

CARACTERIZAÇÃO DA DECOMPOSIÇÃO DA PALHA
DE ARROZ E OBTENÇÃO DE MICRORGANISMOS
CELULOLÍTICOS

Lúcio Alberto Forti Antunes

Orientador: Dr. **Rodolpho de Camargo**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1980

A meus avos:

.i.

Henrique e Justina

A meus pais:

José Benedito e Luiza Elza

A meus irmãos:

*José Henrique, Teresa
Cristina e Maria Bea
triz*

À minha noiva:

Olinda Maria

Dedico.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. *Rodolpho de Camargo*, pela segura orientação e amizade demonstradas no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa.Dra. *Marney Pascoli Cereda*, pela amizade, incentivo e dedicação recebidos durante a realização desta pesquisa.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, pelo auxílio concedido desde 1978, na forma de bolsa de estudos, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Tecnologia dos Produtos Agropecuários da Faculdade de Ciências Agrônômicas do Campus de Botucatu - UNESP, pela cessão dos seus laboratórios para o desenvolvimento da parte experimental desta dissertação.

À Profa. Dra. *Maria Aparecida Mourão Brasil* e Prof. Dr. *Affonso Maria de Carvalho* pela colaboração e sugestões recebidas.

À Profa. Dra. *Gracy Mirian Corso*, pelo auxílio prestado na elaboração dos cortes histológicos para a avaliação da degradação da palha de arroz.

Ao Prof. Dr. *Oswaldo Galvão Brasil*, pelo auxílio prestado na fase experimental para a avaliação da atividade enzimica dos microrganismos.

Ao Prof. Dr. *Augusto S. Ferreira Eira*, pelo auxílio na classificação dos fungos.

À Bióloga *Ada Marina Cagliari*, pelo auxílio na realização das análises microbiológicas do solo.

À bibliotecária *Lúcia Vasconcellos de A. Botelho*, pelo auxílio na preparação das referências bibliográficas.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia dos Produtos Agropecuários da Faculdade de Ciências Agrônomicas do Campus de Botucatu - UNESP, pela colaboração prestada durante a realização deste trabalho.

À *Costa Pinto Industrial de Alimentos*, pelo fornecimento de carboximetilcelulose.

A *Deus*, por tudo.

ÍNDICE

RESUMO	vii
SUMMARY	x
1. INTRODUCAO.....	1
2. REVISAO DA LITERATURA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. MATERIAIS	26
3.1.1. PALHA DE ARROZ	26
3.1.2. ÁGUA	26
3.1.3. SOLO	27
3.1.4. ÁGUA DE DRENAGEM DOS SIMULA DORES	27
3.1.5. PALHA DE ARROZ PROVENIENTE DOS SIMULADORES DE CONDIÇÕES NATURAIS DE DECOMPOSIÇÃO	27
3.1.6. SOLO PROVENIENTE DOS SIMULA- DORES	27
3.2. MÉTODOS	29
3.2.1. SIMULADORES DE CONDIÇÕES NATU RAIS DE DECOMPOSIÇÃO DA PALHÃ DE ARROZ	29
3.2.1.1. Montagem dos simula- dores	29
3.2.1.2. Desmontagem dos simu ladores	29
3.2.2. DETERMINAÇÃO DE CELULOSE (FI- BRA)	30
3.2.3. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TO TAL	30

3.2.4. DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO MINE <u>R</u> RAL FIXO (CINZAS)	30
3.2.5. DETERMINAÇÃO DE SÍLICA	30
3.2.6. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE	31
3.2.7. DETERMINAÇÃO DE REDUTORES TO <u>R</u> TAIS	31
3.2.8. DETERMINAÇÃO DO pH	31
3.2.9. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TO- TAIS	31
3.2.10. TEMEPERATURA DOS SIMULADORES	32
3.2.11. TEMPERATURA AMBIENTE	32
3.2.12. UMIDADE RELATIVA AMBIENTE	32
3.2.13. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS AERÓBIOS	32
3.2.14. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS ANAERÓBIOS	33
3.2.15. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS TO - TAIS DOS SIMULADORES	33
3.2.16. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE FUNGOS E LEVEDURAS	33
3.2.17. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE ACTINOMICETOS	34
3.2.18. CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES	34
3.2.19. CONTAGEM TOTAL DE <i>Nitrosomonas</i>	34
3.2.20. CONTAGEM TOTAL DE <i>Nitrobacter</i>	34
3.2.21. CONTAGEM TOTAL DE <i>Azotobacter</i>	35
3.2.22. CONTAGEM DE ESPOROS DE BACTÉRIAS MESÓFI LAS	35
3.2.23. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS	35
3.2.24. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE EN ZÍMICA DOS MICRORGANISMOS ISO LADOS	36
3.2.25. CARACTERIZAÇÃO DA DECOMPOSI- ÇÃO DA PALHA DE ARROZ	36

3.2.26. CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS	37
4. RESULTADOS	38
4.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	38
4.1.1. ÁGUA DE DRENAGEM	38
4.1.2. PALHA DE ARROZ	43
4.1.3. SIMULADORES DE CONDIÇÕES NATURAIS DE DECOMPOSIÇÃO	49
4.1.4. AMBIENTE EM QUE SE ENCONTRAM OS SIMULADORES	52
4.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	55
4.2.1. ÁGUA DE DRENAGEM	55
4.2.2. SOLO	58
4.2.3. PALHA DE ARROZ	62
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZÍMICA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS	64
4.4. AVALIAÇÃO DA DECOMPOSIÇÃO DA PALHA DE ARROZ	65
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	90
7. LITERATURA CITADA.....	93

CARACTERIZAÇÃO DA DECOMPOSIÇÃO DA PALHA DE ARROZ E OBTENÇÃO DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Lúcio Alberto Forti Antunes

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo
Orientador

R E S U M O

A palha de arroz é um dos resíduos agrícolas mais importantes nos dias atuais, não só em termos de quantidade, mas também pelo potencial energético em que se constitui.

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de microrganismos celulolíticos através da decomposição simulada da palha de arroz, tal como ocorre no solo. Foi dada ênfase especial ao tempo necessário para que a degradação ocorra; as alterações físico-químicas que acontecem na palha; a escolha da melhor fase para se obterem microrganismos celulolíticos e ao conhecimento das atividades enzimáticas dos microrganismos celulolíticos participantes do processo.

A degradação da palha de arroz foi levada a efeito em simuladores de condições naturais de decomposição,

constituídos de quatro camadas de solo, de 500 g cada, e três camadas de palha de arroz, de 100 g cada, os quais recebiam 700 ml semanais de água.

As análises realizadas para a palha de arroz proveniente dos simuladores foram: teores de fibra, nitrogênio total, sílica, cinzas, umidade, contagens totais de microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios. No solo dos simuladores foram realizadas a contagens totais de microrganismos aeróbios mesófilos, fungos e leveduras, actinomicetos, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Azotobacter*, bactérias mesófilas e esporos de bactérias mesófilas. Da água drenada dos simuladores analisou-se: acidez titulável, pH, sólidos totais, redutores totais e contagens totais de microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios.

No desenvolvimento do presente experimento pode ser observado que: a decomposição da palha de arroz ocorreu em três fases distintas, sendo que o melhor período para a obtenção de microrganismos celulolíticos esteve compreendido entre 90 e 120 dias; os microrganismos predominantes foram fungos; as interações entre celulose, lignina e sílica dificultaram o ataque microbiano à celulose; os microrganismos que sobreviveram, após exauridos do meio os açúcares de fácil obtenção, foram os portadores dos componentes enzimáticos C_1 e/ou C_x .

A palha de arroz mostrou ser um substrato pouco susceptível de sofrer degradação enzimática. Porém, quarenta e três microrganismos diferentes com atividade celulolítica foram obtidos; quatro dos quais apresentaram atividade para os componentes C_1 e C_x , vinte e três somente para o componente C_x e dezesseis somente para o componente C_1 .

Dos quatro microrganismos que apresentaram atividade para C_1 e C_x , três pertenciam ao gênero *Penicillium*, sendo que um *Penicillium* sp 47- B₂ - mostrou alta atividade celulolítica. O outro organismo isolado com tal atividade foi um *Cladosporium* sp, cujo gênero ainda não foi descrito com atividade celulolítica.

CHARACTERIZATION OF RICE STRAW DECOMPOSITION AND OBTENTION OF CELLULOSE DECOMPOSING MICROORGANISMS

Lúcio Alberto Forti Antunes

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo
Advisor

S U M M A R Y

Rice straw is one of the most important agricultural residues, not only in terms of existing quantities but also due to its energetic potential.

This work had as objective the obtention of cellulose decomposing microorganisms through simulated decomposition of rice straw, as occurring in soil. Special emphasis was given for the time required to it occur; to the knowledge of the physical-chemical alterations which happens in the straw; to the selection of the most suitable phase to obtain cellulose decomposing organisms; and to the knowledge of the enzymatic activities taking part in the process.

Simulated natural degradation of rice straw was carried on simulators constituted on layers of straw, of

100 g each, weekly irrigated with 700 ml of water.

Analysis performed for the rice straw from the simulators were: fiber content, total nitrogen, silica, ash, moisture and total counting of aerobic and anaerobic cellulose decomposing microorganisms. Soil from the simulators was analysed for total counting for mesophilic aerobic microorganisms, yeasts and moulds, actinomycetes, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Azotobacter*, mesophilic bacteria and mesophilic bacteria spores. For the water drained from the simulators, the following analysis were performed: titratable acidity, pH, total solids, total reducing sugars, and total counting for cellulose decomposing aerobic and anaerobic microorganisms.

As the experiments developed the following observations were made: rice straw decomposition occurred in three distinct phases being the best period to obtain cellulose decomposing microorganisms the one between 90 and 120 days; moulds were the most prevalent organisms; interactions between cellulose, lignin and silica bring difficulties to the microbial attack of cellulose; surviving organisms after easy obtention nutrients exhaustion of the media were the carriers of enzymatic components C_1 and/or C_x

Rice straw proved to be a substrate with low susceptibility for enzymatic degradation. However, forty-three different organisms with cellulose decomposing activity were obtained; four of these presented activities for the enzymatic C_1 and C_x components, twenty-three for the C_x component and sixteen for the C_1 component. Three of four

organisms with activity for the $C_1 - C_x$ complex belong to the genus *Penicillium*, but only one - *Penicillium* sp 47 B₂ showed high activity. Another organism - *Cladosporium* sp. was call to a genus until now never described with this ability.

1. I N T R O D U C A O

A celulose ocupa o primeiro lugar dentre as substâncias orgânicas produzidas pela natureza. Se se considerar que a quantidade de anidrido carbônico que está fixada na celulose das plantas é de 1.100 bilhões de kilogramas, verifica-se que é aproximadamente a metade do que contém a atmosfera. Disso se deduz quão importante é que, por processos naturais de decomposição, a celulose seja novamente transformada em seus componentes originais: anidrido carbônico e água, para que não suceda um paulatino empobrecimento da atmosfera, em carbono.

Devido a grande disponibilidade de certos resíduos agrícolas que contém celulose, como palha de arroz, bagaço de cana e casca de amendoim, alguns pesquisadores têm procurado um melhor aproveitamento para tais resíduos.

A palha de arroz tem papel fundamental entre os resíduos celulósicos, uma vez que segundo levantamento - realizado nas indústrias ligadas ao assunto, um dos problemas com que se deparam as máquinas de beneficiamento de arroz e o destino que se dará à palha. Em média, uma sacada de arroz de 60 kg produz 40 kg de arroz beneficiado, 15 kg de palha e 5 kg de farelo. Na beneficiadora, o farelo é vendido para complementação alimentar de animais e a palha é dada a agricultores que a utilizam como cobertura morta em canteiros ou outras finalidades. Porém, o mercado consumidor da palha é pequeno, em relação à produção desse sub-produto, o que obriga o beneficiador a pagar para que a retirem de sua máquina. O aproveitamento desse resíduo diminuiria esse problema além de fornecer uma melhor utilização para este valioso potencial energético.

Os estudos da degradação de celulose, especialmente por microrganismos, ou suas enzimas, têm se direcionado apenas para culturas puras, em condições de laboratório.

Acredita-se, porém que uma melhor degradação deva ocorrer através de sinergismo entre os microrganismos, assim como acontece na natureza. Além disso, o estudo com microrganismos que habitam o solo e estão em contato direto com a celulose reflete, de maneira mais real, o fenômeno natural.

O conhecimento dos fatores que envolvem a degradação da palha de arroz no solo trará, sem dúvida, marcos importantes para a utilização futura desse material, através de fermentações que permitam o desdobramento da longa cadeia de celulose em substrato utilizável para suplementação alimentar ou para a produção de compostos orgânicos, como álcoois ou ácidos.

A realização deste trabalho teve como objeti-

vo estudar a degradação simulada da palha de arroz, tal como ocorre no solo, com ênfase especial ao tempo necessário, para que a degradação aconteça; as alterações físico-químicas que acontecem na palha e, ainda, a escolha da melhor fase para se obterem microrganismos celulolíticos, bem como o conhecimento da atividade celulolítica dos microrganismos que estiveram em contato com a palha.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza, constituindo, aproximadamente de um terço à metade das quase 150 bilhões de toneladas de materiais orgânicos que são fotossintetizados anualmente (HALL e SLESSOR, 1976 e SHEWALE e SADANA, 1978). É um carboidrato, apresentando uma estrutura polimerizada complexa, formada por unidades de D-glicose unidas por ligações beta, em posição 1-4 (WILKE, 1977), num total de 1.400 a 10.000 unidades por molécula (ALEXANDER, 1961). Localiza-se na parede celular, na forma de unidades microscópicas em forma de bastão denominadas micelas, as quais se agrupam em estruturas maiores com 10 a 20 micelas, chamadas microfibrilas, que se reúnem em estruturas denominadas fibrilas (NORKANS, 1967 e FREIRE, 1975). Outros compostos, como xilanas, mananas, poliuronides, arabanas e galactanas, são encontradas na parede celular ligados à

à celulose, sendo denominadas celulosanas (FREIRE, 1975). Outro constituinte dos vegetais é a hemicelulose que, diferentemente da celulose, é um polímero de xilose, com um grau de polimerização dez vezes menor que esta (WILKE, 1977).

A palha de arroz representa papel importante dentre os resíduos celulósicos, não só em termos de quantidade como de composição. De acordo com HAN e ANDERSON (1974), a palha de arroz tem a seguinte composição, em porcentagem de matéria seca: proteína crua 4,5, extrato etéreo 1,5, fibra crua 35,0, lignina 4,5, celulose 34,0, nutriente digestível total 43,0, extrato não nitrogenado 42,0, cinzas 16,5, sílica 14,0, potássio 1,2, cálcio 0,19, magnésio 0,11, fósforo 0,10 e enxofre 0,10.

O potencial constituído pela celulose demonstra a importância de sua utilização. Da degradação natural se ocupam em primeiro lugar os microrganismos: bactérias e fungos; e, somente uma parte relativamente pequena da celulose encontra sua destruição por outros caminhos, tais como digestão por animais invertebrados e combustão (KARRER, 1933). Apesar disso, poucos são os trabalhos que tratam da decomposição tal como ocorre na natureza.

A decomposição da celulose no solo é influenciada por alguns fatores ambientais que atuam diretamente sobre a decomposição ou sobre a atividade dos organismos envolvidos no processo. Exemplos desses fatores são: disponibilidade de nitrogênio, temperatura, aeração, umidade, pH, etc.. (ALEXANDER, 1961).

De acordo com ALEXANDER (1961), o nitrogênio é um fator limitante na decomposição da celulose. A depen-

dência entre a decomposição da celulose e o nitrogênio disponível é evidente pela correlação entre a decomposição da celulose, a capacidade de mineralização do nitrogênio e o nível de nitrato no solo.

A utilização da celulose é realizada em todos os níveis de temperatura de desenvolvimento microbiano, sendo maior na faixa ótima de crescimento dos microrganismos envolvidos (ALEXANDER, 1961). PAL et alii (1975) estudando

a decomposição da palha de arroz a $7,2^{\circ}$, 22° e 37°C em solos com 60% de retenção de água verificaram que a $7,2^{\circ}\text{C}$ um terço do carbono da palha era perdido após quatro meses de incubação, e que nas outras três temperaturas, a porcentagem de perda de carbono se iniciava após seis dias. Para esses pesquisadores, o aumento da temperatura não tem influência na natureza do efeito primário de decomposição, o qual era positivo no período de incubação; ou seja, a temperatura age apenas no sentido de estimular o crescimento microbiano que atuará na decomposição do resíduo, não exercendo efeito posterior sobre o mecanismo de decomposição da palha de arroz.

A aeração tem influência na composição da microflora. Em ambientes mal drenados predominam bactérias

celulolíticas, ao passo que os fungos e actinomicetos são reduzidos. Devido à pouca eficiência energética das reações anaeróbias, a taxa de metabolismo da celulose em ambientes deficientes de O_2 é bastante reduzida em relação ao ambiente aeróbio (ALEXANDER, 1961).

Enquanto o pH neutro e ligeiramente alcalino parece beneficiar a maioria dos microrganismos celulolíticos, ambientes ácidos favorecem os fungos. Os carboidratos existentes em certos resíduos agrícolas, como sabugo de milho, estimulam a decomposição da celulose, ao que parece, por serem mais facilmente utilizáveis e proporcionarem um maior crescimento dos organismos ; esgotado o suprimento desses carboidratos, a flora já terá se adaptado à celulose (ALEXANDER, 1961) , e a partir desse instante há uma estabilização na velocidade de decomposição.

SAIN e BROADBENT (1975) estudando a influência da absorção de umidade e umidade relativa na palha de arroz, verificaram que num estágio inicial da decomposição o nível de umidade é um fator importante, relacionado com o início do crescimento fúngico. Segundo tais pesquisadores, a decomposição da palha a diversos níveis de umidade relativa mostra-se desigual pela diferença existente em tipos de microrganismos que podem crescer na palha, já que cada microrganismo tem um valor mínimo de umidade requerida para seu crescimento. O conteúdo de umidade da palha de arroz, exposta a umidades relativas constantes, aumenta com o tempo, especialmente acima de 90%. Dessa forma, os autores concluíram que resíduos vegetais enterrados ou deixados na superfície do solo podem ficar suficientemente úmidos para permitirem decomposição apreciável por longos períodos.

A flora capaz de decompor a celulose inclui bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias, fungos, actinomicetos e poucos protozoários, sendo que os organismos celulolíticos são comuns nos habitats mais diversos de aeração,

pH, umidade e temperatura (FREIRE, 1965).

ALEXANDER (1961) relata que os fungos são os principais microrganismos celulolíticos em solos úmidos, e que na degradação dos resíduos florestais, os basidiomicetos são os mais especializados. Na verdade, a posse de enzimas celulolíticas é muito mais comum entre os fungos do que entre bactérias, sendo que bactérias aeróbias assimilam 5-10%, actinomicetos 15-30% e fungos 30-40% do substrato de carbono do solo.

Após tratamento de um solo com celulose, há um significativo aumento do número de fungos. Contagens desses microrganismos, em placas, a mais de 10^6 organismos/g de solo são comuns durante a decomposição de palha acrescida de NaNO_3 . Bactérias aeróbias mesófilas celulolíticas são pouco abundantes em solos sem tratamento com celulose, constituindo uma população de 10^2 a $5 \cdot 10^4$ organismos/g de solo (ALEXANDER, 1961).

Alguns dos principais generos de fungos relacionados na decomposição da celulose são: *Alternaria*, *Aspergillus*; *Chaetonium*, *Coprinus*, *Fomes*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Rhizoctonia*, *Sporotrichum*, *Stachybotris*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium* e *Zigorhynchus* (POCHON, 1963; FREIRE, 1975 e COUTTS e SMITH, 1976). Alguns dos principais generos de bactérias que degradam a celulose são: *Achromobacter*, *Angiococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Polyangium*, *Pseudomonas*, *Sorangium*, *Sporocytophaga* (POCHON, 1963; FREIRE, 1975 e COUTTS e SMITH, 1976). Dentre os principais actinomicetos degradadores de celulose estão: *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptomyces* e

Streptosporangium (FREIRE, 1975). Os víbrios descritos como degradadores de celulose são os pertencentes ao gênero - *Cellvibrio* (BREUIL e KUSHNER, 1976).

A grande disponibilidade dos resíduos agrícolas nos dias atuais tem despertado interesse para seu melhor aproveitamento, principalmente devido à crise de energia e alimentos pela qual o mundo passa atualmente. Uma vez que esses resíduos são ricos em celulose, e esta ser renovável (ARAKAKI, 1977), alguns pesquisadores têm tentado as mais diferentes utilizações para tais resíduos. Assim, MENEZES et alii (1976) investigaram a introdução dessas fontes de celulose, como fonte de carbono, em meios de cultura para microrganismos; outros pesquisadores, como LEPAGE e BORZANI (1973), BELLAMY (1974) e HITCHNER e LEATHERWOOD (1980), estudaram a produção de concentrados proteicos-vit_umínicos por microrganismos, utilizando os resíduos agrícolas como matéria prima. Outra utilização para tais resíduos é a produção de enzimas celulolíticas para a aplicação industrial (MENEZES et alii, 1972; ARAKAKI, 1977 e STERNBERG et alii, 1977). Estas enzimas podem ser utilizadas como agentes de amolecimento de certos tecidos vegetais como cenoura e coco (MENEZES et alii, 1972), ou então, empregadas na fermentação de produtos celulósicos (HAN e ANDERSON, 1974 e WILKE, 1976); sendo que em alguns países, como o Japão, são empregadas na fabricação de tabletes digestivos (MENEZES et alii, 1972).

