

**IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS  
E *Thermoactinomyces* spp. ISOLADOS DO  
PROCESSO DE COMPOSTAGEM PARA  
A PRODUÇÃO DE *Agaricus brasiliensis***

**LUANA CÁSSIA BORGES SILVA**

**2010**

**LUANA CÁSSIA BORGES SILVA**

**IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS E *Thermoactinomyces* spp.  
ISOLADOS DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM PARA A  
PRODUÇÃO DE *Agaricus brasiliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Luana Cássia Borges.

Identificação de actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp.  
isolados do processo de compostagem para a produção de *Agaricus  
brasiliensis* / Luana Cássia Borges Silva. – Lavras : UFLA, 2010.  
70 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.  
Orientador: Eustáquio Souza Dias.  
Bibliografia.

1. Cogumelo. 2. Celulose. 3. Amido. 4. Temperatura. 5. pH. 6.  
Degradação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.15

**LUANA CÁSSIA BORGES SILVA**

**IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS E *Thermoactinomyces* spp.  
ISOLADOS DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM PARA A  
PRODUÇÃO DE *Agaricus brasiliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2010

Profª. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

UFLA

Prof. Dr. Francisco Eduardo de Carvalho Costa

UNIVÁS

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

*“Percebais ou não, o universo se desenrola sem dúvida como deveria. Estai em paz com Deus, qualquer que seja vossa concepção dele e, quaisquer que sejam vossas obras e vossos sonhos, guardai no desconcerto ruidoso da vida a paz em vossa alma. Com todas as suas perfídias, as suas tarefas fastidiosas e os seus sonhos desfeitos, o mundo é belo! Prestai atenção... Tratai de ser felizes.”*

*(Trecho do livro ‘A viagem de Théo’ – Catherine Clément)*

## DEDICO E OFERECO

A minha mãe, Daisa, que simplesmente é a razão de minha vida! Obrigada mãe, por me amar tanto, por me apoiar em todas as minhas decisões coerentes, por me advertir nos atos incorretos, e por fazer quase o impossível pra me ver feliz!

A minha avó materna, Vandete, que também é razão de minha existência e me proporcionou tanto carinho e atenção por tantos anos.

Ao meu pai, José Roberto (*in memoriam*), que da sua forma sempre me amou e sonhou com minha formação profissional.

A todos da minha família, que acolhem e me confortam, me aconselham e auxiliam sempre que é preciso.

Sem vocês, nada faz sentido...

Com vocês, tudo é possível...

Por vocês, tudo vale a pena!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que é o alicerce de minha vida, que sempre me abre caminhos, concede oportunidades de crescimento pessoal e espiritual, e sempre me protege.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar o mestrado, e a Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Eustáquio Souza Dias, pela orientação, apoio, credibilidade e pela oportunidade única que me concedeu de realizar parte do meu trabalho na UFRGS, onde pude aprender tanto sobre as ‘Actinobactérias’.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFLA. Por contribuírem tanto com meu conhecimento, me mostrando como o mundo ‘MICRO’ é tão magnífico, exuberante e extenso, ou melhor, ‘MACRO’.

Aos membros da banca examinadora, professora Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista e professor Dr. Francisco Eduardo de Carvalho Costa, pela participação e sugestões apresentadas.

Ao Thiago Souza e à Claudinelli Galvão, colegas de projeto, pela convivência e parceria no laboratório.

Aos grandes amigos de Lavras, Jessé Valentin, Fabiana Couto, Maryeimy Varón, Thiago Souza, Charles Neris, Alessandra Millezi, Mara Eliza, Cíntia Souza, Paula Marcela, Karina Herrera, Carolina Gusmão e Lisiane Zanella, pelos momentos tão bons que passamos juntos, como também pelas preocupações e receios que compartilhamos, por tantas vezes.

À Cidinha, por ser tão carinhosa, amiga e paciente, além do apoio quando muito precisei.

À professora Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 'PROFA', simplesmente... OBRIGADA, por me receber com tanto carinho e atenção, me fazer sentir como se eu realmente fosse uma de suas 'filhas' da micro, me dar a liberdade e suporte para realizar o meu trabalho e, assim, abrir caminhos para eu conhecer pessoas tão queridas, bem como novos valores e uma cultura diferente.

Ao professor Dr. José Carlos Germani, UFRGS, por intermediar a oportunidade que me foi cedida, e pela atenção e cuidados. 'O trem bão só!'

A Margaroni Fialho (Marga), por me ensinar a identificar as actinobactérias. Obrigada, pela valiosa contribuição que me passou e que será de grande importância em minha vida profissional! Agradeço também pela convivência, amizade e, principalmente, pela paciência.

A Sabrina Salamoni (Bina), por me ensinar tanto em diversas ocasiões, me auxiliar sempre que precisei, pela amizade e pelos momentos bons que passamos juntas.

A Mariana Wanderley (Mari), primeiramente por aceitar me ajudar, por ser o meu braço direito na realização de uma grande parte do meu trabalho, como pela dedicação, paciência e momentos de convivência e amizade. Mari, sem você eu não teria acabado a tempo. Obrigada, por tudo!

Aos queridos amigos de Porto Alegre, tanto os que conheci na Micro, July Zanin, Karina Heck, Michele Mann (Mica), Ana Cassenego, Valdionir Freitas (Obama), Adriane Zimmer, Daniele Oliveira e Viviane Juliano, como os que me receberam e me fizeram sentir como se eu estivesse em casa, Lucélia Cabral, Lúdia Harumi e Rosane Martinazzo. Não tenho palavras para expressar todos os meus agradecimentos! SAUDADE...

Agradeço à minha grande amiga Mariana Borges, minha 'irmãzinha', que cresceu comigo e sempre foi tão fiel à nossa amizade. Uma pessoa que me deixa tão emocionada ao dizer que eu sou seu motivo de orgulho!

Ao André Sá, pela amizade, e sugestões nas correções iniciais deste trabalho, antes da defesa.

Ao João Batista (JB), por ter sido tão fundamental para o início do meu mestrado e por todo o incentivo e apoio que me transmite.

Aos meus amigos e colegas de faculdade, Maria Rosana Barbosa, Maisa Cimadon, Ana Carolina Ferreira, Humberto Queiroz, Mirian Sáber, Joelma Cristina e Etiene Fagundes, por continuarem fazendo parte de minha trajetória, mesmo a distância.

A Nayara Roberto e ao Rodrigo de Góes, pela amizade e momentos de convivência, como pelo apoio e auxílio na finalização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
2.1 Compostagem .....	03
2.2 <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	06
2.3 Actinobactérias .....	07
2.4 <i>Streptomyces</i> .....	10
2.5 <i>Thermoactinomyces</i> .....	11
2.6 Actinobactérias no processo de compostagem .....	13
2.7 Identificação de actinobactérias .....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Substrato e coleta das amostras .....	20
3.2 Isolamento dos microrganismos .....	21
3.3 Local das identificações dos microrganismos .....	21
3.4 Microcultivo e microscopia eletrônica de varredura .....	22
3.5 Análise estatística .....	22
3.6 Identificação bioquímica e fisiológica .....	23
3.6.1 Pigmentação .....	23
3.6.2 Crescimento sobre única fonte de carbono e nitrogênio .....	23
3.6.3 Redução do nitrato .....	24
3.6.4 Testes de degradação: xantina, tirosina, caseína, esculina, amido e gelatina .....	25
3.6.5 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl .....	25
3.6.6 Resistência à fervura .....	26
3.6.7 Motilidade e coloração álcool-ácido resistente .....	26
3.7 Extração do DNA cromossomal .....	26
3.8 Reação em cadeia da polimerase .....	27
3.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores .....	27
3.8.2 Amplificação e eletroforese em gel de agarose .....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1 Isolamento dos microrganismos .....	29
4.2 Identificação dos microrganismos .....	36
4.2.1 <i>Thermoactinomyces</i> spp. ....	36
4.2.2 <i>Streptomyces</i> spp. ....	41
4.2.3 <i>Nocardia</i> spp. ....	48

4.2.4 <i>Streptosporangium</i> sp. ....	50
4.3 Caracterização molecular .....	51
5 CONCLUSÕES .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
ANEXOS .....	61

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Colônias cobertas pelo micélio aéreo cinza e branco, apresentando anéis concêntricos .....	08
FIGURA 2	Esporos de <i>Thermoactinomyces</i> ao longo da hifa. Microscopia de contraste de fase .....	12
FIGURA 3	Pilha de composto mostrando o halo acinzentado das actinobactérias .....	14
FIGURA 4	Tipos de arranjo da cadeia simples de esporos: cadeia reta, flexível, “retinaculum-apertum”, cadeia em espiral .....	17
FIGURA 5	Tipos de arranjo das cadeias verticiladas: monoverticilo, monoverticilo espiral, biverticilo, biverticilo espiral .....	17
FIGURA 6	Modelo da estrutura secundária para a pequena subunidade do rRNA de procariotos, mostrando as regiões de variabilidade (V1-V9) .....	19
FIGURA 7	Comparação pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade das médias das populações de actinobactérias nas 5 amostras do composto .....	31
FIGURA 8	Variação da população de actinobactérias em função da variação de oscilação de temperatura .....	32
FIGURA 9	Frequência dos gêneros de actinobactérias e <i>Thermoactinomyces</i> encontrados nas 5 amostras do composto .....	35
FIGURA 10	Cultura de um isolado de <i>Thermoactinomyces</i> spp. apresentando micélio aéreo branco .....	37
FIGURA 11	Microscopia óptica mostrando os esporos ao longo da hifa de <i>Thermoactinomyces</i> sp. (43A/1.1) .....	37
FIGURA 12	Microscopia eletrônica de varredura exibindo os esporos de <i>Thermoactinomyces</i> sp. (43A/1.1) .....	38

FIGURA 13	Cultura de um isolado de <i>Streptomyces</i> em meio sólido, apresentando micélio aéreo cinza .....	41
FIGURA 14	Microscopia óptica mostrando a cadeia simples de <i>Streptomyces</i> sp. (21C/5.4) .....	42
FIGURA 15	Microscopia eletrônica de varredura exibindo cadeia de esporos simples em formato retinaculum-apertum (setas) de <i>Streptomyces</i> sp. (18B/4.4) .....	43
FIGURA 16	Microscopia eletrônica de varredura exibindo a superfície espinhosa de <i>Streptomyces</i> sp. (18B/4.4) .....	43
FIGURA 17	Microscopia óptica exibindo os esporângios na extremidade das hifas de <i>Streptosporangium</i> sp. (25A/4.2) .....	50
FIGURA 18	Eletroforese em gel de agarose 1,0% exibindo produtos de amplificação dos oligonucleotídeos F243 e R513 .....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	População de actinobactérias no processo de compostagem (fase II), e variação de temperaturas (°C) e pH .....	30
TABELA 2	Percentual de isolados selecionados para a identificação, de acordo com cada morfotipo .....	33
TABELA 3	Resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos realizados para a identificação das espécies de <i>Thermoactinomyces</i> : Crescimento em NaCl 1%, tolerância dos endósporos à fervura, crescimento em 30 e 55°C .....	39
TABELA 4	Resultados dos testes bioquímicos realizados para a identificação das espécies de <i>Thermoactinomyces</i> : testes de degradação, e crescimento em diferentes fontes de carbono..	40
TABELA 5	Resultados dos testes bioquímicos e morfológicos realizados para a identificação das espécies de <i>Streptomyces</i> : coloração do micélio do substrato, produção de melanina, formato da cadeia de esporos .....	44
TABELA 6	Resultados dos testes bioquímicos realizados para a identificação das espécies de <i>Streptomyces</i> : crescimento em diferentes fontes de carbono .....	45
TABELA 7	Resultados dos testes bioquímicos realizados para a identificação das espécies de <i>Streptomyces</i> : crescimento em diferentes fontes de nitrogênio .....	46
TABELA 8	Resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos realizados para a identificação das espécies de <i>Streptomyces</i> : testes de degradação, crescimento em NaCl (7, 10 e 13%), redução do nitrato .....	47
TABELA 9	Resultados dos testes bioquímicos realizados para a identificação de espécies de <i>Nocardia</i> : crescimento em diferentes fontes de carbono .....	49

