



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE PAPEL

Kássia Gisele Hackbarth Heinz<sup>1</sup>, Alexandra Carballo Dominguez<sup>2</sup>, Patrícia Raquel Silva<sup>3</sup>, Tatiani Karini Rensi Botelho<sup>4</sup> e Lorena Benathar Ballod Tavares<sup>5</sup>

**Resumo:** O aumento da demanda energética tem gerado grande interesse por estudos sobre fontes renováveis, sendo o etanol de segunda geração uma das principais estratégias neste setor. No entanto, um dos gargalos do processo é o elevado custo das enzimas utilizadas na liberação dos açúcares das biomassas lignocelulósicas empregadas na produção do etanol. Portanto, isolar micro-organismos produtores dessas enzimas tem sido tema de diversos trabalhos. O presente estudo teve por objetivo isolar micro-organismos do ambiente de processamento de papel (lodo e resíduo fibroso) e avaliar seu potencial de produção das celulasas e xilanases pelo método semiquantitativo em placa de Petri (Cup Plate). Dentre os 44 isolados, 20 foram de bactérias e 24 corresponderam a fungos, com destaque aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Setenta e um por cento (71%) dos fungos apresentaram atividade para ambas as enzimas, 17% somente para xilanase, 8% para celulase e 4% não apresentou atividade enzimática para as enzimas testadas. Para as bactérias, 50% das colônias apresentaram atividade apenas para xilanase. Estes resultados demonstram que o isolamento de bactérias e fungos a partir de biomassas holocelulósicas pode ser uma técnica adequada para a seleção de linhagens com potencial de uso biotecnológico, com destaque aos fungos filamentosos.

**Palavras-chave:** Fungos. Bactérias. Lodo. Celulasas. Xilanases.

### 1 Introdução

Resíduos do agronegócio de natureza lignocelulósica, tais como bagaço e palha de cana, resíduos de origem agroflorestal, de processamento de papel, entre outros, muitas vezes são considerados como passivo ambiental. No entanto, desempenham posição de destaque como material para obtenção de etanol de segunda geração (HERMANN, 2011). O etanol derivado da biomassa lignocelulósica ou etanol de segunda geração pode contribuir para a redução da dependência mundial pelas fontes de energia fóssil, surgindo como alternativa energética promissora por utilizar fontes renováveis e se apresentando como uma alternativa viável em contextos de iminente crise energética (ALVIRA et al., 2010; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

A composição dos materiais lignocelulósicos depende de suas fontes, mas compreende, sobretudo celulose, hemiceluloses e lignina (CHU et al., 2012). De acordo com Nunes et al. (2013), os resíduos agroindustriais são capazes de complementar o uso da cana-de-açúcar como matéria-prima na produção do etanol de segunda geração, uma vez que apresentam características semelhantes em sua composição. Porém um dos principais gargalos que envolvem a produção do etanol de segunda geração é a quebra da parede celular vegetal nas etapas de pré-tratamento e hidrólise que irão liberar os açúcares necessários à fermentação de forma eficaz e viável (SANTOS et al., 2012), sendo que o elevado custo da enzima utilizada no processo de hidrólise é um dos maiores obstáculos (HO-BAEK, 2012).

<sup>1</sup> E-mail: kassiaghgh@gmail.com

<sup>2</sup> E-mail: alexandra.dz27@gmail.com

<sup>3</sup> E-mail: patricia.silva@embrapa.br

<sup>4</sup> E-mail: tatianibotelho@furb.br

<sup>5</sup> E-mail: lorena@furb.br

Atualmente a tecnologia enzimática tem relevância internacional crescente tanto no ambiente acadêmico como na indústria, motivada pela necessidade do desenvolvimento de processos que gerem produtos de qualidade por tecnologias limpas (DIAS, 2012). No Brasil, os avanços na tecnologia de enzimas são favorecidos pela enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis, que podem ser enzimaticamente transformadas em novos produtos (ZOPPAS; MENEGUZZI; TRAMONTINA, 2013). Diante disso, a busca por micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial (a exemplo das celulases e xilanases) a fim de desenvolver processos eficientes e otimizados tem sido uma das estratégias para a obtenção das enzimas que catalisam a hidrólise do material lignocelulósico (DELABONA, 2011; MARCO, 2012).

Vários micro-organismos, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras são capazes de secretar um complexo de enzimas, como as celulases, que poderão ser empregadas na hidrólise enzimática da celulose (GAUTAM et al., 2012; AKARACHARANYA et al., 2014). Os fungos possuem habilidade para se desenvolverem em qualquer substância orgânica, fazendo uso de substratos variados, como por exemplo, o uso de polissacarídeos, lignina e glicose utilizados como fontes de carbono e importantes fornecedores de energia para sua atividade metabólica (POMPEU, 2010). As enzimas dos fungos causadores de podridão branca são seletivas na degradação de lignina, desestruturando a parede celular vegetal, promovendo a conversão dos polissacarídeos em açúcares de fácil assimilação (AGUIAR; FERRÁZ, 2011). Já a bioconversão de resíduos de celulose é catalisada por enzimas chamadas celulases, sendo cruciais na ciclagem de nutrientes no ambiente (SALAMONI, 2005).

