e com um diâmetro de colônia pequeno 2 mm, enquanto outras linhagens apresentaram grande diâmetro de colônia, mas baixo índice enzimático. Lopes e colaboradores (2009) analisaram a atividade celulolítica por meio de ensaios em placas e cálculo dos índices enzimáticos. Duas linhagens de *Trichoderma* apresentaram índices com valores próximos de 1,04 e 1,08. Observaram também que o crescimento das colônias de *Trichoderma* apresentaram variação de 3 cm em média a cada medição (24h).

Souza (2011) avaliou 103 leveduras isoladas da região do cerrado e 20 da região amazônica. Dos 103 isolados, 18 foram positivos apresentando halo de hidrólise ao redor das colônias, evidenciando a produção de celulase com $IE \geq 3$. Dos 20 isolados da região amazônica somente 11 foram produtoras de celulase com valores de $IE \geq 3$.

Goldbeck (2013) isolou 390 cepas de leveduras selvagens, destas apenas 16 executaram hidrólise de celulose, verificada pela presença do halo de degradação ao redor das colônias. Os índices de atividade enzimática em algumas cepas foram de valores de 16,0 mm. Entre estas 16 cepas, 5 se destacaram por apresentarem altos níveis de atividade enzimática.

Da Silva (2011) isolou 11 espécies de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, avaliando quanto à capacidade de degradar amido, celulose e caseína. Entre as espécies estudadas, 6 apresentaram maior índice de relação enzimática para celulase em comparação as demais enzimas, entre estes, as espécies que se destacaram foram *C. cladosporioides* e *P. chrysogenum*, sendo indicadas para estudos de produção em meio líquido.

Silva *et al* (2015) avaliou 28 cepas isoladas de amostras de solo do Parque Nacional de Ubajara, no Estado do Ceará. A atividade enzimática foi verificada pela formação de zonas de hidrólise em torno da colônia de cada cepa e o índice enzimático pela relação entre o diâmetro em milímetros do halo de hidrólise e o diâmetro em milímetros da colônia de cada cepa avaliada. 75% apresentaram atividade celulolítica e aproximadamente 36% mostraram índice enzimático superior a 2. Esses resultados indicam o potencial ecológico e biotecnológico dos isolados do solo da região analisada como produtores da enzima celulase.

A seleção de fungos realizada por Delabona *et al* (2005) se mostrou bastante eficiente. Dos 110 isolados de fungos analisados, foram identificadas 46 colônias quanto à presença ou ausência do halo de hidrólise de celulose. Destas, 10 foram selecionadas para análises de atividade enzimática em meio líquido. Os resultados foram eficientes para produção de celulase e xilanase. Esses dados que os isolados fúngicos da floresta amazônica são uma potencial fonte de celulases e xilanases, fornece apoio a estudos adicionais relacionados ao uso desses microorganismos para obtenção de enzimas necessárias para a conversão de biomassa.

Com o objetivo de selecionar e identificar micro-organismos produtores de celulases, Thongekkaew & Kongsanthia (2016) analisaram um total de 111 amostras coletadas de várias fontes, como solo, cascas de árvores e frugal de insetos. Foram selecionados e identificados para a produção de celulase, 82 cepas de levedura com base nas suas capacidades de degradação da carboximetilcelulose como única fonte de carbono em meio sólido, que foi verificada pelo halo incolor no meio sólido.

Os micro-organismos são muito importantes por apresentarem grandes habilidades de produção de biomoléculas, especialmente enzimas celulolíticas. Apresentam grande potencial de produção de biomassa e conseqüentemente apresentam potencial de aplicação tecnológica. Para o desenvolvimento dos processos microbianos de produção de enzimas, diversos aspectos devem ser analisados com vistas à obtenção de elevados rendimentos e produtividades: linhagem produtora, matéria-prima empregada, formulação do meio de cultivo e otimização dos parâmetros operacionais (BON, 2008).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a importância da prospecção de novas linhagens de micro-organismos produtores de celulases. De maneira geral, pode-se concluir que é possível a utilização de técnicas de *screening* para selecionar linhagens de um extenso banco de isolados. A metodologia de isolamento e cultivo proporcionou a

obtenção de 348 isolados celulolíticos, sendo possível selecionar vários deles pelas altas produções enzimáticas observadas durante as análises.

Diante do exposto, os resultados obtidos até o presente momento estimulam a continuidade do trabalho, especialmente considerando que os valores de atividade enzimática obtidos são promissores e maiores do que aqueles comparados com os trabalhos citados na literatura especializada. Cabe ressaltar que nenhum teste para aprimoramento das condições de cultivo foram realizadas. Logo, os melhores isolados encontrados até o momento poderão ter a sua produção otimizada por meio da adequação das condições de cultivo.

As enzimas celulolíticas são alvos de vários estudos para aplicação biotecnológica, neste contexto a presente pesquisa teve por objetivo selecionar e avaliar o potencial de micro-organismos quanto à produção de enzimas celulolíticas pelo método de avaliação qualitativo. Assim podendo ser aplicados em demais linhas de pesquisa, principalmente no contexto dos biocombustíveis.

A partir desses dados, esses isolados podem ser estudados molecularmente e o gene envolvido na produção da enzima celulase e ser clonado em trabalhos futuros.

6. CONCLUSÕES

A partir das amostras de solo e serapilheira, coletadas em florestas de eucaliptos localizadas em propriedades da empresa Aperam Bioenergia localizada no município de Itamarandiba - Minas Gerais, foram selecionados 348 micro-organismos com potencial para produção de enzimas celulolíticas. A quantidade de isolados produtores de celulasas obtidos superou o objetivo inicial.