TABELA 10	Resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos realizados para a identificação de espécies de <i>Nocardia</i> : testes de degradação, redução do nitrato, crescimento em 30 e 55°C, resistência à fervura .....	49
TABELA 11	Resultados dos testes bioquímicos realizados para a identificação de espécie do isolado pertencente ao gênero <i>Streptosporangium</i> : crescimento fontes de carbono (meso-inositol, raminose), degradação do amido e gelatina, redução do nitrato, motilidade .....	50

## RESUMO

SILVA, Luana Cássia Borges. **Identificação de actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. isolados do processo de compostagem para a produção de *Agaricus brasiliensis***. 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Diferentes grupos microbianos termofílicos se desenvolvem durante o processo de compostagem para a produção de cogumelos, em especial durante a fase II. Além dos fungos, bactérias e actinobactérias desempenham um importante papel no processo, garantindo a qualidade do produto final, que é o composto de cultivo do cogumelo. Os objetivos desse trabalho foram identificar actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. isolados da fase II da compostagem preparada para o cultivo de *Agaricus brasiliensis*, avaliando a diversidade e os gêneros predominantes que atuaram nas etapas desse processo. Obedecendo a um intervalo de dois dias e se iniciando a partir do primeiro dia da fase II, foram coletadas cinco amostras em diferentes pontos da pilha do composto, onde cada uma foi suspensa em água peptonada 0,1%. Diluições em série foram preparadas, sendo que a de  $10^{-6}$  foi plaqueada com uma alíquota de 0,1 mL em meio Aaronson, em triplicata. As placas foram incubadas a 45°C em incubadora úmida, e a contagem de colônias foi realizada após 48-72 horas. Foram isolados 219 procariotos com a presença de micélio aéreo e/ou sobre o substrato, e 13 morfotipos foram catalogados. Cinquenta isolados foram selecionados proporcionalmente, com base nos diferentes morfotipos, e identificados em nível de gênero por testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Em seguida foi realizada a amplificação do gene 16S do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores específicos para actinobactérias F243 e R513, com o objetivo de confirmar a identificação morfológica. A população variou em função da temperatura, atingindo maior densidade na quarta amostra (26º dia), a 60,5°C, com  $2,25 \times 10^7$  UFC/g de composto. Na amostra 2 (22º dia), a 70°C, observou-se a menor população,  $1,01 \times 10^7$  UFC/g. Dentre os 50 microrganismos identificados, *Thermoactinomyces* spp. e *Streptomyces* spp. predominaram nas cinco amostras do composto, com 25 e 18 isolados, respectivamente, indicando a sua habilidade na degradação de polímeros presentes no bagaço de cana e no capim *Coast-cross*, como a celulose e a lignina. Membros do gênero *Nocardia* tiveram baixa expressão, estando presentes nas amostras 1, 2, 3 e 4, com 6 isolados no total.

---

Comitê orientador: Eustáquio Souza Dias - UFLA (orientador)\*, Sueli Teresinha Van Der Sand - UFRGS

Foi identificado um *Streptosporangium* na amostra 4. A análise molecular da região V3 do 16S rDNA confirmou a identificação morfológica dos isolados pertencentes ao filo *Actinobacteria*, de forma que foram detectados somente produtos de amplificação desses microrganismos.

**Palavras-chave:** Compostagem, Actinobactéria, *Thermoactinomyces*

## ABSTRACT

SILVA, Luana Cássia Borges. **Identification of actinobacteria and *Thermoactinomyces* spp. isolated from composting process for the production of *Agaricus brasiliensis*.** 2010. 70p. Dissertation (Masters degree in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Different thermophilic microbial groups develop during mushroom composting process, especially during phase II. Not only fungi play an important role in the process, but bacteria and actinobacteria as well, ensuring the quality of the final product, which is the compost for mushroom cultivation. The objectives of this study was to identify actinobacteria and *Thermoactinomyces* spp. isolated during phase II of the composting process for *Agaricus brasiliensis* cultivation, and to evaluate the diversity and predominant genera involved. After a two-day interval, starting from the first day of phase II, five samples were collected from different points of the compost pile and suspended in peptone water 0.1%. Serial dilutions were made, and the  $10^{-6}$  was plated on Aaronson medium with a rate of 0.1 mL, in triplicate. The plates were incubated at 45°C in humid incubator, and counting of colonies was performed after 48-72 hours. 219 isolated prokaryotes showed aerial mycelium and/or mycelium throughout the substrate, and 13 morphotypes were cataloged. Fifty isolates were selected proportionally, based on different morphotypes, and identified at the genus level through morphological, biochemical and physiological tests. Then the amplification of the 16S rDNA was carried out using specific primers for actinobacteria F243 and R513, in order to confirm the morphological identification. The population varied according to temperature, reaching highest density in sample 4 (26th day) at 60.5°C, with  $2.25 \times 10^7$  CFU/g of compost. In sample 2 (22th day), at 70°C, there was the smallest population, with  $1.01 \times 10^7$  CFU/g. Among all 50 identified microorganisms, *Thermoactinomyces* spp. and *Streptomyces* spp. prevailed in five samples of the compost, with 25 and 18 isolates, respectively, indicating its ability to degrade polymers present in sugarcane bagasse and *Coast-cross* grass, such as cellulose and lignin. Members of the genus *Nocardia* had low expression, being present in samples 1, 2, 3 and 4, with 6 isolates in total.

---

Guidance Committee : Eustáquio Souza Dias - UFLA (advisor)\*, Sueli Teresinha Van Der Sand - UFRGS

A *Streptosporangium* was identified in sample 4. Molecular analysis of the V3 region of 16S rDNA confirmed the morphological identification of isolates from phylum *Actinobacteria*, so, as a result, only amplification products of these microorganisms were detected.

**Key words:** Composting, Actinobacteria, *Thermoactinomyces*

## 1 INTRODUÇÃO

A importância da compostagem vem aumentando, no âmbito biológico e ecológico, uma vez que ela pode ser utilizada para a eliminação de resíduos urbanos e agrícolas, que são potenciais contaminantes ambientais. O produto final da compostagem (o composto) pode ter diversas finalidades. O composto é a base para a produção de cogumelos comestíveis e, além disso, é muito útil na agricultura como fertilizante, na cobertura e no estabelecimento de vegetação em acostamentos de estradas, na biorremediação e como biofiltro.

A compostagem é definida como a degradação do material orgânico, originando CO<sub>2</sub>, calor e o composto propriamente dito. Além disso, ocorre na presença de oxigênio, sendo realizado espontaneamente por uma população diversificada de microrganismos, como bactérias, actinobactérias e fungos, que vão se sucedendo nas diferentes etapas, em função das mudanças físicas e químicas (Bari & Koenig, 2001; Déportes et al., 1995; Liang et al., 2003; Pereira Neto, 1996). Os microrganismos desempenham papel fundamental na preparação de produto estável para o cultivo dos cogumelos. Além da degradação da matéria, eliminam os resíduos tóxicos de amônia e sintetizam proteínas que são importantes na nutrição do fungo cultivado (Chang & Miles, 2004; Colak, 2004; Straatsma, Banson & Olijnsma, 1994).

Actinobactérias termofílicas são freqüentemente citadas pela sua presença na compostagem, em especial para a produção de cogumelos, e desempenham importantes funções na decomposição da matéria orgânica, possuindo habilidade de degradar moléculas complexas e recalcitrantes, como celulose, lignina e lignocelulose (Lacey, 1997; Unaogu, Gugnani & Lacey, 1994). Variados gêneros, como *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Thermomonospora*, *Actinobifida*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*,

*Thermobifida*, entre outros, foram encontrados em compostos para a produção de cogumelos (Lacey, 1997).

*Thermoactinomyces* é um gênero de microrganismos interessantes, visto que produzem micélio aéreo e vegetativo bem desenvolvido, se assemelhando muito às actinobactérias, porém, não pertencem a esse grupo, estando classificado atualmente na ordem *Bacillaceae*. Tem grande importância no processo de compostagem, sendo, geralmente, selecionado nas amostras como um membro do grupo das actinobactérias, e diferenciado destas apenas pela sua micromorfologia.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. da fase II da compostagem voltada para a produção de cogumelos (*Agaricus brasiliensis*), avaliando a diversidade e os gêneros predominantes que atuaram nas etapas desse processo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Compostagem

A compostagem é praticada desde a Antiguidade, em diferentes formulações e com diferentes finalidades. Na atualidade, tem importância biológica e ecológica, uma vez que utiliza matéria orgânica resultante das atividades industriais e agroindustriais, reduzindo a poluição dos ambientes e produzindo fertilizantes orgânicos. Além disso, também pode ser utilizada para a obtenção de substrato para o cultivo de diferentes espécies de cogumelos comestíveis.

A compostagem é um processo biológico natural, aeróbio, realizado espontaneamente por uma população diversificada de microrganismos que promovem a transformação do material orgânico em CO<sub>2</sub>, calor e um produto final estabilizado (Bari & Koenig, 2001; Déportes et al., 1995; Liang et al., 2003; Pereira Neto, 1996). Esse produto final, denominado composto, tem coloração escura devido à mineralização e à humificação parcial dos compostos orgânicos (Melo et al., 2007).

A capacidade dos microrganismos de assimilar o material orgânico do substrato, cujos principais componentes são carboidratos, proteínas e lipídios, vai depender da sua habilidade para produzir as enzimas necessárias para a degradação dessas moléculas. Quanto mais complexo o substrato, mais amplo e complexo é o sistema enzimático requerido. Por meio da ação sinérgica de microrganismos, compostos orgânicos complexos são degradados a pequenas moléculas, as quais podem ser utilizadas pelas células microbianas (Tuomela et al., 2000).

Para o cultivo de cogumelos comestíveis, a produção do composto ocorre em duas etapas, denominadas fase I e fase II. A fase I, de condicionamento, acontece em ambiente aberto, durando, em média, 14 dias.

Inicialmente, em temperatura ambiente, os microrganismos degradam os compostos solúveis de fácil assimilação, como monossacarídeos, amido e lipídeos e, por meio do seu metabolismo exotérmico, proporcionam um aumento gradual da temperatura no interior das leiras (Kiehl,1985; Pereira Neto, 1996). Em seguida, se inicia uma etapa mesófila, em que a atividade metabólica continua com a transformação do material orgânico em ácidos, acarretando uma redução do pH. Os valores da temperatura incrementam até atingir a fase termofílica, promovendo, assim, o desenvolvimento de microrganismos termófilos (Hassen et al., 2001), como fungos e actinobactérias que degradam os resíduos mais complexos, como proteínas, resultando na liberação de amônio e no aumento do pH. Posteriormente fontes de carbono, como celulose, hemicelulose e lignina, são degradadas. Neste período ocorre também a eliminação de microrganismos patogênicos não esporulados (Tuomela et al., 2000).

Durante o processo de compostagem é possível encontrar grande variedade de microrganismos. Mantendo-se as condições aeróbias, a temperatura é o fator determinante da população microbiana. Espécies de fungos, bactérias e actinobactérias vão se sucedendo durante a compostagem, variando de acordo com as condições físicas e químicas do composto. A ação desses microrganismos resulta em elevação da temperatura, em função da biodegradação, favorecendo determinados grupos termofílicos e eliminando populações patogênicas (Ryckeboer et al., 2003).