As celulases são um complexo de enzimas formado pelas exoglucanases, endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, quando atuam conjuntamente, apresentam melhor rendimento do que a soma dos rendimentos individuais, efeito conhecido como sinergia, sendo que as regiões cristalinas da celulose são mais resistentes à hidrólise (FLORENCIO, 2011). As celulases estão em terceiro lugar dentre as enzimas mais produzidas no mundo, sendo utilizada na indústria de alimentação (humana e animal) e na indústria de papel (FAHEINA, 2012). Os micro-organismos produtores de

tais enzimas podem ser aeróbios, anaeróbios, mesófilos e termófilos (BORTOLAZZO, 2011). De acordo com Florencio (2011), as espécies de fungos mais estudadas que produzem enzimas do complexo celulásico são *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus niger* e *Humicola insolens*. Celulases e hemicelulases de *Trichoderma* e *Aspergillus* são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado de enzimas no mundo (MARCO, 2012). O gênero *Aspergillus* é um fungo ascomiceto degradador da celulose e lignina, já as espécies do gênero *Trichoderma* produzem grandes quantidades de celulases e outras enzimas hidrolíticas, sendo *Trichoderma reesei* um conhecido produtor de múltiplas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (SCHEUFELE, 2012).

As xilanases são glicosidases que catalisam a hidrólise de ligações endo-1,4- $\beta$ -D-xilosídicas. Seu substrato, a molécula de xilana, devido a sua diversidade, tem a hidrólise também conduzida pelas endo-1,4- $\beta$ -xilanases, necessitando também de auxílio de hemicelulases numa atuação coordenada (HOFFMAN, 2013). As xilanases podem ser produzidas por fungos fitopatogênicos (DUARTE, 2013), sendo a comercialização de xilanases restrita àquelas produzidas por *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. No entanto, isso pode mudar uma vez que vários fungos foram recentemente descritos como produtores de xilanase (CORRAL; VILLASEÑOR-ORTEGA, 2006).

O isolamento e as técnicas de *screening* de micro-organismos produtores de celulases são de extrema importância para atender a demanda por novas enzimas e ao aumento de suas aplicações biotecnológicas. Este é um passo importante para selecionar espécies desejadas de um extenso banco de espécies, e pode ser realizado em placas contendo meios específicos (KASANA et al., 2008; FLORENCIO, 2011).

Diante do exposto o presente trabalho teve por objetivo isolar micro-organismos (bactérias e fungos) do resíduo de processamento de papel e avaliar seu potencial de produção das enzimas celulase e xilanase pelo método semiquantitativo com placas de Petri (*Cup Plate*).

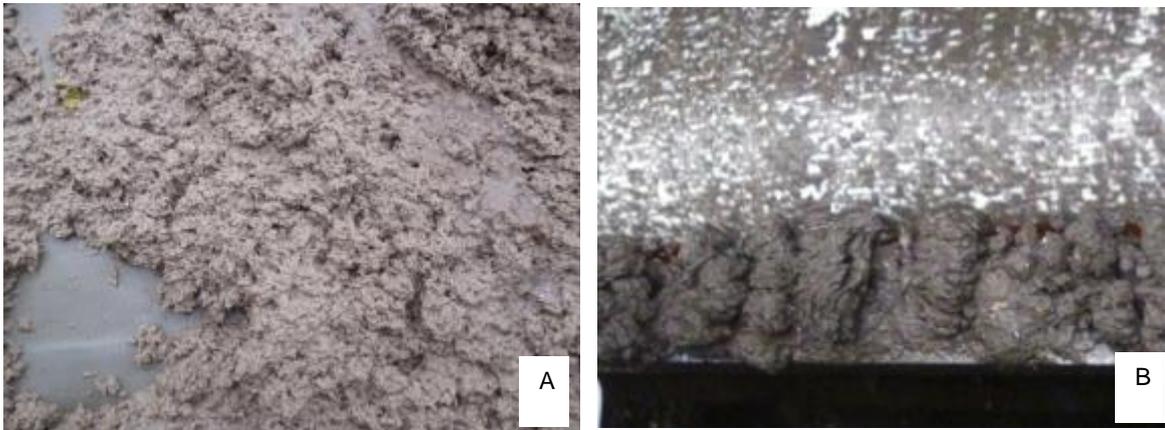
## 2 Material e métodos

**Coleta das amostras** - Os resíduos utilizados como substrato para o isolamento

foram coletados em uma empresa produtora de papéis reciclados, localizada no estado de Santa Catarina. Foram coletadas amostras de resíduo fibroso (Figura 1A) e lodo (Figura 1B). O resíduo fibroso encontra-se no início do processo de tratamento na empresa. Este retorna ao processo produtivo por conter fibras de celulose, porém tal processo não é considerado eficiente pela empresa. Já o lodo é coletado ao final do processo de tratamento, já prensado para remoção de parte da água. Este é utilizado como adubo

para plantio de eucalipto e o excedente é disposto em aterro da própria empresa. Tais amostras foram selecionadas por conterem celulose em sua composição e de tal modo serem potenciais substratos para o desenvolvimento de fungos produtores de celulases. Vale ressaltar que ambos os resíduos encontravam-se ao ar livre no momento da coleta e, desta forma, podem ter sido isolados micro-organismos do ambiente de deposição e não unicamente dos resíduos.

Figura 1 - A -Resíduo fibroso coletado na empresa, B - Lodo coletado na empresa



Fonte: Autoras (2014)

**Isolamento de micro-organismos e manutenção das colônias** – Primeiramente realizou-se o isolamento dos micro-organismos, quando os dois tipos de resíduos foram diluídos em solução salina e plaqueados em placas previamente preparadas contendo Agar específico. Para os fungos utilizou-se Ágar Sabouraud com adição de antibiótico (cloranfenicol) e Ágar Batata Dextrose (BDA), ambos acidificados para pH 5,5. Estas placas foram incubadas em estufa BOD a 25°C e a 45°C, durante 5 dias. Já para o isolamento de bactérias utilizou-se Ágar Nutriente (AN) e Ágar Plate Count (PCA), com pH 7,0 e incubados em estufa a 37°C e 45°C, durante 2 dias. Após o período de incubação realizou-se a contagem das colônias dos fungos e das bactérias (obtida através da média de colônias observadas nos meios de cultivo de cada um). Em seguida foram feitos sucessivos repiques das colônias macroscopicamente distintas até a obtenção de colônias puras. Estas foram mantidas em ágar PCA inclinado (bactérias) e Ágar BDA inclinado (fungos) e sob refrigeração a 8°C.