Nos estudos de MENEZES et alii (1972) referentes à introdução de palha de arroz, como fonte de carbono em meio de cultura para microrganismos, verificou-se que esse material apresentou rendimento menor que bagaço de cana, porém, maior que casca de amendoim. O baixo rendimento de

palha de arroz e da casca de amendoim, segundo os pesquisadores, provavelmente se deve ao elevado teor de lignina desses resíduos, já que se sabe que a resistência oferecida pela celulose a ação enzimica aumenta com o aumento do teor de lignina.

De acordo com HAN e ANDERSON (1974), mais da metade do peso seco da palha é constituído de celulose e hemicelulose, e o restante compreende lignina, compostos nitrogenados e sílica, principalmente. Assim, os pesquisadores relatam que a palha contém celulose suficiente para servir como excelente fonte de energia para ruminantes, após fermentação, uma vez que a celulose e a hemicelulose da parede celular podem ser atacadas por microrganismos celulolíticos e serem decompostas. No entanto, como a palha apresenta em torno de 15% de sílica (SiO_2) na matéria seca, esse componente dificulta a digestibilidade da palha, ou seja, o ataque microbiano que promove um aumento da decomposição.

Segundo TARKOW e FEIST (1969) um tratamento alcalino promove uma dilatação das fibras de celulose e uma melhor penetração das enzimas celulolíticas. Para HAN e ANDERSON (1974) a utilização combinada de celulase e lignase no tratamento da palha e que traria melhor solução para a hidrólise enzimica, com vista à sua decomposição, pois o complexo lignina-celulose da parede da célula constitui o grande obstáculo às enzimas que degradam a celulose (HAN et alii, 1975). Essas observações foram confirmadas por SHEWALE e SADANA (1979) quando submeteram palha de arroz, previamente moída e autoclavada com NaOH 0,25N a 121°C por 1 h, a sacarificação por *Sclerotium rolfsii*. Esses pesquisadores observaram que após 40 horas havia uma produção quatro vezes maior de açúcares redutores. Também nesse mesmo perío-

do de tempo, a porcentagem de sacarificação era quatro vezes maior do que quando da utilização de palha não tratada quimicamente.

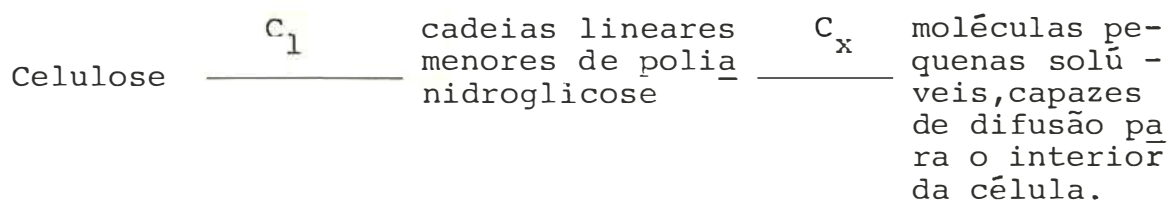
A confirmação de que a palha de arroz pode se tornar uma fonte potencial para suplementação alimentar, após fermentação, como descrito por HAN e ANDERSON (1974), vem do trabalho de LOBO et alii (1953). Segundo estes pesquisadores, após uma hidrólise química com ácido sulfúrico a 3% e sob aquecimento de 121°C por 2 h, a palha de arroz, apresenta uma constituição de 22,10% de redutores totais, 19,65% de pentose; 0,05% de furfural livre e 3,01% de cinzas. Portanto, é um substrato com cerca de 20% de açúcares fermentáveis, podendo se constituir num razoável meio de cultura, uma vez corrigidas as deficiências nutricionais.

O emprêgo da palha de arroz como fertilizante também foi tentado. Dessa forma, DHAWAN e MAHAJAN (1968) verificaram que a adição de 8.250 kg/ha de palha, conseguiu reduzir o pH de um solo alcalino de 9,88 para 8,45 quando se utilizava uma camada de 0-15 cm. Porém, a adição acima de 3.750 kg/ha não parece ser rentável.

Embora as mais diversas utilizações tenham sido testadas nas diferentes fontes de celulose, é na degradação, por via enzimica, que os pesquisadores têm concentrado suas atenções. A produção e modo de ação das enzimas celolíticas, bem como os microrganismos que possam apresentar essas enzimas atraíram o interesse dos pesquisadores. Dessa forma, maior atenção tem sido dada para a conversão de celulose, que a resíduos ricos nesse carboidrato, utilizados em operações agrícolas e manufatura de produtos de madeira (COUTTS e SMITH, 1976).

STUTZENBERGER et alii (1970) estudando a compostagem de resíduos sólidos, verificaram que um dos problemas da mesma é a não degradação de materiais celulósicos. Verificaram também, que durante a primeira semana do processo ocorre uma queda de pH devido à formação de ácidos durante o metabolismo de outros carboidratos que não a celulose.

Embora as atividades de microrganismos celulolíticos intactos (não apresentam enzimas livres de célula), tenham sido descritas desde 1912, somente nas últimas décadas é que sistemas livres de células têm sido obtidos com efeito similar ao micélio intacto nas hidrólises de celulose a açúcares (HALLIWEL e RIAZ, 1970). Esses estudos tiveram início com o trabalho de REESE et alii (1950), quando propuseram o conceito do completo enzimático $C_1 - C_x$. Segundo REESE et alii (1950), a habilidade em desenvolver uma enzima capaz de hidrolisar ligações de β -1,4-glicosídeos é comum entre os microrganismos, mas a habilidade de microrganismos em utilizar celulose como substrato é mais restrita. Assim, fungos não celulolíticos podem se utilizar de carboximetilcelulose. Os autores mostraram que o primeiro passo na hidrólise de celulose natural se deve ao componente C_1 do sistema enzimático da "celulase", o qual prepararia as cadeias de glicose para a ação de outro componente, o C_x , como no esquema seguinte



Organismos não - celulolíticos

Organismos celulolíticos

O fato de organismos não - celulolíticos serem portadores do componente C_x , se deve à descoberta de que tais microrganismos, quando em meio contendo uma fonte de celulose, promovem uma liberação de açúcares redutores, caindo essa liberação com o passar do tempo. Essa hipótese foi sustentada com estudo de microrganismos do gênero *Aspergillus* que não são necessariamente celulolíticos. Tais microrganismos eram viáveis na produção de açúcares redutores (medidos como glicose) de carboximetilcelulose, conseguindo 0,18 a 0,40 mg de glicose/ml para *Aspergillus flavus* QM-10_e e 0,33-0,36 mg de glicose/ml para *Aspergillus sydowi* QM-31_c. Em contrapartida, os microrganismos celulolíticos testados para comparação, chegaram a produzir 0,54 mg de glicose/ml. Pode se concluir, portanto, que a utilização de população mistas torna a hidrólise mais eficiente (LEE e BLACKBURN, 1975).

Segundo REESE et alii (1950), nenhum organismo é capaz de produzir C em ausência de substrato que contenha ligações glicosídicas β -1,4, já que a produção do componente C_x é uma resposta à presença de tais ligações. À vista disso é que POCHON (1963) afirmou que a celulólise representa um exemplo maior do papel das associações sinérgicas dentre todos os meios naturais.

Os estudos de REESE et alii (1950) serviram de base para o desenvolvimento da pesquisa da conversão de celulose em açúcar simples. Assim, o mecanismo de degradação da celulose foi revisto, comprovando-se que três enzimas estariam envolvidas nessa degradação: o fator C_1 , que agiria sobre as cadeias maiores de celulose fibrosa para romper em cadeia, ainda que muito longas de 1-4 glicosídeo, sendo, portanto uma enzima de contato; o fator de C_x , rompendo as cadeias em fragmentos de celobiose; e uma terceira enzima

que hidrolisaria a celobiose em glicose (POCHON, 1963), chamada β -glicosidase (STERNBERG et alii, 1977).

WOOD (1968) apresentou uma teoria onde relata que os microrganismos apresentam uma enzima celulolítica Cx que somente ataca a celulose após tratamentos químicos, e outra, C₁, que é capaz de atacar celulose insolúvel altamente organizada, tornando-a susceptível a um subsequente ataque de enzimas Cx. No entanto, isolou um outro componente C₁ que era independente da atividade Cx e não solubilizava algodão. Mas, WOOD (1968) concorda que, de um modo geral, o que ocorre é uma atividade associada com Cx. Para o pesquisador, os sistemas enzimáticos dos microrganismos podem ser diferentes; e com certeza o sistema de *Trichoderma viride* e *Trichoderma koningii* são diferentes, sendo que as enzimas agem em qualquer ligação β -1,4, da molécula da celulose.

Nos estudos de GUPTA e HEALE (1971), a produção de enzimas celulolíticas é definida como um fenômeno adaptativo, tanto que na ausência de celulose o complexo enzimático não é formado em quantidades detectáveis, embora seja quando induzido por produtos da hidrólise, como celobiose, ou outros polissacarídeos que contenham ligações beta, como lactose. Por outro lado, WHITNEY et alii (1969) estudando a composição da fração Cx de *Verticillium albo-atrum*, na presença de celulose ou celobiose, descobriram que tal componente era constituído de 3 fragmentos, os quais apresentaram os seguintes pesos moleculares: 75.000, 32.000 e 16.000; e mais, a incubação de Cx com carboximetilcelulose produzia somente celobiose e alguns polímeros de médio comprimento. A obtenção desses três componentes sugere que suas ações estejam restritas às superfícies expostas e a liberação de cadeias terminais, já que moléculas com esses tamanhos teriam dificuldades em penetrar na célula da

parede das plantas para degradar a celulose.

REESE et alii (1959) mostraram que, quando ocorre ataque enzimico à celulose para a produção de celobiose, há a formação de um composto intermediário que é celotriose. Porém, a presença de celobiose elimina a possibilidade do microrganismo utilizado - *Streptomyces* sp QM B814 - apresentar um mecanismo diferente dos demais microrganismos.

SELBY e MAITLAND (1967), contrariando REESE et alii (1950), mostraram que carboximetilcelulase isolada não tem efeito detectável, em formas altamente organizadas de celulose. Assim, o fato de *Verticillium albo-atrum* poder utilizar-se dela, como única fonte de carbono seria uma circunstância evidência da presença do componente C_1 .

Para HALLIWELL e GRIFFIN (1973), embora o componente C_1 possa atuar independentemente do componente Cx, sua ação se torna mais rápida e efetiva na presença de Cx, ou ainda, segundo BERGHEN et alii (1975), por remoção contínua da celobiose, ou por hidrólise da celobiose através de β -glicosidase.

Na revisão realizada por NORKANS (1969) definiu-se que o ataque inicial à celulose cristalina se deve somente ao componente C_1 , por remoção de terminais da cadeia, mas em celulose amorfa, o ataque sobre as cadeias relativamente longas é feito ao acaso, por uma endoglucanase que tem maior afinidade por tais substratos que C_1 . Essa idéia é compartilhada por BETRABET e PATEL (1969). O fato descrito por WOOD e McCRAE (1972) de que seria Cx e não C_1 quem iniciaria o ataque em celulose bruta por prover grupos finais por ação de C_1 , é contestado por HALLIWELL e GRIFFIN

(1973), uma vez que, para tais pesquisadores, a exposição de grupos terminais não é essencial para ação de C_1 ; a enzima sozinha é capaz de iniciar a hidrólise e gerar grupos finais de substratos celulósicos de alguma complexidade, sem a adição de Cx.

Em complementação ao trabalho de HALLIWELL e RIAZ (1971), WILKE (1977) propõe que a hidrólise completa da celulose envolve cinco tipos de enzimas e não três como era admitido. Assim, a primeira ação seria a de uma endocelulase (C_2) que cortaria as longas fibras celulósicas em porções menores, agindo a seguir uma celobioidrolase (C_1), que diminuiria o grau de polimerização da parte cristalina em 200 ou menos. Dois componentes de β -glucanase (Cx) levariam então, a degradação até celobiose; seguida pela ação de uma β -glicosidase que transformaria celobiose em glicose. No entanto, costuma-se caracterizar a atividade do complexo enzimático da celulase em termos de atividade C_1 (ação contra algodão, uma celulose cristalina) e atividade Cx (ação contra carboximetilcelulose, ou ainda em termos de atividade total (ação contra papel de filtro Whatman-FPA), segundo MANDELS e WEBER (1969), PEITERSEN (1975) e WILKE (1977).

A despeito da problemática do mecanismo de de gradação enzimática, há um consenso de que a ação do complexo enzimático da celulose desenvolve-se em três fases (STERN BERGER, 1976 e ARAKAKI, 1977):

- a - endoglucanase (s) ou endo- β -1,4-glucanase - age nas ligações beta 1,4 da celulose, no interior da molécula, ao acaso, produzindo glicose e oligossacarídeos.
- b - celobioidrolase ou exo- β -1,4-glucanase - age nas ligações beta 1-4 da celulose, do lado não redutor da molécula de celobiose, produzindo apenas glicose.

c - β -glicosidase ou celobiase - age sobre a celobiose (dímero de glicose) produzindo duas moléculas de glicose.

Os produtos que aparecem no final da ação hidrolítica de enzimas sobre a celulose, em maior quantidade, são glicose e oligossacarídeos maiores (LEE e BLACKBURN, 1975; STERNBERG, 1976 e WILKE, 1977).

Segundo SHEWALE e SADANA (1978) as enzimas que compoem o sistema de enzimas múltiplas da celulase são produzidas, aparentemente, durante o ciclo ativo dos microrganismos, uma vez que foi observado haver estreita correlação entre a formação de enzimas e a quantidade de proteína extracelular.

Em fungos, a celulase é uma enzima adaptativa. No entanto, o substrato indutor - celulose - é insolúvel (MANDELS e REESE, 1960). Para MANDELS e REESE (1960) e possível que produtos solúveis da ação enzimica sejam os indutores naturais das enzimas que atacam substratos insolúveis. De acordo com esta teoria, pequenas quantidades de enzimas induzíveis são produzidas mesmo na ausência do indutor. Quando o substrato está presente, e hidrolisado a produtos solúveis que penetram na célula e induzem mais enzimas. Para esses pesquisadores a celobiose atua como indutor natural de celulose, sendo que *Trichoderma viride* crescido em meio com celobiose, produziu cinco vezes mais celulase, medida como Cx, que quando crescia em meio de celulose. Por outro lado, esses mesmos pesquisadores se antecipam em dizer que em *Trichoderma viride* a celobiose não é um indutor direto, mas atua como um intermediário no mecanismo de indução. Porém, em meio de celulose, celobiose, assim como outros oligossa-

carídeos - lactose, celobiose octacetato, salicina e soforose - atuam como reais indutores da celulase.

Diferentemente do que MANDELS e REESE (1960) mostram, BREUIL e KUSHNER (1976) verificaram que celobiose, assim como glicose, para *Cellvibrio gilvus*, atua como inibidor da produção de celulase. Para BREUIL e KUSHNER (1960) a melhor fonte de carbono para a produção de celulase é uma mistura de carboximetilcelulose (0,1%) e celulose (0,8%). Nessas condições *Cellvibrio gilvus* produziu, após 95 horas de incubação a 30°C em agitador recíproco, 105 unidade de Cx/ml.

Outra substância com efeito comprovadamente indutor é a soforose. De acordo com STERNBERG e MANDELS (1979), soforose (2-0- β -glucopiranosil-D-glicose) induz atividade contra carboximetilcelulose (Cx) em *Trichoderma reesei* QM 6a entre 1,5 a 2 h numa concentração de 1,5 mg por ml. Relatam os pesquisadores que a maior parte da enzima aparece após a soforose ter sido absorvida, mas a presença do indutor é necessária para manter a síntese da enzima, que aparece simultaneamente no meio de cultura e no micélio, não se acumulando em níveis apreciáveis no micélio. Segundo os pesquisadores, a síntese e a secreção da enzima são eventos fortemente associados afetados pelas interações da superfície com o micélio.

Segundo BREUIL e KUSHNER (1976), a produção de enzimas celulolíticas se inicia sempre após o total esgotamento de glicose no meio, sendo que para haver produção da enzima há necessidade de ocorrer um contato entre célula de microrganismo e fibra de celulose.

Além das substâncias conhecidas como indutoras.

da formação de enzimas celulolíticas, existem outras que podem agir inibindo essa formação, como celobiose e metocel, ou outras que inativam tais enzimas, como halogênicos, metais pesados e detergentes (ARAKAKI, 1977).

A enzima produzida por *Trichoderma viride* é inibida também por íons inorgânicos, tais como Ag^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} ; por outro lado, sais de Mg^{2+} , Na^+ , Cd^{2+} e CoCl_2 e NaF ativam a ação enzimática (MANDELS e REESE, 1960 e ARAKAKI, 1977).

WHITNEY et alii (1969) estudando a formação de celulase, como Cx, por *Verticillium albo-atrum* em talos de plantas infectadas, tanto vivas como mortas, verificaram que em plantas mortas os valores de carboximetilcelulase (Cx) eram muito maiores que na planta viva, evidenciando que a enzima somente era produzida em grandes quantidades após a morte do tecido. Essa quase completa repressão por toda a fase parasítica poderia ser explicada, segundo os autores, por uma inibição da produção enzimática por açúcares, como sacarose e glicose.

A invasão saprofítica, que promove alta produção enzimática, somente se dá após exauridos todos os açúcares assimiláveis; fato que é totalmente concordante com as deduções de BREUIL e KUSHNER (1976).

A síntese de enzimas celulolíticas está submetida a um mecanismo de regulação por produtos de hidrólise através de um mecanismo indutor-repressor (NORKANS, 1969). Os estudos com culturas tratadas com tolueno em celulose sob diferentes formas, evidenciam uma susceptibilidade diferente à hidrólise enzimática, sugerindo que a liberação hidrolítica de mais de 0,01 mg de glicose/ml/48 horas envolve uma regulação entre indutor e repressor da síntese enzimática.

NORKANS (1969) afirma que a produção de enzimas celulolíticas se deve a uma secreção ativa no meio de cultura, uma vez que a atividade das preparações de quantidades correspondentes de micélio quase sempre é baixa.

Embora muitos autores tenham concentrado seus estudos no modo de ação das enzimas celulolíticas, alguns têm procurado elucidar a questão da formação e localização de tais enzimas. Como a celulose, sob condições fisiológicas, é insolúvel, sendo, portanto, impenetrável na membrana celular dos microrganismos, pode-se concluir que as enzimas que degradam a celulose devam estar localizadas na superfície da célula ou fora dela (NORKANS, 1969; LEE e BLACKBURN, 1975; BERG e PETTERSSON, 1977. e BERG, 1978).

BERG et alii (1972) sugerem que as enzimas celulolíticas devam estar localizadas na superfície da célula, pelo fato dos organismos celulolíticos crescerem em contato com a celulose. BERG (1975), BERG e HOFSTEN (1976) e BERG e PETTERSSON (1977) afirmam que as enzimas celulolíticas não precisam estar necessariamente fora da célula, já que durante a celulólise pode ser observado que enzimas extracelulares estão presentes nas paredes das células quando nas fases estacionária e pós-estacionária de crescimento microbiano, liberando-se somente na fase exponencial.

BERG e PETTERSSON (1977) propõem que, como as enzimas do complexo celulase contêm os mesmos carboidratos que a célula da parede microbiana, as enzimas podem estar limitando a parede, e ainda, retendo alguns dos carboidratos da célula, quando liberados por lise. Como carboximetilcelulase e β -glicosidase não foram solubilizadas nos tratamentos sônicos com Triton X-100, BERG e PETTERSSON (1977) concluíram que esses componentes do complexo enzimático da celu-

lose não se localizam no limite da membrana, e sim fora dela.

Muitos são os métodos para a determinação da atividade celulolítica dos microrganismos, o que dificulta uma real comparação entre os trabalhos publicados. MANDELS e REESE (1960), determinando a atividade do componente Cx, a pH 6,0, com adição de 1,0 g/l de proteose-peptona ao meio de cultura, verificaram que *Penicillium lilacinum* QM4 teve uma produção de 0,3 U/ml quando o substrato era tanto celulose como lactose. Por outro lado, no mesmo trabalho foi visto que *Trichoderma viride* QM 6 apresentou uma formação

a

de 97 U/ml em celulose como fonte de carbono; Basidiomiceto QM 806 produziu 100 U/ml também em cellose porém 3,8 U/ml em celobiose. *Aspergillus luchuensis* QM 873 produziu Cx a 2,0 U/ml em celulose, 1,7 U/ml em celobiose e 0,9 U/ml em lactose. Altas atividades também tiveram *Penicillium helicum* QM 1852 (32,0 U/ml em celulose) e *Myrothecium verrucaria* QM 460 (26,0 U/ml em celulose).