A fase II é realizada em ambiente controlado (túnel de pasteurização), sendo a etapa na qual ocorre a eliminação de microrganismos indesejáveis, nematoides e ovos de larvas de insetos. Nesse ambiente, a pasteurização ocorre com o aumento da temperatura para, aproximadamente, 60°C por, no mínimo, 8 horas. Em seguida, o condicionamento final, que é importante por favorecer a

assimilação de amônia, ocorre por 7 a 8 dias, na temperatura aproximada de 45°C, com aeração constante (Braga et al., 1998).

Todo esse processo foi desenvolvido, principalmente, para o cultivo de *A. bisporus*, a partir do século XVII, iniciando com um sistema bastante rudimentar, até chegar ao processo descrito anteriormente. A partir da década de 1990, uma nova espécie de cogumelo, *A. brasiliensis*, voltou a despertar interesse no Brasil.

O estudo da microbiota da compostagem voltada para o cultivo de *A. brasiliensis* é ainda bastante insipiente. O único trabalho publicado refere-se à microbiota da fase I da compostagem (Silva et al., 2009). Este foi um trabalho pioneiro, mostrando os diferentes grupos de microrganismos presentes nesse processo, relatando a identificação de bactérias, actinobactérias, leveduras e fungos filamentosos. Apesar de sua grande importância, foi um trabalho ainda incompleto, por não ter abordado as duas fases do processo. Por isso, o trabalho deixou ainda em aberto a necessidade de estudar a fase II da compostagem. Entretanto, um estudo adequado dessa microbiota requer que os diferentes grupos sejam analisados separadamente, de forma a permitir o isolamento, a identificação e a análise de espécies ou grupos predominantes no processo.

Guimarães et al. (2009) fizeram um trabalho de isolamento e identificação de fungos durante a fase II da compostagem, mas identificaram apenas espécies esporulantes de crescimento rápido, como as do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*.

Além dos fungos que desempenham importante papel na degradação de celulose e lignina, os procariotos também são muito importantes para garantir a obtenção de um composto de qualidade. Além de atividade enzimática, esses microrganismos podem ser muito importantes por sua capacidade de utilizar amônia como fonte de nitrogênio, evitando que a mesma permaneça livre no composto em concentrações que possam inibir o crescimento micelial do

cogumelo, durante a fase de colonização. De modo geral, a literatura aponta as actinobactérias como sendo os microrganismos mais importantes na assimilação de amônia, razão pela qual serão abordados neste trabalho.

## **2.2 *Agaricus brasiliensis***

*Agaricus brasiliensis* foi inicialmente identificado como *Agaricus blazei* e sua nomenclatura científica continua a ser discutida (Dias et al., 2008). A espécie pertence ao reino Fungi, filo *Basidiomycota*, classe *Hymenomyces*, ordem *Agaricales*, família *Agaricaceae*, gênero *Agaricus*. Originária do Brasil, a espécie foi descoberta na década de 1960, na cidade de Piedade, estado de São Paulo, pelo agricultor e pesquisador Furumoto. Por se tratar de uma espécie diferente e que chamava a atenção, o agricultor enviou amostras desse cogumelo ao Instituto de Cogumelos no Japão, com a finalidade de identificá-lo, o que também levou ao descobrimento de suas atividades antitumorais (Mizuno, 1995).

Com a morte do Sr. Furumoto, o cultivo de *Agaricus brasiliensis* foi abandonado e, só em 1990 foi retomado, como resultado do interesse de alguns empresários japoneses que trouxeram cepas de *Agaricus brasiliensis* de volta do Japão, onde tinham sido utilizados em estudos de atividade antitumoral (Fujimiya et al., 1999; Kawagishi et al., 1989; Osaki et al., 1994; Itoh et al., 1994; Ito et al., 1997).

Devido ao interesse do mercado japonês, uma nova fase no cultivo de cogumelos foi iniciada no Brasil, em que *Agaricus brasiliensis* tinha o status de um produto de exportação, com preços mais elevados em comparação a outros cogumelos. Como os estudos científicos com essa espécie ainda eram escassos, o seu cultivo baseou-se nas técnicas utilizadas para o cogumelo *Agaricus bisporus* (Dias et al., 2004).

Por pertencerem ao mesmo gênero, o comportamento de *A. bisporus* e *A. brasiliensis* é bastante parecido, sendo a principal diferença a temperatura de indução de frutificação (19°C para *A. bisporus* e 25°C para *A. brasiliensis*). Portanto, as duas espécies crescem bem em composto produzido da mesma forma e a indução da frutificação requer a cobertura do composto colonizado com uma camada de terra, turfa ou outro material apropriado (Dias et al., 2004).

Entretanto, experiências de cultivo têm demonstrado que, nem sempre, o composto produzido para *Agaricus brasiliensis* é bem colonizado por *A. bisporus*, o que indica certa diferença entre as duas espécies, que pode corresponder a diferenças de atividade enzimática ou, até mesmo, diferenças de sensibilidade à amônia presente no composto. Em função disso, é muito importante estudar o processo de compostagem visando ao cultivo do cogumelo *A. brasiliensis*, uma vez que sua produtividade e regularidade de produção ainda são muito inferiores àquelas obtidas por *A. bisporus*. Neste contexto, considerando que a compostagem depende da atividade microbiana que acontece durante todo o processo, o conhecimento dessa microbiota é necessário para que se possa aperfeiçoar o processo na busca de um composto de melhor qualidade. Além disso, o isolamento e a identificação desses microrganismos podem abrir novas possibilidades de aplicações biotecnológicas.

### **2.3 Actinobactérias**

As actinobactérias são um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas que, filogeneticamente, incluem-se no ramo das bactérias gram-positivas com alto teor de G+C (guanina e citosina) em seu DNA, podendo exceder 70% do total de bases nucleotídeas (Araújo, 1998). Estas desenvolvem hifas morfológicamente semelhantes às dos fungos, porém, com diâmetros bem menores, de 0,5 a 1,0 µm e, fisiologicamente, se assemelham a bactérias (Sultan et al., 2002). O filo *Actinobacteria* compreende a classe *Actinobacteria*,

subclasse *Actinobacteridae*, 6 ordens (*Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, *Acidimicrobiales*, *Sphaerobacterales* e *Rubrobacterales*), 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies.

As actinobactérias exibem grande variedade de formas morfológicas, se estendendo de cocos ou bacilos formados a partir da fragmentação de hifas a um micélio altamente diferenciado e ramificado (Piepersberg, 1993). A superfície das colônias pode ser livre ou coberta pelo micélio (possuindo aparência pulverulenta), baixa ou elevada e, ainda, lisa ou enrugada. Algumas espécies formam ainda colônias com anéis concêntricos ao redor da colônia, que são constituídos de esporos (Sathi et al., 2001; Mutitu et al., 2008). O micélio colorido é explicado pela produção de pigmentos, como fenazinas, fenoxazinonas e prodigininas (Rahman et al., 2000). Na Figura 1 mostram-se algumas dessas características.

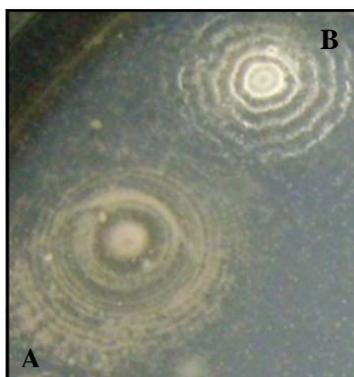


FIGURA 1 Colônias cobertas pelo micélio aéreo (aspecto pulverulento) cinza (A) e branco (B), apresentando anéis concêntricos

Esses microrganismos estão entre os mais amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser isolados de humanos, animais, plantas, águas residuais, alimentos, rochas e, principalmente, no solo (Groth et al., 1999). De acordo com Goodfellow & Simpson (1987), as actinobactérias são abundantes em todos os

tipos de solos, cultivados ou não cultivados, férteis ou inférteis e em várias regiões do mundo, compreendendo mais de 30% da população total de microrganismos. Elas estão adaptadas para crescer sobre substratos sólidos e, segundo McCarthy & Willians (1992), os substratos insolúveis e poliméricos são as fontes primárias de carbono no solo. Dessa forma, elas necessitam da secreção de uma variedade de enzimas extracelulares e hifas penetrando e colonizando o substrato.

Segundo Kennedy (1999), as actinobactérias são, principalmente, aeróbias, mas alguns gêneros são facultativos ou anaeróbios obrigatórios. Estas representam um grupo diverso metabolicamente, podendo ser autotróficas, heterotróficas, quimiotróficas ou fototróficas. Devido a essa diversidade metabólica, sua principal função consiste na decomposição de resíduos de plantas e animais (Williams & Vickers, 1988), tendo, assim, importante papel na ciclagem de nutrientes do solo (Lechevalier & Lechevalier, 1970).

Incluem-se na classe *Actinobacteria* gêneros com diferentes características morfológicas, como *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium*, que se reproduzem por fissão binária e *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, denominados actinobactérias nocardiformes, apresentam o micélio do substrato rudimentar seguido de fragmentação. Do outro lado está o grupo das esporaactinobactérias, abrangendo *Streptomyces*, *Actinoplanes* e *Streptosporangium*, que exibem uma rede de micélio aéreo bem desenvolvido e diferenciado em estruturas especializadas, como artrósporos em cadeia, observados em *Streptomyces* e esporos em vesículas, como em *Actinoplanes* e em *Streptosporangium* (Araújo, 1998).

Os microrganismos da ordem *Actinomycetales*, o maior grupo das actinobactérias, são responsáveis pela produção de cerca de 70% de todos os antibióticos que ocorrem naturalmente (Hongjuan et al., 2006), além de grandes quantidades de enzimas com potencial uso industrial. Segundo Kennedy (1999),

produzem também vitaminas como tiamina, riboflavina, flavoproteínas e vitamina B12, além de várias porfirinas, compostos contendo ferro e coenzimas que podem promover ou inibir o crescimento de outros organismos.

As actinobactérias são, ainda, importantes na rizosfera, agindo contra fungos e bactérias patogênicas por meio da produção de seus metabólitos, podendo, assim, serem utilizadas no controle biológico. Além disso, são importantes degradadoras de pesticidas, como organoclorados, triazinas simétricas, triazinonas, carbamatos, sulfonilúreas e acetanilidas, utilizando esses compostos como fontes de carbono ou para o cometabolismo (Schrijver & Mot, 1999), mostrando, dessa forma, potencial para a biorremediação de solos contaminados.

Enfim, esses microrganismos desempenham papel crucial na decomposição de compostos orgânicos e poluentes ativos na natureza (Groth et al., 1999). Eles são ativos na decomposição de materiais orgânicos no solo, incluindo lignina e outros polímeros recalcitrantes e podem degradar resíduos agrícolas e urbanos, sendo, dessa forma, importantes na compostagem agrícola ou doméstica (Heuer et al., 1997).

#### **2.4 *Streptomyces***

O gênero *Streptomyces* pertence à família *Streptomycetaceae*, subordem *Streptomycineae*, ordem *Actinomycetales*, classe e filo *Actinobacteria*. É o grupo mais conhecido das actinobactérias e é uma das bactérias mais comumente isoladas do solo, como também de composto, sendo estes seus habitats principais (Williams, 1989). É amplamente distribuído na natureza e também encontrado em diferentes ambientes aquáticos, como pântanos e folhagens em decomposição (Araújo, 1998).

As hifas vegetativas produzem um extenso micélio ramificado que raramente se fragmenta. Nas extremidades dos filamentos aéreos maduros, são

formadas cadeias de três ou mais conídios, que podem se dispor de forma simples ou verticilada, variando conforme a espécie. Dessa forma, as características morfológicas desempenham papel de grande importância na distinção dos membros do gênero *Streptomyces* das demais actinobactérias formadoras de esporos (Williams et al., 1989).