**Caracterização de colônias** - Para as bactérias procedeu-se a coloração de GRAM, e para os fungos micro cultivo em

lâmina e coloração com lactofenol azul de algodão seguido de observação em microscópio óptico.

**Análise semiquantitativa de produção de enzimas** – Para a produção do inoculo (formação da matriz secundária), os fungos isolados foram cultivados em placas de Petri com meio BDA por sete dias em estufa BOD na mesma temperatura do isolamento, no escuro. Para a produção do inoculo das bactérias isoladas utilizou-se o Ágar PCA e as placas foram incubadas por dois dias, mantendo a mesma temperatura utilizada no isolamento.

A atividade celulolítica foi realizada por meio de teste modificado de Ruijsenaars e Hartsmans (2001) e Nogueira e Cavalcanti (1996) utilizando nesse caso o meio Ágar Socrean composto de  $\text{NaNO}_3$  (3 g  $\text{L}^{-1}$ );  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 g  $\text{L}^{-1}$ );  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g  $\text{L}^{-1}$ );  $\text{KCl}$  (0,5 g  $\text{L}^{-1}$ );  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g  $\text{L}^{-1}$ ); Ágar (30 g  $\text{L}^{-1}$ ), adicionado de carboximetilcelulose (CMC) e avicel (7 g  $\text{L}^{-1}$  cada) como fontes de carbono.

Cada placa foi inoculada com um disco de micélio de cada fungo isolado de 7 mm na parte central, realizado em triplicata e incubada em estufa a  $25 \pm 1$  °C durante 5 dias e quatro pontos de repique de células

bacterianas/placa, com auxílio de alça de inoculação e incubadas em estufa a 35°C/2 dias. Após o período de crescimento foram adicionados 10 mL de solução de vermelho congo 0,2 % (m/v). Depois de 20 minutos de reação, a solução foi retirada e as placas lavadas com 3 mL de solução NaCl 0,1 M. A produção das celulasas foi verificada pelo aparecimento de uma zona clara de hidrólise (halo de reação) indicando a degradação da celulose.

A atividade xilanólítica foi realizada em placas contendo ágar BDA (fungos) e Agar PCA (bactérias) com a adição de 4% de xilana no meio. A inoculação e a incubação ocorreram da mesma forma que descrito anteriormente para a atividade celulolítica. Após o período de crescimento foi feita a revelação da zona de degradação da xilana com vapor de iodo produzido por 15 g de cristal de iodo distribuído em uma placa de Petri. A base da placa contendo a colônia desenvolvida foi colocada sobre a placa com cristal de iodo por 15 minutos para contato com o vapor produzido em temperatura ambiente, procedimento baseado em Tavares et al. (1998). A reação positiva foi verificada pelo aparecimento de um halo amarelo opaco em volta da colônia (POINTING, 1999).

Para ambas as enzimas foi realizado o cálculo do Índice Enzimático ( $I_e$ ), que se deu conforme a equação 1, onde  $\varnothing h$  refere-se a medida em mm do halo de reação e  $\varnothing c$  a medida do diâmetro da colônia.

$$I_e = \frac{\varnothing h}{\varnothing c} \quad (1)$$

### 3 Resultados e discussão

A contagem de micro-organismos mesófilos (25 – 37°C) provenientes do isolamento foi maior para as bactérias com  $7,6 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  no resíduo fibroso e  $3,1 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  no lodo. Para os fungos a contagem foi de  $2,3 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  para o resíduo fibroso e  $2,0 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  para o lodo. Já em temperatura termofílica (45°C), foram observadas  $1,6 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  para o lodo e  $2,0 \times 10^3$  UFC  $g^{-1}$  para o resíduo fibroso, sendo todos fungos filamentosos. Nenhuma bactéria foi isolada nesta temperatura.

A partir da incubação foram isolados 24 fungos, dentre eles 4 leveduras e 20 fungos filamentosos (16 mesófilos e 4 termófilos) e 20 colônias de bactérias (Tabela 1). Pode-se observar que a diversidade de colônias foi maior para o

resíduo fibroso representando 50% das colônias fúngicas isoladas e 45% das colônias bacterianas, sendo que para ambos os casos observou-se colônias iguais para os dois resíduos (Figura 2).

Sugere-se que a composição dos resíduos pode ter propiciado o desenvolvimento de maior diversidade de micro-organismos no resíduo fibroso, sendo este caracterizado por possuir um teor de carboidratos de 49,1% e um elevado teor de umidade (91,8%). Já o lodo possui 28,2% de carboidratos e 82% de umidade (HEINZ, 2015). Associado a este fato, pode-se sugerir também que o lodo por possuir um teor maior de cinzas (elementos inorgânicos) pode ter restringido o desenvolvimento de determinados micro-organismos. A disponibilidade de água também foi destacada por Park (1968), que comenta que muitas espécies de fungos desenvolvem-se em soluções de elevada pressão osmótica, por isso podem ser encontrados em substratos como couros e papel onde há água livre. Os resultados demonstram que a utilização destes resíduos, em alguns casos já empregados em outras atividades (adubo no solo, cimento, produção de telhas) pode ser promissora tanto na busca de linhagens com uso biotecnológico quanto na destinação secundária dos resíduos de processamento de papel, que por vezes são lançados em aterros das indústrias.