A principal fonte de carbono, o carboximetilcelulose, se mostrou adequada para a seleção de isolados produtores de celulasas neste estudo.

Os valores de índices enzimáticos, IE= 1,00 a 24,00, foram superiores aos encontrados na literatura consultada, o que indica a importância do interesse biotecnológico desses micro-organismos para atuar no processo de produção de bioetanol de 2º geração e para utilização em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. **Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ, usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar.** Curitiba: Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 18, n. 1 p.57-70, 2000.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi.** Oxford: FEMS Microbiology Reviews, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.
- AWAFO, V.A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics.** 1997. 255f. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1997.
- BAHARUDDIN, A.S. *et al.* **Effects palm oil mill effluent (POME) anaerobic sludge from 500 m³ of closed anaerobic methane digested tank on pressed-shredded empty fruit bunch (EFB) composting process.** Serdang: Afr J. Biotechnologic, v. 9, n.16, p. 2427-2436, 2010.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. **Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications.** Whiteknights Road: Biotechnology Advances, v. 15, p. 583-620, 1997.
- BHAT, M.K. **Celulases and related enzymes in biotchenology.** Whiteknights Road: Biochnol Advances, v.18, p. 255-383, 2000.
- BINOD, P.; JANU, K.U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. **Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production.** Trivandrum: Biofuels - Alternative Feedstocks and Conversion Processes, p, 229–250, 2011.
- BOER, C.A. *et al.* **Ciclagem de nutrientes por plantas de cobertura na entressafra em um solo de cerrado.** São Mateus: Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, p.1269-1276, 2007.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol.** In Enzimas em Biotecnologia: Produções, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência Brasil. 1º ed., p. 241-271, 2008.
- BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** 2011. 76f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Piracicaba. São Paulo. 2011.
- BRAVO, C. E. C. *et al.* **Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*.** Lavras: Ciência Agrotecnológica, v.24, p.137-152, 2000.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. **A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.** Dublin: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557-577, 2010.
- BUCKERRIDGE, M.; SANTOS, W.D.; DE SOUZA, A.P. **As rotas para etanol celulósico no Brasil.** In: Cortez L.A.B. Butantã: Etanol, Pesquisa e Desenvolvimento. p. 27, 2009.

- CAGNON, B. *et al.* **Contributions of hemicelluloses, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors.** Genoble: Bioresour Technol, v.100, p.292-298, 2009.
- CAMILI E. A.; CABELLO C. **Produção de etanol a partir de polpa de mandioca.** Botucatu: Energ. Agric., vol. 27, n.2, p.01-19. 2012.
- CAO, Y.; TAN, H. **Effects of cellulase on the modification of cellulose.** Pequim: Carbohydrate Research. v. 337, p. 1291-1296, 2002.
- CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. **Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives.** Manizales: Bioresource Technology. v. 101, p. 4754–4766, 2010.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. J. **Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial wastes.** Rio de Janeiro: Química Nova, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CEN P.; XIA L. **Production of cellulase in solid state fermentation.** In: Scheper T, editor. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics Advances in biochemical engineering /biotechnology. Berlin: Springer. v. 65, p. 69, 1999.
- CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M.T. **Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity.** Clifton: Applied Biochemistry and Biotechnology, v.84, p.5–37, 2000
- CHEIRSILPA.; KITCHAB, S. **Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations.** Hat Yai Songkhla: ScienceDirect , 66, p. 73–80. 2015.
- COLLA, L.M. *et al.* **Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos.** Passo Fundo: Ciência e Agrotecnologia. [online], v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.
- DA SILVA, D. C. V. *et al.* **Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas.** Recife: Revista Brasil. Bot., V.34, n.4, p.607-610, out.-dez. 2011
- DELABONA, P. S. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Berlin: **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 577-591, 2005
- DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. **Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases.** Budapest: Industrial Crops and Products. v. 20, p. 11-21, 2004.
- FACCHINI, F. D. A. **Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes.** 2010.153f. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- FLORENCIO C.; BADINO A.C.; FARINAS C. S. **Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica.** São Carlos: Quim. Nova, Vol. 40, No. 9, 1082-1093, 2017.

- GAURAV, N. *et al.* **Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.73, p. 205–214, 2017.
- GHOSE, T.K. **Measurement of cellulase activities.** New Delhi: Pure & Appl. Chem. v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GOLDBECK R. *et al.* **Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates.** Campinas: Bioresource Technology, v 128, p. 797-803, 2013.
- GUARRO, J.; GENNÉ, J.; STCHIGEL, M. **Developments in Fungal Taxonomy.** Reus: Clin Microbiol Rev, v. 12, n. 3, p. 454–500, 1999.
- HAGERMAN, A.; BLAU, D.M.; McCLURE, A.L. **Plate Assay for Determining the Time of Production of Protease, Cellulase, and Pectinases by Germinating Fungal Spores.** Oxford: Analytical Biochemistry, v. 151, p. 334-342, 1985.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. **The use of solid media for detection of enzymes production by fungi.** New Haven: Mycologia, v. 67, p. 597- 607, 1975.
- HANSEN, G. H. *et al.* **Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation.** Lyngby: Process Biochemistry, v.50, n. 09, p. 1327–1341, 2015.
- HARGREAVES, P.I. **Bioprospeção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana.** 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2008.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. **Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** Wageningen: Bioresour Technol, v.100, p.10-18, 2009.
- JORGENSEN, H.; KRISTENSEN J. B.; FELBY, C. **Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities.** Chichester: Biofuels, Bioproducts and Biorefining, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.
- KASANA, R.C. *et al.* **A Rapid and Easy Method for Detection of Microbial Cellulases on Agar plates Using Gram's Iodine.** Palampur: Current Microbiology. v. 57, p. 503–507, 2008.
- KUMARI, B.L.; SRI, M.H.; SUDHAKAR, P. **Isolation of cellulase producing fungi from soil, optimization and Molecular characterization of the isolate for maximizing the enzyme yield.** Sylhet: World Journal of Science and Technology, v. 5, p. 01-09, 2011.
- LINO, F.S.O. **Engenharia Evolutiva aplicada a *Trichoderma* sp. para produção de celulases.** 2012. 86f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan. São Paulo, 2012.
- LOPES, V.R. *et al.* **Atividade da Xilanase em Cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma*.** Natal: SINAFERM, 2009.

