

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE ISOLADOS DE ACTINOMICETOS
ORIUNDOS DE PROCESSO DE COMPOSTAGEM FRENTE A
DIFERENTES TEMPERATURAS**

Thais Esther Teixeira Nunes

Porto Alegre, dezembro de 2010.

ARTIGO CIÊNTIFICO:

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Biociências.

ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE ISOLADOS DE ACTINOMICETOS ORIUNDOS DE PROCESSO DE COMPOSTAGEM FRENTE A DIFERENTES TEMPERATURAS

Thais Esther Teixeira Nunes ¹, Sueli Teresinha Van Der Sand ²

¹ Acadêmica do curso de graduação em Ciências Biológicas, UFRGS.

² Professora do Departamento de Microbiologia e membro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Endereço para correspondência: Sarmento Leite, 500.

Porto Alegre, RS, Brasil

CEP: 90050-170

Contato: esthais@yahoo.com.br; svands@ufrgs.br

BANCA EXAMINADORA:

Professora Dra. Fátima Menezes Bento

Professora do Departamento de Microbiologia e membro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Dra. Sabrina Pinto Salamoni

Bolsista de pós-doutorado (CNPq) vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Porto Alegre, dezembro de 2010.

RESUMO

A atividade celulolítica de 48 isolados de actinomicetos oriundos de processo de compostagem foi avaliada em placas com CMC (carboximetilcelulose) baseando-se no diâmetro do halo de hidrólise (mm) e do índice de atividade enzimática. Todos isolados apresentaram atividade a 40°C e 27 isolados foram selecionados para avaliação do perfil enzimático em diferentes temperaturas e para a identificação do gênero. A análise do microcultivo evidenciou o predomínio de *Streptomyces* e *Nocardia*. Nas temperaturas de 30 e 40°C todos isolados apresentaram atividade, mas a 50 e 60°C cerca de 85% e 59% apresentaram atividade respectivamente. Uma tendência de diminuição da atividade da CMCase com a elevação da temperatura foi encontrada para a maioria dos isolados. Porém 5 isolados de *Streptomyces* tiveram melhor atividade a 50°C; 3 deles com IE superior na temperatura de 60°C. Isto pode indicar que a celulase destes isolados são mais ativas a 60°C, ou que a produzem mais nesta temperatura. Portanto, estes 3 isolados apresentam maior potencial de produção de celulases ativas e estáveis em temperaturas elevadas.

Palavras-chave: celulase, temperatura, isolados de actinomicetos, processo de compostagem

ABSTRACT

The cellulolytic activity of 48 actinomycetes strains from a composting process was evaluated on plates with CMC through the size of (mm) hydrolysis zone and the rate of enzyme activity. All isolates showed activity at 40°C and 27 isolates were selected for evaluation of enzyme profiles at different temperatures and for genus identification. The microculture analysis showed the predominance isolates from *Streptomyces* and *Nocardia* genera. At temperatures of 30 and 40°C all isolates showed activity, however at 50 and 60°C about 85% and 59% were active respectively. A trend of decreased activity of CMCase with increasing temperature was found for most of the isolates. But, 5 *Streptomyces* isolates had the highest activity at 50°C, 3 of them with IE superior at temperature of 60°C. This may indicate that the cellulase of these isolates are more active at 60°C or produce better at this temperature. Therefore, these 3 isolates had the greatest potential of production of active and stable cellulase at high temperatures.

Key-words: cellulase, temperature, actinomycetes strains, composting process

INTRODUÇÃO

A celulose é o biopolímero mais abundante do mundo (Bayer & Lamed, 1992), sendo o maior componente da parede celular em vegetais superiores, constituindo cerca de 30 a 50% do peso total da planta (Lu *et al.*, 2008). Também está presente em grande quantidade nos resíduos agroindustriais e urbanos. Somente em 2007 foi gerado 606 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos no Brasil, dos quais cerca de 105 milhões de toneladas correspondem a fração celulósica (Castro & Pereira, 2010). Grande parte do potencial destes resíduos não é explorada, e seu tratamento inadequado gera graves problemas ambientais. Entretanto, um dos problemas na utilização da celulose é a sua estrutura altamente estável, necessitando de um complexo de degradação antes de serem utilizadas por microrganismos, plantas ou humanos (Nurkanto, 2009).

A decomposição da celulose requer um complexo enzimático chamado celulase, que é classificada baseada no modo catalítico e nas propriedades estruturais. São três os grandes grupos: as endoglucanases que clivam randomicamente os sítios internos amorfos da cadeia polissacarídica da celulose, originado oligossacarídeos de vários comprimentos; as exoglucanases - que atuam nos terminais redutores ou não-redutores das cadeias de celulose, liberando glicose ou celobiose; e as β -glicosidases que hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (Persson *et al.*, 1991; Lynd *et al.*, 2002; Nurkanto, 2009, Castro & Pereira, 2010). O sinergismo entre estes três tipos de enzimas é que torna possível a efetiva degradação da celulose (Teeri *et al.*, 1997; Vries & Visser, 2001).

Os microrganismos são potenciais agentes para a decomposição da celulose, mas somente alguns possuem capacidade celulolítica e a convertem em uma forma de açúcar assimilável (Nurkanto, 2009). Dentre estes microrganismos, encontram-se os actinomicetos, que são um grupo de bactérias predominantes no solo, serrapilheira e material orgânico. Eles podem crescer e proliferar em um amplo espectro de ecossistemas (Elberson *et al.*, 2000) são saprófitos e atuam ativamente na decomposição de matéria orgânica. Em processos de compostagem, os actinomicetos atuam nas fases termofílica e de maturação, sendo capazes de degradar celulose e solubilizar lignina, tolerando altas temperaturas (Zimmermann, 1990).