Tais resultados encontram-se superiores aos encontrados por Aburjaillet al. (2011), que isolaram micro-organismos em solo do cerrado e com plantio de eucalipto, encontrando um máximo de  $1,3 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$ , isolando 14 morfotipos de bactérias e 3 de fungos para o solo de cerrado e  $2,75 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  para área com plantio de eucalipto, sendo 5 morfotipos de bactérias e 2 de fungos.

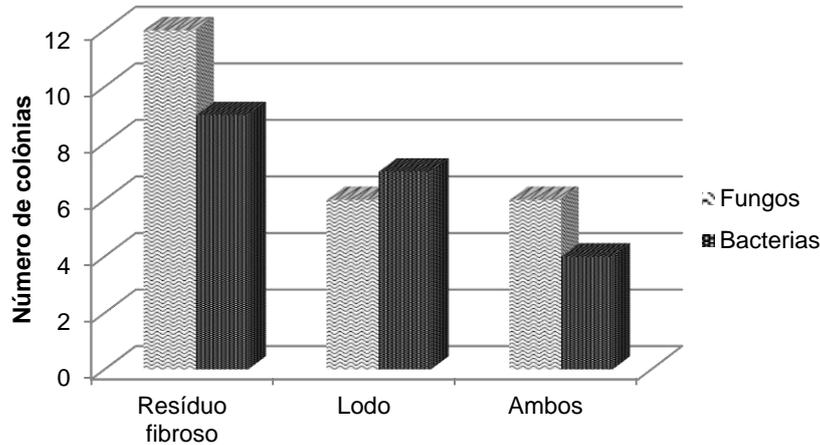
Mesmo com os diversos micro-organismos encontrados não se pode afirmar que foram isolados em sua totalidade, pois o cultivo em placa muitas vezes não permite seu desenvolvimento por não conter todos os nutrientes necessários. Conforme Dias (2012), as condições de cultivo podem não conseguir reproduzir os nichos ecológicos e relações simbióticas encontradas no meio natural assim como as interações.

Dos resultados obtidos pela coloração de GRAM (Figura 3) observou-se um predomínio de bactérias gram positivas, com 19 colônias, sendo apenas uma colônia classificada como cocos gram negativo. As gram positivas foram representadas

principalmente por cocos, 45% (9 micro-organismos), e as demais colônias foram classificadas como estreptococos (3 micro-

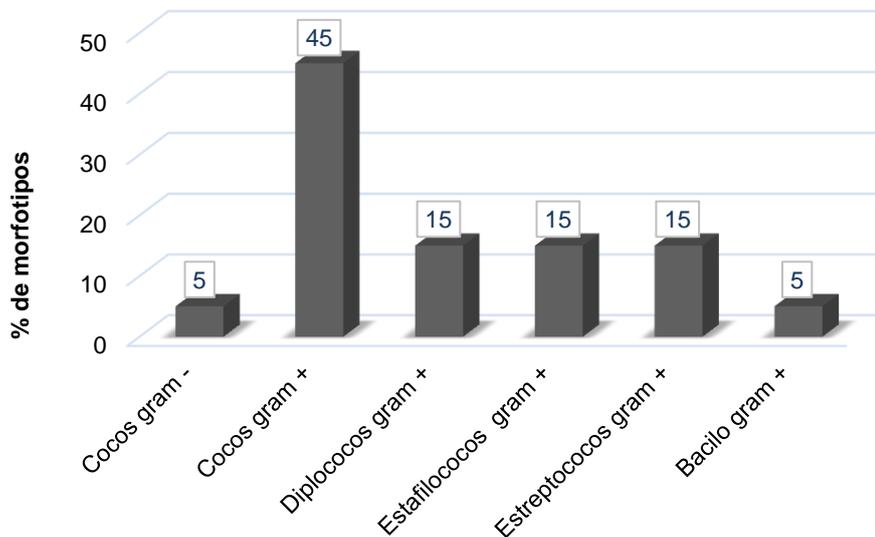
organismos), diplococos (3 micro-organismos) e estafilococos (3 micro-organismos).

Figura 2 - Número de morfotipos isolados para cada resíduo analisado



Fonte: Autoras (2014)

Figura 3 - Classificação dos isolados bacterianos pela coloração de GRAM.



Fonte: Autoras (2014)

