



REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL CELULOLÍTICO¹

Simone Thiele²; Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo³; Adriana Fiorini³; Marise Fonseca dos Santos³; Brenda Vilseque Fernandes²; Fabiano Bisinella Scheufele⁴

¹Apresentado no 6º Simpósio de Biotecnologia na Agroindústria: 08 e 09 de junho de 2017 na UFPR; *Setor Palotina*;

²Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, 85950-000, Palotina. PR, Brasil. simothiele@gmail.com

³Departamento De Biociências, Universidade Federal Do Paraná, Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, 85950-000, Palotina. PR, Brasil.

⁴Departamento de Engenharias e Exatas, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, 85950-000, Palotina, PR, Brasil.

Resumo

As bactérias são os mais abundantes organismos em nosso planeta, são encontradas em diversos habitats e podem ser usadas para o benefício da humanidade. Dentre elas, as bactérias celulolíticas que apresentam um metabolismo capaz de realizar a degradação da celulose, por meio da produção de enzimas celulasas tem grande potencial no setor industrial. Para a identificação de novas estirpes de bactérias celulolíticas deve-se estabelecer um protocolo qualitativo. Neste trabalho, foi empregada uma metodologia modificada baseada no método de Theater e Wood (1989), obtendo-se estirpes bacterianas isoladas de solo na região oeste do Paraná. Como resultados, foi obtida a caracterização de estirpes positivas para a degradação da celulose, demonstrando a interação da bactéria com a celulose (CMC) com a formação de halos de degradação.

Palavras-chave: bactérias, carboximetilcelulose, enzimas celulolíticas.

ESTABLISHMENT OF PROTOCOL FOR THE IDENTIFICATION OF BACTERIA WITH CELLULOLYTIC POTENTIAL

Abstract

Bacteria are the most abundant organisms on our planet, which are found in several habitats and can be used for the benefit of humankind. Among them, the cellulolytic bacteria that present a metabolism capable of accomplishing cellulose degradation, through the production of cellulase enzymes has great potential in the industrial sector. For the identification of new strains of cellulolytic bacteria, a qualitative protocol must be established. In this work, a modified methodology based on the method of Theater and Wood (1989) was described, obtaining bacterial strains isolated from soil in the western region of Paraná. As results, the characterization of positive strains for cellulose degradation was obtained, showing the interaction of the bacterium with the cellulose (CMC) with the formation of degradation halos.

Keyword: bacteria, carboxymethylcellulose, cellulolytic enzymes.

Introdução

As bactérias são microrganismos com um metabolismo independente, não necessitando de outro ser para o seu desenvolvimento. São organismos de morfologia simples em relação aos demais, sendo unicelulares e classificados como procarionte (pré-núcleo) (DAVIS, 1979; TORTORA et al., 2012). As bactérias são encontradas nos mais diversos ambientes: água, terra, ar, endofiticamente ou epifiticamente aderidos a outros organismos. Algumas espécies suportam condições ambientais extremas como temperaturas, salinidade, pH entre outros (CAVICCHIOLI, 2002).

Uma grande gama de bactérias possuem metabólitos com uma diversificada aplicação na área industrial. Dentre estes metabólitos, encontram-se as enzimas, alavancadas pelo franco crescimento de bioprocessos e da biotecnologia visando a substituição dos tradicionais processos químicos por processos menos agressivos ao meio ambiente (EMBRAPA, 2015).

Neste contexto, as bactérias celulolíticas vêm ganhando destaque pelo seu ainda pouco explorado uso, sendo que a grande maioria das celulases comerciais são produzidas pelos fungos filamentosos *Trichoderma reesei* ou *Aspergillus niger* por fermentação submersa (FSm) (CHUNDAWAT et al., 2011; SCHEUFELE et al., 2012).

Bactérias celulolíticas consistem em um grupo de bactérias capaz de produzir enzimas extracelulares denominadas celulases, responsáveis pela decomposição da celulose. As enzimas são em geral macromoléculas proteicas, que aceleram as reações químicas e/ou bioquímicas sem interferir no equilíbrio do processo, via processo catalítico. As celulases se enquadram na família das glicosil-hidrolases (i.e. hidrolisa, oligossacarídeos e polissacarídeos) e, são classificadas conforme seu modo de catálise (MARTINEZ-ANAYA et al., 2008).