JOHANSSON (1966), realizando estudo comparativo, quanto a atividade celulolítica, em fungos brancos e marrons degradadores de celulose, e utilizando em meio basal celulose como principal fonte de carbono, verificou que os fungos marrons são mais viáveis para atacar celulose que os brancos. Para tal, mediu a atividade celulolítica através de método turbidimétrico, conseguindo para *Polyporus hirsutus* (fungo branco) atividade de C_1 de 270 após duas horas e, 345 após uma hora, e para *Polyporus sericeo-mollis* - 20, após duas horas e 30, após uma hora. Vale ressaltar que os resultados de JOHANSSON (1966) não são expressos em unidade de enzima, mas em decréscimo do valor turbidimétrico, a partir de 500.

WOOD (1968), estudando a produção e a atividade de carboximetilcelulase (Cx) de *Trichoderma koningii* I. M.I. 73022, utilizando-se para a medida da enzima de tampão acetato 0,2M, a pH 5,4, e determinando a atividade por liberação de açúcares redutores equivalentes a 20 mg de glicose, verificou que esse microrganismo tinha uma atividade Cx de 0,08 U/ml, após cinco dias de crescimento a 27°C; 0,13 U/ml, após 10 dias e 0,20 U/ml, após 35 dias de crescimento.

STUTZENBERGER (1971) relatou que um actinomiceto (*Thermomonospora curvata*) isolado de resíduo municipal sólido apresentou, após 3 dias de incubação a 55°C e 180 r.p.m., uma atividade C₁ de 0,03 U/ml e Cx 3,0 U/ml, sendo que as atividades foram medidas por liberação de açúcares redutores.

LEE e BLACKBURN (1975) observando a formação de enzima celulolítica em carboximetilcelulose e algodão como substratos, puderam verificar que o organismo testado (*Clostridium* sp) apresentou uma atividade do componente C₁ de 0,028 U/ml e do componente Cx de 0,269 U/ml, após 4 dias de crescimento a 60°C. As determinações de atividade foram baseadas na liberação de açúcares redutores. Segundo BREUIL e KUSHNER (1976), *Cellvibrio gilvus* ATCC 13127 atinge o máximo de atividade Cx a 110 h de incubação em agitador recíproco a 30°C, quando mostra uma atividade de 10 U/ml, ou 8 U/ml com 96 horas de incubação. Os pesquisadores utilizaram papel de filtro Whatman nº 1 como fonte de celulose, e mediram a atividade pela liberação de açúcares redutores. *Sporotrichum thermophile* UAMH 2015 crescido em meio contendo "Solka-Floc" como fonte de carbono e inoculado em agitador recíproco a 45°C, apresentou uma atividade de C₁ de 9,9 U/ml e de Cx de 13,6 U/ml, quando a fonte de nitrogênio

era NaNO_3 . Com uréia como fonte de nitrogênio, a pH 5,0 a atividade de C_1 foi 9,6 U/ml e a de Cx de 14,4 U/ml (COUTTS e SMITH, 1976).

MENEZES et alii (1976) utilizando meio com bagaço de cana como fonte de celulose e principal fonte de carbono isolaram um basidiomiceto, denominado 50F, que se mostrou uma fonte tão boa do complexo celulolítico C_1 - Cx quanto as linhagens altamente produtivas de *Trichoderma viride*. Testando o basidiomiceto 50F e outros microrganismos conhecidamente celulolíticos obtiveram os seguintes resultados de avaliação enzimica, após 4 dias de incubação a 30°C em agitador rotativo a 25 r.p.m.: basidiomiceto 50F 0,20 U/ml para C_1 e 0,87 U/ml para Cx; *Geotrichum* 5F 0,10 U/ml para C_1 e 0,30 U/ml para Cx; *Myrothecium verrucaria* NRRL 2003 0,0 U/ml para C_1 e 1,30 U/ml para Cx; *Trichoderma viride* QM 9123 0,19 para C_1 e 1,40 para Cx. Os mesmos pesquisadores, determinando apenas o componente C_1 de alguns microrganismos, verificaram que basidiomiceto 50F produziu 0,13 U/ml, *Geotrichum* 5F 0,039 U/ml e *Myrothericum verrucaria* 0,11 U/ml, sob as mesmas condições utilizadas na determinação do complexo C_1 -Cx. As unidades foram medidas pela liberação de açúcares redutores.

BERG (1978) verificou por método colorimétrico, que *Phialophora malorum* apresentou uma atividade Cx máxima após 96 horas de incubação a 22°C em agitador rotativo, num meio de sais minerais contendo 0,5% de celulose. Nessas condições, o fungo apresentou uma atividade de 5,0 U/ml.

Um estudo sobre atividade celulolítica em diversas fontes de celulose foi efetuado por SHEWALE e SADANA (1978) utilizando basidiomiceto CPC 142. Foi observado que tal microrganismo apresentou atividade C_1 de 0,013 U/ml, em

quanto a Cx era de 36 U/ml, quando o substrato celulósico - era palha de arroz crua. Já em palha de arroz submetida a uma autoclavagem a 121°C por 1 h com NaOH 0,25 N, as atividades subiram para 0,30 para C₁ e 55 U/ml para Cx. A evidência de que um pré-tratamento termoquímico é mais suficiente na produção de enzimas sobre substratos celulósicos, foi confirmada quando da utilização de bagaço de cana vaporizado por uma hora com NaOH 4N. Sob tais condições o basidiomiceto CPC 142 teve uma atividade de 0,025 U/ml para C₁ e 64 U/ml para Cx, enquanto no bagaço sem tratamento era 0,009 U/ml para C₁ e 5 U/ml para Cx. A utilização de carboximetilcelulose como substrato levou o microrganismo a mostrar uma atividade de 0,016 U/ml para C₁ e 11 U/ml para Cx.

SHEWALE e SADANA (1979) relatam que *Sclerotium rolfsii* produziu enzima C₁ com atividade de 4,0 U/ml, em 24 h, com palha de arroz como substrato celulósico. Essa palha sofria um pré-tratamento termoquímico, sendo autoclavada a 121°C/1 h com NaOH 0,25 N e 30°C/24 hs com NaOH 4 N.

SADANA et alii (1979) conseguiram um mutante de *Sclerotium rolfsii* CPC 142 que apresentou 2-2,5 vezes mais atividade contra papel de filtro que o "strain" original. O mutante, chamado UV-8, produziu 180 U/ml de Cx num meio de saís contendo celulose-123 (Carl Schleicher 80 Schull Co.). No mesmo meio de cultura enriquecido com 3% de farelo de arroz, o mutante produziu 210 U/ml de Cx.

STERNBERG e MANDELS (1979) relataram que *Trichoderma reesei* crescido em meio contendo sofrose como indutor de enzima, apresentou uma atividade de carboximetilcelulase de 0,2 U/mg de micélio a 39°C de 6-22 horas, e de 1,2 U/mg de micélio após 20 horas a 28°C. Para a obtenção desses resultados, os autores se utilizaram de uma solução

de carboximetilcelulose a 0,5%, e a atividade foi medida pela hidrólise de celobiose 7,5 mM. A produção total de carboximetilcelulase de *T. reesei* utilizando soforose foi de 9,6 U/ml, após 9 dias de incubação.

A utilização de enzimas celulolíticas, segundo ARAKAKI (1977), se presta à sacarificação da celulose para a produção de glicose a partir desta. Dessa forma poderiam também ser obtidas proteínas monocelulares, álcool etílico e outros produtos, através de fermentação. Poderiam também ser utilizadas no amolecimento de alimentos vegetais, aumentando a digestibilidade (no caso de alimentos infantis), ou para facilitar a desintegração de alimentos na fabricação de pures, como cenoura, arroz, batata, feijão e soja; ou ainda serem usadas na extração de óleos essenciais e de substâncias flavorizantes e aromatizantes contidas nos vegetais; no processamento de frutas cítricas, aumentando a extração e produzindo sucos mais homogêneos e estáveis, etc ...

Como observado nesta revisão, a degradação de resíduos celulósicos é fator de considerável importância na atualidade, e as enzimas produzidas envolvidas nesse processo oferecem uma gama enorme de situações em que podem ser aproveitadas. A degradação dos resíduos celulósicos, em especial a palha de arroz, não tem sido objeto de um estudo mais profundo que leve ao conhecimento de todas as interações envolvidas. Por isso, direcionou-se este trabalho para o estudo das alterações físico-químicas que ocorrem na palha de arroz, quando levada a uma decomposição simulada, bem como para o conhecimento do tempo necessário para que a degradação ocorra, a melhor fase para se obterem microrganismos celulolíticos e suas respectivas atividades enzimáticas.

3. M A T E R I A I S E M É T O D O S

3.1. M A T E R I A I S

Os materiais utilizados no presente experimento foram:

3.1.1. PALHA DE ARROZ

A palha de arroz utilizada foi coletada em máquinas apropriadas para o benefício de arroz.

3.1.2. ÁGUA

Utilizou-se de água para prover umidade a simuladores de condições naturais de decomposição da palha de arroz (Figura 1).

3.1.3. SOLO

O solo utilizado para a formação dos simuladores era de serrapilheira, proveniente da camada superior (até 30 cm) do solo do Jardim Botânico do Campus de Botucatu - UNESP.

3.1.4. ÁGUA DE DRENAGEM DOS SIMULADORES

Água de drenagem dos simuladores era a água coletada dos simuladores assim que estes atingiam seu Ponto de Capacidade de Campo.

3.1.5. PALHA DE ARROZ PROVENIENTE DOS SIMULADORES

A palha de arroz dos simuladores utilizada para análise era a que se localizava nas camadas mais próximas de solo.

3.1.6. SOLO PROVENIENTE DOS SIMULADORES

O solo proveniente dos simuladores destinados à análise era uma fração retirada após homogeneização de todas as camadas de solo dos simuladores.

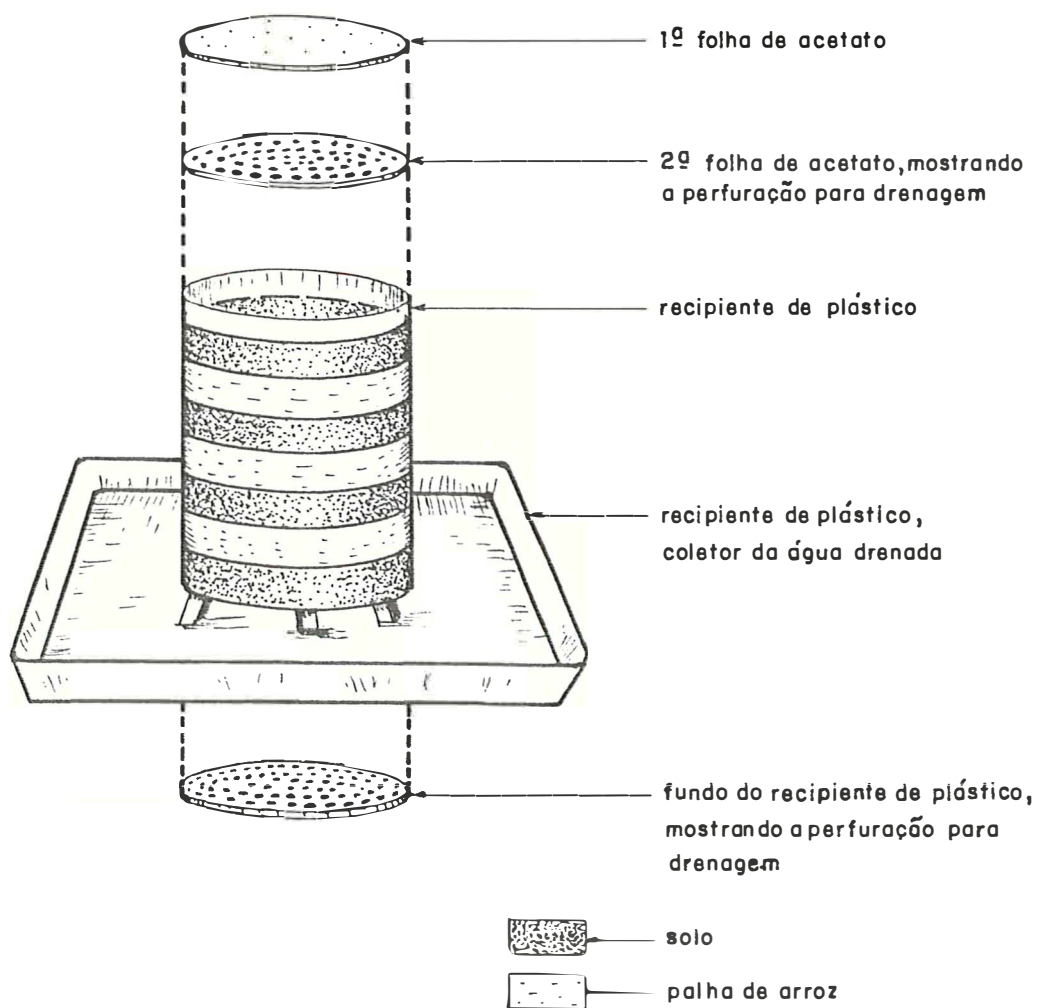


FIGURA 1. Representação esquemática dos simuladores de condições naturais de decomposição

3.2. MÉTODOS

3.2.1. SIMULADORES DE CONDIÇÕES NATURAIS DE DECOMPOSIÇÃO DA PALHA DE ARRÔZ

3.2.1.1. Montagem dos simuladores

Os simuladores, em numero de seis, foram montados com quatro camadas de solo, de 500 g cada, alternadas com três camadas de palha, de 100 g cada, para proporcionar volumes iguais de solo e palha, tal como na Figura 1. Este esquema de montagem foi adotado após diversos ensaios prévios.

Antes de ser colocado nos simuladores, o solo foi peneirado em peneiras de malhas de 4,76 mm de abertura, para remoção de partículas grosseiras.

Aos simuladores, após montados, foram adicionados 700 ml de água, a cada sete dias, para deixar os simuladores no Ponto de Capacidade de Campo, já que estas condições se mostraram melhores, de acordo com os ensaios prévios.

Após a adição de água, e completa drenagem, coletava-se a água drenada nos recipientes plásticos e realizavam-se análises físico-químicas e microbiológicas.

3.2.1.2. Desmontagem dos simuladores

A cada trinta dias um simulador da série de seis era desmontado, retirando-se as camadas de solo, as quais eram homogeneizadas e submetidas a análises microbiológicas. Das camadas de palha foram coletadas as frações

mais próximas as de solo, submetendo-as, a seguir, a análises microbiológicas, físico-químicas e caracterização do estado de decomposição.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DE CELULOSE (FIBRA)

Os teores de celulose (fibra) da palha de arroz foram verificados segundo A.O.A.C. (1970).

3.2.3. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL

A pesquisa dos teores de nitrogênio total da palha de arroz foi realizada pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1970).

3.2.4. DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO (CINZAS)

Os teores de cinzas presentes na palha de arroz foram determinados segundo A.O.A.C. (1970).

3.2.5. DETERMINAÇÃO DE SÍLICA

A determinação dos teores de sílica da palha de arroz foi levada a efeito segundo A.O.A.C. (1970).

3.2.6. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

A determinação da umidade da palha arroz de proveniente dos simuladores foi realizada de acordo com A.O.A.C. (1970).

3.2.7. DETERMINAÇÃO DE REDUTORES TOTAIS

A verificação dos redutores totais presentes na água de drenagem dos simuladores foi realizada segundo NELSON (1944) e SOMOGY (1952), em espectrofotometro Coleman modelo 295. Os valores relacionados correspondem à média de três leituras.

3.2.8. DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH da água de drenagem dos simuladores foi realizada por leitura em potenciômetro Metrohm Herisau modelo E396B, contendo eletrodo de vidro e divisões de 0,05 unidades.

3.2.9. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS

A determinação dos valores referentes a quantidade de sólidos totais presentes na água de drenagem dos simuladores foi levada a efeito segundo o método descrito em A.O.A.C. (1970). Os valores relacionados são a média de duas leituras.

3.2.10. TEMPERATURA DOS SIMULADORES

A verificação da temperatura interna dos simuladores de condições naturais de decomposição foi realizada através de um termômetro de 0 a 100°C , com divisão de 1,0°C, inserido no último dos simuladores a ser aberto. Os dados correspondem a média de leitura diária durante sete dias.

3.2.11. TEMPERATURA AMBIENTE

Os valores da temperatura do ambiente em que se encontravam os simuladores foram conseguidos através de medição com um termoigrógrafo. Os valores correspondem a média da leitura de sete dias.

3.2.12. UMIDADE RELATIVA AMBIENTE

A determinação da umidade relativa do ambiente em que se encontravam os simuladores foi realizada por medição com um termoigrógrafo. Os valores correspondem a média de leituras diárias desse parâmetro a cada sete dias.

3.2.13. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS AERÓBIOS

Uma grama do material foi colocado em tubo de cultura contendo 9,0 ml de água destilada esterilizada, agitado mecanicamente por 30 segundos e, a seguir, realizada diluição decimal e plaqueamento pela técnica de MENEZES et alii (1976). Essa técnica foi empregada para a pesquisa de

microrganismos celulolíticos aeróbios em palha de arroz e solo provenientes dos simuladores. Para água de drenagem realizou-se diluição decimal em série e plaqueamento segundo MENEZES et alii (1976).

3.2.14. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS ANAERÓBIOS

A contagem de microrganismos celulolíticos anaeróbios, foi realizada pela técnica descrita no item 3.2.13., com a adição de agar-tioglicolato (SHARF, 1972) sobre as placas, para prover anaerobiose, sendo utilizada para: palha de arroz, solo e água de drenagem provenientes dos simuladores de condições naturais de decomposição da palha de arroz.

3.2.15. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS DO SOLO DOS SIMULADORES

A contagem total de microrganismos aeróbios do solo dos simuladores foi levada a efeito segundo a técnica descrita por SHARF (1972), utilizando-se agar nutriente.

3.2.16. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE FUNGOS E LEVEDURAS

A contagem total de fungos e leveduras do solo dos simuladores foi realizada utilizando-se agar-batata-dextrose-acidificado (SHARF, 1972), adicionado de 0,033 g/l de rosa de Bengala, como indicado por BLACK et alii (1965).

3.2.17. CONTAGEM TOTAL EM PLACAS DE ACTINOMICETOS

A contagem total em placas de actinomicetos do solo dos simuladores foi realizada utilizando-se o meio de agar-dextrose-nitrato, segundo o método de BLACK et alii (1965).

3.2.18. CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DENITRIFICANTES

Os valores das contagens totais de bactérias denitrificantes do solo dos simuladores foram obtidos através da técnica do número mais provável, de acordo com BLACK et alii (1965).

3.2.19. CONTAGEM TOTAL DE *Nitrosomonas*

A contagem total de *Nitrosomonas* do solo dos simuladores foi feita segundo BLACK et alii (1965), pela técnica do número mais provável, utilizando-se o meio de carbonato de cálcio - amônia.

3.2.20. CONTAGEM TOTAL DE *Nitrobacter*

Os resultados das contagens de *Nitrobacter* do solo dos simuladores foram obtidos pela técnica do número mais provável, utilizando-se o meio de carbonato de cálcio -nitrito, segundo o método descrito por BLACK et alii (1965).

3.2.21. CONTAGEM TOTAL DE *Azotobacter*

Os valores da contagem total de *Azotobacter* do solo dos simuladores foram conseguidos através da técnica do número mais provável, utilizando-se o meio de sacarose - sais minerais, como descrito por BLACK et alii (1965).

3.2.22. CONTAGEM DE ESPOROS DE BACTÉRIAS MESÓFI - LAS

A contagem de esporos de bactérias mesófilas foi realizada de acordo com a técnica descrita por BLACK et alii (1965), utilizando-se o meio de agar-nutriente.

3.2.23. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTI - COS

Das pesquisas realizadas segundo os itens 3.2.13. e 3.2.14. isolaram-se microrganismos, os quais foram inoculados em meio de cultura descrito por MENEZES et alii (1976), porém sem agar e sem carboximetilcelulose. Esse meio de cultura era passado para tubos de cultura (10,0 x 1,20 cm) num volume correspondente a 1/3 do volume dos tubos. A seguir adicionava palha de arroz lavada e seca ao ar, num volume correspondente a 2/5 do volume dos tubos; sendo que para bactérias utilizava-se palha moída em moinho de faca, enquanto para os fungos utilizava-se palha integral.

Para os microrganismos anaeróbicos adicionava-se vaspar sobre o meio de metilcelulose para prover anaerobiose.

3.2.24. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZÍMICA DOS MICROORGANISMOS ISOLADOS

A avaliação da atividade enzimática dos microrganismos isolados conforme o item 3.2.23., foi realizada para a determinação das enzimas C_1 e C_x , componentes do complexo enzimático celulolítico dos microrganismos, segundo MENEZES et alii (1976), considerando uma unidade de C_1 e uma unidade C como sendo a quantidade de enzima que libera 1,0 mg de glicose nas condições do teste (MENEZES et alii, 1976).