A bioconversão dos polímeros lignocelulósicos pode ser realizada através do processo de compostagem; que se caracteriza por ser um processo natural, aeróbio, desenvolvido por uma população diversificada de microrganismos, os quais decompõem a matéria orgânica em nutrientes simples. O processo de compostagem é caracterizado por quatro estágios microbianos relacionados à temperatura: psicofílico, mesofílico, termofílico e

de maturação. A fase psicrófila caracteriza-se por apresentar temperaturas entre 10 e 25°C, onde os microrganismos metabolizam os compostos solúveis e de fácil degradação, resultando no aumento da temperatura no interior da leira. Na fase mesófila (25 a 45°C) as fontes de carbono mais facilmente assimiláveis continuam sendo degradadas, gerando calor por reações metabólicas exotérmicas e elevando a temperatura. Inicia-se a terceira fase, termófila, com temperaturas entre 45 e 65°C, onde o crescimento dos mesófilos é inibido, e estimula-se a germinação dos esporos de fungos e actinomicetos. Nessa etapa restam os polissacarídeos e outros substratos complexos, como celulose, hemicelulose e lignina, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares. Na última fase, de maturação, ocorre um decréscimo de temperatura devido à diminuição da atividade microbiana com a recolonização da população mesófila. Dessa forma, espera-se que fungos e bactérias termofílicas moderados sejam potenciais produtores de enzimas despolimerizantes (Fogarty & Tuovinen, 1991; McCarthy & Williams, 1992; Tuomela *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2007).

Enzimas termoestáveis são produzidas por microrganismos termofílicos e mesofílicos. Apesar dos microrganismos termofílicos serem potenciais fontes de enzimas termoestáveis, a maioria destas enzimas utilizadas pelas indústrias são originárias de organismos mesófilos. Entretanto, bactérias termófilas estão recebendo atenção especial como fontes de enzimas altamente ativas e termoestáveis (Endo *et al.*, 2001; Bischoff *et al.*, 2006; Viikar *et al.*, 2007). Proteínas de microrganismos termofílicos geralmente apresentam maior termoestabilidade intrínseca que sua equivalente mesófila, embora mantenham a estrutura básica particular da família a que pertencem (Gomes *et al.*, 2007).

A demanda por enzimas termoestáveis com aplicações industriais vem crescendo muito nos últimos anos. Celulases termoestáveis possuem diversas aplicações industriais, tais como indústrias de alimentos e açúcar, onde processos de altas temperaturas, como pasteurização, são utilizados. Outras aplicações incluem indústrias de biocombustíveis, papel, tratamento de resíduos domésticos e agroindustriais (Jang & Cheng, 2003). Actinomicetos termofílicos tem sido alvo de diversos estudos em função da produção de enzimas termoestáveis. Diferentes trabalhos indicam que as celulases de actinomicetos possuem melhor atuação em temperaturas por volta de 50°C e valores de pH entre neutros e moderadamente ácidos (George *et al.*, 2001; Jang & Chen, 2003; Lima, *et al.*, 2005). Dentre os diferentes gêneros do grupo dos actinomicetos, *Streptomyces* é o mais comumente encontrado produzindo celulases.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade celulolítica de isolados de actinomicetos originários de amostras em processo de compostagem frente a

diferentes temperaturas, implicando na seleção de microrganismos com potencial para a produção de celulasas ativas e estáveis em temperaturas elevadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Os actinomicetos estudados foram previamente coletados e isolados por outra colaboradora em nosso laboratório (dados não publicados) a partir de leiras de processo de compostagem da Unidade de Triagem e Compostagem de Resíduos do Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU) no Município de Porto Alegre, RS. Foram empregados 48 isolados de actinomicetos, conservados em glicerol, dos quais 27 foram selecionados para a caracterização da atividade celulolítica a diferentes temperaturas.

Recuperação das amostras

Alíquotas de 100µL dos isolados armazenados em glicerol a temperatura de -20°C foram semeadas em placas contendo o meio de cultivo ágar amido caseína (ACA: amido 1%, caseína 0,03%, KNO₃ 0,2%, NaCl 0,2%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄ 0,005%, FeSO₄ 0,001%, CaCO₃ 0,002% e ágar 1,5%) através da técnica de espalhamento de superfície com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A incubação ocorreu a uma temperatura de 30° C por no mínimo 7 dias. Posteriormente os isolados foram inoculados em tubos contendo o meio ACA inclinado e incubados a 30°C por 7 dias. Após a incubação os isolados foram mantidos refrigerados à temperatura de 4° C para a posterior realização dos experimentos.