A celulose é um polissacarídeo encontrado em abundância nas células vegetais, constituído por moléculas de glicose que se unem entre si devido à formação de ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (FENGEL; WEGENER, 1989). Existem lacunas para a completa elucidação dos mecanismos de ação das enzimas celulolíticas na degradação das estruturas celulósicas, isto pode ser explicado devido à grande especificidade de atuação das mesmas.

De maneira geral, as celulases compõem uma classe de enzimas que atuam em diferentes substratos e regiões da celulose e/ou seus intermediários. No entanto, a macroestrutura da celulose é mais complexa e resiliente aos ataques enzimáticos, sendo que por meio de interações inter- e intramoleculares (i.e. pontes de hidrogênio) formam-se fibrilas elementares, as quais podem ser cristalinas ou amorfas (RAMOS, 2003). As fibrilas celulósicas, por sua vez, se associam entre si e formam estruturas maiores juntamente com os demais polímeros comumente encontrados nos vegetais (hemicelulose e lignina), formando a estrutura lignocelulósica – heteropolímero extremamente resistente aos ataques enzimáticos e químicos.

Atualmente, a maior parte das celulases comerciais têm origem a partir de fungos (HOWARD et al., 2003). No entanto, as bactérias vêm ganhando espaço, pelo fato das enzimas bacterianas apresentarem propriedades bioquímicas diferentes como, por exemplo, atividade enzimática resistente às modificações de pH e temperatura (maior termoestabilidade) (ZHANG et al., 2006).

As celulases bacterianas têm o potencial de ampliar as possibilidades de aplicação em escala industrial, bem como diminuir custos devido à diminuição de perdas. Além disso, como vantagens em relação aos fungos, as bactérias costumam apresentar maior taxa de crescimento. Mesmo assim, o potencial de produção de celulases a partir de bactérias ainda é vagamente explorado (SETHI et al., 2013).

Nos últimos anos, há um crescente interesse no desenvolvimento e produção de enzimas celulolíticas, entrelaçadas a vários ramos industriais, dentre estes: ração animal, cervejaria, tecelagem, papel e sua reciclagem, detergentes, e especialmente a produção do etanol celulósico - atuando na etapa de pré-tratamento (degradação dos polímeros constituintes da estrutura lignocelulósica em açúcares fermentescíveis) (MARRA et al., 2015).

A atividade celulolítica pode ser induzida e monitorada através da carboximetilcelulose (CMC, celulose em pó) como fonte de carbono no meio de crescimento dos isolados, como demonstrado no método de Theater e Wood (1989). Deste modo, o primeiro passo no isolamento de estirpes com potencial celulolítico é a determinação de um protocolo qualitativo pela produção de celulases. Evidentemente, após identificação de cepas que apresentem potencial celulolítico, estudos mais aprofundados para a caracterização das celulases e otimização da sua produção devem ser conduzidos de forma que estas apresentem viabilidade técnico-econômica.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia adequada para a identificação e triagem de bactérias com capacidade de produção de enzimas com potencial celulolítico em bactérias provenientes de solo na região oeste do Paraná.

Material e Métodos

Microrganismos isolados

No desenvolvimento deste protocolo foram testadas as cepas de bactérias *Paenibacillus* sp. (isolado 21) e *Ochrobactrum* sp. (isolado 103), obtidas da coleção de bactérias do Laboratório de Bioquímica e Genética (Labiogen) da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina.

Essas bactérias são endofíticas e foram isoladas do solo da região oeste do Paraná utilizando como planta isca o milho e trigo. Para a purificação da cepa foi realizada a lavagem e maceração das raízes de plantas, em seguida diluído para o plaqueamento em meio de cultura sólido, repetindo o repique até se obter colônias puras dos microrganismos (CHAVES, 2013).

Caracterização molecular das estirpes bacterianas

Extração de DNA genômico

Para confirmar a identificação das estirpes bacterianas isoladas foi realizada o sequenciamento da região correspondente ao rRNA 16S. Para isto, procedeu-se a extração do DNA genômico onde colônias bacterianas isoladas foram inoculadas em meio Luria-Bertani líquido (LB) e mantidas por aproximadamente 16 h, sob agitação (120 rpm), a 28 °C. O DNA genômico foi extraído de acordo com o método descrito por Shahriar et al. (2011), a partir de 3 mL da cultura. O DNA extraído foi diluído na proporção 1:10 em água Milli-Q e a sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% com tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM; Ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0).