3.2.25. CARACTERIZAÇÃO DA DECOMPOSIÇÃO DA PALHA DE ARROZ

A caracterização da degradação da palha de arroz dos simuladores foi realizada através de fotografias e microfotografias.

3.2.25.1. Método fotográfico

Quando da abertura dos simuladores de condições naturais de decomposição, as camadas de palha de arroz eram separadas, homogeneizadas, e retiradas parcelas unitárias, as quais eram colocadas em placas de Petri e fotografadas por câmara Nikon.

3.2.25.2. Método microfotográfico

Com a palha de arroz separada na abertura dos simuladores, procedeu-se a realização de microfotografias

por cortes histológicos, como recomendado por SASS (1964), para uma avaliação do estado de decomposição dos tecidos da palha, utilizando-se microscópio Carl Zeiss com luz polarizada, com câmara fotográfica Carl Zeiss acoplada ao microscópio.

3.2.26. CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS CELULOLÍ- TICOS

Os microrganismos que apresentavam atividade celulolítica para o complexo enzimico $C_1 - C_x$, apresentando ambas enzimas, foram repicados em meio de batata-dextrose-agar, incubados a 28°C por 5 dias e classificados segundo BARNETT (1967), visto que os microrganismos que apresentaram tais características eram fungos.

4. R E S U L T A D O S

4.1. ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS

4.1.1. ÁGUA DE DRENAGEM

Os valores das análises semanais de pH, acidez titulável, redutores totais e sólidos totais da água de drenagem dos simuladores de condições naturais de decomposição são expressos na Tabela 1 e Figuras 2 a 4.

TABELA 1. Valores das análises semanais de pH, acidez titulável, redutores totais e sólidos totais da água de drenagem dos simuladores

Dias	pH	Acidez Titulável (ml de NaOH 0,1 N/100 ml)	Redutores Totais (mg de glicose/100 ml)	Sólidos Totais (g/100 ml)
0	6,10	0,23	0,101	0,092
7	7,60	0,30	0,098	0,066
14	7,00	0,20	0,077	0,087
21	7,00	0,27	0,069	0,234
28	7,40	0,30	0,172	0,390
35	6,90	0,33	0,167	0,028
42	6,90	0,27	0,290	0,214
49	6,60	0,37	0,119	0,102
56	7,40	0,23	0,077	0,065
63	7,60	0,27	0,122	0,114
70	6,80	0,43	0,130	0,087
77	6,30	0,20	0,287	0,114
84	6,40	0,57	0,221	0,071
91	6,30	0,20	0,288	0,061
98	7,70	0,15	0,195	1,220
105	6,60	0,20	0,245	1,224
112	6,00	0,20	0,256	0,059
119	7,45	0,33	0,240	0,040
126	7,15	0,43	0,150	0,088
133	7,50	0,43	0,166	0,070
140	6,45	0,43	0,151	0,041
147	6,25	0,53	0,124	0,067
154	6,45	0,45	0,183	0,068
161	6,70	0,40	0,245	0,069
168	6,60	0,47	0,232	0,054
175	6,15	0,53	0,200	0,054

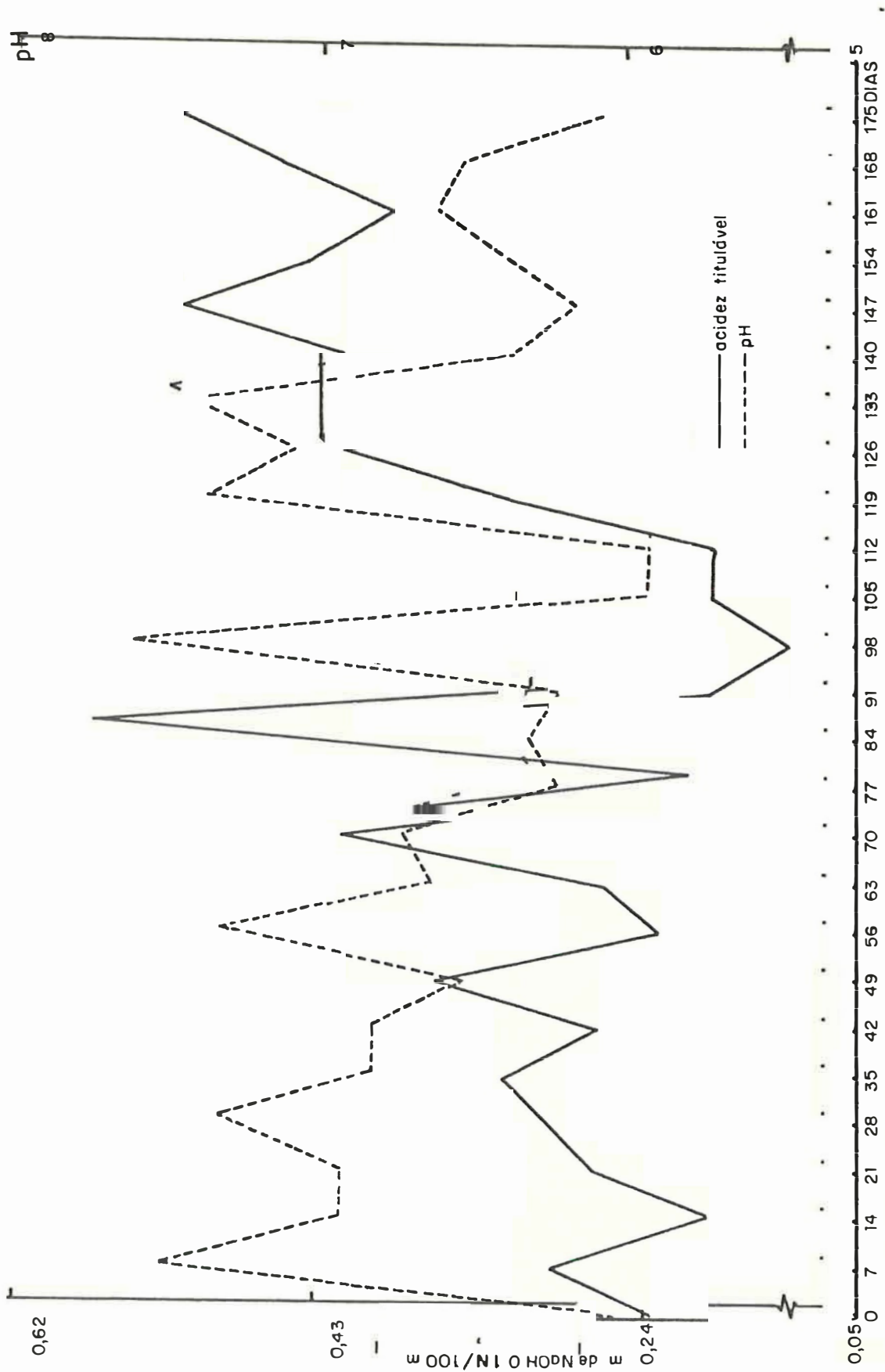


FIGURA 2 Variação semanal da acidez titulável, em ml de NaOH 0,1 N/100 ml, e pH da água de drenagem dos simuladores de condições naturais de decomposição da palha de arroz

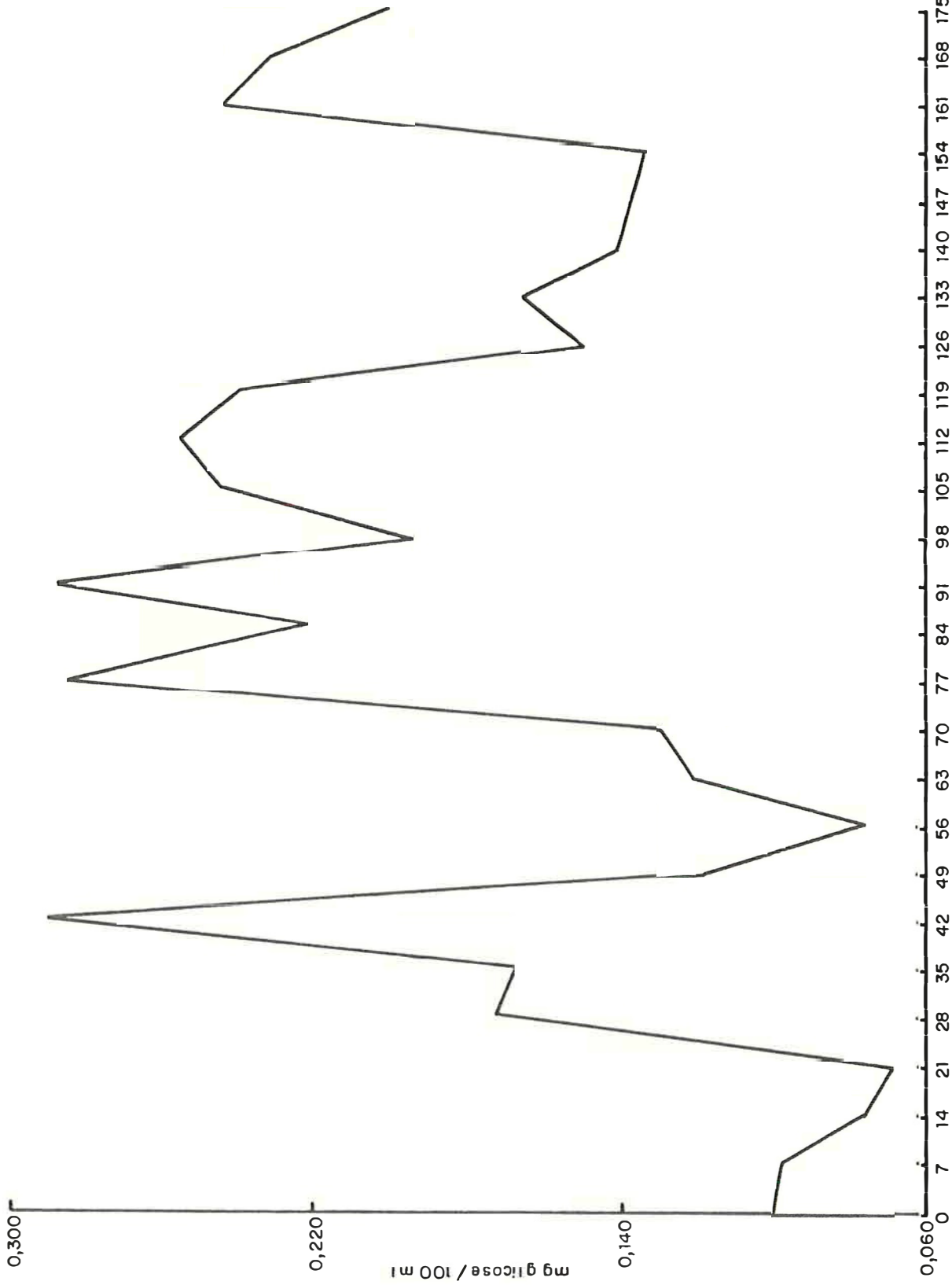


FIGURA 3 - Variação semanal de resutores totais, em mg de glicose/100 ml, da água de drenagem dos simuladores de condições naturais de decomposição . 41.

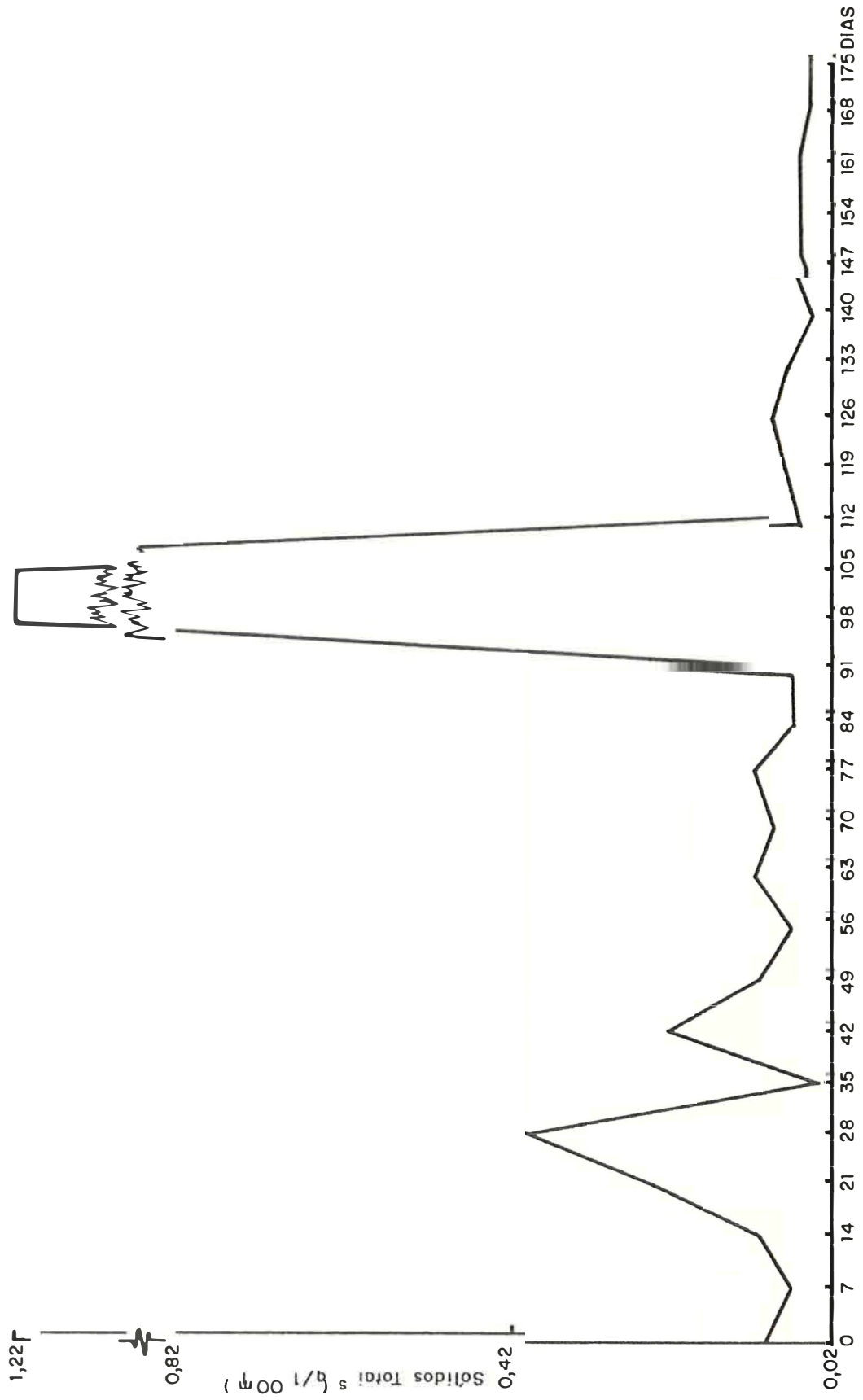


FIGURA 4 - Variação semanal dos sólidos totais da água de drenagem dos simuladores de condições naturais de decomposição.

4.1.2. PALHA DE ARROZ

Os valores das análises de umidade, fibra, nitrogênio total, cinzas e sílica da palha de arroz proveniente dos simuladores de condições naturais de decomposição são relacionados na Tabela 2 e Figuras 5 a 8.

TABELA 2. Teores de umidade, fibra, nitrogênio total (N.T.), cinzas e sílica da palha de arroz proveniente dos simuladores

Dias	Umidade (%)	Fibra (g/100 g)	N.T. (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Sílica (g/100 g)
0	10,17	53,56	3,43	15,69	1,45
30	10,22	34,01	4,29	35,83	2,90
60	20,30	18,08	4,91	32,23	2,01
90	48,57	32,64	6,77	34,78	2,72
120	47,75	32,05	8,06	26,55	1,05
150	50,17	32,21	9,03	31,77	3,41
180	49,15	20,88	10,30	40,71	2,06

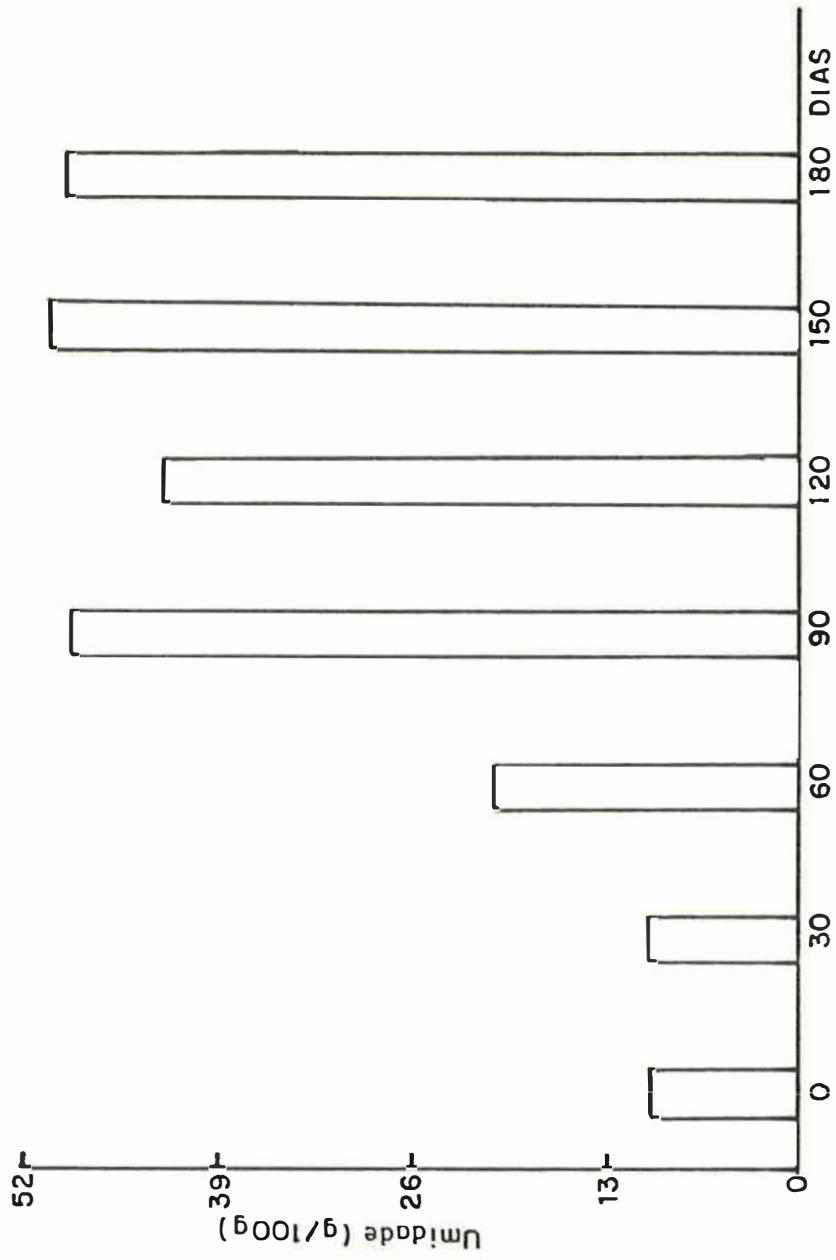


FIGURA 5 - Variação mensal da umidade da palha de arroz dos simuladores de condições naturais de decomposição.