Atividade celulolítica

A atividade celulolítica foi avaliada utilizando-se placas de Petri contendo o meio de cultivo proposto por Tuncer (1999) suplementado com 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono. Os diferentes isolados foram inoculados em duplicata na forma de picada e as placas foram incubadas nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C por 5 dias. Para a visualização dos halos de hidrólise, as superfícies das placas foram cobertas com Lugol (2,0g KI e 1,0g de iodo em 300mL de água destilada) por 3 a 5 minutos (Kasana *et al.*, 2008); e o seu diâmetro e o das colônias foram aferidos com o auxílio de uma régua milimetrada. O lugol forma um complexo com polissacarídeos, tais como a celulose, mas não com a glicose

(monossacarídeo), assim é observado um halo claro ao redor das colônias correspondente a zona de hidrólise da celulose, demonstrando que o microrganismo produz a enzima carboximetilcelulase (endoglucanase). A atividade enzimática foi avaliada através de duas metodologias: diâmetro do halo de hidrólise e índice de atividade enzimática. O diâmetro da zona de hidrólise geralmente é proporcional a atividade da CMCase (Jang & Chen, 2003). O índice de atividade enzimática (IE) foi calculado através do diâmetro total da colônia mais a zona de hidrólise dividido pelo diâmetro da colônia conforme proposto por Hankin & Anagnostakis (1975).

Identificação Morfológica

A técnica de microcultivo foi utilizada para identificar em nível de gênero os diferentes isolados de actinomicetos, conforme descrito por Williams *et al.*(1989) (Figura 1). Esta técnica permite estudar as características morfológicas, tais como estruturas reprodutivas, presença de hifas sobre o substrato e hifas aéreas. Esta técnica consiste de uma placa de petri contendo um chumaço de algodão e uma lâmina para microscopia sobreposta a dois palitos. Nas extremidades da lâmina foi adicionado cerca de 700 μ L de meio ACA, e após a solidificação do meio, foi inoculado cada um dos isolados através de um risco transversal. Em seguida 2mL de água destilada estéril foram adicionados ao algodão para manter a umidade no meio, e as placas foram incubadas a 30°C por 5 dias. Diariamente as lâminas foram observadas em microscópio óptico no aumento de 10x40.



Figura 1: Técnica do microcultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Actinomicetos compreendem um grupo diverso de bactérias filamentosas, muitos dos quais são importantes ecologicamente e possuem potencial para a produção de enzimas, antibióticos, vitaminas, substâncias inibidoras da atividade enzimática e outros compostos biologicamente ativos (Edwards, 1993; Taguchi *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 1999; Ramesh & Mathivanan, 2009). Alguns destes microrganismos podem degradar celulose e solubilizar lignina, e são capazes de tolerar temperaturas e pH mais elevados do que fungos. Portanto, actinomicetos são importantes agentes da degradação de lignocelulose durante o pico de aquecimento do processo de compostagem, sendo presentes também durante a fase de resfriamento e maturação (Tuomela *et al.*, 2000).

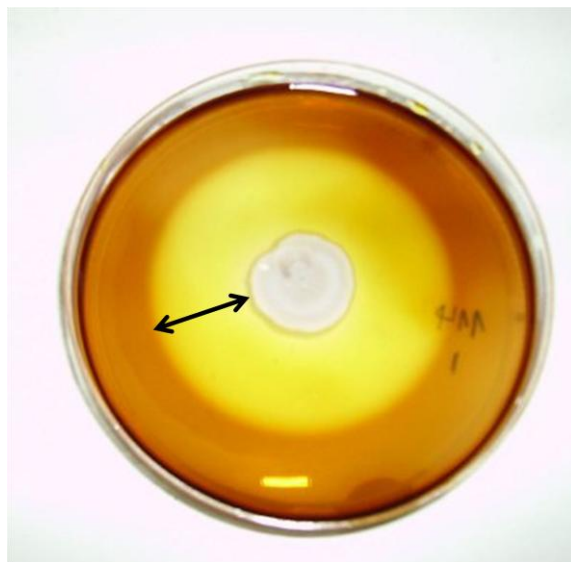


Figura 2: Hidrólise da Carboximetilcelulose. Isolado 114 testado na temperatura de 50°C apresenta zona de hidrólise de 36 mm diâmetro, com índice de atividade enzimática de 2,8. A zona de hidrólise corresponde a faixa clara (indicado pela seta) ao redor da colônia.

Considerando que actinomicetos oriundos das fases termofílica e de maturação do processo de compostagem podem apresentar capacidade celulolítica, foram testados 48 isolados de actinomicetos para a atividade de carboximetilcelulase a 40°C. Todos os isolados apresentaram capacidade de degradar a carboximetilcelulose evidenciado pela zona clara ao redor da colônia (Figura 2), com medidas de halos de hidrólise que variaram de 5 a 35mm de diâmetro (Figura 3), e índice de atividade enzimática (IE) entre 1,5 a 10,5. Cerca de 29% dos

isolados apresentaram halos de hidrólise entre 20 e 25mm de diâmetro e 16% com medidas de 26 a 35mm (Figura 3). Resultado semelhante foi encontrado por Salamoni (2005), onde todos os isolados de actinomicetos provenientes de processo de compostagem apresentaram capacidade de degradar CMC incubados a 35°C, entretanto as medidas de halo de hidrólise foram superiores ao do presente estudo, variando de 17 a 48mm. Rodrigues (2006) avaliando o potencial enzimático de actinomicetos oriundos de composto relatou a capacidade celulolítica em 91% dos actinomicetos quando crescidos na temperatura de 37°C. Jaradat *et al.* (2008) estudando actinomicetos em amostras de solo, observaram que 94% dos actinomicetos foram positivos para celulase, apresentando halos de atividade celulolítica inferiores ao do presente estudo, com 81% dos isolados apresentando halo de hidrólise menor que 10 mm e apenas 1% com diâmetro de 20 a 25mm. Já em um estudo com actinomicetos marinhos apenas 35% dos isolados apresentaram atividade celulolítica. No entanto, grande parte destes isolados produziram lipases o que pode significar uma forma de se adaptar a um ambiente extremo, visto que o ambiente marinho apresenta grandes quantidades de lipídeos (Ramesh & Mathivanan, 2009). Deste modo, a alta capacidade celulolítica dos actinomicetos isolados, encontrados no presente estudo, pode ser devido à grande disponibilidade de materiais lignocelulósicos em composteiras, em resposta a este ambiente.