Amplificação, por PCR, da região rDNA 16S de bactérias e sequenciamento

A amplificação da região rRNA 16S foi realizada com os *primers* Y1 *forward* (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') Young et al. (1991) e Y3 *reverse* (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') Cruz (2001), produzindo um *amplicon* de 1500 pb. A reação de PCR foi realizada em 30 µL com 2 µL do DNA genômico diluído 1:10, tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da *Taq* DNA Polimerase (Bioron) e 0,2 µM de cada *primer*. As reações foram amplificadas em termociclador Bioer Life Express (modelo MJ96). As condições de amplificação foram: 5 min iniciais a 94 °C, e 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 57 °C e 45 s a 72 °C, como extensão final de 5 min a 72 °C. O produto de amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X utilizando o padrão de peso molecular de 100pb (Kasvi), com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e foto documentada em equipamento Loccus Biotecnologia L.PIX.

Em seguida, o fragmento amplificado de 1500 pb foi eluído do gel e purificado com kit de eluição EZ10 (Bio Basic Inc), para a purificação dos fragmentos para o sequenciamento. Uma alíquota de 2 µL dos produtos de PCR foi quantificada com o auxílio de espectrofotômetro Nanodrop2000 (ThermoScientific). O grau de pureza foi determinado pela relação A260/280. Após quantificação, as amostras foram secas em estufa a 60 °C e enviadas para a empresa Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada-RS, para a realização do sequenciamento.

Caracterização bioquímica das estirpes bacterianas

Coloração de Gram

Para coloração de Gram foi utilizada a metodologia segundo Magnani (2005) em que uma única colônia isolada em placa foi retirada com o auxílio de um palito e realizada o esfregaço numa lâmina de vidro com uma gota de solução salina estéril. A fixação da bactéria na lâmina ocorreu pela submissão ao fogo, seguida de adição de solução cristal de violeta e tratamento com lugol por 1 min. A descoloração foi realizada com álcool-acetona, tratamento com fucsina por 1 min e visualização em microscópio.

Identificação do potencial celulolítico dos isolados

O protocolo de identificação de bactérias celulolíticas foi realizado pelo método de triagem por ensaio qualitativo modificado de Theater e Wood (1989). Neste procedimento, foram avaliados 3 métodos de plaqueamento, visando estabelecer a melhor condição de identificação: (1) poços a partir de canudos, no qual perfurou-se as placas empregando canudos cilíndricos sendo as bactérias dispostas no seu interior; (2) poços sem canudo, realizados com perfurador metálico, sendo as bactérias dispostas no interior do poço; e (3) em gotas, na qual realizou-se o gotejamento superficial sobre a placa.

A partir do pré-inóculo de cada uma das bactérias, 100 µL foram dispostos em um tubo com 5 mL de meio caldo DYGS (*Dextrose Yeast Glucose Sucrose* - 0,2 g de glicose; 0,1 g de ácido málico; 0,15 g de peptona bacteriológica; 0,1 g de extrato de levedura; 0,05 g de K₂HPO₄; 0,05 g de MgSO₄·7H₂O; 100 mL de água destilada) e incubados por 24 h a 32 °C e 120 rpm. Em seguida, deste inóculo 100 µL foram transferidos para outro tubo contendo 1 mL de meio caldo indutor de enzima (0,2 g de NaNO₃; 0,1 g de K₂HPO₄; 0,05 g de MgSO₄; 0,05 g de KCl; 0,2 g de CMC; 100 mL de água destilada) e no DYGS, em pH 7 e novamente incubados por 24 h a 32 °C no shaker e 120 rpm de rotação.

Após este período, as alíquotas foram centrifugadas durante 15 min a 3.000 rpm a 4 °C. Do sobrenadante, 25 µL foram dispostos centralmente num poço formado por canudos previamente esterilizados (Método 1) e para os poços sem canudo (Método 2). No tratamento de gota (Método 3), 1 µL foi disposto na parte central de cada quadrante da placa de Petri com o meio sólido (0,2 g de NaNO₃; 0,1 g de K₂HPO₄; 0,05 g de MgSO₄; 0,05 g de KCl; 0,2 g de CMC; 1,7 g de ágar; 100 mL de água destilada).