- LYND, L.R.; BASKARAN, S.; CASTEN, S. **Salt accumulation associated with KOH added for pH control, and not ethanol, limits growth of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8 at elevated feed xylose concentrations in continuous culture.** New Hampshire: Biotech. Prog., v. 17, p. 118–125, 2001.
- LYND, L.R. *et al.* **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.** Microbiology and molecular biology reviews. New Hampshire: American Society for Microbiology., n.3, v.66, p.506-577, 2002.
- MATOS, R.W.M. **O sistema celulolítico de *Penicillium echinulatum*: Análise da ultraestrutura miceliana e influência de moduladores epigenéticos.** 2012. 125f. Dissertação (Mestrado), Pós graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília UnB, Brasília, 2012.
- NASCIMENTO, R. P. *et al.* **Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production using endo- β 1,4-xylanase titres.** Bahia: World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 19, p. 879-881, 2009.
- NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. **Cellulolytic fungi isolated from processed oats.** São Paulo: Revista de Microbiologia, v. 27, p. 7-9, 1996.
- OLIVEIRA, G. S. **Expressão Heteróloga do Gene de Celobiohidrolase (*cbh1.2*) do Fungo *Humicola grisea* var *thermoidea* em *Pichia pastoris*.** 2007. 113f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2007.
- OLIVEIRA, N. A. *et al.* **Extracellular hydrolytic enzymes in indigenous strains of rhizobia in Central Amazonia,** Amazonas: Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 26, p. 853-860, 2004.
- PALOMER, X. *et al.* **Study of the strawberry Cell1 endo- β -(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*.** Barcelona: Plant Science. v. 167, p. 509-518. 2004.
- PEIXOTO, A. B. **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões brasileiras.** 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.
- PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Frense) Wehmer.** 2012. 111 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras. 2012.
- PEREIRA, D, E, P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado.** 2013. 35f. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2013.
- PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. **Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7.** Kliment Ohridski Sofia: Biotechnology Letters, v. 24, p. 2104-2111, 2002.

- POLIZELI, M.L.T.M. *et al.* **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** São Paulo: Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 67, p. 577-591, 2005.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R.; EICHHORN, S.E. **A composição molecular das células vegetais.** In: Raven P.H.; Evert R. F. and Eichhorn S.E. (orgs). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Biologia Vegetal. 6ª ed. p. 17-39, 2001.
- ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido.** 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S.; **Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes,** São Paulo: Biomass and bioenergy, v. 37, n. 03, p. 243-250, 2012.
- RODRIGUES, G. **Prospecção de Genes de Celulase presentes em Biblioteca Metagenômica.** 2008, 47f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de Campinas, Jaboticabal, 2008.
- ROGALINSKI, T.; INGRAN, T.; BRUNNER, G. **Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures.** Hamburg: J. Supercrit Fluids, v. 47, p. 54-63, 2008.
- RUBIN, E. **Genomics of cellulosic biofuels.** Londres, Nature, v. 454, p 841-856, 2008.
- RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins.** São Paulo, Brasil: Revista Brasileira de Botânica, v. 2, p. 205–211, 2004.
- SÁNCHEZ, C. **lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.** Tlaxcala: Biotechnology Advances, v. 27, p.185-194, 2009
- SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. **Triends in biotechnological production of the ethanol from different feedstocks.** Tlaxcala: Bioresource Technology, v. 99, p. 5270-5295, 2008
- SANTOS, F. A.; COLODOTTE, J. L.; QUEIROZ, J. H.; **Bioenergia & Biorrefinaria.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 541 p, 2013.
- SANTOS, F.A. *et al.* **Potencial de palha de cana-de-açúcar na produção de etanol.** Viçosa: *Química Nova*, v.35, n. 5, p. 1004 - 1010. 2012.
- SANTOS, S.F.M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** 2007. 148f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. 2007
- SAZCI, A.; RADFORD, A.; ERENLER, K. **Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method.** Kocaeli: Journal Applied Bacteriol., v. 61, p. 559–562, 1986.