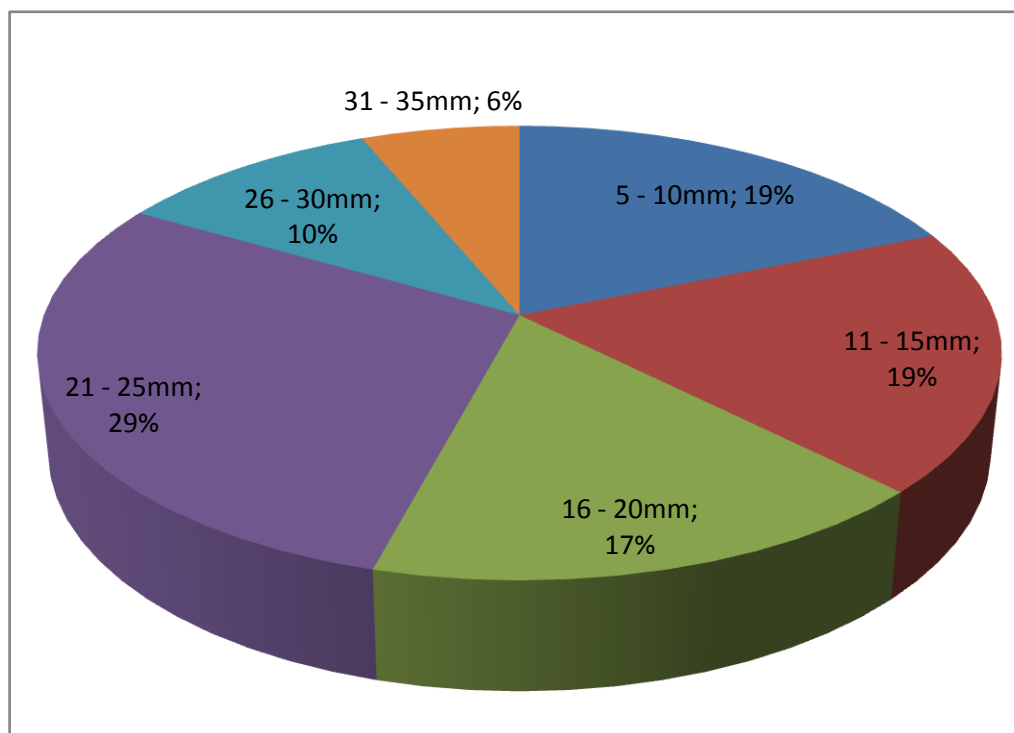


Figura 3: Distribuição dos isolados de actinomicetos em relação ao halo de degradação em meio Agar CMC.

Dos 48 actinomicetos testados inicialmente, 27 foram selecionados para serem avaliados a diferentes temperaturas de incubação. Dentre estes 27 isolados, 23 foram selecionados por terem apresentado halo de hidrólise superior a 20mm de diâmetro. Outros 4 isolados (isolados 183, 191, 320 e 631) que apresentaram halo de hidrólise inferior a 20mm também foram selecionados com o intuito de verificar se apresentariam maior atividade celulolítica em temperaturas mais elevadas, o que não foi observado (tabela 1). A técnica de microcultivo possibilitou a identificação do gênero destes 27 isolados através da observação microscópica de estruturas reprodutivas e de crescimento. Houve uma prevalência do gênero *Streptomyces* (n=14) com 52% do total de isolados, seguido por *Nocardia* com 26% (n=7). Foram identificados dois isolados pertencentes ao gênero *Streptosporangium* (7%), e não foi possível identificar quatro isolados por meio do microcultivo. O isolado 183 foi identificado como pertencente ao gênero *Streptoverticillium*, mas de acordo com a Validation List N° 38 (1991) este gênero foi incorporado ao gênero *Streptomyces*, portanto foi contabilizado como tal. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura: Rodrigues (2006), estudando actinomicetos em processos de compostagem, encontrou um predomínio dos gêneros *Streptomyces* 66,1%, *Nocardia* 25,1%, *Terrabacter* 6,6% e *Nocardiopsis* 2,5%. De forma semelhante, Oliveira (2002), relatou predominância de *Streptomyces* e *Nocardia*, com a incidência menor de outros gêneros, *Terrabacter*, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Streptoverticillium* e *Nocardiopsis*. Os gêneros encontrados, com maior frequência, por Lacey (1997) foram *Streptomyces* e *Nocardia*, seguidos por *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* e *Micromonospora*. Outros trabalhos reportam que há um predomínio do gênero *Streptomyces* em processo de compostagem (McCarthy & Williams, 1990; Tuomela *et al.*, 2000).