Todos os tratamentos foram incubados em quadruplicata, pelo período de 48 h a 32 °C em estufa. Para finalizar, as placas foram coradas por 15 min com o corante Reativo Azul 5G (RA5G) (1,0 mg/mL) e lavadas com a solução de NaCl 1 M.

A análise semi-quantitativa por meio da medição dos diâmetros dos halos foi realizada por meio de régua graduada e os dados foram submetidos à ANOVA e as médias avaliadas pelo teste Tukey ($p < 0,01$) (CRUZ, 2006).

Resultados e Discussão

A região do gene ribossomal 16S das bactérias foi amplificada pela PCR e um fragmento de 1500 pb DNA genômico foi obtido (Figura 1).

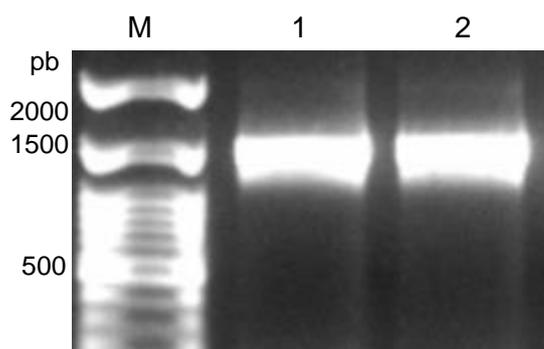


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação por PCR de 1500 pb referente a região do RNA ribossomal 16S de duas amostras bacterianas. M. Marcador de tamanho molecular 100 pb (Norgen). pb (pares de bases). 1. Correspondente a bactéria *Paenibacillus* sp.. 2. Correspondente a *Ochrobactrum* sp.

Com base na amplificação por PCR (Figura 1), foi enviada as amostras para a empresa Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada-RS, assim realizado o sequenciamento. Os resultados do sequenciamento confirmam o isolado 21 como sendo *Paenibacillus* sp. (98% de identidade) e o isolado 103 pertencente ao gênero *Ochrobactrum* sp. (99% de identidade).

A caracterização pela coloração de Gram, apontam o gênero bacteriano *Ochrobactrum* sp. como Gram-negativa, apresentando uma coloração vermelha (Figura 2 - b). Por outro lado, o isolado *Paenibacillus* sp. foi Gram-positiva, apresentando uma coloração roxa/azul (Figura 2 - a).

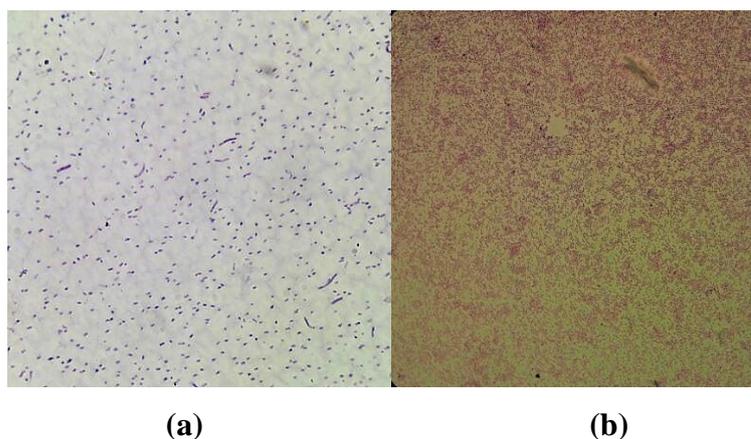


Figura 2: Aspecto visual da coloração Gram nos isolados. (a) *Paenibacillus* sp.; (b) *Ochrobactrum* sp., ambas visualizadas com um aumento de 40x em microscópio ótico.

Visando estabelecer uma metodologia prática e adequada para identificação de cepas bacterianas com potencial celulolítico, foram avaliados diferentes métodos de plaqueamento das culturas, os resultados obtidos na avaliação qualitativa do potencial celulolítico estão demonstrados na Tabela 1. Foi observada a atividade celulolítica nos métodos (1) poços a partir de canudos e (2) poços sem canudo para a cepa *Paenibacillus* sp.. Nestes ensaios, as placas apresentaram halos nas proximidades do local de inoculação, caracterizando a degradação da carboximetilcelulose pela atuação das bactérias por meio da produção e liberação de enzimas celulolíticas. Todavia, a cepa *Ochrobactrum* sp. não apresentou atividade celulolítica por nenhum dos métodos empregados sob as condições avaliadas neste trabalho.