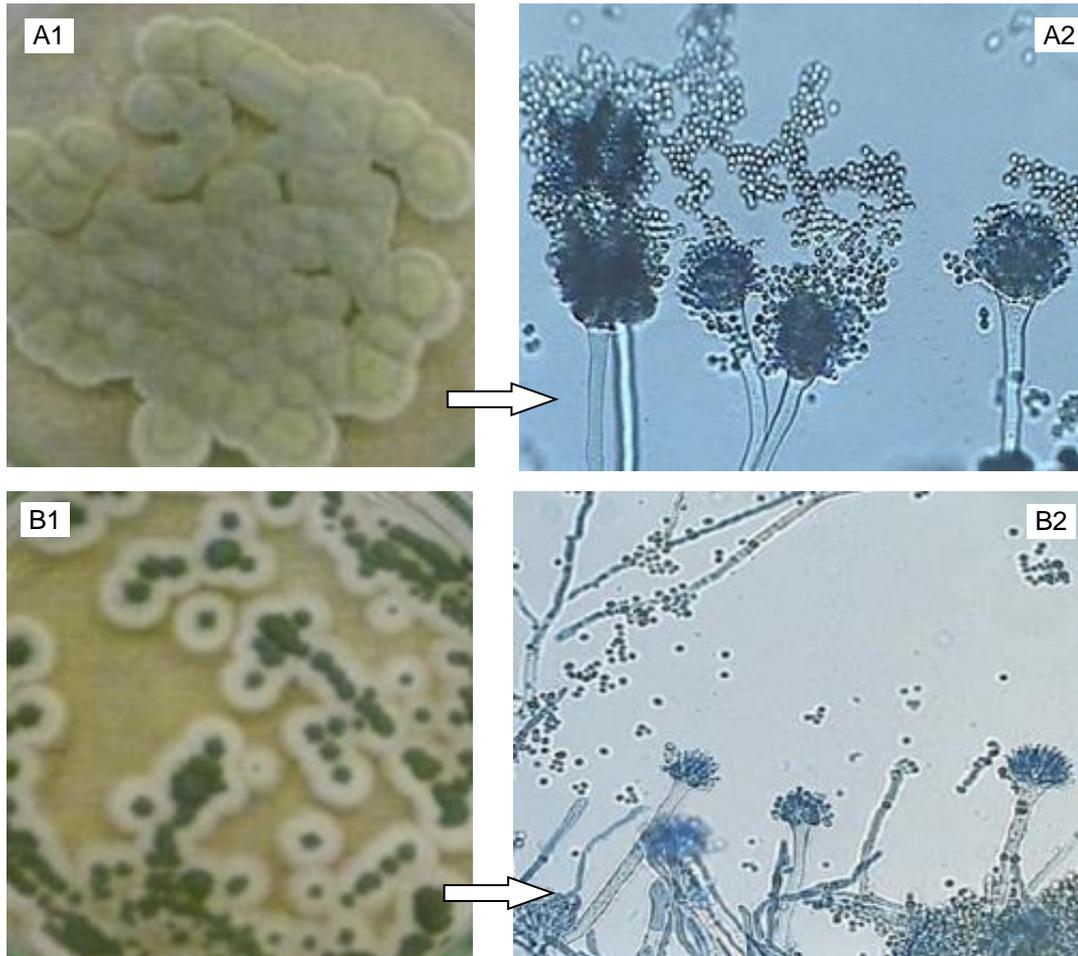
Na figura 4 podem-se observar dois dos morfotipos fúngicos analisados, dos quais grande parte pertence aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabela 1). Estes gêneros também foram encontrados por Delabona (2011) no bioma amazônico, além de outros gêneros como *Fusarium*, *Trichoderma*, e *Mucor*. Egea (2010) isolou 75 linhagens fúngicas provenientes de solo de plantação de cana de açúcar, pertencendo a 10 gêneros diferentes, sendo a maioria referente ao gênero *Trichoderma* (40%),

seguido de *Fusarium* (15%), *Cunninghamella* (13%) e *Aspergillus* (12%). Sridevi e Charya (2011) utilizaram diversos substratos lignocelulósicos para isolamento, dos quais um total de 30 diferentes cepas fúngicas foram isoladas em meio BDA e destas, aproximadamente 50% pertencem a espécies de *Aspergillus*, que formaram um grupo dominante, seguido por espécies *Penicillium* e espécies de *Trichoderma*. A dominância destes gêneros também foi detectada por Gaddeyya et al. (2012), ao

analisar solos agrícolas, que atribuíram a este fato a facilidade de esporulação de espécies do gênero *Penicillium* e a produção de toxinas de *Aspergillus*, o que pode impedir o desenvolvimento de outras culturas.

Além da produção enzimática os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido alvo de diversos estudos devido ao seu potencial biotecnológico, dentre eles destacam-se produção de pigmentos que possuam atividade antimicrobiana e tóxica (TEIXEIRA et al., 2012).

Figura 4 - Isolados fúngicos sem ágar BDA (A1 e B1) e submetidos à microscopia com aumento de 400x ; *Aspergillus* sp.(A2); *Penicillium* sp.(B2)



Fonte: Autoras (2014)

Em relação aos resultados de atividade enzimática (Tabela 1), os fungos filamentosos destacaram-se principalmente para as celulases, em número de colônias positivas para o teste assim como maiores índices enzimáticos quando comparados às leveduras e bactérias.

Pode-se notar que as colônias com maior índice enzimático não foram as mesmas que apresentaram maior diâmetro de colônia, tal resultado também foi constatado por Bortolazzo (2011). A autora comenta que ao se avaliar as cepas para selecionar uma como boa produtora de enzima celulolítica, não se deve ter como

referência somente os dados sobre o índice enzimático, mas também se deve levar em consideração o crescimento do micro-organismo no meio de cultura.

Dos 24 fungos isolados, 71% apresentou atividade para ambas as enzimas analisadas, 17% apenas para xilanase, estes representados pelas 4 leveduras, 8% somente para celulase e 4% não apresentou atividade para nenhuma enzima.

Charest, Antoun e Beauchamp (2004) isolaram micro-organismos do resíduo de tinturaria de papel e assim como no presente estudo, nenhuma bactéria termofílica foi observada e dos fungos

REA – Revista de *estudos ambientais* (Online)  
v.16, n. 2, p.37-47, jul./dez. 2014

isolados, 11 termófilos e 23 mesófilos, grande parte apresentou perfil enzimático positivo para degradação de xilana e celulose. Dentre as bactérias mesofílicas (18 isolados) a maioria apresentou capacidade

de degradação de xilana e pouca celulose. Contrariamente ao presente trabalho onde nenhuma das bactérias apresentou degradação de celulose.