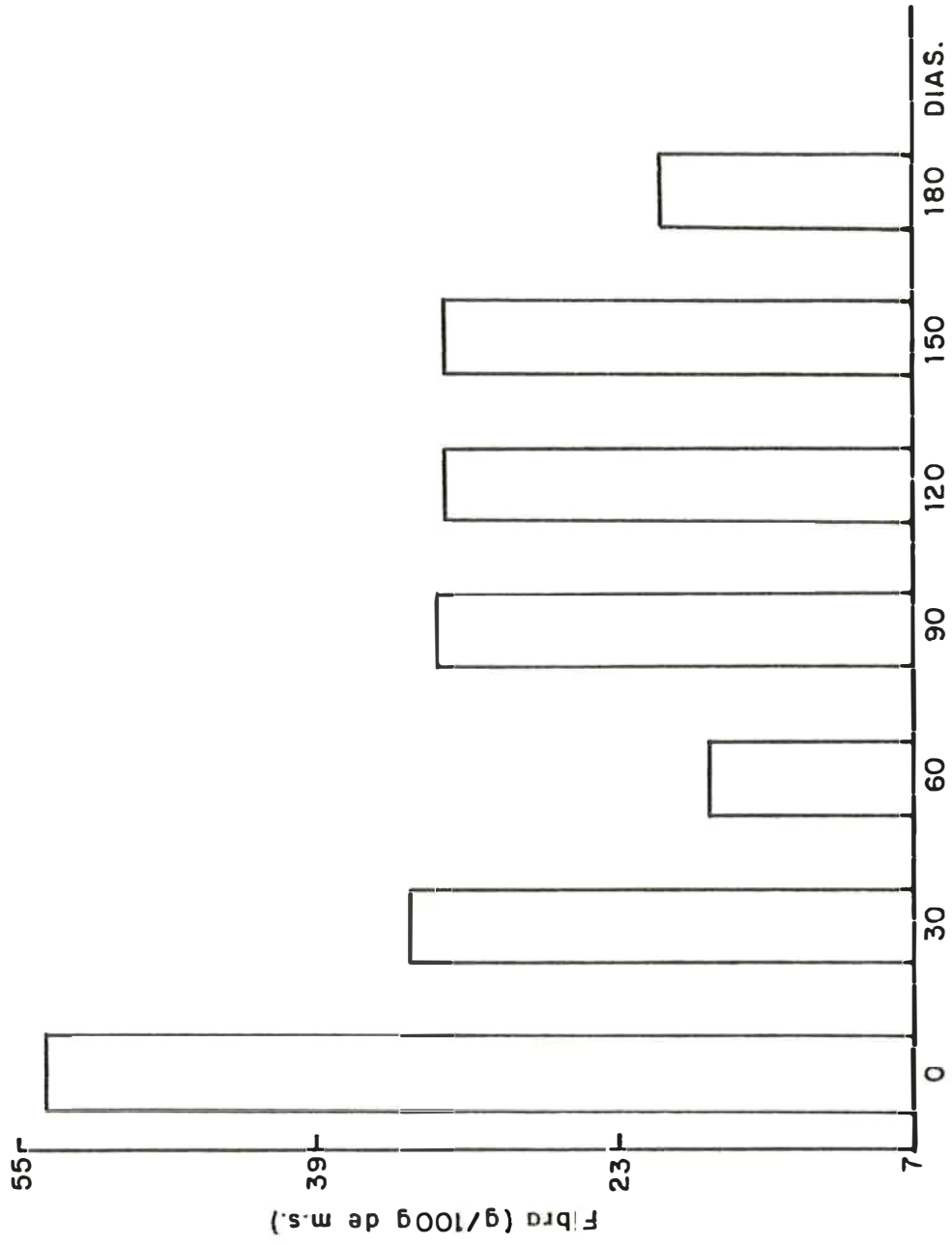


FIGURA 6 - Variação mensal dos teores de fibra da palha de arroz dos simuladores de condições naturais de decomposição.

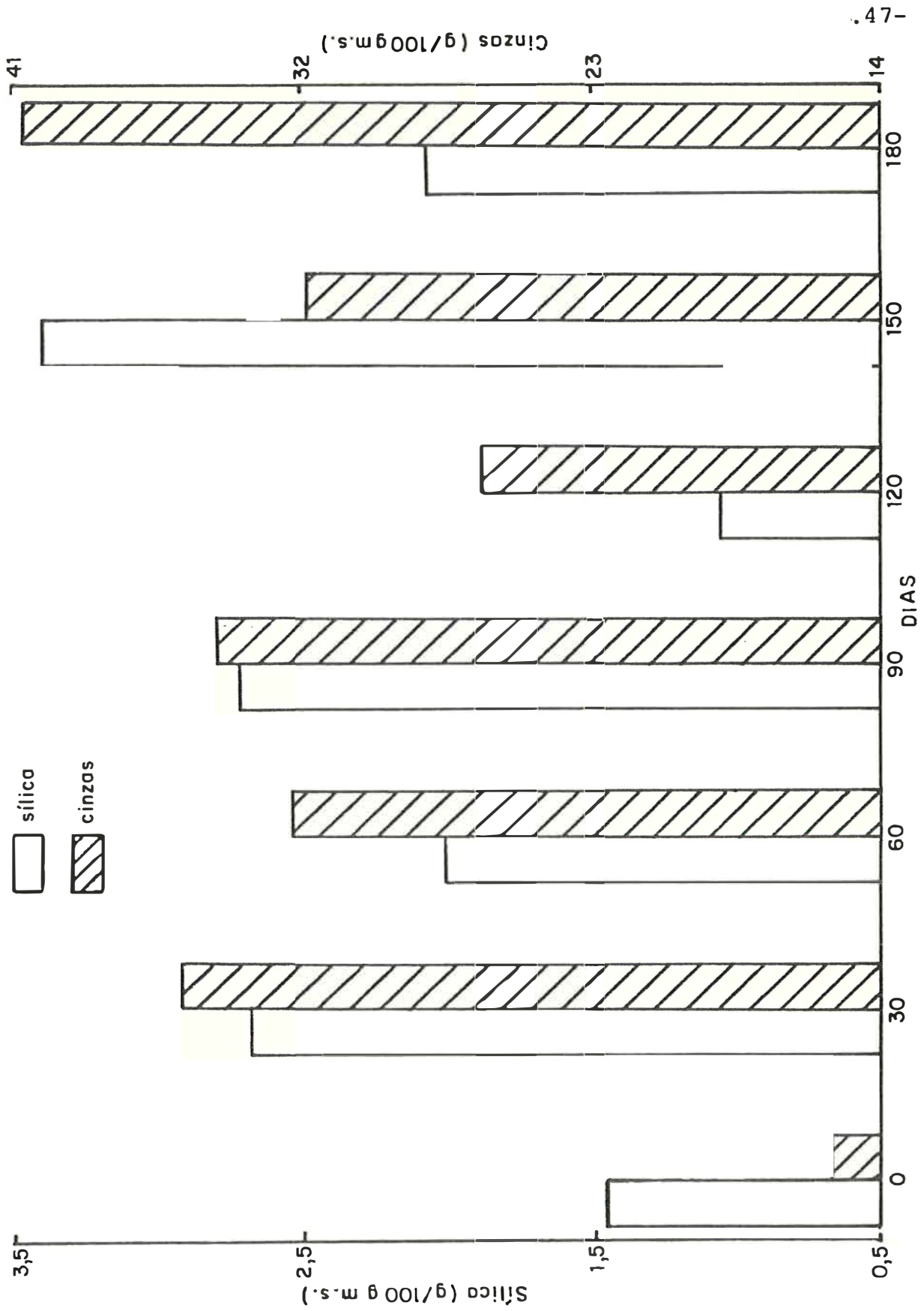


FIGURA 7 - Variação mensal dos teores de sílica e cinzas da palha de arroz dos simuladores de condições naturais de decomposição.



FIGURA 8 - Variação mensal do nitrogênio total (N.T.) da palha de arroz dos simuladores de condições naturais de decomposição.

4.1.3. SIMULADORES DE CONDIÇÕES NATURAIS DE DECOM- POSIÇÃO

Os valores semanais da temperatura do simulador aberto aos 180 dias são expressos na Tabela 3 e Figura 9.

TABELA 3. Variação semanal da temperatura do simulador aberto aos 180 dias

D i a s	Temperatura (°C)
0	24
7	24
14	24
21	24
28	23
35	23
42	21
49	21
56	22
63	23
70	24
77	23
84	23
91	24
98	24
105	21
112	20
119	20
126	23
133	23
140	25
147	25
154	27
161	24
168	27
175	22

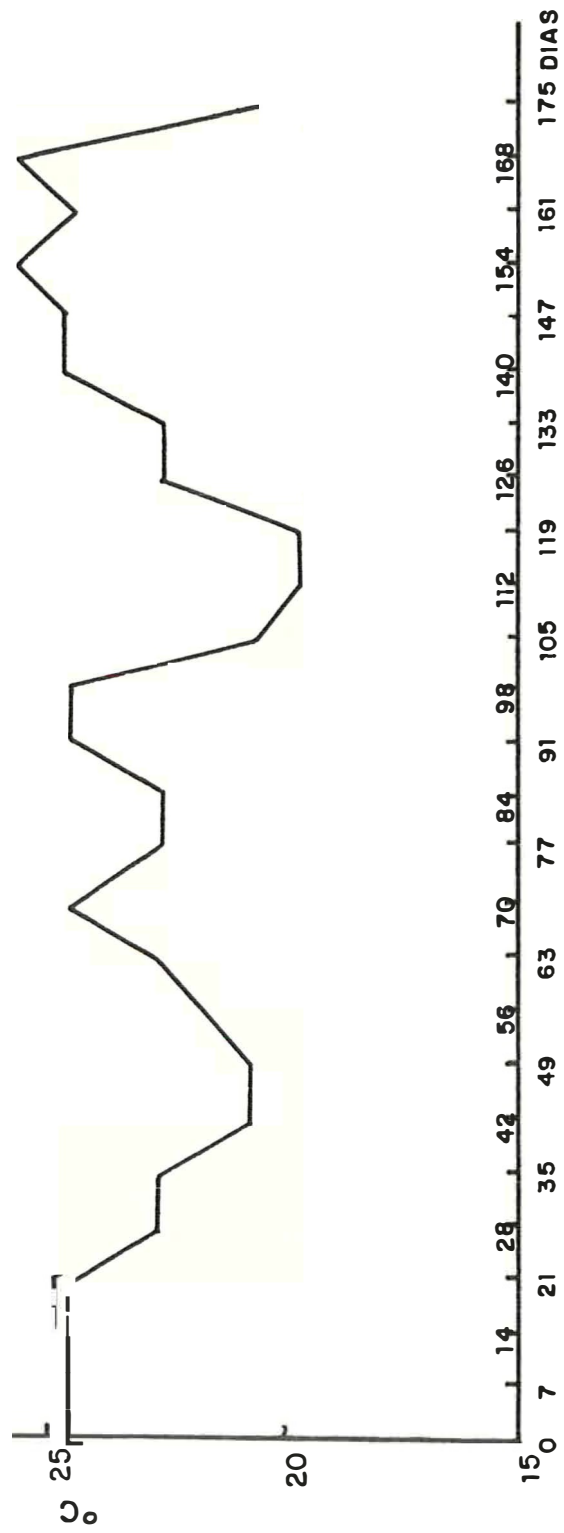


FIGURA 9 - Variação semanal da temperatura interna do simulador aberto aos 180 dias

4.1.4. AMBIENTE EM QUE SE ENCONTRAVAM OS SIMULADORES

A variação semanal da temperatura e da umidade relativa (U.R.) do ambiente em se encontravam os simuladores de condições naturais de decomposição são expressos na Tabela 4 e Figura 10.

TABELA 4. Variação semanal da temperatura e da umidade relativa do ambiente em se encontravam os simuladores

D i a s	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)
0	-	-
7	27,0	16,5
14	27,7	13,0
21	29,1	17,5
28	29,5	17,0
35	28,7	18,5
42	29,0	24,5
49	27,2	22,0
56	29,0	19,0
63	31,5	22,5
70	28,7	22,5
77	31,7	23,0
84	29,5	21,0
91	30,7	17,0
98	30,0	20,0
105	29,0	20,0
112	29,0	20,0
119	30,6	21,5
126	29,0	15,5
133	33,0	16,0
140	31,5	21,5
147	32,5	17,5
154	33,2	17,2
161	33,5	17,0
168	33,5	18,0
175	30,5	17,0

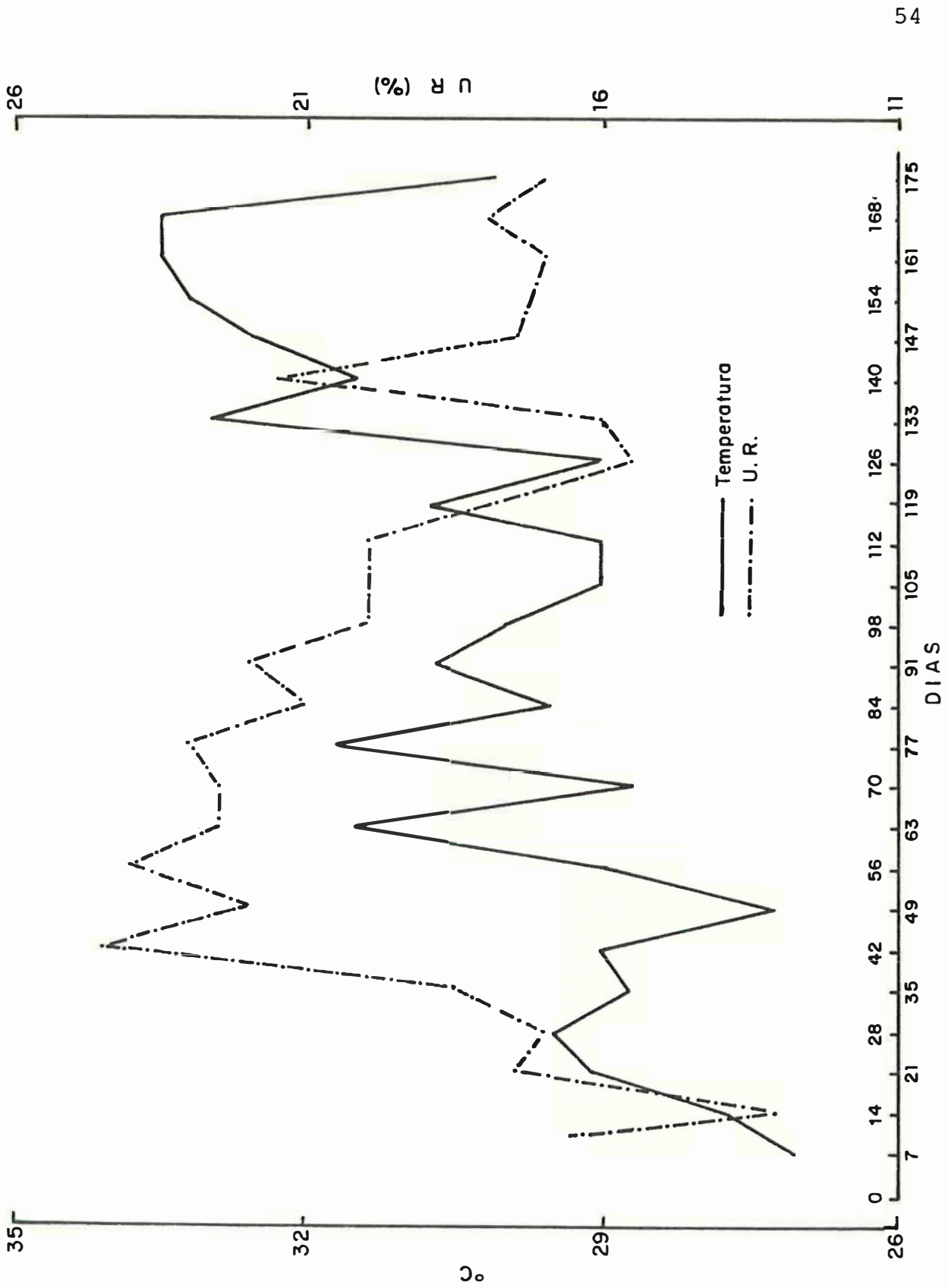


FIGURA 10 - Variações semanais da temperatura e U.R. do ambiente em que se encontravam os simuladores

4.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.2.1. ÁGUA DE DRENAGEM

Os resultados das contagens totais em placas de microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios da água de drenagem proveniente dos simuladores de condições naturais de decomposição são mostrados na Tabela 5 e Figura 11.

TABELA 5. Variação semanal das contagens totais de microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios da água de drenagem dos simuladores

D i a s	C.T. de Aeróbios (microrg./ml)	C.T. de Anaeróbios (microrg./ml)
0	$2,22.10^5$	$1,80.10^5$
7	$1,59.10^4$	$6,10.10^6$
14	$9,04.10^8$	$8,91.10^8$
21	$1,50.10^7$	$3,00.10^7$
28	$2,95.10^7$	$3,53.10^7$
35	$6,60.10^7$	$7,20.10^6$
42	$2,90.10^6$	$6,54.10^6$
49	$2,18.10^7$	$1,15.10^7$
56	$2,70.10^7$	$1,40.10^7$
63	$6,35.10^6$	$3,98.10^7$
70	$1,26.10^8$	$1,47.10^8$
77	$7,25.10^6$	$2,10.10^7$
84	$4,45.10^5$	$1,70.10^6$
91	$2,07.10^8$	$8,00.10^8$
98	$3,16.10^8$	$1,75.10^8$
105	$1,00.10^8$	$1,50.10^7$
112	$1,95.10^9$	$6,00.10^7$
119	$9,50.10^6$	$6,00.10^6$
126	$4,00.10^6$	$1,15.10^7$
133	$3,65.10^5$	$1,85.10^5$
140	$4,85.10^4$	$3,10.10^5$
147	$1,52.10^5$	$1,75.10^5$
154	$1,50.10^5$	$1,37.10^5$
161	$1,49.10^5$	$1,00.10^5$
168	$1,75.10^5$	$2,32.10^5$
175	$1,03.10^5$	$6,30.10^5$

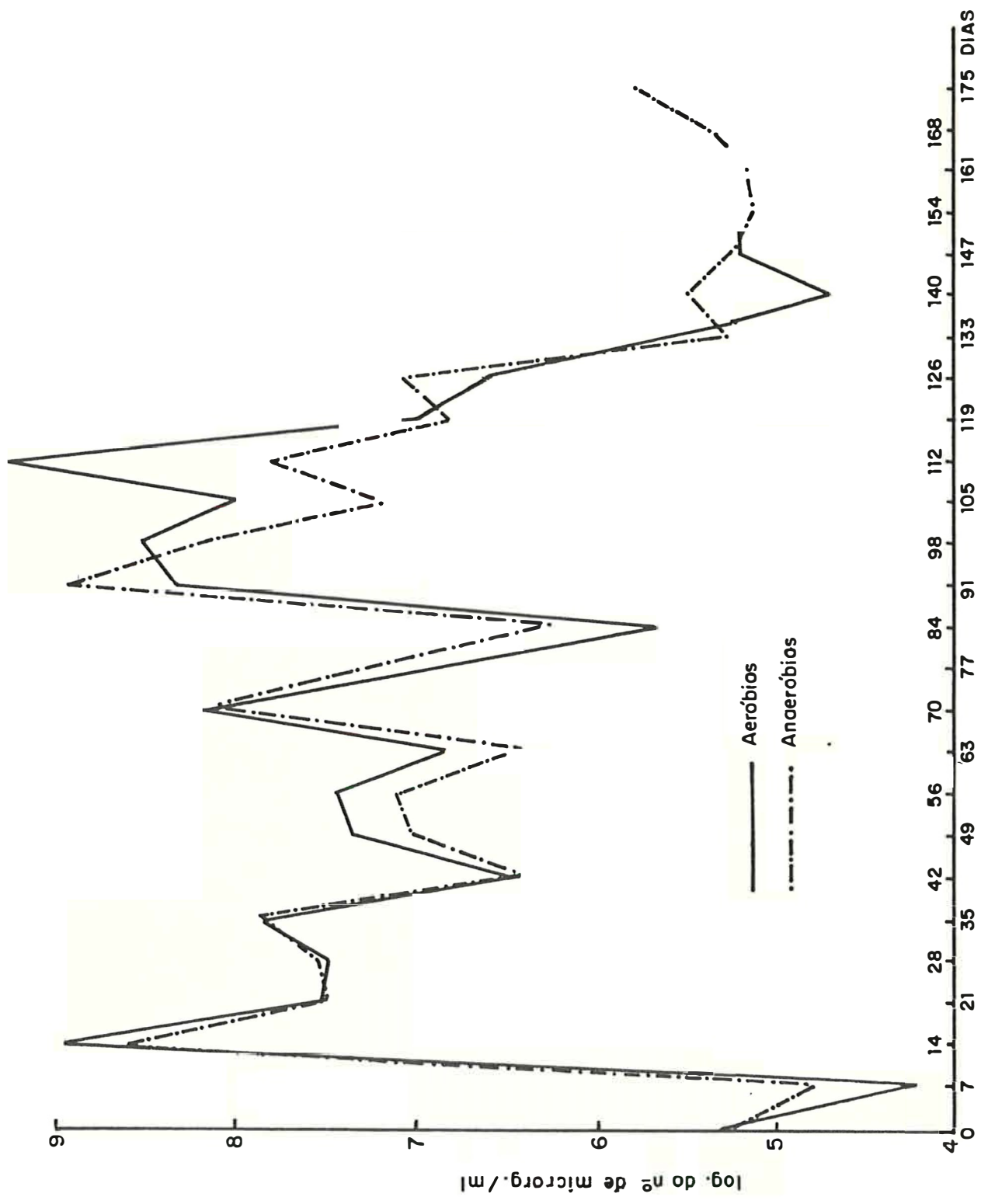


FIGURA 11 - Variação semanal das contagens totais de microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios da água de drenagem dos simuladores

4.2.2. SOLO

4.2.2.1. Na Tabela 6 são mostrados os resultados das contagens microbianas do solo dos simuladores de condições naturais de decomposição.