- SILVA, L.A.D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 2008. 119f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2008.
- SILVA, M.S. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau**. 2011. 83f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. Feira de Santana – Bahia, 2011.
- SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. **Atividade Celulolítica de Actinobactérias de Região Semiárida do Ceará**. Goiânia: Enciclopédia Biosfera, v.11 n.21; p. 2015-2026, 2015.
- SINGHANIA, R.R. *et al.* **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases**. Trivandrum: Enzyme and Microbial Technology, v.46, p.541-549, 2010.
- SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking**. Berlin: Springer-Verlag, p. 316, 1999.
- SOARES, G.C. **Estoque de carbono em plantas jovens de Eucalyptus e Coymbria em diferentes idades de plantio**. 2016. 65f. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis). Programa de Pós Graduação em Biocombustíveis. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2016.
- SOCOL, C.R. *et al.* **Breeding and growth of Rhizopus in raw cassava by solid state fermentation**. Applied Microbiology Biotechnology, v.41, p.330-336, 1994.
- SOUZA, I. F. **Isolamento e avaliação de fungos filamentosos naturalmente ocorrente em biomassas lignocelulósicas para a produção de enzimas holocelulolíticas**. 2015. 109f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2015.
- SOUZA, A. C. **Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração**. 2011. 89f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, 2011.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. **Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban)**. Campinas: Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.
- SUDHANSHU S. B.; RAMESH C. R. **Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies**. Bhubaneswar: International Journal of Biological Macromolecules, v.86, p. 656–669, 2016.
- SUKUMARAN, R.K. *et al.* **A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production**. Trivandrum: Renew. Energy. v. 34, p. 421-424, 2009.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. **Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen.** Ottawa: Applied and Environmental Microbiology, v. 43, p.777-780, 1982.

TEN, L.N. *et al.* **Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates.** Daejeon: Journal of Microbiological Methods. v.56, p.375-382, 2004.

THONGEKKAEW, J.; KONGSANTHIA, J. **Screening and Identification of Cellulase Producing Yeast from Rongkho Forest, Ubon Ratchathani University.** Ubon Ratchathani: Bioengineering and Bioscience, v. 4, n. 3, p. 29-33. 2016.

TURNER, B. L.; LAMBIN, E. F.; REENBERG, A. **The emergence of land change science for global environmental change and sustainability.** PNAS, v.10, p. 20666-20671, 2007.

VILELA, E. D. S. **Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces sp.*** 2013.89f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre, 2013.

WATANABE H.; TOKUDA G. **Cellulolytic systems in insects.** Ibaraki: Annu Ver Entomol, v. 55, p. 609- 632, 2010.

WOODWARD, J.; WISEMAN, A. **Fungal and other alfa-D-glicosidasestheir properties and applications.** Enzyme Microb. Technol. 4: 73-79, 1982.

Yoon H, *et al.* **Frataxin-bypassing Isu1: characterization of the bypass activity in cells and mitochondria.** Philadelphia: Biochem J v. 459, n. 1, p. 71-81, 2014.

ZANDONÁ, F. A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas.** 2001. 139f. Tese (Doutorado), Processo Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2001.

ZHANG Y-H.P.; LYND, L.R. **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** New Hampshir: Biotechnology and Bioengineering, v.88, p. 797- 824, 2004.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. **Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies.** Blacksburg: Biotechnology Advances, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.

ANEXO A

ANEXO 1: Valores dos índices enzimáticos (IE) de produção de celulases pelos isolados analisados.

Isolado	Média Øc	Média Øc	Desvio Pad.	Valor do IE	Tipo de micro-organismos isolado
25-50	0,50	12,0	0,00	24,00a	Bactéria (-)
1-74	0,50	11,00	0,00	22,00b	Bactéria (+)
1-75	0,50	10,33	0,94	20,66c	F. filamentoso
1-64	0,50	8,67	1,89	17,33d	F. filamentoso
1-70	0,50	8,67	0,94	17,33d	F. filamentoso
13-102	0,50	8,33	0,94	16,66e	F. filamentoso
1-61	0,50	8,00	0,00	16,00e	F. filamentoso
1-59	0,50	7,67	1,89	15,33f	F. filamentoso
Serrapilheira-54	1,33	17,33	4,71	14,66f	F. filamentoso
5-34	0,50	7,00	0,00	14,00f	F. filamentoso
13-13	0,50	6,33	0,94	12,66g	F. filamentoso
13-55	0,50	6,33	0,94	12,66g	F. filamentoso
5-36	0,50	5,33	0,94	10,66h	F. filamentoso
13-88	3,00	31,67	0,16	10,55h	F. filamentoso
1-5	1,00	10,33	0,47	10,33h	F. filamentoso
16-74	1,00	10,33	0,47	10,33h	F. filamentoso
7-37	1,00	10,33	0,47	10,33h	F. filamentoso
7-33	2,00	20,00	0,71	10,00h	F. filamentoso
25-88	0,50	4,33	0,94	8,66i	F. filamentoso
13-92	4,33	36,00	0,54	8,36i	F. filamentoso
13-99	4,67	38,67	0,80	8,36i	F. filamentoso
25-59	1,00	8,33	0,47	8,33i	Bactéria (-)
7-43	2,00	16,67	0,24	8,33i	F. filamentoso
7-44	1,00	7,67	0,47	7,66j	Bactéria (-)
32-12	8,00	19,00	0,62	7,66j	F. filamentoso
32-33	11,00	17,67	0,04	7,66j	F. filamentoso
5-27	2,00	12,67	3,23	7,61j	F. filamentoso