Membros do gênero *Streptomyces* produzem uma variedade de pigmentos responsáveis pela cor do micélio aéreo e vegetativo, como também pigmentos coloridos difusíveis no meio de cultura podem ser formados. Dessa forma, a cor da massa de esporos tem sido largamente utilizada para distinguir as espécies em 'seções' ou 'séries' (branco, vermelho, cinza, azul, rosa, verde, amarelo ou violeta), sendo um critério muito útil, porém, podendo apresentar problemas como influência do meio de cultura, regime de crescimento, idade da cultura. Às vezes, a coloração não classifica o microrganismo em nenhuma categoria (Williams et al., 1989).

São organismos aeróbicos obrigatórios que utilizam uma variedade de compostos orgânicos como fontes de carbono e energia para o crescimento. A temperatura ótima de desenvolvimento está na faixa de 25°-35°C, porém, com algumas espécies psicrófilas e termofílicas (Williams et al., 1989).

## **2.5 *Thermoactinomyces***

As espécies pertencentes ao gênero *Thermoactinomyces* formam um grupo taxonomicamente interessante. As suas propriedades morfológicas, como a formação do micélio aéreo e do substrato, inicialmente, as levaram a serem classificadas como actinobactérias. Entretanto, dados taxonômicos, como a habilidade de produzirem endósporos contendo ácido-dipicolínico, baixo teor de G + C (52%-54,8%), menaquinonas insaturadas e as sequências das regiões 5S e 16S do rDNA sugeriram que a família *Thermoactinomycetaceae* não mais

deveria pertencer à ordem *Actinomycetales*, mas, sim, reclassificadas na ordem *Bacillales*, classe *Bacilli*, filo *Firmicutes* (Lacey, 1989).

Assim como as actinobactérias, os membros de *Thermocatinomyces* produzem um micélio bem desenvolvido. A disposição dos esporos, crescendo ao longo das hifas (Figura 2), é morfologicamente semelhante aos membros de *Thermomonospora* (actinobactéria). O micélio aéreo é produzido por todas as espécies, sendo amarelo em *Thermoactinomyces dichotomicus* e branco nas demais. Todas as espécies são aeróbicas e saprófitas e a maioria, termofílicas, crescendo de 30°-60°C. Somente *T. peptonophilus* é mesofílica, crescendo abaixo de 45°C (Lacey, 1989).

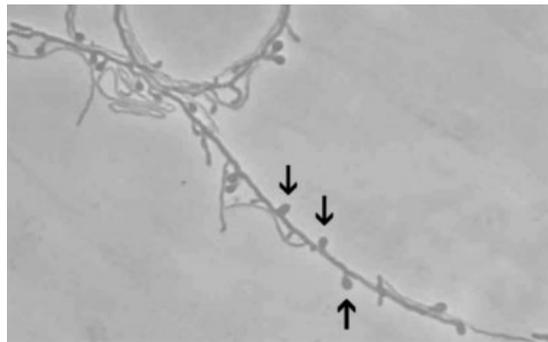


FIGURA 2 Esporos de *Thermoactinomyces* ao longo da hifa. Microscopia de contraste de fase (Fonte: Hatayama et al., 2005)

Os esporos de *Thermoactinomyces* são verdadeiros endósporos, com os mesmos estágios de desenvolvimento, resistência ao aquecimento e outras propriedades dos endósporos de *Bacillus* spp. Seu hábitat é o solo, as plantas em decomposição e os compostos, geralmente com aquecimento espontâneo (Lacey, 1989).

## 2.6 Actinobactérias no processo de compostagem

Actinobactérias termofílicas são numerosas no processo de compostagem e desempenham importantes funções na decomposição do material orgânico, bem como na assimilação de amônia. A degradação do material orgânico está relacionada com a habilidade desses microrganismos em degradar moléculas complexas e recalcitrantes, como celulose, lignina e lignocelulose (Ouhdouch et al., 2001). O desenvolvimento de actinobactérias nesse processo é dependente de condições aeróbicas, temperatura e teor de água, embora a inter-relação desses fatores e a ocorrência de diferentes taxa não tem sido estudado em composto (Lacey, 1997).

A maioria dos estudos com actinobactérias nos processos de compostagem tem sido realizada em composto para o cultivo de cogumelos (basidiomicetos), em que o processo é dividido em duas etapas distintas, sendo a fase I e a fase II (pasteurização e condicionamento final). Neste tipo de compostagem, as actinobactérias atuam sobre substratos ricos em manano, xilano, hemicelulose, celulose e lignina (Lacey, 1997).

Antes do início da fase I, o material orgânico utilizado para a preparação do composto pode conter espécies de actinobactérias, como *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Saccharomonospora* spp., *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus* e *Streptomyces* spp. (série cinza). Durante a fase I, as elevadas temperaturas constituem fator limitante para o crescimento de actinobactérias, exceto nas bordas das pilhas e no final dessa fase (Lacey, 1997). Entretanto, Waksman et al. (1939) mostraram que actinobactérias termofílicas cresceram na fase I, em composto preparado com estrume de animais, sendo que após 10 dias a uma temperatura de 50°C, foi obtida uma população de  $12 \times 10^9$  UFC/g de composto, isolando espécies de *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*. A população diminuiu a 65°C, e o crescimento foi inibido em temperaturas inferiores a 28°C e superiores a 75°C.

Durante a fase II, actinobactérias termofílicas crescem extensivamente e, muitas vezes, são evidentes macroscopicamente pelos halos brancos ou acinzentados de micélio no composto (Figura 3). Além da degradação do material orgânico, esses microrganismos transformam a amônia livre (que é prejudicial ao crescimento do micélio de cogumelos) em proteínas disponíveis. Muitas das espécies são termofílicas, com temperatura ótima em torno de 55°C. Nessa fase, a termogênese dentro das pilhas de composto é essencial para proporcionar temperaturas adequadas para o crescimento desses microrganismos. Uma variedade de gêneros, como *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Thermomonospora*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora* e *Saccharopolyspora*, entre outros, foi encontrada em compostos para cogumelos na fase II (Lacey, 1997). O gênero *Thermoactinomyces* é incluído por apresentar grande importância no processo de compostagem, apesar de não pertencer ao grupo das actinobactérias, sendo mais proximamente relacionado às espécies do gênero *Bacillus*.



FIGURA 3 Pilha de composto, mostrando o halo acinzentado das actinobactérias (Fonte: Guimarães, 2006)

Existem poucos trabalhos sobre o desenvolvimento de actinobactérias em compostagem de resíduos domésticos, mas a sua presença é demonstrada pela abundância de esporos aéreos, quando o composto é revolvido. Os resíduos domésticos frescos contêm poucas actinobactérias (Lacey, 1997), contudo, os números aumentam rapidamente com a evolução do processo (Dees & Ghiorse, 2001). Os gêneros descritos nesse processo incluem *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora* (Lacey, 1997).

A microbiologia da compostagem com resíduos ‘verdes’ (grama, palha de aveia, caules de milho) também é pouco estudada. O aumento da população de actinobactérias ocorre durante um aquecimento espontâneo. Resultados de pesquisas mostraram dados incompletos, embora suficientes para mostrar que muitas actinobactérias são liberadas do composto quando ele é revirado. Dentre os gêneros encontrados no resíduo fresco e durante a compostagem estão *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptomyces* (série cinza), *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*.

Os esporos de actinobactérias são facilmente dispersos no ar durante o processo de revolvimento das leiras. A concentração pode ser superior a  $2 \times 10^7$  esporos/m<sup>3</sup>, no ambiente de compostagem para cogumelos e superior a  $7,4 \times 10^8$  esporos/m<sup>3</sup>, próximo as leiras em revolvimento. Na compostagem de resíduos domésticos e de resíduos verdes, esses valores alcançam uma concentração máxima de  $10^6$  UFC/m<sup>3</sup> (Lacey, 1997).

## **2.7 Identificação de actinobactérias**

A identificação das actinobactérias, bem como de *Thermoactinomyces* spp., envolve, principalmente, suas características morfológicas e culturais, sendo também suportada por provas bioquímicas e análises moleculares. Os

critérios morfológicos incluem observação da ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo e sua fragmentação ou produção de esporos (Williams et al., 1989). Neste último caso, observam-se também o tipo e o número de esporos, bem como o seu arranjo. Dessa forma, os esporos podem ser únicos, como os encontrados em *Micromonospora*, em pares longitudinais característicos de *Microbispora*, em cadeias de esporos como *Streptomyces* ou contidos dentro de um esporângio, como em *Actinoplanes* e *Streptosporangium*. Em relação ao arranjo, a cadeia dos esporos pode ser simples ou verticilada, podendo a primeira ser em formato de cadeias de esporos eretas (Figura 4a), flexíveis (Figura 4b), retinaculum-apertum (RA) (Figura 4c) ou espirais (Figura 4d); o segundo caso se caracteriza por um verticilo verdadeiro com um eixo principal maior do que as hifas ramificadas e com espaço uniforme entre os verticilos, podendo produzir monoverticilos (Figura 5a), monoverticilos espirais (Figura 5b), biverticilos (Figura 5c) ou biverticilos espirais (Figura 5d) (Shirling & Gottlieb, 1996). Além disso, a análise da superfície dos esporos com o auxílio do microscópio eletrônico pode conferir informações adicionais importantes, podendo ser lisa, enrugada, espinhosa ou felpuda (Williams et al., 1989).

A coloração da massa de esporos, do micélio do substrato e a produção de pigmentos sob diferentes meios de cultura são características culturais e coloniais de grande valor na taxonomia desses microrganismos, sendo apoiados pelos testes bioquímicos, como a utilização de fontes de carbono e nitrogênio, a degradação de diversas substâncias, a produção de antibióticos, além de testes fisiológicos, da composição de açúcares e lipídios da parede celular, que também auxiliam na identificação (Williams et al., 1989).

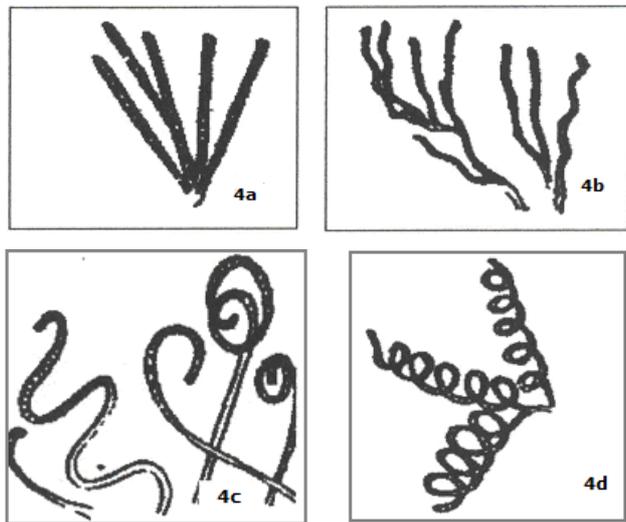


FIGURA 4 Tipos de arranjo da cadeia simples de esporos: (4a) cadeia reta; (4b) cadeia flexível; (4c) cadeia “retinaculum-apertum”; (4d) cadeia em espiral (Fonte: Shirling & Gottlieb, 1966).