TABELA 6. Variação mensal das análises microbiológicas dos solos dos simuladores, expressas em número de microrganismo/g de matéria seca

Dias Análises	30	60	90	120	150	180
Contagem total	$5,77.10^5$	$1,45.10^6$	$2,16.10^6$	$1,62.10^6$	$3,37.10^6$	$1,63.10^6$
Fungos e leveduras	$4,68.10^4$	$1,71.10^5$	$1,40.10^4$	$1,05.10^4$	$1,19.10^4$	$1,50.10^2$
Actinomicetos	$6,93.10^5$	$1,52.10^6$	$7,06.10^6$	$9,60.10^4$	$3,35.10^4$	$2,07.10^5$
Denitrificantes	$1,44.10^7$	$2,27.10^7$	$1,12.10^9$	$8,17.10^7$	$5,38.10^7$	$1,06.10^7$
<i>Nitrobacter</i>	$2,46.10^4$	$2,40.10^4$	$5,33.10^4$	$6,68.10^4$	$1,82.10^5$	0,00
<i>Nitrosomonas</i>	$6,99.10^1$	$2,15.10^4$	$1,80.10^2$	$1,80.10^2$	$1,80.10^2$	$1,90.10^2$
<i>Azotobacter</i>	$2,06.10^4$	$1,26.10^4$	$1,34.10^5$	$1,07.10^5$	$4,07.10^4$	$4,66.10^3$
Esporos	$7,22.10^3$	$1,68.10^4$	$7,72.10^5$	$2,05.10^6$	$6,30.10^5$	$5,55.10^3$

4.2.2.2. Microflora Celulolítica

Os resultados das contagens totais em placas dos microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios do solo dos simuladores são relacionados na Tabela 7 e Figura 12.

TABELA 7. Variação mensal das contagens totais (C.T.) em placas dos microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios do solo dos simuladores, em número de microrganismo/g de matéria seca

Dias	C.T. de Aeróbios	C.T. de Anaeróbios
0	$7,98.10^6$	$8,62.10^5$
30	$2,32.10^7$	$1,93.10^6$
60	$7,70.10^7$	$2,06.10^8$
90	$2,88.10^7$	$1,15.10^8$
120	$5,95.10^7$	$2,55.10^7$
150	$1,33.10^7$	$6,00.10^6$
180	$2,20.10^6$	$3,42.10^6$

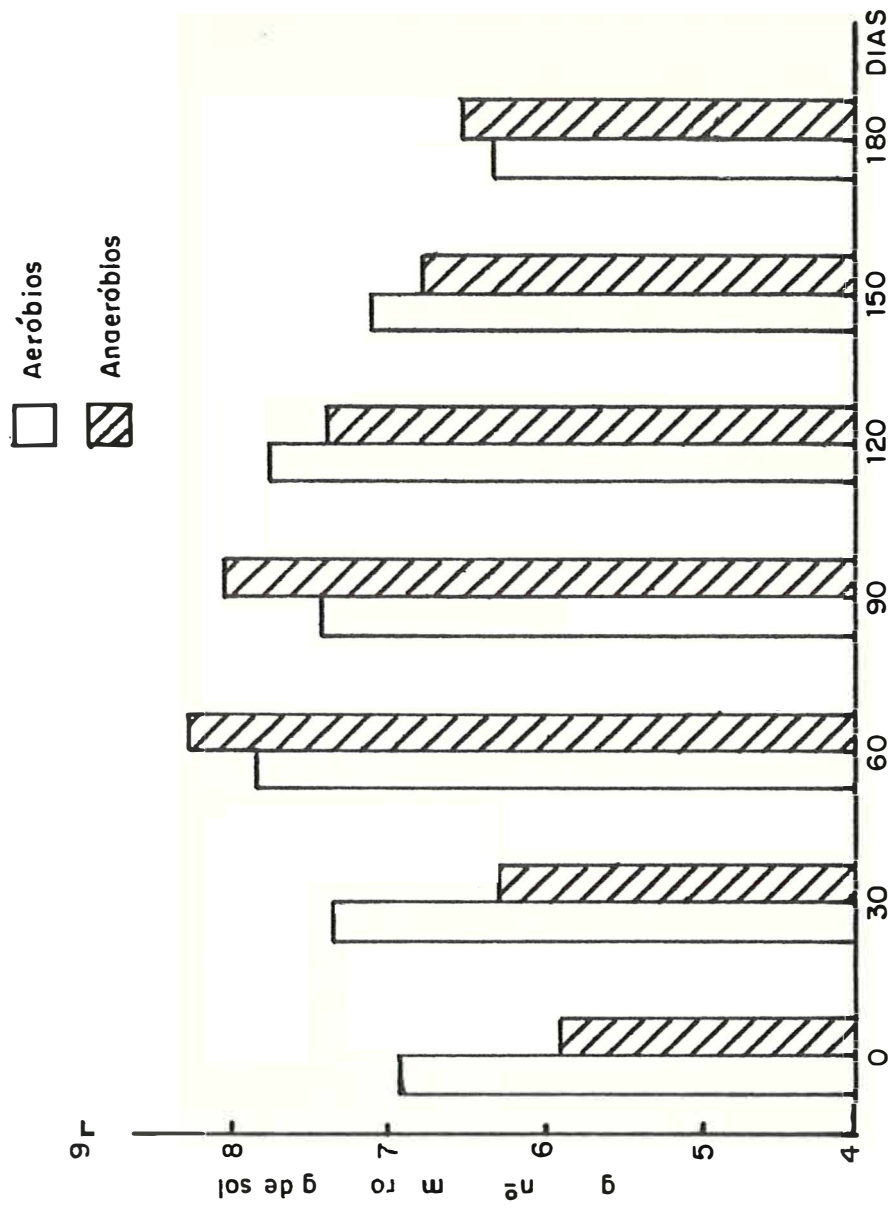


FIGURA 12 - Variação mensal das contagens totais de microrganismos ce-
lulolíticos aeróbios e anaeróbios do solo dos simuladores

4.2.3. PALHA DE ARROZ

Na Tabela 8 e Figura 13 estão expressos os valores das análises de microrganismos celulolíticos da palha de arroz proveniente dos simuladores de condições naturais de decomposição.

TABELA 8. Resultados das contagens totais em placas dos microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios da palha de arroz dos simuladores

Dias	Contagens Totais	
	Aeróbios (microrg./g)	Anaeróbios (microrg./g)
0	$3,22 \cdot 10^7$	$6,41 \cdot 10^7$
30	$1,50 \cdot 10^8$	$8,70 \cdot 10^8$
60	$6,05 \cdot 10^8$	$1,52 \cdot 10^8$
90	$6,25 \cdot 10^8$	$2,15 \cdot 10^{10}$
120	$9,20 \cdot 10^7$	$2,60 \cdot 10^7$
150	$2,90 \cdot 10^7$	$5,50 \cdot 10^6$
180	$8,30 \cdot 10^6$	$9,50 \cdot 10^6$

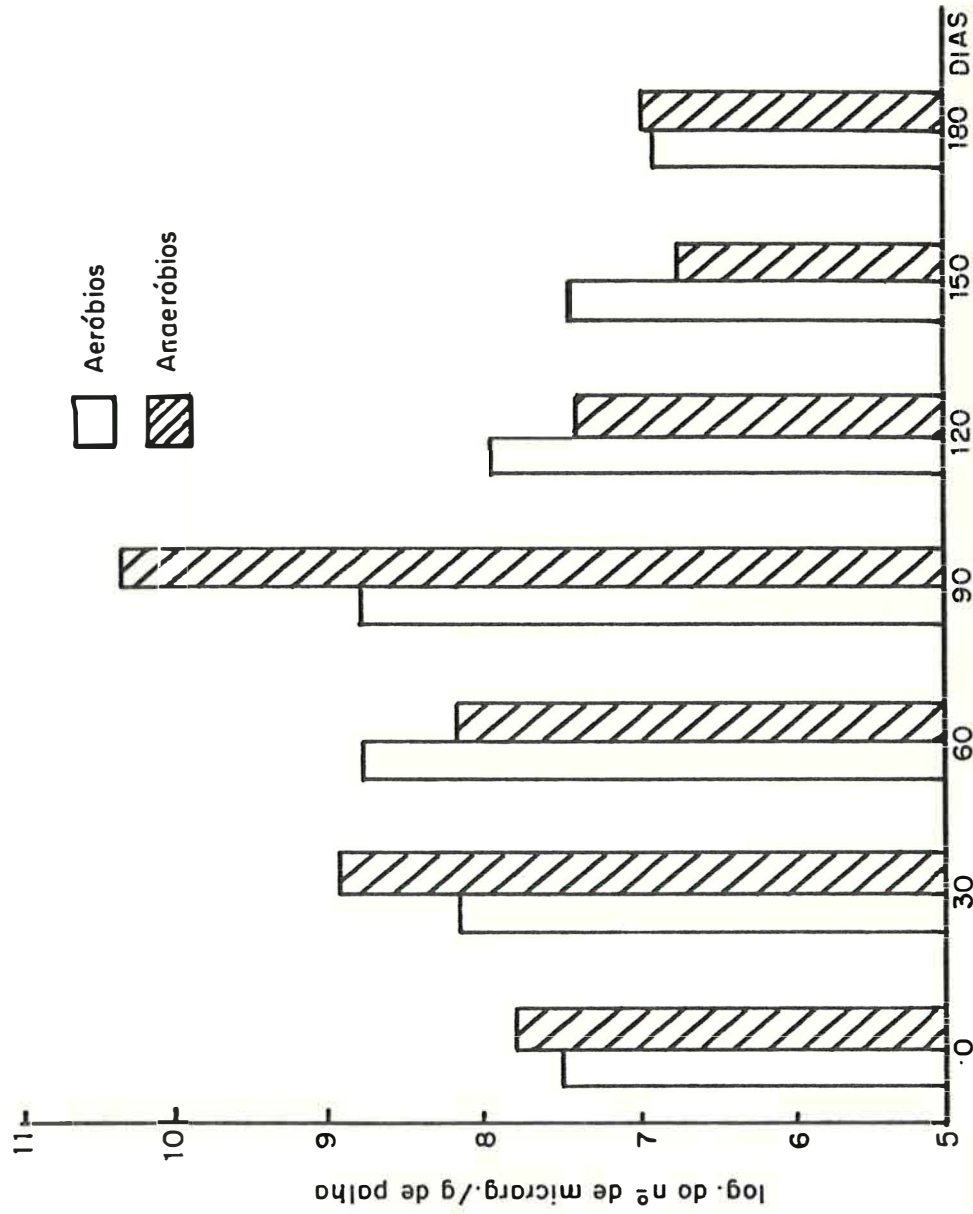


FIGURA 13 - Variação mensal das contagens totais de microrganismos ce-
lulolíticos aeróbios e anaeróbios da palha de arroz dos si-
muladores

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZÍMICA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

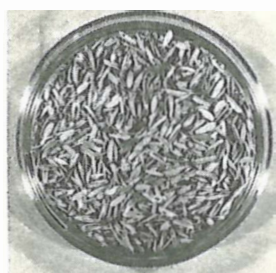
Dos microrganismos isolados, como citado no ítem 3.2.23., avaliou-se a capacidade de produção dos componentes C_1 e C_x do complexo enzimático da celulose. Os resultados são mostrados na Tabela 9.

TABELA 9. Valores da atividade celulolítica dos microrganismos portadores do complexo C_1-C_x , isolados dos simuladores de condições naturais de decomposição

Microrganismos	Atividade (unidades/ml)	
	C_1	C_x
<i>Cladosporium</i> sp	0,063	0,192
<i>Penicillium</i> sp 14B	0,016	0,083
<i>Penicillium</i> sp 41B	0,072	0,050
<i>Penicillium</i> sp 47B ₂	0,101	0,074

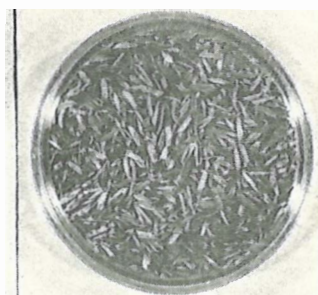
4.4. AVALIACAO DA DECOMPOSICAO DA PALHA DE ARROZ

A avaliação da decomposição da palha de arroz e evidenciada nas Figuras 14 a 18.

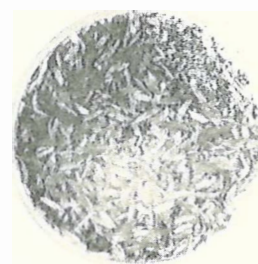


0 DIAS

FIGURA 14. Aspecto da palha de arroz no início do experimento.



30 DIAS

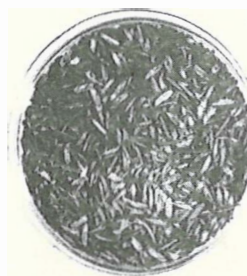


60 DIAS

FIGURA 15. Aspecto da palha de arroz aos 30 e 60 dias.



90 DIAS



120 DIAS

FIGURA 16. Aspecto da palha de arroz aos 90 e 120 dias.

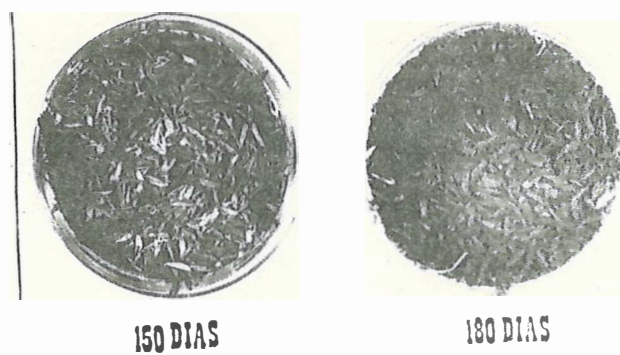
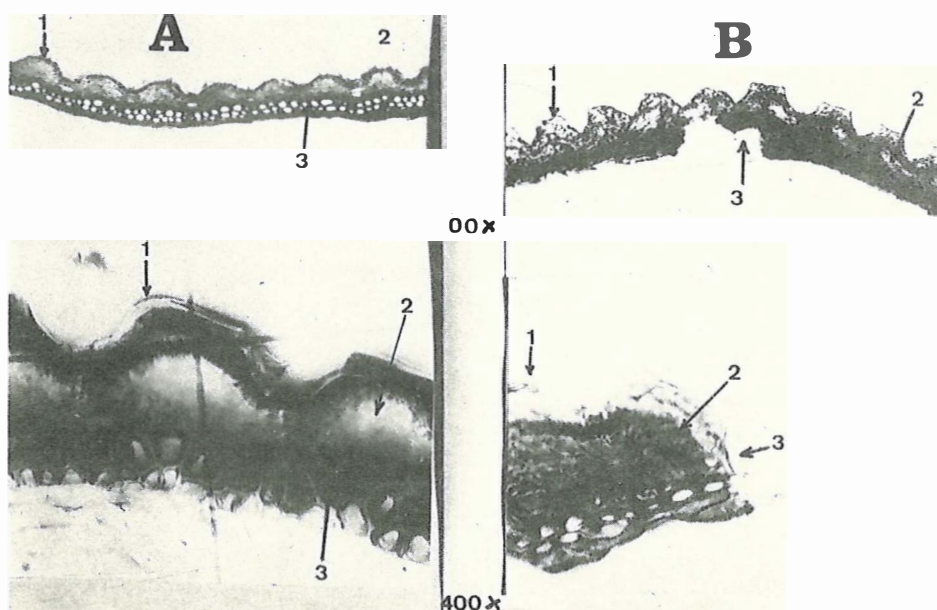


FIGURA 17. Aspecto da palha de arroz aos 150 e 180 dias.



LEGENDA: 1. Sílica
2. Cutícula
3. Epiderme esclerificada

FIGURA 18. Corte transversal de palha de arroz no início do experimento (A) e após 180 dias (B).

5. D I S C U S S A O

A decomposição da palha de arroz na natureza e a utilização da molécula da celulose pelos microrganismos habitantes do solo, como suprimento nutricional e energético. Na verdade, a ação microbiana sobre a celulose da palha de arroz, quando estudada em condições simuladas de decomposição, está sujeita a determinadas particularidades. Estas decorrem da complexa organização morfológica desse sub-produto e das condições de crescimento oferecidas pelo meio aos microrganismos participantes do processo. Neste sentido, procurou-se caracterizar as modificações do complexo palha-solo, durante o processo, bem como analisar a água drenada deste conjunto.

A água de drenagem dos simuladores foi submetida a análises semanais de pH, acidez titulável, redutores totais, sólidos totais e contagens de microrganismos celulo

líticos. Assim, pela análise da Tabela 1 e das Figuras 2 a 4 pode-se observar que os valores relativos à determinação do pH da água de drenagem dos simuladores de condições naturais de decomposição variaram entre 6,00 e 7,00. Os valores da acidez titulável mostraram uma variação entre um mínimo de 0,15 ml de NaOH 0,1 N/100 ml e um máximo de 0,57 ml de NaOH 0,1 N/100 ml. Já a determinação dos redutores totais, presentes na água de drenagem dos simuladores, esteve entre 0,77 mg de glicose/100 ml e 0,29 mg de glicose/100 ml. Os valores da determinação de sólidos totais estiveram compreendidos no intervalo de 0,040 a 0,390 g/100 ml.

A observação comparativa entre os resultados de acidez titulável e pH (Figura 2) mostrou que inicialmente há uma tendência de aumento da acidez titulável, até cerca de 84 dias. Este fato poderia ser explicado pela presença de nutrientes mais facilmente disponíveis à flora microbiana mista presente nos simuladores, permitindo, assim, a formação de compostos de reação ácida, que seria uma indicação da utilização dos nutrientes durante o metabolismo microbiano (WHITNEY et alii, 1969 e STUTZENBERGER et alii, 1970). É importante lembrar que a determinação da acidez titulável tem o caráter geral de neutralização de compostos de reação ácida, não sendo possível, para as condições das análises feitas, se concluir se houve ou não formação de ácidos. Após 84 dias, nota-se um decréscimo nos valores da acidez titulável, seguido de uma lenta tendência na elevação desses níveis. Essas observações levam à constatação de que houve uma exaustão dos nutrientes de fácil obtenção por parte da flora microbiana presente no solo, possibilitando, dessa forma, o aparecimento de uma microflora caracteristicamente celulolítica, uma vez que esses organismos se fazem presentes após exauridos do meio os açúcares de assimilação

mais fácil (ALEXANDER, 1961; WHITNEY et alii, 1969 e FREIRE, 1975), promovendo a liberação dos monômeros de D-glicose da molécula de celulose, e que livres, permitem que sejam metabolizados pelos organismos presentes no meio.

O aumento de acidez poderia ser explicado também pela lixiviação de compostos de reação ácida da matéria orgânica degradada. Na verdade, tanto o pH quanto a acidez da água de drenagem exprimem somente o que se consegue arrastar. Por isso, pode ser que o pH, bem como a acidez titulável, tenham valores superiores aos determinados, mas pelo tempo que a água percola não é possível haver equilíbrio total entre essa e o material dos simuladores para que os valores correspondam à situação real.

A queda dos valores de pH durante as primeiras semanas do processo era esperada, pois, segundo STUTZENBERGER et alii (1970), ela é proveniente da formação de ácidos durante o metabolismo dos carboidratos viáveis; e a elevação posterior a esse período se deve à presença de amônia livre.

A desigualdade de comportamento mostrada pelas curvas de acidez titulável e pH da água de drenagem dos simuladores, vem realçar que no solo dos mesmos, os microrganismos estão em fases metabólicas diferentes. Isto porque, os ácidos formados a partir de carboidratos utilizáveis, podem, ao mesmo tempo, estarem sendo consumidos por outros microrganismos presentes.

A Figura 3 mostra que ocorreu uma liberação dos redutores totais no início do processo de decomposição, seguida de rápida queda. De acordo com REESE et alii (1950), fato semelhante acontece em estudos de degradação de celulo

se envolvendo microrganismos não especificamente celulolíticos, quando razoáveis quantidades de redutores totais são liberadas, caindo com o passar do tempo. É interessante notar que os picos máximos de redutores estão compreendidos entre 77-91 dias, sendo este o mesmo período em que se tem o máximo de acidez. Isto leva a crer que nesse período ocorre uma mi-croflora ávida por nutrientes, os quais devem estar diminuídos, como consequência do desenvolvimento microbiano e da lixiviação promovida pela água adicionada. A queda dos redutores totais subsequente a 91 dias dá a idéia da atuação dos microrganismos celulolíticos, uma vez que somente esses conseguirão se utilizar da celulose como fonte energética, tornando óbvio que a palha nessa fase passa por um processo ativo de decomposição. A tendência de diminuição na liberação dos redutores mostrada a partir de 161 dias vem de encontro às deduções de HAN e ANDERSON (1974) e HAN et alii (1975), para quem o alto teor de sílica da palha de arroz, bem como as interações entre lignina e celulose, que nesta fase estão mais expostas, dificultam sobre maneira o ataque microbiano à celulose.

Na verdade, os dados de redutores totais exprimem o metabolismo total dos microrganismos presentes. Por isso, uma queda nos valores desse parâmetro não significa, necessariamente, que a atividade microbiana tenha diminuído, mas pode indicar um consumo maior de açúcar por parte da microflora. Porém, é de se esperar que os açúcares dos quais os microrganismos se utilizam sejam provenientes da molécula de celulose, ao menos após esgotados os açúcares de assimilação mais fácil.