**Tabela 1 – Índice Enzimático (Ie) para celulasas e xilanas dos micro-organismos isolados do resíduo de processamento de papel reciclado. Os isolados com a letra “F” referem-se aos fungos e com a letra “B” a bactérias. A letra t refere-se aos micro-organismos isolados em condições termófilas (45°C)**

Isolados	Classificação microscópica	Ø colônia (mm) - celulase	Ie Celulase	Ø colônia (mm) - xilase	Ie Xilase
LEB 45 Ft	<i>Aspergillus</i> sp.	26,3	1,23	21,4	1,26
LEB 46 F	Levedura	9,0	Ausente	12,0	1,65
LEB 47 F	<i>Aspergillus</i> sp.	15,3	1,72	14,3	1,96
LEB 48 F	<i>Penicillium</i> sp.	15,4	2,29	18,3	1,26
LEB 49 F	Levedura	8,0	Ausente	12,3	1,07
LEB 50 F	<i>Penicillium</i> sp.	27,7	1,05	19,6	1,71
LEB 51 F	<i>Penicillium</i> sp.	19,0	1,68	20,3	Ausente
LEB 52 F	<i>Aspergillus</i> sp.	18,3	0,98	18,7	Ausente
LEB 53 F	N.I. <sup>1</sup>	27,3	1,06	56,4	1,05
LEB 54 F	<i>Rhizopus</i> sp.	40,0	1,03	40,3	1,07
LEB 55 F	Levedura	30,2	Ausente	16,8	1,19
LEB 56 F t	<i>Aspergillus</i> sp.	40,6	1,16	46,0	1,09
LEB 57 F t	<i>Aspergillus</i> sp.	37,3	1,21	19,4	1,19
LEB 58 F t	<i>Aspergillus</i> sp.	29,0	1,10	27,7	1,55
LEB 59 F	N.I. <sup>1</sup>	14,8	1,76	17,8	1,29
LEB 60 F	<i>Aspergillus</i> sp.	21,3	1,27	23,7	1,48
LEB 61 F	<i>Aspergillus</i> sp.	47,3	1,01	50,3	1,07
LEB 62 F	<i>Penicillium</i> sp.	14,0	1,64	11,9	1,25
LEB 63 F	Levedura	9,6	Ausente	15,2	Ausente
LEB 64 F	<i>Penicillium</i> sp.	15,6	1,22	19,4	1,19
LEB 65 F	<i>Penicillium</i> sp.	19,1	1,31	14,1	1,49
LEB 66 F	<i>Aspergillus</i> sp.	27,7	1,26	34,4	1,16
LEB 67 F	Levedura	16,3	Ausente	14,7	1,29
LEB 68 F	<i>Aspergillus niger</i>	37,4	1,06	40,2	1,19
LEB 69 B	Estreptococos gram +	31,00	Ausente	26,30	Ausente
LEB 70 B	Cocos gram +	11,00	Ausente	13,00	2,23
LEB 71 B	Estafilococos gram +	8,80	Ausente	10,00	Ausente
LEB 72 B	Cocos gram +	8,50	Ausente	9,60	Ausente
LEB 73 B	Cocos gram +	7,50	Ausente	8,30	Ausente
LEB 74 B	Cocos gram +	6,70	Ausente	7,50	Ausente
LEB 75 B	Diplococos gram +	14,30	Ausente	12,00	Ausente
LEB 76 B	Estafilococos gram +	8,20	Ausente	10,50	Ausente
LEB 77 B	Diplococos gram +	17,10	Ausente	18,90	Ausente
LEB 78 B	Cocos gram +	19,70	Ausente	17,60	2,08
LEB 79 B	Cocos gram +	31,00	Ausente	13,50	2,89
LEB 80 B	Cocos gram +	16,30	Ausente	17,00	2,03
LEB 81 B	Cocos gram +	16,60	Ausente	18,40	1,80
LEB 82 B	Cocos gram +	16,30	Ausente	19,30	1,76
LEB 83 B	Bacilos gram +	10,00	Ausente	9,80	Ausente
LEB 84 B	Cocos gram -	15,20	Ausente	17,30	1,33
LEB 85 B	Estreptococos gram +	12,00	Ausente	13,40	1,31
LEB 86 B	Estafilococos gram +	6,00	Ausente	6,00	1,62
LEB 87 B	Diplococos gram +	8,90	Ausente	10,20	Ausente
LEB 88 B	Estreptococos gram +	26,70	Ausente	20,70	1,81
<i>Trichoderma reesei</i>	Controle	33,8	1,31	26,0	1,4
RUT 30					

<sup>1</sup> Não identificado pelo método de microscopia utilizado  
Fonte: Autoras (2014)

Gautamet al. (2012) utilizaram como substrato de isolamento resíduos sólidos

urbanos conseguindo um total de 250 isolados e destes, 165 isolados de 37

espécies de fungos e 85 isolados pertencentes a 21 espécies bacterianas. Pelo *screening* realizado, detectou-se atividade celulolítica em 49 diferentes isolados após 4 dias de incubação. Melo (2014) isolou 720 leveduras em material de descarte de ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*, compreendendo 52 espécies distribuídas em 20 gêneros. Destas 711 estirpes foram testadas quanto à capacidade de produção de enzimas, sendo que para a xilanase 64,4% do total de estirpes apresentou atividade, enquanto a celulase foi produzida por 52% dos isolados.

Os resultados do presente estudo estão próximos dos encontrados por Fernandes (2009), no que diz respeito a alguns dos fungos testados, *Penicillium solitum* (0062A), *Penicillium sp.* (0064A), e *P. solitum* (0063M), que apresentaram um potencial enzimático correspondendo a 1,93, 1,82 e 1,64 respectivamente, e inferiores aos demais fungos isolados pela autora, caso do *P. crustosum* (0056A) IE = 5,83; *P. expansum* (0057M) IE = 3,67; *P. solitum* (0061M) IE = 2,67; *P. roqueforti* (0060M) IE = 2,41; *A. clavatus* (0005M) IE = 2,19 e *P. commune* (0052M) IE = 2,13.