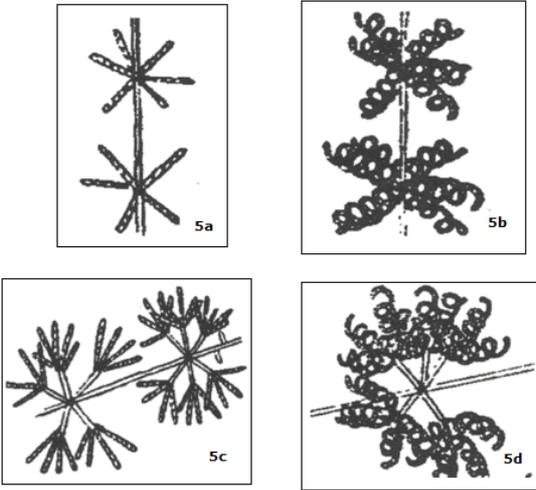


FIGURA 5 Tipos de arranjo das cadeias verticiladas: (5a) monoverticilo; (5b) monoverticilo espiral; (5c) biverticilo; (5d) biverticilo espiral (Fonte: Shirling & Gottlieb, 1966).

A região 16S do rDNA é altamente conservada, codificando a pequena subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA) em procariotos. Devido à importância dos ribossomos, cuja função básica é traduzir o mRNA em peptídeos e proteínas, a região 16S do rDNA é alvo de análises filogenéticas para a distinção de organismos (Lewin, 2000). Entretanto, apesar de altamente conservada entre os procariotos, essa sequência contém regiões variáveis (Figura 6), que são adequadas para discriminar os diferentes taxa. As mais empregadas para a construção de oligonucleotídeos iniciadores incluem as regiões V1 a V9. As regiões V4-V5 dos genes 16S rDNA são utilizadas para eubactérias e a região V3, para actinobactérias. Dessa forma, a amplificação do 16S rDNA completo, ou de regiões variáveis, como no caso da V3 para actinobactérias, constitui uma ferramenta molecular de grande utilidade para detectar e distinguir esses microrganismos dos demais em uma amostra (Heuer et al., 1997), além de confirmar as identificações morfológicas e bioquímicas.

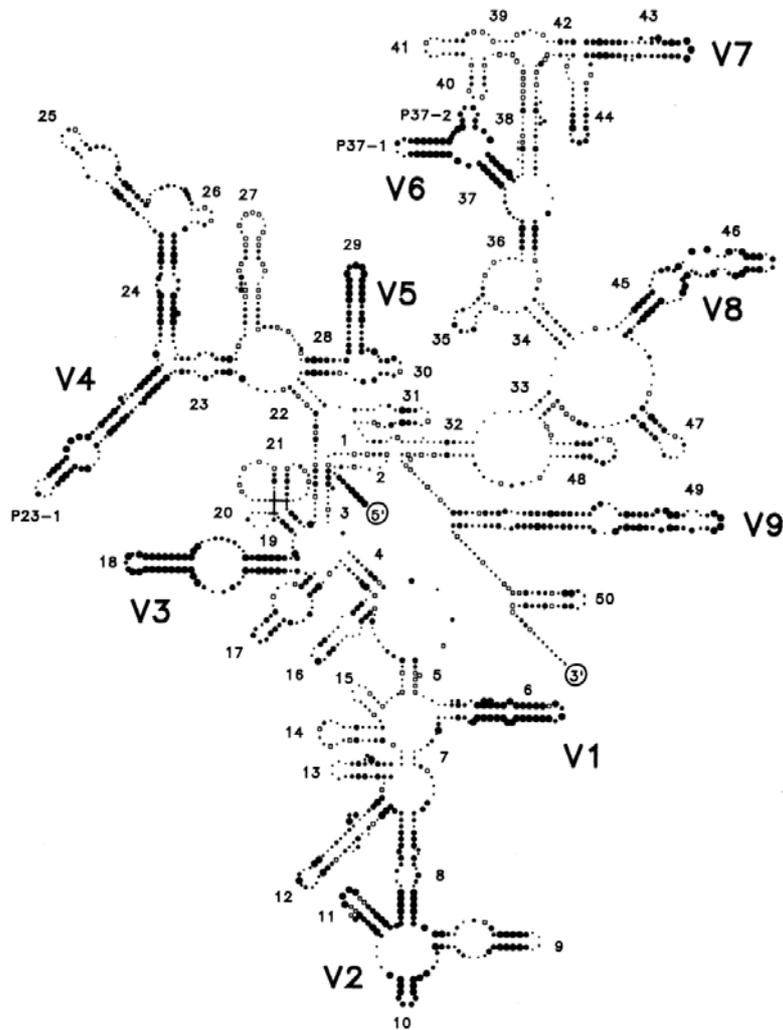


FIGURA 6 Modelo da estrutura secundária para a pequena subunidade do rRNA de procariontes. Os sítios são divididos em 5 categorias de aumento de variabilidade, sendo representados por círculos com diâmetro proporcional a esta variação. Os sítios invariáveis são representados por pontos preenchidos. Áreas contendo os sítios mais variáveis são denominadas V1 a V9 (Fonte: Neefs et al., 1993)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Substrato e coleta das amostras

A pilha do composto, com dimensões aproximadas de 1 m de largura, 1,5 m de altura e 5 m de comprimento, foi constituída por 1.000 kg de bagaço de cana (*Saccharum officinarum* L.), 1.000 kg de capim-coast-cross [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] e, no quarto dia, suplementada com farelo de trigo (154 kg), calcário (30 kg), gesso agrícola (30 kg) e uréia (26 kg). O composto foi revolvido manualmente, a cada dois dias e sua umidade avaliada, adicionando-se água sempre que necessário para mantê-la entre 65% e 70%. Esta etapa, denominada fase I, teve duração de 19 dias. Posteriormente, o composto foi transferido para um pasteurizador, no qual foi submetido à pasteurização e ao condicionamento por mais 9 dias (totalizando 28 dias), período denominado fase II. A temperatura máxima alcançada durante a fase II foi de 70°C e o pH do produto final, 6,68.

A compostagem e o isolamento dos microrganismos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Cogumelos Comestíveis (Setor de Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia) da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, Brasil. O material para a produção do composto foi obtido na região de Lavras e a montagem e o desenvolvimento da compostagem foram conduzidos nos meses de novembro e dezembro de 2008.

As análises de isolamento e identificação dos microrganismos foram realizadas somente na fase II da compostagem. Foram cinco dias amostrais, iniciando a partir do 20º dia do processo, e as coletas realizadas obedecendo a um intervalo de dois dias (20º, 22º, 24º, 26º e 28º dias). A pilha do composto foi dividida em cinco partes iguais, onde foi retirada de cada uma delas uma amostra composta (a coleta foi feita em cinco pontos aleatórios de cada parte), que foram nomeadas de acordo com o dia coletado (1.1 – amostra coletada no

20º dia e na primeira parte da pilha do composto; 1.2 – amostra coletada no 20º dia e na segunda parte da pilha do composto; 1.3 – amostra coletada no 20º dia e na terceira parte da pilha do composto; 1.4 – amostra coletada no 20º dia e na quarta parte da pilha do composto; 1.5 – amostra coletada no 20º dia e na quinta parte da pilha do composto; 2.1 – amostra coletada no 22º dia e na primeira parte da pilha do composto; 2.2, 2.3, 2.4, 2.5; ... 5.5).

### **3.2 Isolamento dos microrganismos**

Dez gramas de cada amostra coletada do composto foi suspensa em 180 mL de água peptonada 0,1%, e agitadas por 2 min. Diluições seriadas de cada amostra foram preparadas, sendo até  $10^{-6}$ , e uma alíquota de 0,1 mL foi espalhada sobre a superfície do meio Aaronson (Anexo 1A), em triplicata. As placas foram incubadas a 45°C, em incubadora úmida e o número de colônias foi determinado, após 2 a 3 dias. Os microrganismos que produziram micélio aéreo e/ou sobre o substrato, bem como colorações distintas, foram separados de acordo com os diferentes morfotipos e a frequência de cada um foi estipulada por amostra. Em seguida, foram feitas a purificação e a estocagem dos isolados em meio ágar nutriente (Anexo 2A). A nomenclatura dos isolados baseou-se na numeração estipulada para os morfotipos identificados, seguida por uma barra, depois da qual vem a identificação da do dia de amostragem e da parte da pilha do composto de origem do microrganismo (isolado UFLA 25/1.3 – morfotipo 25 que foi isolado na amostra 1 e na terceira parte do composto).

### **3.3 Local das identificações dos microrganismos**

As identificações dos microrganismos foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada, no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, RS, Brasil.

### **3.4 Microcultivo e microscopia eletrônica de varredura**

A caracterização morfológica para a identificação dos gêneros foi realizada pelo método do microcultivo em blocos de ágar nutriente (Anexo 2A), de acordo com a metodologia de Holt et al. (1994). A incubação foi feita em estufa úmida, a 45°C, por dois dias ou até o desenvolvimento do micélio e das estruturas de esporulação. A observação foi realizada em microscópio óptico (Olympus CX40) com o aumento de 400X, sendo observadas características como ramificação do micélio sobre o substrato, formação do micélio aéreo, bem como a sua fragmentação, estruturas de esporulação e produção e arranjo de esporos.

Após a identificação dos gêneros, um isolado de *Streptomyces* e um de *Thermoactinomyces* foram selecionados para a observação em microscópio eletrônico de varredura. Lâminas de microcultivo foram preparadas para a visualização, de acordo com a metodologia modificada de Ciftcioglu & Kajander (1998). Essa técnica foi utilizada para verificar, principalmente, a superfície dos esporos, tendo-se observado também o formato de cadeias e a fragmentação de hifas.

### **3.5 Análise estatística**

Os tratamentos consistiram de cinco dias de amostragem após o início da fase II da compostagem (20º, 23º, 25º, 27º e 29º dias), dispostos em blocos casualizados, com cinco repetições. Após a tabulação dos dados, foi realizada a análise de variância das populações e quando o valor de F foi significativo, procedeu-se a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### **3.6 Identificação bioquímica e fisiológica**

As características observadas nos microcultivos permitiram diferenciar os isolados em gêneros distintos. Dessa forma, procedeu-se a identificação bioquímica (avaliação da produção de melanina, coloração do micélio aéreo, coloração do micélio sobre o substrato e utilização de fontes de carbono e nitrogênio), conforme a bibliografia recomendada para a identificação de actinobactérias (Willians et al., 1989; Willians et al., 1983a; Willians et al., 1983b; Shirling & Gottlieb, 1966). Os demais testes foram realizados segundo a bibliografia utilizada para a identificação de outros grupos bacterianos, seguindo MacFaddin (2000). Os resultados obtidos foram comparados com as chaves de identificação (Willians et al., 1989; Holt et al., 1994; Goodfellow et al., 1987).

#### **3.6.1 Pigmentação**

Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura ágar tirosina (ISP7) (Anexo 3A) para a avaliação da produção de melanina, cujo resultado positivo era caracterizado pelo escurecimento do meio, com tonalidade marrom ou vermelha. A coloração da massa de esporos foi verificada em meio ágar amido sais minerais (ISP4) (Anexo 4A) e a cor do micélio do substrato nos meios ágar glicerol asparagina (ISP5) (Anexo 5A) e ágar extrato de levedura-extrato de malte (ISP2) (Anexo 6A). A incubação foi a 45°C, por 10 dias ou até o desenvolvimento da colônia. A observação foi feita sob condições padrões, no mesmo horário, local e sob um fundo claro (Shirling & Gottlieb, 1966).

#### **3.6.2 Crescimento sobre única fonte de carbono e nitrogênio**

A habilidade dos microrganismos para a utilização de treze fontes de carbono foi examinada no meio para utilização de fontes de carbono (ISP9) (Anexo 7A), por 10 dias a 45°C. Os isolados também foram inoculados em meio basal mineral sem fonte de carbono como controle negativo, e sobre este meio suplementado com glicose 1% como controle positivo. O resultado foi

considerado positivo quando o crescimento sobre a fonte de carbono testada foi maior que o controle negativo, e igual ou maior que o controle positivo (Shirling & Gottlieb, 1966). As fontes de carbono testadas foram: Acetato de sódio, L-Arabinose, L-Raminose, Salicina, D-Galactose, *meso*-Inositol, D-Xilose, D-Frutose, D-Manose, D-Lactose, Adonitol e Sacarose.