16-42	4,33	32,67	1,33	7,55j	F. filamentoso
Serrapilheira-1	3,00	22,33	0,16	7,44j	F. filamentoso
32-38	0,50	1,00	0,00	7,40j	F. filamentoso
13-106	0,50	3,67	0,94	7,33j	F. filamentoso
32-90	0,50	3,67	0,94	7,33j	Bactéria (-)
32-47	5,00	36,33	0,09	7,26j	F. filamentoso
13-82	2,00	14,33	0,24	7,16j	Levedura
13-21	5,67	40,33	0,19	7,13j	F. filamentoso
5-18	1,67	10,33	2,25	6,83k	F. filamentoso
Serrapilheira-7	3,33	22,33	0,75	6,80k	F. filamentoso
1-77	5,00	33,67	0,09	6,73k	F. filamentoso
16-7	2,00	12,67	0,24	6,33k	F. filamentoso
13-103	0,50	3,00	0,00	6,00k	F. filamentoso
13-42	0,50	3,00	0,00	6,00k	F. filamentoso
25-70	1,33	7,67	1,41	6,00k	F. filamentoso
32-18	3,00	18,00	0,00	6,00k	F. filamentoso
7-48	0,50	3,00	0,00	6,00k	F. filamentoso
Serrapilheira-31	3,67	20,33	0,73	5,63l	F. filamentoso
Serrapilheira-42	3,67	20,33	0,73	5,63l	F. filamentoso
13-107	3,00	16,33	0,16	5,44l	F. filamentoso
32-91	3,00	16,33	0,16	5,44l	Bactéria (-)
32-60	3,33	17,67	0,64	5,38l	F. filamentoso
5-93	3,67	19,00	1,67	5,36l	F. filamentoso
25-9	0,50	2,67	0,94	5,33l	Levedura
Serrapilheira-44	3,00	15,67	0,16	5,22l	F. filamentoso
5-57	4,33	22,33	0,59	5,21l	F. filamentoso
Serrapilheira-5	4,33	21,67	0,47	5,05l	F. filamentoso
3-40	6,33	31,00	0,84	5,03l	F. filamentoso
7-17	0,20	1,00	0,00	5,00l	Bactéria (-)
7-8	0,67	3,00	1,41	5,00l	F. filamentoso
16-39	5,00	24,67	0,34	4,93l	F. filamentoso
7-96	4,00	19,67	0,12	4,91l	F. filamentoso
Serrapilheira-35	5,33	25,67	0,37	4,84l	F. filamentoso
3-21	6,67	32,00	0,36	4,82l	F. filamentoso
7-88	3,00	14,33	0,16	4,77l	F. filamentoso
7-58	4,00	19,00	0,00	4,75l	F. filamentoso
Serrapilheira-37	5,00	23,67	0,09	4,73l	F. filamentoso
3-4	5,00	23,00	0,75	4,71l	F. filamentoso
1-16	1,00	4,67	0,47	4,66l	Levedura

7-45	3,00	13,67	0,16	4,55m	F. filamentoso
25-62	2,00	9,00	0,00	4,50m	F. filamentoso
3-8	6,00	26,33	0,21	4,38m	F. filamentoso
7-67	3,67	15,67	0,47	4,33m	F. filamentoso
Serrapilheira-49	3,67	14,67	1,39	4,31m	F. filamentoso
Serrapilheira-15	5,33	22,67	0,32	4,27m	F. filamentoso
Serrapilheira-19	4,67	19,67	0,52	4,26m	F. filamentoso
Serrapilheira-39	3,00	12,67	0,42	4,22m	F. filamentoso
25-2	3,00	12,67	0,16	4,22m	F. filamentoso
7-34	4,33	18,00	0,29	4,18m	F. filamentoso
Serrapilheira-16	5,00	20,00	0,68	4,11m	F. filamentoso
3-5	6,00	24,00	0,70	4,09m	F. filamentoso
3-7	4,00	16,33	0,51	4,08m	F. filamentoso
Serrapilheira-9	5,33	21,33	0,39	4,03m	F. filamentoso
7-19	4,67	18,67	0,33	4,03m	F. filamentoso
13-19	0,50	2,00	0,00	4,00m	Bactéria (-)
16-10	1,00	5,33	1,15	4,00m	F. filamentoso
3-14	6,00	24,00	0,00	4,00m	F. filamentoso
5-68	5,00	20,00	0,00	4,00m	F. filamentoso
7-21	5,00	20,00	0,00	4,00m	F. filamentoso
7-74	2,67	10,33	0,72	4,00m	F. filamentoso
32-2	4,67	18,33	0,54	3,98m	F. filamentoso
3-48	4,67	18,33	0,45	3,96m	F. filamentoso
16-11	6,00	23,67	0,08	3,94m	F. filamentoso
Serrapilheira-51	5,00	19,67	0,09	3,93m	F. filamentoso
3-32	7,67	30,00	0,25	3,92m	F. filamentoso
Serrapilheira-2	5,33	20,67	0,29	3,90m	F. filamentoso
5-30	7,00	27,00	0,00	3,85m	F. filamentoso
3-22	8,67	33,00	0,22	3,81n	F. filamentoso
3-11	5,67	21,33	0,45	3,80n	F. filamentoso
16-41	5,00	19,00	0,00	3,80n	F. filamentoso
3-1	7,33	27,67	0,29	3,79n	F. filamentoso
3-25	6,00	22,33	0,46	3,78n	F. filamentoso
1-1	1,67	6,00	0,87	3,77n	F. filamentoso
7-111	3,00	11,33	0,16	3,77n	F. filamentoso
32-19	4,67	17,00	0,40	3,68n	F. filamentoso
Serrapilheira-34	3,33	12,00	0,47	3,66n	F. filamentoso
13-30	2,00	7,33	0,47	3,66n	F. filamentoso
3-2	7,67	28,00	0,24	3,66n	F. filamentoso