Dos 10 isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus*, todos apresentaram atividade para celulase e apenas um não apresentou atividade para xilanase, e dos 6 isolados de *Penicillium* houve o mesmo comportamento. Khokharet al. (2012), isolaram 17 morfotipos fúngicos de substratos celulósicos como madeira, vegetais, efluentes industriais e dentre esses 8 isolados de fungos foram identificados como produtor de celulase. A maior parte pertencia ao gênero *Trichoderma* (3) e *Penicillium* (3) seguido por *Aspergillus* (2). No entanto, alguns isolados de *Aspergillus* (7) e *Penicillium* (2) não mostraram qualquer atividade celulolítica, sendo que para os positivos o índice enzimático variou de 0,99 a 1,01, menores do que o observado no presente estudo. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também se destacaram no isolamento realizado por Tavares et al. (2012), que isolaram e identificaram 23 fungos da estrutura foliar de *Morinda citrifolia*, dos quais *Aspergillus* N34 e *Aspergillus* N42 foram os que apresentaram os maiores halos celulolíticos assim como no estudo de Naveenkumar e Tippeswamy (2013), em que dos 28 isolados, 24 foram capazes de sintetizar celulase sendo a maior atividade celulolítica detectada em espécies

de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* *Penicillium*.

No presente estudo as bactérias apresentaram atividade apenas para xilanase (50%) e destas 60% correspondem a cocos gram positivo, 20% a estreptococos gram positivo, 10% a cocos gram negativo e 10% a estafilococos gram positivo. Nenhum dos isolados bacterianos apresentou reação positiva para celulase.

Resultado semelhante foi encontrado por Sacco (2013) que não observou produção de celulase em nenhuma das bactérias isoladas através da mesma metodologia aplicada. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que micro-organismos em cultura pura regularmente demonstram atividades lignocelulolíticas insatisfatórias (KIM et al., 2006 *apud* SACCO, 2013). Reginato (2008), ao isolar bactérias em água de cisternas e das folhas de bromélia, detectou 76 bactérias endofíticas da bromélia e 124 bactérias provenientes da água das cisternas. Dos gêneros identificados houve predominância de *Bacillus*, *Burkholderia*, *Staphylococcus* e *Streptomyces*. Ainda neste estudo, as bactérias Gram positivas apresentaram um maior número de cepas produtoras de enzimas extracelulares comparadas às Gram negativas. Dias (2012) ao isolar bactérias de frutos nativos do Cerrado, obteve no total 1560 isolados, agrupados em 717 morfotipos diferentes, dos quais assim como no presente estudo, a maioria pertence ao grupo de bactérias Gram positivas. Em contrapartida a autora também realizou análise qualitativa de produção enzimática de celulases em 600 dos isolados e destes 178 cepas (30%) foram capazes de formar o halo de degradação da celulose ao redor das colônias.

#### 4 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o isolamento de bactérias e fungos a partir de biomassa holocelulósica pode ser uma técnica adequada para a seleção de linhagens com potencial de uso biotecnológico. Pode-se concluir também que a composição do resíduo fibroso proporciona o desenvolvimento de maior diversidade de micro-organismos, supondo-se que a maior quantidade de celulose e também maior quantidade de água livre podem propiciar maior diversidade, apesar da quantidade de

unidades formadoras de colônia ter sido similar entre os resíduos. Nos resultados de atividade enzimática, os fungos filamentosos destacaram-se em número de colônias positivas para o teste de celulase assim como maiores índices enzimáticos quando

comparados às leveduras e bactérias, corroborando com o que tem sido apresentado na literatura que destaca os fungos filamentosos como agentes degradadores na natureza.

### 5 Cup plate evaluation of the hydrolytic activity of microorganisms isolated from paper processing waste

**Abstract:** *Increasing energy demand has generated great interest in studies with renewable sources, including the production of second-generation ethanol. However, one of the bottlenecks of the process is the high cost of the enzymes used for releasing sugars from lignocellulosic biomass in the production of ethanol. Thus, isolation, screening and identification of microorganisms capable of producing these enzymes have been the subject of several studies. This study aimed to isolate microorganisms from paper processing wastes and evaluate its potential for production of cellulases and xylanases through the semiquantitative method in Petri dishes (CupPlate). Among the 44 isolates, 20 were bacteria and 24 corresponded to fungi, especially *Aspergillus* and *Penicillium*. Seventy-one percent (71%) of fungi showed activity for both enzymes, 17% only for xylanase, 8% for cellulase and 4% showed no activity. For bacteria, 50% of the colonies showed activity only for xylanase. These results demonstrate that the isolation of bacteria and fungi from cellulosic biomass can be a suitable technique for the selection of strains with potential for biotechnological use, especially filamentous fungi.*

**Keywords:** Fungi. Bacteria. Sludge. Cellulase. Xylanase.

### 6 Referências

ABURJAILE, S. B.; SILVA, M. P.; BATISTA, E. A. F. S.; BARBOSA, L. P. J. L.; BARBOSA, F. H. F. Pesquisa e caracterização da diversidade microbológica do solo, na região de São José do Buriti – MG, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa (cerrado) por plantações de eucalipto. *Ciência Equatorial*, v. 1, n.2, p.69-81, 2011.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Química Nova*. v. 34, n.10, p. 1729-1738, 2011.

AKARACHARANYA, A.; TAPRIG, T.; SITDHIPOL, J.; TANASUPAWAT, S. Characterization of cellulase producing *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from Thai oils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v.4, n.5, p. 006-011, 2014.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v.101, p.4851–4861, 2010.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências) -

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo. Piracicaba - SP, 2011.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, v.101, p.4754-4766, 2010.