Tabela 1: Resultado dos diferentes métodos utilizados para a análise qualitativo do potencial celulolítico.

Respostas visuais na formação do halo de degradação da celulose						
Estirpe bacteriana	Gota		Poço		Canudo	
	DYGS	CMC	DYGS	CMC	DYGS	CMC
<i>Paenibacillus</i> sp.	N	N	N	P	N	P
<i>Ochrobactrum</i> sp.	N	N	N	N	N	N

N – negativa; P – positiva.

Na Figura 3 é possível visualizar a formação de halos, em torno dos poços obtidos pelos Métodos 1 e 2, devido à degradação da CMC pela cepa da bactéria *Paenibacillus* sp.. Pode-se concluir também que o corante reativo Azul 5G apresentou eficiência como indicador dos halos de atividade celulolítica.



Figura 3: Visualização dos resultados positivos para a bactéria *Paenibacillus* sp. com halos evidentes em meio CMC: (a) Método 1 (poços canudos) e; (b) Método 2 (poços sem canudos).

As respostas da avaliação semi-quantitativa por meio da medição dos diâmetros dos halos obtidos estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Análise semi-quantitativa da atividade celulolítica da bactéria *Paenibacillus* sp..

Quadrante	Diâmetro do halo (cm)	
	Método 1 (Poços com canudos)	Método 2 (Poços sem canudos)
1	0,94	0,94
2	0,92	0,92
3	0,88	0,82
4	0,84	0,85
Média	0,89 ^a	0,88 ^a
Desvio Padrão	0,044	0,049

^a Estatisticamente iguais ao nível de confiança de 99%.

Analisando os resultados dos diâmetros dos halos obtidos para cada método, verificam-se valores similares em torno de entre 0,82 cm e 0,94 cm. Os Métodos 1 (Canudo) e 2 (Poço) não influenciaram significativamente na interpretação dos diâmetros dos halos. Desta forma, é possível afirmar que ambos os métodos são adequados na triagem e identificação de bactérias com potencial celulolítico (Tabela 2).

Desta forma, com base na metodologia proposta, foi possível identificar de maneira adequada o potencial celulolítico da bactéria *Paenibacillus* sp. Também, serão utilizadas as cepas *Paenibacillus* sp. e *Ochrobactrum* sp. como padrão positivo e negativo, respectivamente, para a atividade celulolítica em futuros trabalhos. A literatura reporta diversos gêneros de bactérias que apresentam propriedades celulolíticas: *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Butyrivibrio*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Micrococcus*, incluindo os estudados neste trabalho, *Paenibacillus* sp. e *Ochrobactrum* sp. (GILBERT; HAZLEWOOD, 1993; LIN et al., 2012; SETHI et al., 2013; HUANG; PING; HONGYU, 2012; GRADY et al., 2016).

É importante ressaltar que a indução e, conseqüente, produção de enzimas celulolíticas por microrganismos é dependente de uma série de fatores operacionais como, por exemplo: composição do meio (fontes de carbono, macro e micronutrientes, presença de indutores), temperatura, pH, aeração, quantidade de inóculo, dentre outras (ALMEIDA, 2012).

Asha et al. (2012), estudaram a produção de celulasas por bactérias *Paenibacillus barcinonensis*. Os autores avaliaram diferentes parâmetros operacionais encontrando condições ótimas de produção de celulasas na temperatura (35 °C), pH (7) e efeitos indutores (fonte de nitrogênio) em 0,5% de extrato de levedura.

Os resultados evidenciam a intensa dependência da produção das celulasas para cada cepa específica com tais parâmetros operacionais. Neste sentido, este trabalho fornece base para a triagem e identificação de espécies com potencial de produção de celulasas, as quais devem ser individualmente estudadas visando a otimização tanto do seu crescimento celular, quanto da produção das enzimas.

Conclusões

De maneira geral, é possível concluir que o protocolo qualitativo apresenta elevado potencial para a triagem e identificação de bactérias produtoras de celulasas, caracterizando-se

como um método versátil e rápido, viabilizando a identificação de novas cepas com características celulolíticas diferenciadas.