3-20	1,00	3,67	0,47	3,66n	F. filamentoso
3-9	6,00	22,00	0,00	3,66n	F. filamentoso
32-58	4,00	14,67	0,12	3,66n	F. filamentoso
3-6	6,67	24,00	0,27	3,61n	F. filamentoso
5-83	4,67	16,67	0,28	3,60n	F. filamentoso
5-103	12,33	40,00	0,14	3,58n	F. filamentoso
5-75	4,00	14,33	0,77	3,58n	F. filamentoso
7-104	4,33	15,33	0,42	3,58n	F. filamentoso
16-68	3,33	11,33	1,37	3,55n	F. filamentoso
5-89	3,00	10,67	0,16	3,55n	F. filamentoso
5-70	10,33	36,67	0,11	3,55n	F. filamentoso
25-104	2,00	7,00	0,00	3,50n	F. filamentoso
Serrapilheira-20	6,33	21,67	0,34	3,44n	F. filamentoso
16-112	3,00	10,33	0,16	3,44n	F. filamentoso
3-31	4,00	13,67	0,12	3,41n	F. filamentoso
3-19	8,00	27,00	0,00	3,37n	F. filamentoso
5-106	8,00	26,00	0,77	3,37n	F. filamentoso
16-76	3,00	10,00	0,00	3,33n	F. filamentoso
32-11	0,50	1,67	1,89	3,33n	F. filamentoso
7-52	2,00	6,67	0,62	3,33n	F. filamentoso
3-28	4,67	15,33	0,32	3,31n	F. filamentoso
Serrapilheira-14	5,33	17,33	0,32	3,27n	F. filamentoso
Serrapilheira-30	5,33	17,33	0,32	3,27n	F. filamentoso
5-105	12,33	40,00	0,14	3,26n	F. filamentoso
7-59	3,33	10,67	0,38	3,25n	F. filamentoso
5-81	11,00	35,67	0,04	3,24n	F. filamentoso
Serrapilheira-40	6,00	19,33	0,08	3,22n	F. filamentoso
3-41	3,00	9,67	0,16	3,22n	F. filamentoso
7-68	2,67	8,33	0,57	3,22n	F. filamentoso
Serrapilheira-8	6,67	21,00	0,41	3,20n	F. filamentoso
7-64	4,33	13,67	0,29	3,18n	F. filamentoso
Serrapilheira-45	3,33	10,33	0,49	3,16n	F. filamentoso
25-1	4,00	12,67	0,24	3,16n	F. filamentoso
5-69	8,00	25,00	0,00	3,12n	F. filamentoso
5-86	10,33	32,00	0,14	3,10n	F. filamentoso
Serrapilheira-46	4,67	14,33	0,12	3,08n	F. filamentoso
Serrapilheira-53	5,33	16,00	0,25	3,02o	F. filamentoso
Serrapilheira-33	7,00	18,33	0,98	3,01o	F. filamentoso
13-20	2,67	7,67	0,72	3,00o	F. filamentoso

13-4	1,00	3,00	0,00	3,00o	F. filamentoso
3-3	4,00	12,00	0,20	3,00o	F. filamentoso
13-78	9,33	27,67	0,28	2,99o	F. filamentoso
3-36	7,00	20,67	0,41	2,97o	F. filamentoso
Serrapilheira-48	4,67	13,67	0,39	2,96o	F. filamentoso
5-43	3,67	10,67	0,34	2,94o	F. filamentoso
3-51	4,00	11,67	0,12	2,91o	F. filamentoso
7-57	4,00	11,67	0,12	2,91o	F. filamentoso
7-71	4,00	11,67	0,12	2,91o	F. filamentoso
1-58	5,67	16,33	0,22	2,90o	F. filamentoso
1-83	2,33	7,00	0,55	2,88o	F. filamentoso
7-75	3,67	10,33	0,55	2,88o	F. filamentoso
7-69	4,33	12,33	0,19	2,86o	F. filamentoso
Serrapilheira-18	5,67	16,00	0,25	2,84o	F. filamentoso
1-13	5,67	16,00	0,25	2,84o	F. filamentoso
25-33	2,00	5,67	0,24	2,83o	F. filamentoso
Serrapilheira-26	4,67	13,00	0,31	2,81o	F. filamentoso
16-5	8,33	23,33	0,10	2,80o	F. filamentoso
1-60	5,00	14,00	0,00	2,80o	F. filamentoso
Ierrapilheira-4	6,00	16,67	0,16	2,77o	F. filamentoso
32-23	7,00	19,33	0,27	2,76o	F. filamentoso
7-15	3,67	10,00	0,20	2,75o	F. filamentoso
13-91	6,67	15,00	1,47	2,73o	F. filamentoso
7-85	4,67	12,67	0,19	2,73o	F. filamentoso
Serrapilheira-41	6,33	17,00	0,19	2,69o	F. filamentoso
16-6	8,00	21,33	0,12	2,66o	F. filamentoso
7-107	2,00	5,33	0,24	2,66o	F. filamentoso
16-78	5,00	12,33	0,54	2,61o	F. filamentoso
Serrapilheira-3	5,00	13,00	0,00	2,60o	F. filamentoso
5-73	14,00	36,33	0,12	2,59o	F. filamentoso
5-29	4,00	10,33	0,24	2,58o	F. filamentoso
25-17	2,67	6,67	0,63	2,55o	F. filamentoso
Serrapilheira-17	5,67	14,33	0,19	2,54o	F. filamentoso
32-54	19,00	48,33	0,02	2,54o	F. filamentoso
1-19	6,33	16,00	0,18	2,53o	F. filamentoso
3-33	5,00	12,67	0,19	2,53o	F. filamentoso
1-2	9,33	23,33	0,09	2,50o	F. filamentoso
Serrapilheira-6	6,67	16,67	0,16	2,50o	F. filamentoso
25-85	4,00	10,00	0,41	2,50o	F. filamentoso