Os actinomicetos isolados são primariamente termófilos, considerando que o ambiente de onde foram isolados apresentou temperatura superior a 45°C (Tabela 1). Segundo Gomes *et al.*, (2007) existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um microrganismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Assim é esperado que microrganismos termófilos produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente a, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento, ou seja, acima de 45°C. Entretanto o perfil enzimático revelou que nas temperaturas de 30 e 40°C todos os isolados degradaram a CMC, mas com o acréscimo da temperatura para 50 e 60°C somente 85% e 59% dos isolados, respectivamente, demonstraram atividade celulolítica. De uma forma geral, os actinomicetos apresentaram uma tendência de diminuição da atividade da CMCase com o acréscimo da temperatura. Cerca de 59% dos isolados (n=16) demonstraram uma maior atividade e/ou produção de carboximetilcelulase a 30°C, com um leve decréscimo a 40°C e

uma baixa atividade celulolítica a 50°C, conforme evidenciado pelo diâmetro do halo de hidrólise (Figura 4A e Tabela 1). Seis isolados (22%) apresentaram melhor atividade celulolítica a 40°C. Outros autores tem obtido resultados com máxima produção de celulase por *Streptomyces* a 37°C (Malek *et al.*, 1988), 35°C (Tuncer *et al.*, 2004) e 30°C (Ishaque e Kluepfel, 1980). Salamoni (2005) demonstrou máxima produção de celulase a 35°C utilizando diferentes substratos celulósicos com um isolado de *Streptomyces* oriundo de processo de compostagem. Apesar de muitos isolados terem tolerado a temperatura de 50°C, apresentando um baixo crescimento e atividade de CMCase nesta temperatura, os dados revelaram que a atividade enzimática se assemelha mais a de um microrganismo mesofílico. Além disso, observou-se maior crescimento microbiano na temperatura de 40°C, evidenciada pelo maior diâmetro das colônias no substrato de CMC.

Neste estudo 5 isolados, pertencentes ao gênero *Streptomyces*, fugiram ao padrão encontrado de diminuição da atividade celulolítica com a elevação da temperatura. Os isolados 314 e 334 apresentaram atividade celulolítica praticamente estável nas temperaturas de 30 a 50°C, com um acentuado declínio do diâmetro do halo de hidrólise na temperatura de 60°C (Tabela 1 e Figura 4B). Entretanto, os isolados 314 e 334 apresentaram altos índices de atividade enzimática (IE) a 30°C, 11,8 e 10,8 respectivamente. Assim a temperatura de 30°C parece ser a mais indicada para a produção de celulase. Os isolados 114, 188 e 481 aumentaram a atividade enzimática com a elevação da temperatura até 50°C, apresentando halo de hidrólise a 60°C similar ao encontrado a 50°C, com exceção do isolado 114. Interessantemente, os isolados 114, 188 e 481 apresentaram índice de atividade enzimática superior na temperatura de 60°C. Isto pode indicar que as enzimas secretadas por estes *Streptomyces* são mais ativas a 60°C ou que estes isolados secretam mais celulase nesta temperatura, visto que, proporcionalmente o halo de hidrólise foi cerca de 9 vezes superior ao diâmetro da colônia. Considerando a atividade enzimática e o maior crescimento microbiano a 50°C, estes cinco isolados de *Streptomyces* podem ser considerados actinomicetos termofílicos.