Agradecimentos

Agradecemos à Comissão Científica do 6º Simpósio de Biotecnologia na Agroindústria idealizado e realizado pelo Curso de Engenharia e Bioprocessos e Biotecnologia em 01 e 02 de junho deste ano pela oportunidade de publicação de nosso trabalho.

Referências

ALMEIDA, M. C. de O. e. **Indução de Celulases e Xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em Cultivo em Estado Sólido a Partir de Substratos Lignocelulósicos.** 145f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

ASHA, B. M. Purification and Characterization of a Thermophilic Cellulase from a Novel Cellulolytic Strain, *Paenibacillus Barcinonensis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, n. 11, p. 1501–1509, 28 nov. 2012.

CAVICCHIOLI, R. Extremophiles and the Search for Extraterrestrial Life, **Astrobiology**, v. 2, p. 281-292, 2002.

CHAVES, E. I. D. L. **Diversidade de bactérias endofíticas obtidas de solos do oeste do Paraná usando milho e trigo como planta isca.** 133f. Tese (Doutorado em Agronomia). Campus de Marechal Cândido Rondon-Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2013.

CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **The Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**. v. 2, p. 121–145, 08 mar. 2011.

CRUZ, C. D. **Programa Genes** – estatística experimental e matrizes. 1. ed. Viçosa: UFV, 2006. V. 1. 285 p.

CRUZ, L. M. et al. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananascomosus* (L.) Merrill). **Appl Environ Microb.** v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DAVIS, B. D. Estrutura bacteriana. DAVIS, B. D. et al. **Microbiologia de Davis: fisiologia e genética bacterianas.** 2.ed. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1979.

EMBRAPA. **Enzimas: a chave da biotecnologia**. Brasília, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/8504625/enzimas-a-chave-da-biotecnologia>>. Acessado em: 09 nov. 2017.

FENGEL, D; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions**, 1ª ed., Walter de Gruyter: Berlin, 1989.

GILBERT, H. J., G. P. HAZLEWOOD. Bacterial Cellulases and Xylanases. **Journal of General Microbiology**, v.139, n.2, p.187–194, 1993.

GRADY, E. N. et al. Current Knowledge and Perspectives of *Paenibacillus*: a Review. **Microbial Cell Factories**. v. 15, n. 1, p. 205, 1 dez. 2016.

HOWARD, R. L. et al. Lignocellulosic biotechnology: issue of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**. v.12, n.12, p. 602-619, 2003.

HUANG, S.; PING, S.; HONGYU, Z. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of *Holotrichia Parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **International Journal of Molecular Sciences**. v. 13, n. 12, p. 2563–2577, 23 fev. 2012.

KIMURA, G. K. **Investigação do potencial celulolítico de bactérias de processo de compostagem**. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

LIN, L. et al. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Electron. J. Biotechnol.**, v.15, n.3, 2012.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endolíticas em cana-de-açúcar**. 93f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARRA, I. F. et al. Efeito do pH, umidade e indutores sobre a produção de celulases por *Trichoderma sp.* em fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.17, n.2, p.125-131, 2015.

MARTINEZ-ANAYA, C. et al. Celulasas fúngicas: aspectos biológicos y aplicaciones em la indústria energética. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**. v. 50, n. 3-4, p. 119-130, set. 2008.

RAMOS, L. P. The Chemistry Involved in the Steam Treatment of Lignocellulosic Materials. **Química Nova**. v. 26, n. 6, p. 863-871, maio. 2003.

SCHEUFELE, F. B. et al. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**, v. 14, n. 3. p. 310-321, 2012.

SETHI, S. et al. Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. **ISRN Biotechnology**. v. 2013, p. 1-7, 5 jan. 2013.

SHAHRIARET, M. et al. Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains. **Stamford J Pharm Sci**. v. 4, p.53–57, 2011.

TEATHER, R. E WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, no. 4, p. 777-780, abr. 1982.

TORTORA, G. J.; FUNK, B. R.; CASE, C. L. O Mundo Microbiano e Você. In:_____. **Microbiologia**. 10° ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 3-4.

YOUNG, J.P.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J Appl Bacteriol**. v. 173, p. 2271-2277, 1991.

ZHANG, Y, -H, P. et al. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.