7-106	4,00	9,67	0,41	2,50o	F. filamentoso
Serrapilheira-47	6,33	15,67	0,25	2,49o	F. filamentoso
13-15	7,00	17,33	0,07	2,47o	F. filamentoso
25-68	2,67	6,33	0,42	2,44o	F. filamentoso
7-26	3,00	7,33	0,16	2,44o	F. filamentoso
3-50	7,00	16,67	0,42	2,42o	F. filamentoso
32-16	7,00	17,00	0,00	2,42o	F. filamentoso
13-108	4,00	9,67	0,12	2,41o	F. filamentoso
32-92	4,00	9,67	0,12	2,41o	F. filamentoso
13-72	9,33	22,33	0,11	2,39o	F. filamentoso
5-79	6,00	14,33	0,67	2,38o	F. filamentoso
1-63	13,00	31,00	0,00	2,38o	F. filamentoso
1-7	6,33	15,00	0,17	2,38o	F. filamentoso
13-12	8,00	19,00	0,62	2,37o	F. filamentoso
32-9	8,00	19,00	0,18	2,37o	F. filamentoso
5-100	8,00	19,00	0,10	2,37o	F. filamentoso
3-10	6,67	15,67	0,22	2,36o	F. filamentoso
3-16	6,67	15,67	0,22	2,36o	F. filamentoso
7-25	16,00	37,67	0,06	2,35o	F. filamentoso
13-80	1,00	2,33	0,47	2,33o	F. filamentoso
7-6	3,33	7,67	0,27	2,33o	F. filamentoso
7-77	2,33	5,33	0,21	2,25p	F. filamentoso
1-82	8,00	18,00	0,00	2,25p	F. filamentoso
3-39	8,00	18,00	0,00	2,25p	F. filamentoso
1-79	9,00	20,00	0,09	2,22p	F. filamentoso
13-29	3,00	6,67	0,16	2,22p	F. filamentoso
25-10	3,00	6,67	0,16	2,22p	F. filamentoso
3-49	8,33	18,00	0,47	2,21p	F. filamentoso
32-13	8,00	17,67	0,06	2,20p	F. filamentoso
32-24	8,00	17,67	0,06	2,20p	F. filamentoso
13-9	4,00	8,67	0,12	2,16p	F. filamentoso
25-74	1,67	3,33	0,62	2,16p	F. filamentoso
32-17	2,67	5,67	0,24	2,16p	F. filamentoso
25-11	4,67	9,67	0,37	2,15p	F. filamentoso
5-91	8,00	17,00	0,00	2,12p	F. filamentoso
7-97	3,00	6,33	0,16	2,11p	F. filamentoso
13-100	4,67	9,67	0,29	2,10p	F. filamentoso
7-51	4,00	8,33	0,24	2,08p	F. filamentoso
16-61	5,67	11,67	0,09	2,06p	F. filamentoso

Serrapilheira-13	6,00	12,33	0,08	2,05p	F. filamentoso
16-75	5,00	10,00	0,34	2,05p	F. filamentoso
7-16	3,33	6,67	0,24	2,02p	F. filamentoso
1-81	10,67	21,33	0,08	2,00p	F. filamentoso
Serrapilheira-55	55	0,50	1,00	2,00p	F. filamentoso
13-10	4,00	8,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
13-14	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
13-38	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
13-5	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
16-26	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
16-43	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
16-50	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
16-67	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
25-44	1,67	3,00	0,71	2,00p	F. filamentoso
25-8	1,67	3,33	0,41	2,00p	F. filamentoso
32-29	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
32-44	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
5-28	0,50	1,00	0,00	2,00p	F. filamentoso
7-66	1,67	3,00	0,71	2,00p	F. filamentoso
13-59	3,33	6,33	0,34	1,94p	F. filamentoso
16-108	7,33	14,00	0,27	1,94p	F. filamentoso
32-8	12,00	23,33	0,04	1,94p	F. filamentoso
25-43	6,00	11,33	0,08	1,88p	F. filamentoso
32-43	24,67	46,33	0,07	1,87p	F. filamentoso
Serrapilheira-27	6,00	11,00	0,26	1,86p	F. filamentoso
1-23	16,67	31,00	0,05	1,86p	F. filamentoso
32-27	8,67	16,00	0,10	1,85p	F. filamentoso
16-1	24,00	43,67	0,12	1,84p	F. filamentoso
3-15	8,00	14,67	0,12	1,83p	F. filamentoso
7-94	2,00	3,67	0,47	1,83p	F. filamentoso
1-45	7,33	13,33	0,05	1,82p	F. filamentoso
16-30	14,33	26,00	0,06	1,81p	F. filamentoso
13-45	6,33	11,33	0,27	1,80p	F. filamentoso
13-26	6,33	11,33	0,18	1,80p	F. filamentoso
1-49	17,00	30,33	0,17	1,80p	F. filamentoso
13-11	5,00	9,00	0,00	1,80p	F. filamentoso
1-31	16,00	28,67	0,10	1,79p	F. filamentoso
1-72	27,00	48,33	0,09	1,79p	F. filamentoso
13-23	6,00	10,33	0,46	1,78p	F. filamentoso