De forma semelhante, a capacidade dos microrganismos para utilizar nove compostos como fontes de nitrogênio foi testada, porém, somente com os isolados do gênero *Streptomyces*. O crescimento foi avaliado após 10 dias, por comparação com o controle positivo (meio basal suplementado com L-Asparagina 0,1%) (Anexo 8A) e negativo (meio basal sem fonte de nitrogênio), sendo o resultado considerado positivo quando o crescimento sobre a fonte de nitrogênio testada era maior que o controle negativo, e igual ou maior que o controle positivo (Williams et al., 1983b). As fontes de nitrogênio testadas foram: Nitrato de potássio, L-Fenilalanina, L-Histidina, L-Cisteína, L-Valina, L-Treonina, L-Serina, L-Metionina e L-Arginina.

### **3.6.3 Redução do nitrato**

A redução do nitrato foi avaliada em 2 mL de caldo nitrato (Anexo 9A), com 3 dias de incubação, a 45°C. A revelação foi feita adicionando-se os reagentes A (N-N-dimetil- $\alpha$ -naftalamina) e B (ácido sulfanílico 0,8%). Os tubos foram agitados e a formação da coloração vermelha indicou resultado positivo. Nos tubos com reação negativa, adicionou-se pó de zinco e os que apresentaram coloração vermelha confirmaram a presença do nitrato (resultado negativo), e os que permaneceram com a cor inalterada indicaram que o nitrato foi reduzido a produtos voláteis, como o óxido nitroso ou N<sub>2</sub>, sendo o resultado positivo.

#### **3.6.4 Testes de degradação: xantina, tirosina, caseína, esculina, amido e gelatina**

A degradação da xantina (0,05%) e da tirosina (0,04%) foi detectada em meio basal ágar nutriente (Anexos 10A e 11A), após três dias e o resultado foi considerado positivo com o desaparecimento dos grânulos desses compostos.

A degradação da caseína foi avaliada em meio para a degradação da caseína (Anexo 12A), e com três dias de crescimento, uma zona clara ao redor da colônia indicou resultado positivo. E para a esculina, o teste foi realizado em meio ágar esculina (Anexo 13A), sendo que com três dias de crescimento a degradação foi verificada pelo escurecimento do meio ao redor da colônia (resultado positivo).

O teste de degradação do amido (0,1%) foi realizado em meio para a degradação do amido (Anexo 14A) e a leitura feita após três dias, com a adição de lugol nas placas, tendo uma zona clara ao redor da colônia sido considerada resultado positivo.

A degradação da gelatina foi avaliada em meio gelatina nutriente (Anexo 15A) e, decorridos cinco dias de incubação, os tubos foram colocados, por 4 horas, a 4°C, para observar se, após esse período, o meio permanecia líquido (resultado positivo) ou não (resultado negativo).

Todos os testes foram avaliados a 45°C.

#### **3.6.5 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl**

A capacidade dos isolados de crescerem em meio BHI contendo NaCl (1, 7, 10 e 13%) (Anexo 16A) foi avaliada após 10 dias de incubação a 45°C, em que foram considerados positivos os tubos que apresentaram crescimento.

### **3.6.6 Resistência à fervura**

A resistência ao aquecimento foi testada para os gêneros *Thermoactinomyces* e *Nocardia*, em caldo nutriente (Anexo 17A); os tubos contendo a cultura desenvolvida foram colocados em banho-maria, a 100°C, por 30 minutos e, em seguida, realizou-se a inoculação das culturas em meio ágar nutriente (Anexo 2A), com incubação a 45°C, por três dias ou até que se observasse crescimento dos microrganismos. O crescimento das colônias indicou a presença de endósporo (o isolado pertence ao gênero *Thermoactinomyces*).

### **3.6.7 Motilidade e coloração álcool-ácido resistente**

O isolado de *Streptosporangium* sp. foi submetido ao teste de motilidade celular para a confirmação de gênero, tendo a inoculação sido feita em meio SIM (Anexo 18A), a 45°C, por 5 dias e, após esse período, foi verificado o padrão de crescimento do microrganismo.

A coloração álcool-ácido resistente foi realizada para os isolados de *Nocardia* e a visualização feita em microscópio óptico (Olympus CX40) em um aumento de 1000X, verificando-se a cor das células. As bactérias ácido resistentes retêm o primeiro corante, permanecendo com a coloração rosa e as não ácido resistentes ficam azuis.

### **3.7 Extração do DNA cromossomal**

O DNA cromossomal das actinobactérias e dos isolados de *Thermoactinomyces* foi extraído seguindo o protocolo descrito por Hopwood et al. (2000), com modificações. Para o isolamento do DNA genômico, os isolados foram inoculados em 10 mL de caldo nutriente (Anexo 17A) e incubados à temperatura de 45°C, por 24 horas. As células foram obtidas após centrifugação a 13.000 rpm, por 4 minutos e, então, ressuspensas em tampão SET (NaCl 75

mM, EDTA 25 mM pH8.0, Tris-HCl 20 mM pH 7,5) (Anexo 19A). Adicionou-se lisozima a uma concentração final de 1mg/mL (Anexo 20A), seguida de incubação em banho de água, a 37°C, por uma hora. Após este período, foram adicionados SDS (Anexo 21A) à concentração final de 1% e solução de proteinase K (Anexo 22A) à concentração final de 0,5mg/mL. A mistura foi incubada à temperatura de 55°C, por 2 horas. Após este período, uma solução de NaCl 5M (concentração final de 1,25 mM) (Anexo 23A) foi adicionada à mistura e esta foi homogeneizada por inversão. Depois, um volume de clorofórmio foi adicionado e novamente misturado por inversão, por 30 minutos. A solução foi centrifugada, por 20 minutos, a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e extraído uma vez com fenol, duas vezes com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1) (Anexo 24A) e duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (Anexo 25A). Retirou-se sobrenadante e o DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol e incubado, por 18 horas, a -20°C. Após este período, o material foi centrifugado por 20 minutos, o sobrenadante retirado e o DNA lavado com NaCl 1M e deixado secar em temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 200 µL de TE (Anexo 26A).

### **3.8 Reação em cadeia da polimerase**

#### **3.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores**

Os oligonucleotídeos iniciadores F243 e R513 foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA da região 16S do DNAr dos isolados.

Sequência dos *primers*:

**F243: Actinomyces (226-243): 5'GGATGAGCCCGCGGCCTA3'**

**R513: (513-528): 5'CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA3'**

### **3.8.2 Amplificação e eletroforese em gel de agarose**

Para a PCR, foi utilizada a seguinte mistura de reação: DNA molde (50ng), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de reação 1X, 158 nM de oligonucleotídeos iniciadores (GibcoBRL), 0,3 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (Amersham Pharmacia Biotech) (Anexo 27A), 1 unidade da enzima DNA Taq polimerase (Invitrogen) e água MiliQ estéril para completar o volume de 25 µl.

As condições de amplificação foram: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 1 minuto de desnaturação a 94°C, 2 minutos de anelamento a 61°C, 2 minutos de extensão a 72°C e 10 minutos de extensão final a 72°C, total de 35 ciclos. Um isolado de *Streptomyces* sp. (coleção de cultura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) foi utilizado como controle positivo.

Os fragmentos obtidos por meio da técnica da PCR foram observados em gel de agarose 0,8% (Anexo 28A), corados com brometo de etídeo (Anexo 29A). O gel foi submetido à voltagem de 70 Volts em tampão TAE 1X (Anexo 30A), por 30 minutos e os fragmentos foram visualizados por meio de transluminador com luz ultravioleta.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento dos microrganismos

A população de actinobactérias nas cinco amostras coletadas a cada dois dias na fase II do processo de compostagem está descrita na tabela 1. Observa-se uma variação nessa população no decorrer dessa etapa da compostagem, em que no 22º dia ocorreu uma redução ( $1,01 \times 10^7$  UFC/g de composto), aumentando a partir do 24º dia ( $1,41 \times 10^7$  UFC/g) e atingindo a população máxima no 26º dia ( $2,24 \times 10^7$  UFC/g).

Também foram constatadas variações na temperatura do composto, sendo um fator que afetou diretamente a densidade populacional. No 26º e no 28º dia da fase II da compostagem, quando a população atingiu as maiores densidades, foram verificadas temperaturas de 60,5°C e 39°C, respectivamente. As temperaturas entre 40º-60°C caracterizam a fase termofílica, na qual há um aumento do número de microrganismos termofílicos e/ou termotolerantes, como bactérias, actinobactérias e fungos (Beffa et al., 1996). Quando o composto atingiu no terceiro dia, a temperatura de 70°C, a população de actinobactérias foi reduzida. Em temperaturas superiores a 60°C, o ambiente ótimo para a maioria dos termofílicos é atingido e o próprio sistema começa a se tornar limitante, devido à atividade inibitória das altas temperaturas (McKinley & Vestal, 1984).

TABELA 1 População de actinobactérias no composto preparado a partir de bagaço de cana e capim *Coast-cross*, e variação de temperaturas (°C) e pH na fase II da compostagem

	20° dia - Amostra 1	22° dia - Amostra 2	24° dia - Amostra 3	26° dia - Amostra 4	28° dia - Amostra 5
Actinobactérias (UFC/g de composto)	1,40 x 10 <sup>7</sup>	1,01 x 10 <sup>7</sup>	1,41 x 10 <sup>7</sup>	2,24 x 10 <sup>7</sup>	1,89 x 10 <sup>7</sup>
Temperatura (°C)	54°C	70°C	45°C	60,5°	39°
pH	6.8	6.53	6.68	6.55	7.48

O pH, nas cinco amostras do composto (Tabela 1), variou de uma faixa ácida a neutra, de 6,53-7,48. Thambirajah et al., (1995) afirmam que o pH ótimo de actinobactérias está situado entre 7 e 8, não significando, entretanto, que esses microrganismos não possam tolerar um potencial hidrogeniônico inferior ou superior a essa faixa descrita, como observado no presente trabalho, em que o pH apresentou valores pouco abaixo da faixa ideal. No início da fase II da compostagem (fase termofílica), os microrganismos metabolizam proteínas, o que aumenta a amônia livre e causa um aumento no pH que, de 4,5-5,0, na fase mesofílica, passa para a faixa de 7,0-8,0 na fase termofílica (Ryckeboer et al., 2003).

A figura 7 mostra que as amostras 1, 2 e 3 não apresentaram diferença significativa entre as populações de actinobactérias e os valores encontrados (UFC/g de composto) foram inferiores àqueles verificados nas amostras 4 e 5, que também não diferiram entre si.