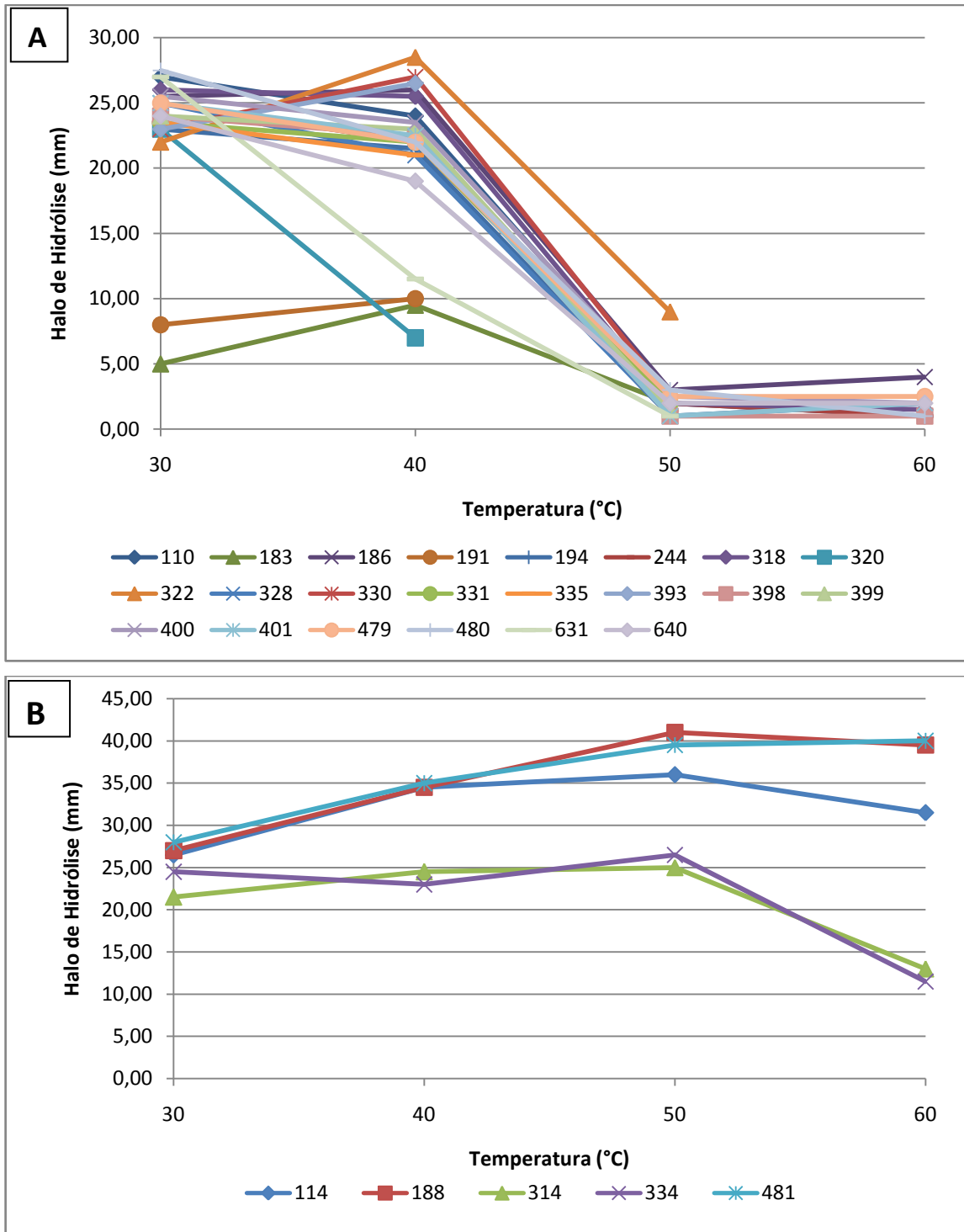


Figura 4: Detecção da atividade enzimática de celulasas secretadas por isolados oriundos de processo de compostagem: atividade celulolítica avaliada através do diâmetro do halo de hidrólise (em mm) frente às temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C. **A)** Isolados que apresentaram tendência de diminuição da atividade celulolítica com a elevação da temperatura (n=22). **B)** Isolados que aumentaram a atividade com a elevação da temperatura (n=5).

Diversos trabalhos com *Streptomyces* são reportados com máxima atividade em temperaturas elevadas. Alani *et al.* (2007) encontrou máxima atividade de carboximetilcelulase, no extrato bruto, entre 50 e 60°C em um isolado de *Streptomyces sp.*, indicando que esta enzima pode ser considerada termofílica. Diferentes isolados de *Streptomyces* apresentaram máxima atividade de carboximetilcelulase a 50°C (Lima *et al.*, 2005; Salamoni, 2005). De maneira semelhante, uma cepa transformada de *Streptomyces*, isolada em processo de compostagem de resíduos agrícola, secreta uma celulase termoestável com máxima atividade a 50°C, mantendo a atividade por mais de 7 dias de incubação com CMC (Jang & Chen, 2003). McCarthy (1987) reportou uma ótima temperatura para atividade de celulase entre 40 e 55°C para várias espécies de *Streptomyces*, *S. lividans*, *S. flavogrisus*, e *S. nitrosporus*. Outros gêneros de actinomicetos termofílicos também apresentam atividade celulolítica em temperaturas elevadas. Um isolado termofílico *Thermomonospora* proveniente de composteira apresentou máxima atividade de carboximetilcelulase a 50°C, apresentando alta estabilidade térmica (Geoge *et al.*, 2001). O isolado termofílico identificado como *Thermomonospora curvata*, oriundo de amostras de composteira municipal apresentou uma ótima condição para produção de celulase quando crescido a 55°C, e uma ótima temperatura para atividade da celulase a 65°C no extrato bruto (Stutzenberger, 1971).

Em relação ao índice de atividade enzimática, a temperatura de 30°C apresentou os maiores valores, com IE médio igual a 6,0, ou seja, nesta temperatura os isolados apresentaram halos de hidrólise cerca 6 vezes o diâmetro de suas colônias (Tabela 1). Apesar do IE ser útil para a seleção de microrganismos produtores de celulases, deve ser acompanhado da análise do halo de hidrólise, visto que alguns isolados com baixo crescimento microbiano geraram altos índices de atividade enzimática. Isto poderia levar a seleção de isolados que apresentem baixa atividade celulolítica. Nurkanto (2009) realizou um estudo onde a atividade celulolítica foi avaliada em meio líquido em isolados de actinomicetos que apresentaram maiores índices de atividade enzimática. Entretanto os resultados obtidos demonstraram que os maiores IEs não foram seguidos por maior atividade enzimática em meio líquido. No presente estudo o IE foi útil como um critério de seleção da temperatura em que o microrganismo apresentou melhor atividade, e não como um critério de comparação entre os diferentes isolados. Resultado semelhante foi observado em um estudo de avaliação da atividade celulolítica de fungos, onde o valor do índice enzimático não foi um parâmetro adequado de avaliação no intuito de comparar atividades entre diferentes linhagens (Ruegger & Tauk-Tornisiello, 2004).