25-67	3,00	5,33	0,16	1,77p	F. filamentoso
16-105	11,00	17,33	0,35	1,75p	F. filamentoso
13-68	9,33	16,00	0,08	1,71p	F. filamentoso
1-10	17,67	30,00	0,09	1,70p	F. filamentoso
1-56	10,00	17,00	0,00	1,70p	F. filamentoso
32-1	4,33	7,33	0,07	1,70p	F. filamentoso
5-15	9,33	15,67	0,15	1,69p	F. filamentoso
16-16	22,00	37,00	0,00	1,68p	F. filamentoso
1-21	19,33	32,33	0,03	1,67p	F. filamentoso
1-66	21,00	35,00	0,00	1,66p	F. filamentoso
25-4	3,00	5,00	0,27	1,66p	F. filamentoso
Serrapilheira-10	7,00	11,67	0,07	1,66p	F. filamentoso
16-2	27,00	44,67	0,03	1,65p	F. filamentoso
16-82	11,33	16,33	0,51	1,64p	F. filamentoso
7-105	9,33	15,33	0,11	1,64p	F. filamentoso
1-62	17,00	28,00	0,00	1,64p	F. filamentoso
1-15	22,33	36,67	0,01	1,64p	F. filamentoso
7-55	24,00	39,33	0,02	1,63p	F. filamentoso
1-29	18,33	30,00	0,04	1,63p	F. filamentoso
13-25	6,33	10,33	0,04	1,63p	F. filamentoso
1-78	27,00	44,00	0,00	1,62p	F. filamentoso
13-33	11,00	17,67	0,04	1,60p	F. filamentoso
16-28	5,00	8,00	0,00	1,60p	F. filamentoso
13-94	4,00	6,33	0,12	1,58p	F. filamentoso
1-12	8,67	13,67	0,03	1,57p	F. filamentoso
13-24	6,00	9,33	0,08	1,55p	F. filamentoso
7-87	3,00	4,67	0,16	1,55p	F. filamentoso
25-20	9,67	14,67	0,13	1,51p	F. filamentoso
13-87	2,00	3,00	0,00	1,50p	F. filamentoso
13-89	2,00	3,00	0,00	1,50p	F. filamentoso
25-107	2,00	3,00	0,00	1,50p	F. filamentoso
25-78	2,00	3,00	0,00	1,50p	F. filamentoso
7-40	2,00	3,00	0,00	1,50p	F. filamentoso
7-90	2,00	3,00	0,00	1,50p	F. filamentoso
13-22	10,00	14,67	0,09	1,46p	F. filamentoso
13-27	13,00	19,00	0,03	1,46p	F. filamentoso
25-101	3,00	4,33	0,16	1,44p	F. filamentoso
25-66	3,00	4,33	0,16	1,44p	F. filamentoso
7-60	2,33	3,33	0,08	1,44p	Levedura

5-94	11,33	16,00	0,12	1,41p	F. filamentoso
5-60	30,00	41,67	0,06	1,38p	F. filamentoso
25-72	2,67	3,67	0,08	1,38p	F. filamentoso
16-84	15,00	20,67	0,03	1,37p	F. filamentoso
13-104	14,00	19,00	0,12	1,35p	F. filamentoso
7-36	17,33	23,33	0,01	1,34p	F. filamentoso
7-108	19,33	26,00	0,03	1,34p	F. filamentoso
7-92	3,00	4,00	0,00	1,33p	F. filamentoso
7-98	9,00	12,00	0,00	1,33p	F. filamentoso
16-55	53,00	70,00	0,00	1,32p	F. filamentoso
16-52	40,67	53,67	0,00	1,31p	F. filamentoso
16-80	8,00	3,33	4,33	1,30p	F. filamentoso
13-95	14,67	18,33	0,15	1,29p	F. filamentoso
32-31	17,00	22,00	0,00	1,29p	F. filamentoso
16-23	50,00	64,67	0,01	1,29p	F. filamentoso
1-24	32,00	40,67	0,02	1,27p	F. filamentoso
16-72	10,33	13,00	0,06	1,26p	F. filamentoso
5-76	42,33	53,33	0,02	1,26p	F. filamentoso
16-79	6,67	8,33	0,18	1,25p	F. filamentoso
16-20	16,00	20,00	0,00	1,25p	F. filamentoso
32-52	18,33	22,67	0,06	1,24p	F. filamentoso
1-6	29,33	36,33	0,04	1,23p	F. filamentoso
13-8	6,00	26,33	0,21	1,22p	F. filamentoso
3-38	33,33	40,67	0,03	1,22p	F. filamentoso
13-16	25,00	30,33	0,02	1,21p	F. filamentoso
16-86	11,67	13,67	0,15	1,21p	F. filamentoso
5-110	42,67	51,67	0,02	1,21p	F. filamentoso
3-30	32,00	38,67	0,06	1,20p	F. filamentoso
5-67	44,00	53,00	0,00	1,20p	F. filamentoso
3-37	32,67	39,33	0,02	1,20p	F. filamentoso
32-7	7,00	8,33	0,07	1,19p	F. filamentoso
16-81	23,33	27,67	0,04	1,18p	F. filamentoso
13-3	24,00	28,00	0,00	1,16p	F. filamentoso
32-48	10,00	11,67	0,05	1,16p	F. filamentoso
16-51	46,67	53,67	0,02	1,15p	F. filamentoso
5-59	44,33	51,00	0,02	1,15p	F. filamentoso
32-6	7,00	8,00	0,00	1,14p	F. filamentoso
13-7	24,00	27,33	0,02	1,13p	F. filamentoso
25-16	31,33	34,67	0,12	1,11p	F. filamentoso

7-110	22,33	23,67	0,02	1,05p	F. filamentoso
13-105	17,00	18,00	0,00	1,05p	F. filamentoso
32-89	17,00	18,50	0,50	1,05p	F. filamentoso
32-57	14,33	15,00	0,23	1,05p	F. filamentoso
25-5	22,67	23,00	0,02	1,01p	F. filamentoso
32-46	20,67	21,00	0,02	1,01p	F. filamentoso
Serrapilheira-36	30,00	30,33	0,02	1,01p	F. filamentoso
25-23	30,00	30,33	0,02	1,00p	F. filamentoso

Øc= diâmetro da colônia (mm); Øh= diâmetro do halo (mm); Ie.= índice enzimático. * Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Scott-Knott.