CHAREST, M. H.; ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J. Dynamics of water-soluble carbon substances and microbial populations during the composting of de-inking paper sludge. *Bioresource Technology*, v.91, p.53-67, 2004.

CHU, F.J.; LIN, C. W.; I, Y. P.; WUB, C. H.; CHEN, D. H. Hydrolysis of bamboo cellulose and cellulose characteristics by *Streptomyces Griseo Aurantiacus* ZQBC691. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 43, p. 220–225, 2012.

CORRAL, O. L.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F. Xylanases. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; TORRES-PACHECO, I. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. p.305-322, 2006.

DELABONA, P. S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos - SP, 2011.

REA – Revista de *estudos ambientais* (Online)  
v.16, n. 2, p.37-47, jul./dez. 2014

- DIAS, M. **Diversidade e produção de celulases por bactérias epifíticas de frutos típicos do Cerrado mineiro.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2012.
- DUARTE, G. C. **Holocelulases produzidas por *Aspergillusoryzae*: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2013.
- EGEA, T. C. **Avaliação do perfil de produção de enzimas e potencial de degradação do herbicida diuron pelos fungos isolados de solo de plantação de cana-de-açúcar.** Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto – SP, 2010.
- FAHEINA, G. S. **Produção de celulases por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, 2012.
- FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2009.
- FLORENCIO, C. **Micro-organismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade de São Carlos. São Carlos - SP, 2011.
- GADDEYYA, G.; NIHARIKA, P. S.; BHARATHI, P.; KUMAR, P. K. R. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. **Advances in Applied Science Research**, v.3, n.4, p.2020-2026, 2012.
- GAUTAM, S. P.; BUNDELA, P. S.; PANDEY, A. K.; JAMALUDDIN; AWASTHI, M. K.; SARSAIYA, S. Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain. **International Journal of Microbiology**, v.2012, p.1-12, 2012.
- HEINZ, K. **Produção de enzimas celulolíticas por fungo isolado de resíduo da reciclagem de papel e hidrólise de biomassa celulósicas.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Regional de Blumenau – FURB. Blumenau – SC, 2015.
- HERMANN, K. L. **Produção de manganês peroxidase por *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana* cultivados em biomassa lignocelulósica.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Regional de Blumenau – FURB. Blumenau – SC, 2011.
- HO-BAEKA, S.; KIMA, S.; LEEA, K.; LEEB, J. K.; HAHN, J. S. Cellulosic ethanol production by combination of cellulase-displaying yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.51, p. 366–372, 2012.
- HOFFMAN, Z. B. **Estudos funcionais e estruturais de hemiceluloses para potencial aplicação biotecnológica.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2013.
- KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A.A. Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.
- KHOKHAR, I.; HAIDER, M. S.; MUSHTAQ, S.; MUKHTAR, I. Isolation and Screening of Highly Cellulolytic Filamentous Fungi. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v.16, n. 3, p.223 - 226, 2012.
- MARCO, E. G. **Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus sp.*** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2012.
- MELO, W. G. P. **Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (hymenoptera: Formicidae) de áreas de cerrado do estado do Tocantins.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP, 2014.
- NAVEENKUMAR, K. J.; THIPPESWAMY, B. Isolation and screening of potential cellulolytic fungi from Areca nut husk waste. **Current Science Journal**, v.8, p. 125-132, 2013.
- NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.
- NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, A. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- PARK, D. The ecology of the terrestrial fungi. In: AINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S. (Org.). **The Fungal Population: An Advanced Treatise**, v.3. London – New York, 1968, cap. 1.
- POINTING, S.B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme

REA – Revista de *estudos ambientais* (Online)  
v.16, n. 2, p.37-47, jul./dez. 2014

production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v.2, p. 17-33, 1999.

POMPEU, G. B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências) - Universidade de São Paulo. Piracicaba - SP, 2010.

REGINATO, T. S. C. **Diversidade de bactérias associadas a bromélias do Parque Estadual Itapuã/RS.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2008.

RUIJSSENAARS, J.; HARTSMANS, S. Plate screening methods for the detection of polysaccharase producing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p.143–149, 2001.

SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal – SP, 2013.

SALAMONI, S. P. **Produção e caracterização de celulases secretadas por *Streptomyces* sp. isolado de processo de compostagem.** Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS, 2005.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v.35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHEUFELE, F. B. **Bioconversão de resíduos agroindustriais por micro-organismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo – PR, 2012.

SRIDEVI, B.; CHARYA, M. A. Isolation, identification and screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 22, p. 4624-4630, 2011.

TAVARES, L.B.B. **Fermentação alcoólica de material amiláceo por levedura amilolítica recombinante em reator com células imobilizadas.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica) - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP, 1998.

TAVARES, A. C. D.; FONSECA, J. S.; FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F.; SOUZA, R. A. T.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, F. S. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n. 2, p. 1-6, 2012.

TEIXEIRA, M. F. S.; MARTINS, M. S.; SILVA, J. C. S.; KIRSCH, L. S.; FERNANDES, O. C. C.; CARNEIRO, A. L. B.; CONTI, R.; DURÁN, N. Amazonian Biodiversity: Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-Characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.6, n. 3, p. 300-311, 2012.

ZOPPAS, F. M.; MENEGUZZI, A.; TRAMONTINA, F. Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes. **International Journal of Modern Engineering Research – IJMER**, v.3, n.4, p. 2374 – 2381, 2013.

## 7 Agradecimentos

A FAPESC/CAPES/CNPq pelas bolsas, ao programa de pós-graduação em engenharia ambiental e departamento de engenharia química da FURB, Fundação Universidade Regional de Blumenau e a Embrapa Florestas pelos materiais e suporte cedidos.