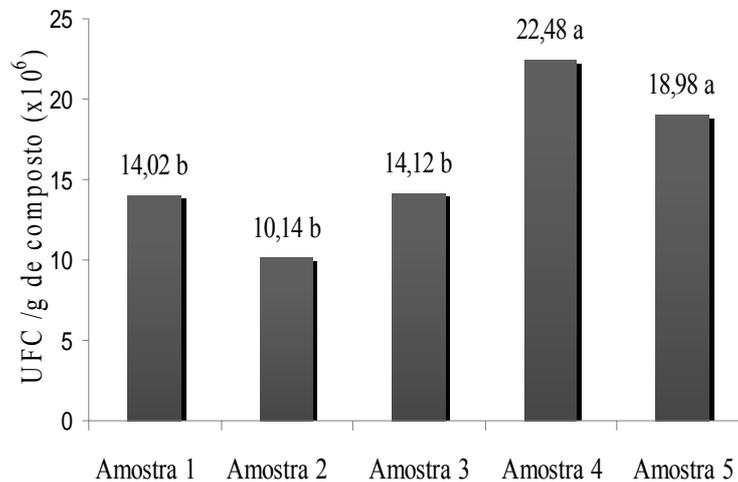


FIGURA 7 Médias das populações de actinobactérias observadas em cada amostra. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A Figura 8 mostra a relação da população com a temperatura nas cinco amostras do composto. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre as amostras 1, 2 e 3, verificou-se que quando a temperatura estava mais elevada (70°C), houve uma tendência de queda da população de actinobactérias (amostra 2). As temperaturas elevadas nesse processo devem-se, provavelmente, às reações exotérmicas de liberação de calor pelo metabolismo das bactérias e actinobactérias termofílicas (Ryckeboer et al., 2003). O calor pode inibir organismos (por meio de inativação enzimática) ou limitar o fornecimento de oxigênio, diminuindo, dessa forma, a biodiversidade funcional e dificultando a degradação de nutrientes. (Ryckeboer et al., 2003). Observa-se, entretanto, que, no 24º dia da fase II da compostagem, a 45°C, a população de actinobactérias voltou a crescer. Cross (1968) afirma que, sob condições adversas, as

actinobactérias podem sobreviver na forma de esporos, fato que pode esclarecer a diminuição da população a 70°C, seguida pelo aumento desta a 45°C.

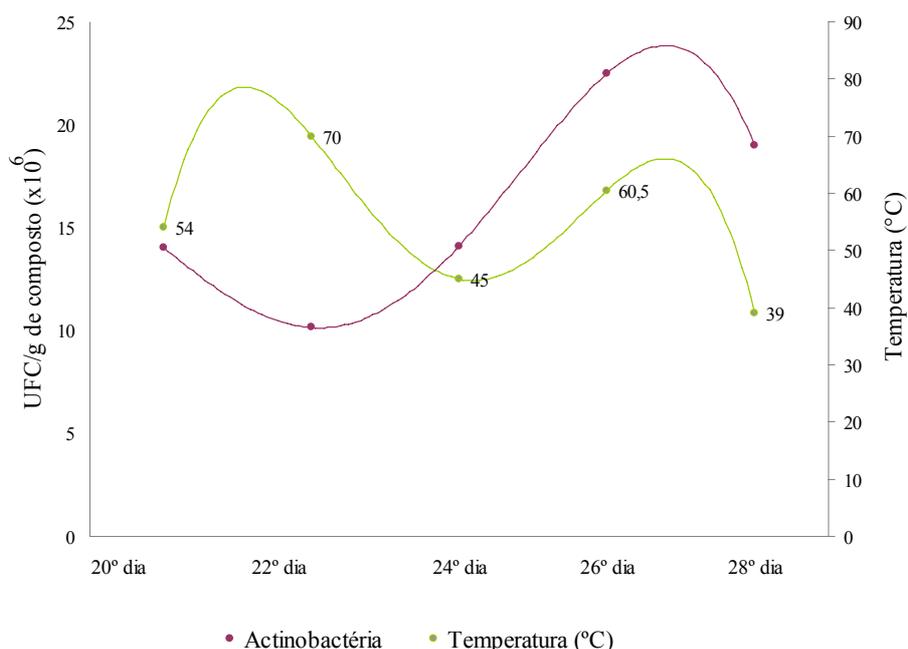


FIGURA 8 Variação da população de actinobactérias em função da oscilação de temperatura durante a fase II da compostagem

O plaqueamento das cinco amostras no meio de cultura Aaronson possibilitou o isolamento de 219 isolados de bactérias com presença do micélio aéreo e do substrato e, dentre estes, foram catalogados 13 morfotipos, de acordo com os diferentes formatos de colônias.

Foram realizadas as purificações dos 219 isolados e, logo após, uma amostra de 50 microrganismos foi selecionada proporcionalmente, com base nos diferentes morfotipos (Tabela 2).

TABELA 2 Percentual de isolados selecionados para a identificação, de acordo com cada morfotipo.

Morfotipos	Quantidade isolada	Percentual (%)	Amostra identificada
17	47	10,73	10
18	38	8,675	8
19	9	2,05	2
20	1	0,225	1
21	17	3,88	4
23	1	0,225	1
24	11	2,51	2
25	43	9,815	9
26	3	0,68	1
27	12	3,195	3
29	1	0,225	1
42	6	1,365	1
43	28	6,39	7
Total	219	100%	50

Os 50 isolados selecionados foram identificados por padrões morfológicos e bioquímicos, em que 25 microrganismos representaram o gênero *Thermoactinomyces* (50%) dentro da ordem *Bacillales* e os demais foram relacionados a 3 gêneros da ordem *Actinomycetales*, sendo *Streptomyces* (18 isolados - 36%), *Nocardia* (6 isolados - 12%) e *Streptosporangium* (1 isolado - 2%). A baixa diversidade de gêneros encontrada pode estar relacionada ao tipo de material utilizado na compostagem (bagaço de cana e o capim *Coast-cross*). Kleyn & Wetzler (1981) observaram resultados semelhantes em relação à diversidade do composto montado a partir de esterco de cavalo e palha, do qual

foram isolados o gênero *Thermoactinomyces* (ordem *Bacillales*) e dois gêneros de actinobactérias, *Streptomyces* e *Thermomonospora*. Entretanto, Song et al. (2001) avaliaram a comunidade de microrganismos em cinco compostos diferentes, preparados com feno, algodão, feno com algodão, serragem com farelo de trigo e feno com solo, relatando o gênero *Thermoactinomyces* e cinco gêneros de actinobactéria, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* e *Thermobifida*.

A figura 9 retrata a relação percentual de gêneros encontrados em cada dia amostrado na fase II. Constata-se que os isolados de *Thermoactinomyces* predominaram em todas as amostras, exceto na quinta amostra, onde houve um equilíbrio com o gênero *Streptomyces*. Entretanto, *Streptomyces* também se destacou, estando presente em todas as amostras. Song et al. (2001) analisaram a diversidade de 41 microrganismos termofílicos isolados de amostras de compostos preparados para a produção de cogumelos, e a partir da análise filogenética da sequência 16S do rDNA mostraram a predominância de *Thermoactinomyces* (39%) e *Streptomyces* (41%).

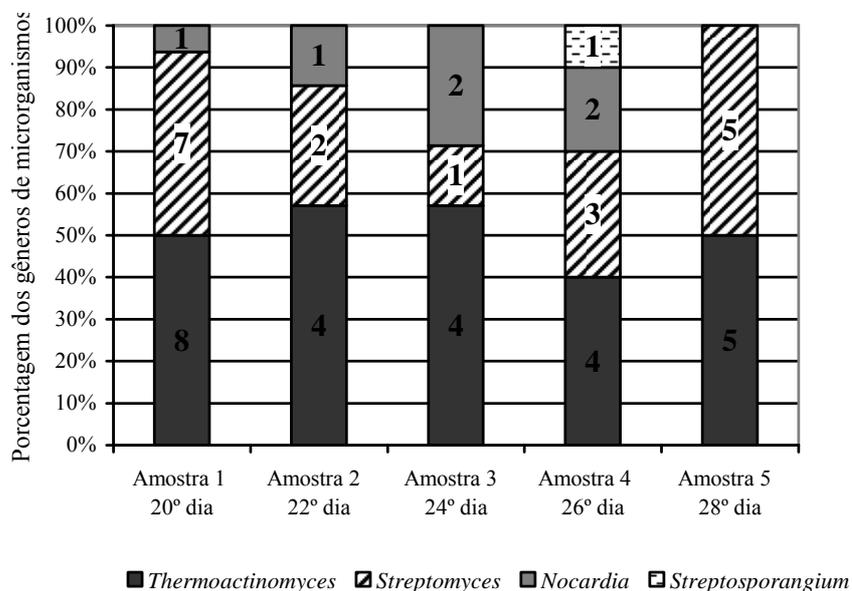


FIGURA 9 Frequência dos gêneros de actinobactérias e *Thermoactinomyces* encontrados nas 5 amostras do composto na fase II. As frequências foram calculadas com base nos 50 isolados identificados

Os membros do gênero *Nocardia* spp. (Figura 2) foram detectados até a quarta amostra, sendo que na amostra 3 sua população foi superior à *Streptomyces*, e na amostra 5, não houve representantes. Fergus (1964) relatou alguns gêneros em composto preparado para a produção de cogumelos, dentre eles *Nocardia*, além de *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora* e *Saccharopolyspora*.

*Streptosporangium* sp. (Figura 9) foi isolado na amostra 4 (26º dia), com apenas um representante do gênero. Peters et al. (2000) realizaram estudos da sucessão microbiana durante a fase termofílica da compostagem preparada com

plantas de milho e palha de cama de cavalo, em que a homologia de sequências de produtos da região V3 do 16S rDNA relatou as espécies *Streptomyces nodosus*, *Streptomyces thermodiastaticus* e *Streptosporangium vulgare*, durante todo o processo de compostagem.

A predominância de *Thermoactinomyces* e *Streptomyces* nas leiras da compostagem mostrou o grande potencial desses microrganismos na decomposição de celulose e lignina presente no bagaço de cana e no capim-coast-cross. Essas fontes de carbono são insolúveis e poliméricas, necessitando da secreção de uma gama de enzimas extracelulares para degradá-las. Dessa forma, actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. que se desenvolvem no composto, em especial aqueles preparados para o cultivo de cogumelos (McCarthy & Williams, 1992), desempenham importante papel na decomposição natural de polímeros insolúveis e colonizam a matéria orgânica após as bactérias e os fungos terem consumido facilmente frações degradáveis (Ryckeboer et al., 2003).

## **4.2 Identificação dos microrganismos**

### **4.2.1 *Thermoactinomyces* spp.**

Os 25 isolados identificados como *Thermoactinomyces* spp. se desenvolveram bem no meio de cultura ágar nutriente, formando o micélio do substrato, bem como o micélio aéreo abundante de coloração branca e com o aspecto pulverulento (Figura 10), indicando que as colônias estavam em fase de maturação de esporos.



FIGURA 10 Cultura de um isolado de *Thermoactinomyces* spp. (UFLA 27G/4.2), apresentando micélio aéreo branco

Observações feitas no microscópio óptico sob o aumento de 400 x permitiram visualizar a presença de esporos produzidos isoladamente ao longo das hifas (Figura 11), estrutura que caracteriza o gênero *Thermoactinomyces*, segundo Lacey (1989).



FIGURA 11 Microscopia óptica mostrando os esporos ao longo da hifa de *Thermoactinomyces* sp. (UFLA 43A/1.1), indicados pelas setas

A microscopia eletrônica de varredura do isolado de *Thermoactinomyces* UFLA 43D/1.5 mostrou que os esporos desse microrganismo são esféricos e com cerca de 1  $\mu\text{m}$  de comprimento (Figura 12). De acordo com Lacey (1989), o gênero em questão possui esporos esferoidais e com diâmetro de 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ .

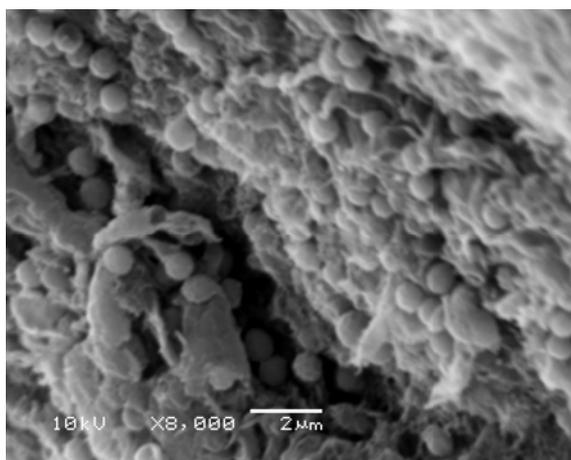


FIGURA 12 Microscopia eletrônica de varredura, exibindo os esporos com menos de 1  $\mu\text{m}$  de *Thermoactinomyces* sp. (UFLA 43A/1.1).