CONCLUSÃO

Dos 48 isolados oriundos de processo de compostagem inicialmente testados, 23 apresentaram halo de hidrólise superior a 20mm a 40°C, sendo promissores produtores de celulasas. Destes isolados, 5 *Streptomyces* destacaram-se por terem demonstrado maior atividade celulolítica em temperaturas elevadas, considerados, assim, actinomicetos termofílicos. Os isolados termofílicos 114, 188 e 481 ofereceram maior potencial para produção de celulasas ativas e estáveis em altas temperaturas, de acordo com os resultados obtidos com o halo de hidrólise e IE. Contudo mesmo entre os mesófilos, é possível encontrar enzimas que atuem em temperaturas altas. Assim, estudos com o extrato bruto das enzimas secretadas por estes actinomicetos são necessários para avaliar a atividade e a estabilidade destas celulasas.

Tabela 1: Atividades de carboximetilcelulase produzida por diferentes isolados oriundos de processo de compostagem frente a diferentes temperaturas. A temperatura de isolamento refere-se a temperatura média da composteira onde o actinomiceto foi isolado. ¹ Diâmetro médio do halo de Hidrólise (mm). ² Diâmetro médio da colônia (mm). ³ Índice de Atividade Enzimática = (ØC+ ØH)/ ØC. nc= isolados que não cresceram.

N° isolado	Gênero	Temperatura isolamento	30°			40°			50°			60°		
			Ø H ¹	Ø C ²	IE ³	Ø H	Ø C	IE	Ø H	Ø C	IE	Ø H	Ø C	IE
110	<i>Streptomyces</i>	55°C	27,0	6,5	5,2	24,0	14,0	2,7	2,0	3,0	1,7	1,0	1,0	2,0
114	<i>Streptomyces</i>	55°C	26,5	5,0	6,3	34,5	11,5	4,0	36,0	20,0	2,8	31,5	4,0	8,9
183	<i>Streptomyces</i>	57,3°C	5,0	6,0	1,8	9,5	1,0	10,5	2,0	1,0	3,0		nc	
186	<i>Streptomyces</i>	57,3°C	25,5	7,0	4,6	26,0	13,0	3,0	3,0	3,0	2,0	4,0	1,0	5,0
188	<i>Streptomyces</i>	57,3°C	27,0	5,0	6,4	34,5	10,0	4,5	41,0	14,0	3,9	39,5	5,0	8,9
191	Não identificado	57,3°C	8,0	1,0	9,0	10,0	2,0	6,0		1,0			nc	
194	<i>Streptomyces</i>	57,3°C	23,0	7,0	4,3	21,5	10,0	3,2	1,0	3,5	1,3	2,0	1,0	3,0
244	<i>Nocardia</i>	63,3°C	25,0	6,0	5,2	22,0	7,0	4,1	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	2,0
314	<i>Streptomyces</i>	67,6°C	21,5	2,0	11,8	24,5	15,5	2,6	25,0	20,5	2,2	13,0	8,0	2,6
318	<i>Streptomyces</i>	67,6°C	26,0	6,0	5,3	25,5	9,0	3,8	2,0	2,0	2,0	1,5	1,0	2,5
320	Não identificado	67,6°C	23,0	5,0	5,6	7,0	4,0	2,8		1,0			nc	
322	<i>Streptomyces</i>	67,6°C	22,0	6,0	4,7	28,5	13,5	3,1	9,0	2,5	4,6		nc	
328	<i>Nocardia</i>	67,6°C	25,0	5,0	6,0	21,0	5,5	4,8	1,0	3,5	1,3		1,0	
330	<i>Streptomyces</i>	67,6°C	23,0	6,0	4,8	27,0	9,5	3,8	2,5	1,0	3,5		nc	
331	Não identificado	67,6°C	23,5	5,0	5,7	22,0	7,0	4,1	2,0	2,0	2,0		nc	
334	<i>Streptomyces</i>	67,6°C	24,5	2,5	10,8	23,0	11,5	3,0	26,5	21,0	2,3	11,5	12,0	2,0
335	<i>Streptosporangium</i>	67,6°C	23,5	4,5	6,2	21,0	9,0	3,3		1,0			nc	
393	<i>Nocardia</i>	46°C	23,0	4,0	6,8	26,5	8,0	4,3		nc			nc	
398	<i>Streptosporangium</i>	46°C	24,0	5,0	5,8	22,5	4,5	6,0	1,0	2,0	1,5	1,0	1,0	2,0
399	<i>Nocardia</i>	46°C	24,0	6,0	5,0	23,0	7,0	4,3	1,5	2,5	1,6		1,0	
400	<i>Nocardia</i>	46°C	25,5	6,0	5,3	23,5	9,0	3,6	2,5	1,0	3,5	2,0	1,0	3,0
401	<i>Streptomyces</i>	46°C	25,0	7,0	4,6	22,5	13,0	2,7	1,0	5,0	1,2	2,0	1,0	3,0
479	Não identificado	24°C	25,0	5,5	5,5	22,0	7,0	4,1	2,5	3,0	1,8	2,5	1,0	3,5
480	<i>Nocardia</i>	24°C	27,5	4,5	7,1	22,0	6,5	4,4	3,0	1,0	4,0	1,0	1,0	2,0
481	<i>Streptomyces</i>	24°C	28,0	5,0	6,6	35,0	12,0	3,9	39,5	16,5	3,4	40,0	5,0	9,0
631	<i>Nocardia</i>	37°C	27,0	6,0	5,5	11,5	7,5	2,5	1,0	1,0	2,0		1,0	
640	<i>Streptomyces</i>	37°C	24,0	6,0	5,0	19,0	10,0	2,9	2,0	4,0	1,5	2,0	1,0	3,0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANI, F.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. New isolate of *Streptomyces* sp. With novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol Lett.* V. 30:123–126, 2008.
- BAYER, E.A. & LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation.* V.3:171-188, 1992.
- BISCHOFF, K. M.; ROONEY, A. P.; LI, X. L.; LIU, S.; HUGHES, S. R. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett.* V. 28:1761–5, 2006.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulase na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova.* V. 33: 181-188, 2010.
- EDWARDS, C. Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* V.42: 161-179, 1993.
- ELBERSON, M. A.; MALEKZADEH, F.; YAZDI, M. T.; KAMERANPOUR, N.; NOORIDLOI, M. R.; MATTE, M. H.; SHAHAMAT, M.; COLWELL, R.R; SOWERS, K. R. *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas sirensis* sp. nov. mesophilic cellulose degrading bacteria isolated from forest soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 50: 993-996, 2000.
- ENDO, K.; HAKAMADA, Y.; TAKIZAWA, S.; KUBOTA, H.; SUMITOMO, N.; KOBAYASHI, T. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Appl Microbiol Biotechnol*, V.57:109–16, 2001.
- FOGARTY, A. M.; TUOVINEN, O. H. Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiological Reviews*, Washington. V. 55: 225 – 233, 1991.
- GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethylcellulase produced by an alkalithermophilic actinomycete. *Bioresource Technology.* V. 77: 171-175, 2001.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova.* V. 30: 136-145, 2007.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, V. 67: 597-607, 1975.
- ISHAQUE, M; KLUEPFEL, D. Cellulase complexo of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Canadian Journal of Microbiology.* V. 26: 183 – 9, 1980.
- JANG, H.D.; CHEN, K.S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World Journal Microbiology and Biotechnology.* V.19: 263-268, 2003.