Os dados referentes às determinações semanais de sólidos totais da água de drenagem dos simuladores, ex-

pressos na Tabela 1 e evidenciados na Figura 4, revelam que ocorreu um máximo entre 91-112 dias, sugerindo que nessa fase ocorre uma maior liberação de resíduos fixos do complexo palha-solo, que poderia, por exemplo, se constituir de sílica, e que após os 112 dias tal liberação é bem menos acentuada. Isto reforça a idéia de que é nessa fase que ocorre um processo ativo de decomposição da palha de arroz. Na verdade, trata-se de um arraste mais ou menos acentuado, já que nesses períodos os resíduos fixos da palha podem estar mais incorporados ao solo, em virtude da utilização microbiana da celulose da palha. Como os resíduos, ao menos a sílica, formam como que um arcabouço que protege a estrutura celulósica, quando a celulose se desfaz os resíduos ficam soltos podendo, então, se incorporarem ao solo dos simuladores, sendo mais facilmente arrastados.

Quanto às análises da palha de arroz, cumpre lembrar que as amostras foram obtidas quando da abertura dos simuladores, de modo que obteve-se dados mensais a 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do início do experimento.

Pela análise da Tabela 2, pode-se notar que os teores de umidade da palha de arroz variaram de 10,17-50,17%. Os valores das análises de fibra mostraram uma variação de 18,08-53,56 g/100 g de matéria seca, ao passo que os dados das determinações de sílica variaram de 1,05 a 3,41 g/100 g de matéria seca. Os dados referentes à umidade da palha, expressos na Tabela 2 e Figura 5 mostram que houve um aumento gradual até 60 dias, seguido de rápida elevação nesses valores até 90 dias, após o que aparece uma tendência de estabilização dos dados. A essa altura, a palha deve ter-se tornado mais permeável, talvez devido a decomposição da molécula de celulose, o que faz com que haja

uma maior absorção de água por parte da mesma. Aliás, as microfotografias da palha de arroz evidenciadas na Figura 18 atestam tal fato.

A Figura 6, bem como os dados de fibra da palha de arroz relacionados na Tabela 2, mostram a variação sofrida no transcorrer do experimento por esses parâmetros. Essa variação não pode ser analisada como se fosse um sistema contínuo, mas considerando cada simulador com um sistema isolado. Dessa forma, a explicação para a brusca redução apresentada no simulador aberto aos 60 dias, provavelmente reside no fato de que nesse simulador a microflora tenha conseguido um estágio ótimo de desenvolvimento, diferente dos que foram apresentados nos simuladores abertos após 90, 120, 150 e 180 dias do início do experimento, acarretando assim, as diferenças evidenciadas na Figura 6. De qualquer maneira, no geral, houve um decréscimo, o que mostra que realmente ocorreu uma decomposição da celulose da palha.

A interpretação da Figura 7 deve ser levada a efeito tal como para a variação de fibra (Figura 6). Assim a queda da curva de sílica entre 90 e 120 dias não significa, necessariamente, que nesse período tenha havido uma diminuição dos respectivos teores, bem como a elevação mostrada entre 120-150 dias. Por outro lado, como é possível ser observado nas Figuras 14 a 17, a palha dos simuladores abertos a 120 e 150 dias mostrou as maiores evidências de decomposição, tornando muito difícil a separação das camadas de solo na desmontagem dos simuladores. O solo, nessa fase, já se mostrava bastante aderido à palha, de modo que uma outra explicação para o aumento dos níveis de sílica

nestes simuladores seria dado pela sílica proveniente do solo. As observações dos teores de sílica também devem ser conduzidas para o fato de poder ter acontecido uma maior atividade microbiana celulolítica nos simuladores. No entanto, a elevação nos teores de sílica e cinzas devem indicar uma maior utilização da celulose da palha.

As suposições feitas em relação às Figuras 6 e 7, mostrando que a microflora de um simulador pode agir diferentemente da de outro, mesmo quando a montagem foi simultânea e com o mesmo material, levam a supor que a palha começa a sofrer uma degradação mais efetiva por volta de 60 dias. Essa proposição é totalmente concordante com os estudos de compostagem de STUTZENBERGER et alii (1970). Para esses pesquisadores as condições ótimas para atividade celulolítica se dão após as três primeiras semanas do processo, e a queda na extensão da hidrólise, no final do processo, se deve à exaustão dos sítios susceptíveis de hidrólise. Os mesmos pesquisadores observaram também que após 4 a 8 semanas de compostagem, 40% da celulose estava decomposta, e que a porção inacessível ao ataque enzimico não é atingida, devido ao baixo conteúdo em água ou à associação com substâncias protetoras, como lignina.

O aumento constante nos valores de nitrogênio total da palha de arroz, dando uma configuração linear a Figura 8, é ocasionado, provavelmente, tanto pela morte de microrganismos, que são decompostos no solo (ALEXANDER, 1961), como pela liberação de amônia livre, resultante do metabolismo dos nutrientes utilizados, tal como citado por STUTZENBERGER et alii (1970). A porcentagem de nitrogênio com qual os microrganismos contribuem, não como decorrente de seu metabolismo, mas pelo seu conteúdo celular, torna-se

maior com o passar do tempo, pois assim que nutrientes de fácil obtenção tenham se esgotado, os microrganismos não-celulolíticos encontram dificuldade cada vez maiores de sobrevivência.

A Tabela 3 e a Figura 9 mostram a variação dos valores da temperatura interna do simulador aberto aos 180 dias, onde se observa que os dados variaram entre 20-27°C. Deve ser ressaltado que a leitura da temperatura interna foi realizada semanalmente somente no último simulador (180 dias), pois acreditava-se que a atividade microbiana na celulolítica, levando ao processo de degradação, fosse semelhante em todos os simuladores. Porém, como já explicado, embora o processo de degradação ocorra da mesma forma em todos os simuladores, esses devem ser analisados isoladamente. Na Figura 9, nota-se que os picos máximos de temperatura são conseguidos entre 147-168 dias, levando a supor que pelo menos para o simulador aberto aos 180 dias é nessa fase que ocorre a maior atividade degradativa dos microrganismos. Isto vem de encontro ao observado nas Figuras 6 e 7, quando, respectivamente, os valores de fibra são baixos e os de sílica altos, confirmando a atividade microbiana de celulólise nesse período.

Analisando-se a Tabela 4 e Figura 10, observa-se que a temperatura do ambiente em que se encontravam os simuladores variou entre 27°C e 33,5°C, enquanto a umidade relativa ambiental esteve entre 13% e 24,5%. Pela observação da curva de temperatura ambiente (Figura 10) torna-se difícil se fazer uma afirmação tão categórica quando a de PAL et alii (1975) de que a temperatura não tem influência na decomposição da palha de arroz no solo, pois esses pesquisadores estudaram a decomposição no campo. Porém como os si-

muladores eram constituídos de recipientes de extensão limitada, é de se esperar que um aumento da temperatura ambiente seja sentido de maneira diferente pela microflora, uma vez que a temperatura tem uma atuação diferente da que ocorreria com relação ao solo de campo. Dessa forma é difícil afirmar que a temperatura ambiente não influenciou a degradação. Por outro lado, pode ser constatado pela Figura 10 que a variação da temperatura ambiental foi de 27-33,5°C.

Quando se observam as Figuras 9 e 10, percebe-se que as variações ambientais de temperatura foram sentidas pelos simuladores, porém, estes conseguiram equilibrar tais variações, mostrando um padrão mais estável.

O fato de LEE e BLACKBURN (1975) terem citado que a elevação da temperatura beneficia a marcha e a extensão da degradação da celulose, não pode ser aqui considerado, uma vez que os pesquisadores trabalharam com cultura pura de microrganismos, o que é muito diferente do complexo ecossistema do solo. Além disso, os pesquisadores estudaram a degradação através de um microrganismo termófilo *Clostridium* sp. De qualquer maneira a faixa de temperatura observada deve ter estimulado o desenvolvimento de organismos mesófilos.

Quanto à umidade relativa mostrada na Tabela 4 e na Figura 10, pode-se notar que apresentou valores baixos. Segundo SAIN e BROADBENT (1975), resíduos vegetais enterrados ou deixados na superfície do solo podem permanecer úmidos para permitirem decomposição por longos períodos, se a umidade relativa for maior que 90%, já que dessa forma, podem manter-se úmidos o suficiente para permitirem um crescimento microbiano ideal. No entanto, nas condições do experimento, os simuladores não necessitaram da

umidade contida no ar para condicionar o desenvolvimento da microflora presente. Como não se poderia contar com chuva, o umedecimento foi feito com adição semanal de água.

Uma vez analisadas as condições dos simuladores que deveriam proporcionar o desenvolvimento microbiano, procurou-se verificar como os principais grupos de microrganismos se situaram frente a estas condições, na palha e no solo, assim como se a água foi eficiente no arraste dos microrganismos, o que constituía um dos propósitos de sua adição.

No solo dos simuladores, além dos microrganismos celulolíticos, foram detectados também os aeróbios mesófilos, fungos e leveduras, actinomicetos, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Azotobacter*, bactérias denitrificantes e esporos de bactérias mesófilas. A finalidade era explicar possíveis alterações de contagens dos celulolíticos, em função de influências de outros grupos de microrganismos.

Pelo comportamento da microflora do solo dos simuladores de condições naturais de decomposição durante o decorrer do experimento, segundo os dados relacionados na Tabela 6, pode-se observar que a contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos sofreu uma variação de $5,77.10^5$ a $3,37.10^6$ microrganismos/g de solo. No entanto, após 60 dias a microflora tende a se estabilizar atingindo seu desenvolvimento máximo por volta de 150 dias. A tendência dos dados relativos à contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos após o transcurso de 60 dias, vem confirmar que nessa época se estabelece uma microflora celulolítica, em decorrência da escassez de nutrientes no meio, permitindo assim, que os microrganismos celulolíticos possam se estabelecer.

As contagens totais de fungos e leveduras do solo (Figura 6) mostram um comportamento semelhante aos da contagem total de aeróbios mesófilos, confirmando que, após 60 dias, os microrganismos realmente passam a ter dificuldades em conseguir nutrientes, predominando então, a microflora celulolítica, ocasionando uma queda após 150 dias. Essa queda na população de fungos e leveduras se dá pela dificuldade em se atingir a celulose, em decorrência da forte ligação entre lignina, sílica e fibra, dificultando a ação microbiana, tal como descrito por STUTZENBERGER et alii (1970) e HAN e ANDERSON (1974).

Os actinomicetos, assim como os microrganismos denitrificantes, também são constituintes da flora microbiana normal do solo, estando presentes em diversas reações que aí tem lugar. Esses microrganismos apresentaram um padrão de comportamento semelhante ao dos microrganismos aeróbios mesófilos, fungos e leveduras. Pelo fato de alguns actinomicetos serem celulolíticos (STUTZENBERGER et alii, 1970; STUTZENBERGER, 1971 e FREIRE, 1975) é que esses microrganismos mostram contagens elevadas após 60 dias de experimento (Tabela 6).

Os microrganismos desnitrificantes, como por exemplo, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Thiobacillus denitrificans*, são aqueles que transformam o nitrogênio orgânico em inorgânico, imobilizando-o (FREIRE, 1975). Os resultados das contagens desses microrganismos relacionados na Tabela 6, evidenciam que a população de denitrificantes permanece relativamente estável, já que, segundo FREIRE (1975), uma elevada contagem obtida não significa alto potencial de desnitrificação ou presença de desnitrificantes constituindo alta população, pois microrganismos ativos em outros processos, como amonificação e proteólise, tam

bém atuam como denitrificantes. Por outro lado, FREIRE (1975) relata que a marcha da denitrificação é lenta quando se tem como substrato carbonado palha ou capim, pois esses substratos são de difícil fermentação. Esta observação por si só explica a constância das contagens de microrganismos denitrificantes.

Na Tabela 6 também são mostrados os resultados das contagens de *Nitrobacter* e *Nitrosomonas* que são microrganismos nitrificantes, os quais atuam a partir do nitrogênio imobilizado (FREIRE, 1975). As contagens de *Nitrobacter*, bem como as de *Nitrosomonas*, mostraram um comportamento idêntico até os 60 dias, a partir do que *Nitrobacter* tende a sofrer uma pequena elevação em sua população até 150 dias, após o que não foi detectado do meio. Já *Nitrosomonas* após 60 dias sofre uma queda no número de indivíduos de sua população, apresentando uma estabilização até o final do experimento. A supremacia de *Nitrobacter* sobre *Nitrosomonas* durante a maior parte do experimento era esperada, uma vez que, embora sempre se encontre *Nitrobacter* e *Nitrosomonas* juntos, deve ocorrer tal predominância, pois se houvesse acúmulo de nitrito no solo, este fatalmente inibiria a flora microbiana (FREIRE, 1975).

São relacionados ainda na Tabela 6, os resultados das contagens de *Azotobacter* e de esporos de bactérias mesófilas. Os microrganismos pertencentes ao gênero *Azotobacter* podem viver livremente no solo, e participar da fixação não-simbiótica do nitrogênio, sendo também heterotróficos, pois dependem da disponibilidade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (FREIRE, 1975). Esses microrganismos têm um comportamento razoavelmente estável até os 90 dias. Desse período até os 120 dias têm sua popu

lação elevada, provavelmente em decorrência de que nessa fase há uma atividade celulolítica intensa, resultando em fonte energética para o seu desenvolvimento; além disso também podem ser celulolíticos. Após esse período, como a fonte de carbono torna-se cada vez mais difícil de ser conseguida, de crescem. Fato semelhante é observado na produção de esporos bacterianos. A grande produção mostrada entre 90-150 dias seria explicada pela obtenção de energia a partir do metabo-lismo dos microrganismos celulolíticos, após o que, com dificuldades de se atingir a celulose, as condições tornam-se cada vez mais adversas às bactérias, resultando não somente na queda da população bacteriana, como também na produção de esporos.

Observando-se as Tabelas 5, 7 e 8 e as Figuras 11 a 13, nota-se que a despeito do que se poderia esperar, a palha carrega desde o início do experimento uma carga maior de microrganismos celulolíticos que o solo, mesmo sendo este procedente de serrapilheira. O objetivo de se adicionar tal solo aos simuladores era exatamente o de proporcionar inóculo de celulolíticos a palha. Isto, no entanto, não invalida a hipótese de que o solo possuía microrganismos com maior atividade celulolítica.

Embora relacionados como anaeróbios pelo método de contagem empregado (SHARF, 1972), na verdade não se pode afirmar que houve a ocorrência de microrganismos anaeróbios, pois não aconteceu inibição dos aeróbios. Por isso, deve se considerar que os simuladores estiveram sob microaerobiose, e que os microrganismos relacionados como anaeróbios eram na verdade, microaerófilos ou facultativos.

Na Tabela 7 e na Figura 12 vê-se que a contagem de microrganismos celulolíticos aeróbios do solo variou de $2,20 \cdot 10^6$ a $7,70 \cdot 10^7$ microrganismos/g, enquanto a de anae

róbios esteve entre $1,93.10^6$ - $2,06.10^8$ microrganismos/g. A variação das contagens de microrganismos celulolíticos da palha (Tabela 8) oscilou entre $8,30.10^6$ - $6,26.10^8$ microrganismos/g para os aeróbios e entre $5,50.10^6$ e 250.10^{10} microrganismos/g, para os anaeróbios. Embora apresentando tais variações, é notório que, em se tratando do solo que seria a principal fonte de microrganismos celulolíticos para a degradação, os microrganismos tem alto desenvolvimento enquanto ocorrem nutrientes facilmente assimiláveis, sofrendo brusca queda em sua contagem após 120 dias. Este fato também pode ser observado quanto aos microrganismos da palha.

Quanto à água de drenagem dos simuladores, percebe-se que funcionou como boa extratora para os microrganismos do complexo palha-solo, acompanhando as variações de ambos os materiais.

Pelos dados expostos na Tabela 5 e na Figura 11, percebe-se que a microflora celulolítica aeróbia da água de drenagem dos simuladores de condições naturais de decomposição variou entre $1,59.10^4$ - $1,95.10^9$ microrganismos/ml, com seu valor máximo sendo atingido após 112 dias de transcurso do experimento. Enquanto isso, a microflora celulolítica anaeróbia da água de drenagem esteve com sua população entre $1,00.10^5$ - $8,91.10^8$ microrganismos/ml, com seu valor máximo obtido após 14 dias de desenvolvimento do experimento. Nota-se também, que a microflora celulolítica aeróbia apresentou um comportamento semelhante ao da anaeróbia, mesmo nos primeiros períodos de desenvolvimento deste trabalho quando as condições de anaerobiose ou de microaerobiose predominavam. Com isso, se é levado a pensar que os microrganismos celulolíticos aeróbios presentes conseguem ob

ter seus nutrientes mais rapidamente que os aneróbios, e assim, se desenvolver tão bem quanto esses.

A observação das Tabelas e Figuras até aqui descritas leva a concluir que o desenvolvimento da microflora presente nos simuladores e que, direta ou indiretamente, tomam parte no processo de decomposição da palha de arroz, se dá por etapas, que marcam os resultados da metabolização de nutrientes e as competições entre os diversos grupos ocorrentes.

Os microrganismos que conseguem sobreviver após exauridos os nutrientes de fácil obtenção, de um modo geral são aqueles portadores do complexo enzimático C_1-C_x descrito por REESE et alii (1950). Alguns microrganismos não-celulolíticos podem sobreviver, mas quase que obrigatoriamente têm de apresentar o componente C do complexo enzimático da celulase, já que, segundo REESE et alii (1950) esse componente não é inerente aos microrganismos celulolíticos, fato que ocorre com o componente C_1 . Dessa forma, os microrganismos portadores do componente C_x conseguiriam se utilizar dos terminais livres deixados na molécula de celulose pelo ataque realizado pelos microrganismos portadores do componente C_1 .

MANDELS (1975) verificou que a celulose tem uma estrutura altamente organizada - "celulose cristalina" - e para ser degradada enzimicamente requer microrganismos possuidores de ambos os componentes enzimáticos C_1 e C_x ; ou então, como relataram REESE e MANDELS (1980) e RYU e MANDELS (1980), sofrer um pré-tratamento para aumentar a quantidade de celulose amorfa, a qual é susceptível de ser atacada por C, uma vez que o pré-tratamento substitui a ação do componente C_1 . Este componente tem uma atividade enzimática rela-

tivamente baixa, mas agindo sobre celulose cristalina, torna-a reativa. Assim, os microrganismos portadores apenas do componente C_x podem se utilizar dessa celulose reativa, desdobrando-a em celobiose e glicose, seguindo o modelo de RYU e MANDELS (1980).

MANDELS et alii (1978) relataram que o maior fator envolvido na extensão da hidrólise da celulose e a susceptibilidade do substrato ao ataque enzimico, sendo que a celulose amorfa é rapidamente hidrolisada, seguida por uma fraca hidrólise de porções mais cristalinas e resistentes. Porém, os pesquisadores enfatizam que a extensão dessa fase rápida depende do tipo de celulose, pré-tratamento utilizado e presença de impurezas não hidrolisáveis. Dessa forma, a palha de arroz por apresentar uma estrutura altamente organizada, com um alto teor de sílica, disposta como uma "carapaça" a proteger a parte fibrosa da palha onde se localiza a celulose disponível ao ataque microbiano, realmente apresenta grande dificuldade em sofrer uma degradação microbiana. Por outro lado, essa degradação pode se tornar mais eficaz se se submeter a palha de arroz a um pré-tratamento em moinho de bola (MANDELS et alii, 1978) ou então a um pré-tratamento termo-alcálico (SHEWALE e SADANA, 1979).

Quanto à avaliação dos microrganismos em relação a sua habilidade de hidrolizar a celulose, os resultados mostraram que das cepas isoladas, 44 apresentaram alguma atividade. Houve uma predominância de fungos, fato que já era esperado, uma vez que ALEXANDER (1961) relatou que a posse de enzimas celulolíticas é mais comum entre os fungos do que entre as bactérias.

Além dos cinco microrganismos isolados como portadores do complexo C_1-C_x (Tabela 9), outras trinta e no

ve cepas mostraram atividade enzimica para um ou outro componente isoladamente. Dessas cepas, 16 apresentaram atividade somente para o componente C_1 , enquanto 23 mostraram atividade somente para o componente C_x . A variação da produção de C_1 celulase foi de 0,0009-0,317 unidades/ml, ao passo que nos microrganismos que apresentaram somente atividade C_x , a variação foi de 0,007 unidades/ml a 0,298 unidades/ml. Este relato vem confirmar a proposição de REESE et alii (1950) de que microrganismos não especificamente celulolíticos podem apresentar o componente C_x , e, dessa forma, participarem do processo de degradação da palha de arroz. Porém o componente C_1 é inerente aos microrganismos celulolíticos. Essa proposição é baseada nas observações de WOOD (1968) de que o componente C_1 é o componente capaz de atacar celulose insolúvel, altamente organizada, tornando-a susceptível a um subsequente ataque por parte de C_x .