- JARADAT, Z.; DAWAGREH, A.; ABABNEH, Q.; SAADOUN, I. Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* Sp. (Strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences*. V. 1: 141- 146, 2008.
- 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. *Curr Microbiol* V.57:503–507, 2008.
- LACEY, J. Actinomycetes in composts. *Annals Agriculture Environmental and Medical*, Tokio, Japan. V. 4: 113 – 121, 1997.
- LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*. V.37: 272-277, 2005.
- LU, Z. F.; GUO, K. L.; LI, C. Overview of cellulase and its utilization in alcohol Industry. *Liquor-Making Sci Tech*. V. 1: 98-102 (in Chinese with English abstract), 2008.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; Pretorius, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. *Am. Soc. Microbiol.* V.66: 506-577, 2002.
- MALEK, M. A. et al. Bacterial cellulases and saccharification of lignocellulosic materials. *Enzyme of Microbial Technology*. V. 10: 750 – 3, 1988.
- MCCARTHY, A. J. Lignocellulose degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol*. V.46: 145-163, 1987.
- MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T.; Actinomycetes as agents of biodegradation in environment - a review. *Gene*, Amsterdam. V. 115: 189-192, 1990.
- NURKANTO, A. Cellulolytic Activities of Actinomycetes Isolated from Soil Rhizosphere of Waigeo, Raja Ampat, West Papua. *J. Tanah Trop*. V.14: 239-244, 2009.
- OLIVEIRA, M. F. Identificação de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.
- PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, V. 34: 99-108, 1999.
- PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAGERDAL, B. H. Fungal Cellulolytic Enzyme Production: A Review. *Process Biochem*. V. 26: 65-74, 1991.
- RAMESH, S.; MATHIVANAN, N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J Microbiol Biotechnol*. V.25: 2103–2111, 2009.
- RODRIGUES, K. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em

Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

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. 27: 205-211, 2004.

SALAMONI, S. P. Produção e caracterização de celulases secretadas por *Streptomyces* sp. Isolado de processo de compostagem. . Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

STUTZENBERGER, F. J. Cellulase Production by *Thermomonospora curvata* Isolated from Municipal Solid Waste Compost. Appl Microbiol. V. 22: 147–152, 1971.

TAGUCHI, S.; KIKUCHI, H.; SUZUKI, M; KOJUMA, S.; TERABE, M.; MIURA, K. I.; MOMOSE, H. Streptomyces subtilisin inhibitor-like proteins are distributed widely in Streptomyces. Applied and Environmental Microbiology, V. 59: 4338-4341, 1993.

TEERI T. T. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. Trends Biotechnol. V. 15: 160–167, 1997.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolad in Turkey. Journal of Applied Microbiology, Oxford. V. 97: 783 -791, 2004.

TUNCER, M.; ROB, A.; BALL, A.S.; WILSON, M.T. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. Enzyme and Microbial Technology. V. 25: 38–47, 1999.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M.; Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour. Technol.* V. 72: 169-183, 2000.

VALIDATION LIST N° 38. Int. J. Syst. Bacteriol. V. 41:456-457, 1991 [WITT (D.) and STACKEBRANDT (E.): Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. Syst. Appl. Microbiol., V.13: 361-371, 1990.

VIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J; SIIKA-AHO, M. Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis. Adv Biochem Engin/Biotechnol. V. 108: 121–145, 2007.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol Mol Biol Rev, V. 65: 497–522, 2001.

WILLIAMS, S.T, SHARPE, M.E, HOLT, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, V. 4: 2300–2648, 1989.

ZIMMERMANN, W. Degradation of lignin by bacteria. Journal of Biotechnology, Amsterdam, Netherlands, V. 13: 119- 130, 1990.