Quando se observam os dados de atividade enzimica dos diversos microrganismos citados na literatura, nota-se que aqueles apresentam uma atividade muito superior aos isolados dos simuladores. Porém, os diversos pesquisadores que trabalham nessa área utilizam-se de culturas puras de microrganismos provenientes de micotecas, e na grande maioria dos casos utilizam-se de celulose pura, enquanto o presente experimento foi conduzido com celulose em estado natural, associado a outros componentes do tecido vegetal, como lignina, sílica, etc., que dificultam o ataque dos microrganismos celulolíticos e decompositores (HAN e ANDERSON, 1974), e a microflora utilizada foi a presente no solo dos simuladores e na palha. Dessa forma, torna-se difícil uma comparação de dados, pois as melhores fontes de enzimas celulolíticas que são os organismos pertencentes ao gênero *Trichoderma* (STERNBERG, 1976), ou qualquer outro microrganismo celulolítico, nunca foram testados em condições

semelhantes as desenvolvidas neste experimento.

Dos CinCo miCroorganismos isolados Como portadores do complexo C_1-C_x , quatro eram *Penicillium* (14B, 41B e 47B₂) e um *Cladosporium*.

A despeito de toda a problemática para se fazer uma fiel comparação entre os resultados, pode ser notado que o *Penicillium* sp 47B₂ apresentou o componente C_1 com uma atividade maior que a de *Myrothecium verrucaria* NRRL 2003 (0,092 unidades/ml) utilizado por MENEZES et alii (1976); e mais, sua atividade C_x foi pouco menor que a do Basidiomiceto 50F (0,130 unidades/ml), o qual é descrito por MENEZES et alii (1976) como um fungo altamente produtor de celulase. Por outro lado, o *Penicillium* sp 47B₂ mostrou ter a mesma capacidade de produção da enzima C_1 que *Stachybotrys atra* NRRL 1877, que tem uma atividade para esse componente de 0,100 unidades/ml (MENEZES et alii, 1976). Pelas atividades demonstradas pelo *Penicillium* sp 47B₂ pode ser evidenciado que devido ao seu alto poder enzimico poderá ser empregado em atividades que requeiram um microrganismo celololítico.

Na observação da Tabela 9 um fato interessante se destaca: *Cladosporium* sp e um organismo nunca descrito antes como celololítico, e no presente experimento se mostrou com uma atividade de 0,063 unidades/ml para o componente C_1 e 0,192 unidades/ml para C_x . O aparecimento de tal organismo sugere que ou se trata de uma espécie nova ou um microrganismo mutante, que pelas condições adversas de obtenção de nutrientes impostas pelos simuladores, desenvolveu os componentes do complexo enzimico da celulase.

As atividades enzimáticas de *Penicillium* sp 14B e *Penicillium* sp 41B (Tabela 9) embora não tão elevadas quanto às do *Penicillium* sp 47B₂, não podem ser desprezadas, no contexto geral, já que os demais microrganismos presentes, atuando simultaneamente, podem auxiliar na intensidade de ação degradativa dos microrganismos. Convém ressaltar que a degradação da palha de arroz, através da degradação de sua celulose, deve ser entendida como um processo altamente dinâmico, com um importante sinergismo ocorrendo entre toda a microflora presente nos simuladores.

As Figuras de 14 a 17 mostram o aspecto macroscópico da palha de arroz durante as diversas etapas do experimento. Observando-se tais Figuras, nota-se que a partir de 90 dias (Figura 16) há um início de decomposição da palha, fato este que é bem evidenciado na Figura 17. Essas observações são totalmente concordantes com as de STUTZENBERGER et alii (1970) de que a degradação microbiana de resíduos celulósicos se inicia após três semanas.

A Figura 18 mostra o aspecto microscópico da palha de arroz antes de sofrer o ataque microbiano e após iniciada a etapa de degradação. Pela Figura 18 pode ser no estado que a camada de fibra está envolta por uma camada de sílica, que forma como que uma "carapaça" a proteger a parte celulósica o que, sem dúvida, dificulta o ataque microbiano à fibra. Por outro lado, a mesma Figura mostra o floema desintegrado da palha, bem como algumas células parenquimatosas. Há predominância de sílica em alguns locais, e na ausência dessa, princípio de degradação. Essas observações ilustram que realmente ocorreu uma ação microbiana sobre a palha de arroz nos simuladores de condições naturais de decomposição, levando a uma degradação de tal resíduo.

Tomando a discussão dos dados até aqui relacionados, de forma mais abrangente, observa-se que entre 14 e 35 dias ocorre uma elevação nos valores de pH e acidez titulável (Figura 2), redutores totais (Figura 3), sólidos totais (Figura 4) e contagens de microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios da água de drenagem (Figura 11). As contagens de microrganismos celulolíticos da palha e do solo (Figuras 12 e 13) também mostram uma elevação entre 0 e 60 dias. Os resultados das análises físico-químicas da água de drenagem sofrem, de modo geral, uma queda em seus valores até em torno de 85 dias, quando novamente se elevam. As contagens microbianas da água de drenagem, solo e palha também mostram altas contagens por volta de 90 dias. A Figura 16 evidencia que a partir de 90 dias a palha já mostra sinais de decomposição.

Em função do exposto, deve ser proposto que os microrganismos, que direta ou indiretamente estão envolvidos na decomposição da palha de arroz, apresentam três fases distintas de desenvolvimento para levarem a palha a decomposição. Assim, a primeira fase compreenderia o período de 14 dias a 35 dias, onde as elevadas contagens são plenamente justificáveis, uma vez que nesse período existem nutrientes que são facilmente conseguidos pelos microrganismos, acarretando inclusive um aumento no teor de acidez titulável da água de drenagem, devido ao metabolismo desses nutrientes. STUTZENBERGER et alii (1970) também observaram tal fato quando estudaram a compostagem de resíduos municipais sólidos.

A segunda fase seria aquela compreendida entre 85-127 dias, quando realmente deve haver a instalação de uma microflora estritamente celulolítica, já que nesse pe-

ríodo os nutrientes devem ter se esgotado restando, então, a celulose como fonte energética para os microrganismos.

A terceira seria a que se daria a partir de 134 dias, quando provavelmente acontece uma exaustão dos radicais mais susceptíveis de serem atacados pelas enzimas microbianas, uma vez que, nessa fase, a celulose restante deve estar fortemente associada a substâncias protetoras, como a lignina (STUTZENBERGER et alii, 1970 e HAN e ANDERSON, 1974).

Vale ressaltar que o desenvolvimento microbiano continua nas etapas intermediárias às três aqui apresentadas, somente que nessas etapas os microrganismos não atingem os estágios ótimos de desenvolvimento conseguidos nos períodos correspondentes às três fases de desenvolvimento apresentadas.

As observações de BREUIL e KUSHNER (1976) de que em meio de cultura as enzimas capazes de degradar a celulose são produzidas somente após o total esgotamento de glicose do meio, quando passa a ocorrer um íntimo contato entre fibra e célula microbiana, possibilitando o desdobramento da molécula de celulose, vem reforçar a proposição feita.

Embora muitas explicações tenham sido obtidas neste trabalho, muitas outras ainda esperam elucidação, uma

vez que se trata de um assunto extremamente complexo. A utilização de pré-tratamento deve ser considerada para se acelerar o processo de decomposição. Assim, os estudos da decomposição dos materiais celulósicos devem ser intensificados para que se consiga um melhor aproveitamento desses subprodutos. Aliado a isso, o emprego das enzimas celulolíticas no Brasil, deveria ser intensificado, de modo a se tentar uma utilização mais racional para a palha de arroz.

6. C O N C L U S Õ E S

Nas condições do presente experimento pode-se concluir que:

- 1 - O desenvolvimento da flora microbiana apresenta três fases ótimas de desenvolvimento. A primeira acontecedo entre 14 e 35 dias, quando a microflora apresenta grande desenvolvimento em consequência da presença de nutrientes de fácil assimilação no meio. De 85 a 127 dias ocorre a segunda fase de desenvolvimento, quando se instala uma microflora celulolítica. E a terceira

acontece após 134 dias, quando os radicais das moléculas de celulose susceptíveis de serem atacados diminuem, tornando mais difícil a ação microbiana.

- 2 - O melhor período para a obtenção de microrganismos celulolíticos está compreendido entre 90 dias e 120 dias.
- 3 - Os microrganismos microaerófilos foram mais abundantes que os aeróbios, porém somente estes mostraram atividade enzimica detectável.
- 4 - Os microrganismos prevaletentes no processo de decomposição da palha de arroz foram os fungos.
- 5 - A microflora de um simulador pode se comportar diferentemente de outro, num mesmo instante, embora o processo de decomposição passe pelas mesmas etapas em todos os simuladores.
- 6 - As interações entre celulose, lignina e sílica que se estabeleceram após 14 dias, dificultam o ataque microbiano à celulose.
- 7 - Os microrganismos que conseguiram sobreviver após esgotados do meio os nutrientes de fácil assimilação foram os portadores dos componentes enzimáticos C_1 e/ou C_x
- 8 - Microrganismos não-celulolíticos portadores do componente C_x celulase puderam se desenvolver após esgotados os nutrientes facilmente assimiláveis pela flora microbiana.

- 9 - A palha de arroz mostrou ser um substrato celulósico pouco susceptível de sofrer degradação enzimática, em virtude do seu alto teor de sílica.
- 10 - O *Penicillium* sp 47 B₂ obtido do experimento é um microrganismo com alto potencial de utilização como celulolítico.
- 11 - O aparecimento de um *Cladosporium* sp com atividade celulolítica, sugere se tratar ou de uma espécie nova ou de uma cepa mutante que se adaptou às condições do meio e desenvolveu os componentes C₁ e C_x celulase.

7. L I T E R A T U R A C I T A D A

ALEXANDER, M., 1961. Introduction to Soil Microbiology.
New York, John Wiley. 472p.

ARAKAKI, T., 1977. Produção de Enzimas Celulolíticas. Bo-
letim do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas,
49: 33-44.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTRY, 1970. Offi-
cial Methods of Analysis. 11.^a ed.. Washington, A.O.A.C..
1015p.

BARNETT, H.L., 1967. Illustrated Genera of Imperfect Fungi.
2.^a ed.. Minneapolis, Burgess Publishing. 225p.

BELLAMY, W.D., 1974. Single Cell Protein from Cellulosic

Wastes. Biotechnology and Bioengineering. New York, 16: 323-336.

BERG, B., 1970. Cellulose Degradation and Formation by *Phialophora malorum*. Archives für Mikrobiologie. Berlin, 118: 61-65.

BERG, B., 1975. Location of Cellulase in *Cellvibrio fulvus* as Dependent on Carbon Source for Growth. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 21: 51-57.

BERG, B. e A.V. HOFSTEN, 1975. The Ultrastructure of the Fungus *Trichoderma viride* and Investigation of its Growth on Cellulose. Journal of Applied Bacteriology. London, 41: 395-399.

BERG, B. e G. PETERSSON, 1977. Location and formation in *Trichoderma viride*. Journal Applied Bacteriology. London, 42: 65-75.

BERG, B.; B.V. HOFSTEN e G. PETERSSON, 1972. Growth and Cellulase Formation by *Cellvibrio fulvus*. Journal of Applied Bacteriology. London, 35: 201-214.

BERGHEM, L.E.R.; L.G. PETERSSON e U.B. AXIÖ-FREDRIKSSON, 1975. The Mechanism of Enzymatic Cellulase Degradation. Characterization and Properties of a β -1,4-Glucan Cellobiohydrolase. European Journal of Biochemistry. Berlin e New York, 53: 55-62.

BETRABET, S.M. e U.I. PATEL, 1969. Studies on cellulolytic enzymes of *Aspergillus terreus*. Journal of Sciences Technology, 7B(3): 221-226. Apud Biological Abstracts.

Philadelphia, 1970. 51(19) 109223.

BLACK, C.A.; D.D. EVANS, J.L. WHITE; L.E. ENSMINGER e F.E. CLARK, 1965. Methods of Soil Analysis. Part 1. Madison, American Society of Agronomy. 770p.

BREUIL, C. e D.J. KUSHNER, 1976. Cellulase Induction and Use of Cellulose as Preferred Growth Substrate by *Cellvibrio gilvus*. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 22:1776-1781.

COUTTS, A.D. e R.E. SMITH, 1976. Factors Influencing the Production of Cellulases by *Sporotrichum thermophile*. Applied and Environmental Microbiology. Baltimore, 31: 819-825.

DHAWAN, C.L. e V.P. MAHAJAN, 1968. Melhoramento de Solos Salinos e Alcalinos pelo Emprego de Palha de Arroz. Fertilité. Paris, 32: 27-36.

FREIRE, J.R.J., 1975. Microbiologia do Solo. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia - UFRS. 234p.

GUPTA, D.P. e J.B. HEALE, 1971. Induction of Cellulase(C_x) in *Verticillium albo-atrum*. Journal of General Microbiology. Cambridge, 63:163-173.

HALL, D. e M. SLESSOR, 1976. Self sufficiency through biology. New Scientist. London, 71: 136-137.

HALLIWELL, G. e M. RIAZ, 1970. The Formation of Short Fibres from Native Cellulase by Components of *Trichoderma koningii* Cellulase. Biochemical Journal. London, 116: 35-42.

- HALLIWELL, G. e M. RIAZ, 1971. Interaction between components of the cellulase complex in *Trichoderma koningii*. Archives für Mikrobiologie. Berlin, 78: 295-309.
- HALLIWELL, G. e M. GRIFFIN, 1973. The Nature and Mode of Action of the Cellulolytic Component C₁ of *Trichoderma koningii* on Nature Cellulose. Biochemical Journal. London, 135: 587-594.
- HAN, Y.M. e A.W. ANDERSON, 1974. The Problem of Rice Straw. A Possible Feed Trough Fermentation. Economic Botany. New York, 24: 338-344.
- HAN, H.M.; J.S. LEE e A.W. ANDERSON, 1975. Chemical Composition and Digestibility of Ryegrass Straw. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Washington, 23: 928-931.
- HITCHNER, E.V. e J.M. LEATHERWOOD, 1980. Use of a Cellulase-Depressed Mutant of Cellulomonas in the Production of a Single-Cell Protein Product from Cellulose. Applied and Environmental Microbiology. Baltimore, 39: 382-386.
- JOHANSSON, M., 1966. A Comparisson between the cellulolytic activity of whitw and Brown Rot Fungi. I. The Activity on Insoluble Cellulose. Physiology Plantarum. Copenhagen, 19: 709-722.
- KARRER, P., 1933. Tratado de Química Orgânica. 3^a ed.. Buenos Aires, Manual Marin. 1150p.
- LEE, B.H. e T.H. BLACKBURN, 1975. Cellulase Production by a Thermophilic *Clostridium* Species. Applied Microbiology. Baltimore, 30: 346-353.

- LEPAGE, E.S. e W. BORZANI, 1973. Agitação por Injeção de ar em Fermentador para Serragem. Revista Brasileira de Tecnologia. São Paulo, 4: 127-132.
- LOBO, J.M.V.; A.C. CASAS e E.P. YÓFERA, 1953. Aprovechamiento Industrial de los Subproductos del Arroz. Microbiología Española. Madrid, 6: 129-147.
- MANDELS, M., 1975. Microbial Sources of Cellulase. Bio - technology and Bioengineering. New York, 5: 81-105.
- MANDELS, M. e E.T. REESE, 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. Journal of Bacteriology. Washington, 79: 816-826.
- MANDELS, M. e J. WEBER, 1969. The production of cellulases. Advances in Chemistry Series. Washington, 95: 391-414.
- MANDELS, M.; S. DORVAL e J. MEDEIROS, 1978. Saccharification of Cellulose with *Trichoderma* Cellulase. Annual Symposium on Fuel from Biomass, 2nd. New York, 2: 627-669.
- MENEZES, T.J.B.; H. CASTLE e H. VILLAS BOAS Jr., 1972. Efeito da Composição do Meio na Produção de Celulase por *Stachybotrys atra*. Revista Brasileira de Tecnologia. São Paulo, 3: 189-195.
- MENEZES, T.J.B.; P.R. DE LAMO e T. ARAKAKI, 1976. Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Celúlase. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 7(1): 83-90.
- MENEZES, T.J.B.; T. ARAKAKI e P.R. DE LAMO, 1976. Produção

de Complexo Celulolítico C_1-C_x por Microrganismos. Coleção do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 7(1): 91-96.

NELSON, N.N., 1944. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 153: 375-380.

NORKANS, B., 1969. Cellulose and Cellulolysis. Advances in Applied Microbiology. New York e London, 9: 91-130.

PAL, D.; F.E. BROADBENT e D.S. MIKKELSEN, 1975. Influence of Temperature on the Kinetics of Rice Straw Decomposition in Soils. Soil Science. Baltimore, 120: 442-449.

PEITERSEN, N., 1975. Production of Cellulase and Protein from Barley Straw by *Trichoderma viride*. Biotechnology and Bioengineering. New York, 17: 361-374.

POCHON, J., 1963. Aspect du probleme de la Cellulolyse. Microbiologia Española. Madrid, 16: 130-137.

REESE, E.T.; E. SMAKULA e A.S. PERKIN, 1959. Enzymic Production of Cellotriose from Cellulose. Archives of Biochemistry and Biophysics. New York, 85: 171-175.

REESE, E.T. e M. MANDELS, 1980. Production of Microbial Enzymes for Cellulose Hydrolysis. Ciência Biológica. Coimbra, 5: 11-26.

REESE, E.T.; R.G. SIU e H.S. LEVINSON, 1950. The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivates and its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis.

Journal of Bacteriology. Baltimore, 59: 485-497.

RYU, D.D.Y. e M. MANDELS, 1980. Cellulase: biosynthesis and applications. Enzyme Microbial Technology, 2: 91-102.

SADANA, J.C.; J.G. SHEWALE e M.V. DESHPANDE, 1979. Enhanced Cellular Production by a Mutant of *Sclerotium rolfsii*. Applied and Environmental Microbiology. Baltimore, 38: 730-733.

SAIN, P. e F.E. BROADBENT, 1975. Moisture Absorption, Mold Growth and Decomposition of Rice Straw at Different Relative Humidities.-- Agronomy Journal. Madison, 67: 759-762.

SASS, E.J., 1964. Botanical Microtechnique. 3^a ed.. Ames, The Iowa State University. 228p.

SELBY, K. e C.C. MAITLAND, 1967. The Cellulase of *Trichoderma viride*. Separation of the components involved in the solubilization of cotton. Biochemical Journal. London, 104: 716-724.

SHEWALE, J.G. e J.C. SADANA, 1978. Cellulase and β -Glucosidase production by a basidiomycete species. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 24: 1204-1216.

SHEWALE, J.G. e J.C. SADANA, 1979. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtrate for sugar production. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 25: 773-783.

SOMOGY, M., 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 195: 19-23.

STERNBERG, D., 1976. β -Glucosidase of *Trichoderma*: Its Bio synthesis and Role in Saccharification of Cellulose. Applied and Environmental Microbiology. Baltimore, 31: 648-654.

STERNBERG, D. e G.R. MANDELS, 1979. Induction of Cellulolytic Enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. Journal of Bacteriology. Washington, 139: 761-769.

STERNBERG, D.; P. VIJAYAKUMAR e E.T. REESE, 1977. β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 23: 139-147.

STREAMER, M.; K.E. ERKSSON e B. PETTERSSON, 1975. Extracellular Enzymes System Utilized by the *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*). Functional Characterization of Five Endo-1,4- β -Glucanases and One Exo-1,4- β -Glucanase. European Journal of Biochemistry. Berlin e New York, 59: 607-613.

STUTZENBERGER, F.J., 1971. Cellulase Production by *Thermomonospora curvata* Isolated from Municipal Solid Waste Compost. Applied Microbiology. Baltimore, 22: 147-152.

SHARF, J.M., 1972. Exame Microbiológico de Alimentos. São Paulo, Poligono. 257p.

STUTZENBERGER, F.J.; A.J. KAUFMAN e R.D. LOSSIN, 1970. Cellulolytic Activity in Municipal Solid Waste Compositing. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 16: 553-560.

TARKOW, H. e W.C. FEIST, 1969. A mechanism for improving -

the digestibility of lignocellulosic material with dilute alkali and liquid ammonia. Advances in Chemistry Series. New York, 95: 197-204.

WHITNEY, P.; J.M. CHAPMAN e J.B. HEALE, 1969. Carboximetil cellulase Production by *Verticillium albo-atrum*. Journal General Microbiology. Cambridge, 56: 215-225.

WILKE, C.R., 1976. Systems for Hydrolyzing Cellulose to Generate Fermentable Carbohydrates. Energy and Bioconversion Symposium, São Paulo. 43p.

WILKE, C.R., 1977. Production of Sugars and Ethanol Based on the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Fuels from Biomass Symposium. Champaign, p.115-144.

WOOD, T.M., 1968. Cellulolytic Enzyme System of *Trichoderma koningii*. Separation of Components Attacking Native Cotton. Biochemical Journal. London, 109: 217-227.

WOOD, T.M. e S.I. McCRAE, 1972. The Purification and Properties of the C₁ Component of *Trichoderma koningii* Cellulase. Biochemical Journal. London, 128: 1183-1192.