Dois isolados de *Thermoactinomyces* spp. (UFLA 25B/2.1 e UFLA 20/1.5), apresentaram, nas extremidades de algumas hifas, estruturas não descritas para o gênero, aparentando-se com pequenos esporângios. Dessa forma, algumas provas bioquímicas não foram realizadas para esses isolados, pelo fato de essa morfologia diferente, inicialmente, deixar dúvidas quanto ao gênero a que pertenciam. Entretanto, o teste de resistência à fervura dos endósporos foi realizado (Tabela 3) e, somando-se ao fato de que possuem esporos dispostos singularmente ao longo das hifas, esses microrganismos permaneceram classificados no gênero *Thermoactinomyces*.

Provas bioquímicas e fisiológicas foram realizadas para a identificação da espécie e os resultados encontram-se nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3 Resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos realizados para a identificação das espécies de *Thermoactinomyces*: crescimento em NaCl 1%, tolerância dos endósporos à fervura, crescimento em diferentes temperaturas

Isolados	Crescimento em NaCl 1%	Resistência à fervura	Crescimento	
			30°C	55°C
UFLA 17A/1.1	+	+	-	+
UFLA 17A/1.5	+	+	-	+
UFLA 17B/2.3	+	-	-	+
UFLA 17A/3.4	+	-	-	+
UFLA 17B/4.1	+	-	-	+
UFLA 17B/4.5	+	+	-	+
UFLA 17A/5.2	+	+	-	+
UFLA 17C/5.4	+	+	-	+
UFLA 20/1.5	NT	+	NT	-
UFLA 23B/4.5	+	-	-	+
UFLA 25B/2.1	NT	+	NT	-
UFLA 25/2.3	+	+	-	+
UFLA 25/2.5	+	-	-	+
UFLA 25A/3.2	+	-	-	+
UFLA 25D/5.1	+	-	-	+
UFLA 25A/5.5	+	-	-	+
UFLA 27G/4.2	+	+	-	+
UFLA 29/1.3	+	-	-	+
UFLA 43A/1.1	+	+	-	+
UFLA 43D/1.1	+	-	-	+
UFLA 43A/1.2	+	+	-	+
UFLA 43A/1.3	+	+	-	+
UFLA 43A/3.3	+	-	-	+
UFLA 43B/3.3	+	-	-	+
UFLA 43/5.1	+	+	-	+

NT: não testado

TABELA 4 Resultados dos testes realizados para a identificação das espécies de *Thermoactinomyces*: degradação – Caseína (CS), Gelatina (GL), Xantina (XT), Tirosina (TR), Esculina (ES); crescimento em fontes de carbono – D-Frutose (FR), Manitol (MT), Sacarose (SC)

Isolados	Degradação					Fontes de carbono		
	CS	GL	XT	TR	ES	FR	MT	SC
UFLA 17A/1.1	+	+	+	+	-	-	-	+
UFLA 17A/1.5	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA 17B/2.3	+	-	+	+	-	-	-	+
UFLA 17A/3.4	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA 17B/4.1	+	-	+	+	-	-	+	+
UFLA 17B/4.5	+	-	+	+	-	-	+	-
UFLA 17A/5.2	+	+	+	+	-	-	+	+
UFLA 17C/5.4	+	-	+	+	-	-	+	-
UFLA 20/1.5	+	NT	NT	+	-	NT	-	-
UFLA 23B/4.5	+	+	+	+	-	-	+	-
UFLA 25B/2.1	NT	NT	NT	+	-	NT	-	-
UFLA 25/2.3	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA 25/2.5	+	+	+	+	-	-	+	-
UFLA 25A/3.2	+	+	+	+	-	-	+	+
UFLA 25D/5.1	+	-	+	+	-	+	-	+
UFLA 25A/5.5	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA 27G/4.2	+	+	+	+	-	-	+	-
UFLA 29/1.3	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA 43A/1.1	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA 43D/1.1	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA 43A/1.2	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA 43A/1.3	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA 43A/3.3	+	+	+	+	-	-	+	+
UFLA 43B/3.3	+	+	+	+	-	-	+	-
UFLA 43/5.1	+	-	+	+	-	-	+	+

NT: não testado

As estruturas observadas na identificação morfológica para *Thermoactinomyces* spp. foram consistentes com as dos membros da família *Thermoactinomycetaceae*. Os testes bioquímicos e fisiológicos realizados permitiram aproximar os microrganismos da espécie *Thermoactinomyces putidus*, de acordo com a chave de identificação do Manual de Bergey de

Bacteriologia e Sistemática (Williams, 1989). Contudo, apenas o isolado de *Thermoactinomyces* UFLA 17A/1.1 apresentou todos os resultados consistentes com *T. putidus*, tendo os demais variado de uma a três características. Microrganismos isolados de material vegetal podem se deparar com escassez de nutrientes no ambiente, podendo haver uma alteração na expressão gênica e, conseqüentemente, na sua diversidade metabólica, se diferenciando, dessa forma, dos padrões descritos para uma espécie. No entanto, o solo é habitado por uma grande diversidade de microrganismos, das quais muitas espécies estão ainda por serem descritas, o que leva à possibilidade de os isolados de *Thermoactinomyces* pertencerem a novas espécies.

#### 4.2.2 *Streptomyces* spp.

Os 18 isolados de *Streptomyces* spp. formaram o micélio aéreo abundante e de coloração cinza nos meios ágar nutriente e ágar amido sais minerais (ISP4), o que permitiu agrupá-los na série cinza (Figura 13) (Williams et al., 1989).



FIGURA 13 Cultura de um isolado de *Streptomyces* (UFLA 18B/2.3) em meio sólido, apresentando micélio aéreo cinza

A partir da microscopia óptica, observou-se que os isolados de *Streptomyces* spp. apresentam cadeia de esporos simples (Figura 14), onde o isolado UFLA 18I/4.4 possui padrão flexuoso, enquanto que o UFLA 21/4.5 possui o padrão reto a flexuoso, e nos demais a disposição de cadeia simples ocorre em formato *retinaculum-apertum*.



FIGURA 14 Microscopia óptica mostrando a cadeia simples de *Streptomyces* sp. (UFLA 21C/5.4)

A microscopia eletrônica de varredura do isolado UFLA 18B/4.4 confirmou a cadeia *retinaculum-apertum*, como também se pode visualizar a cadeia de esporos do micélio aéreo (Figura 15). Essa técnica também mostrou que a superfície dos esporos desse isolado é espinhosa (Figura 16).

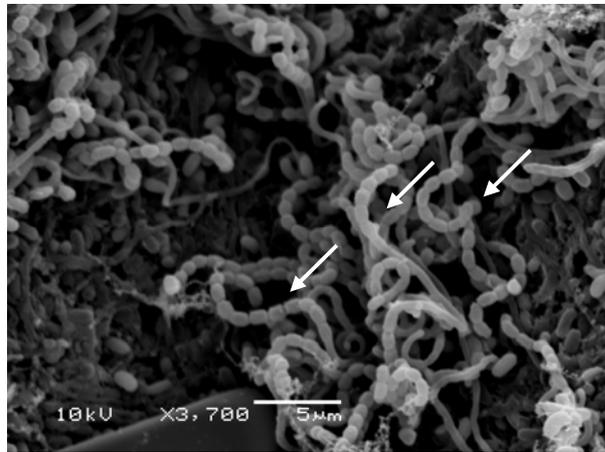


FIGURA 15 Microscopia eletrônica de varredura exibindo cadeia de esporos simples em formato *retinaculum-apertum* (setas) de *Streptomyces* sp. (UFLA 18B/4.4).

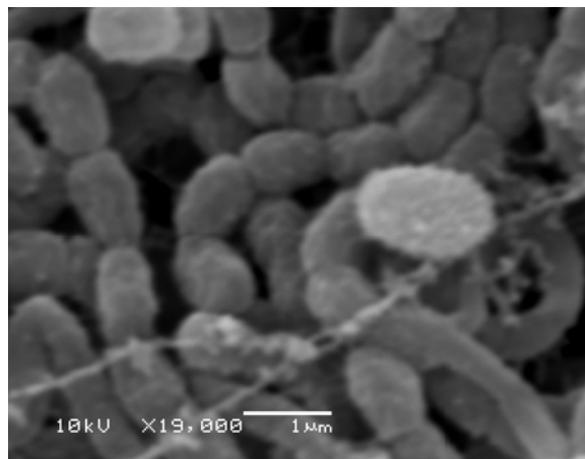


FIGURA 16 Microscopia eletrônica de varredura exibindo a superfície espinhosa de *Streptomyces* sp. (UFLA 18B/4.4).

As provas bioquímicas, morfológicas e fisiológicas que foram realizadas para a identificação da espécie se encontram nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

TABELA 5 Resultados dos testes realizados para a identificação das espécies de *Streptomyces*: de coloração do micélio do substrato, produção de melanina e formato da cadeia de esporos (*Streptomyces* spp.)

Isolado	Cor do micélio substrato – (ISP2, ISP5)	Produção de melanina (ISP7)	Formato da cadeia de esporos		
			Reta a flexuosa	Retinaculum apertum	Flexuosa
UFLA 18A/1.1	bege claro	-	-	+	-
UFLA 18A/1.2	bege claro	-	-	+	-
UFLA 18I/1.2	bege claro	-	-	-	+
UFLA 18B/2.3	bege claro	-	-	+	-
UFLA 18C/2.3	bege claro	-	-	+	-
UFLA 18/3.3	bege claro	-	-	+	-
UFLA 18B/4.4	bege claro	-	-	+	-
UFLA 18E/5.2	bege claro	-	-	+	-
UFLA 19/1.2	bege claro	-	-	+	-
UFLA 19/5.4	bege claro	-	-	+	-
UFLA 21/4.5	bege claro	-	+	-	-
UFLA 21A/5.2	bege claro	-	-	+	-
UFLA 21C/5.4	bege claro	-	-	+	-
UFLA 24B/1.4	bege claro	-	-	+	-
UFLA 26B/1.1	bege claro	-	-	+	-
UFLA 27B/4.3	bege claro	-	-	+	-
UFLA 27E/5.2	bege claro	-	-	+	-
UFLA 42/1.3	bege claro	-	-	+	-

TABELA 6 Fontes de carbono testadas para a identificação das espécies de *Streptomyces*: glicose – controle positivo (GL), Acetato de sódio (AS), L-Arabinose (AR), L-Raminose (RM), Salicina (SL), D-Galactose (GL), *meso*-Inositol (MI), D-Xilose (X), D-Frutose (F), D-Manose (M), D-Lactose (L), Adonitol (AD), Sacarose (S), controle negativo (CN)

Isolado	Fontes de Carbono													
	GL (+)	A S	A R	R M	S L	G L	M I	X	F	M	L	A D	S	C N
UFLA 18A/1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 18A/1.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 18I/1.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 18B/2.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 18C/2.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 18/3.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 18B/4.4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 18E/5.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 19/1.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
UFLA 19/5.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 21/4.5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 21A/5.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 21C/5.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 24B/1.4	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 26B/1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 27B/4.3	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 27E/5.2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 42/1.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA 7 Fontes de nitrogênio testadas para a identificação das espécies de *Streptomyces*: L-Asparagina – controle positivo (AP), Nitrato de potássio (NP), L-Fenilalanina (FN), L-Histidina (HT), L-Cisteína (CT), L-Valina (VL), L-Treonina (TN), L-Serina (SR), L-Metionina (MT), L-Arginina (AR), controle negativo (CN)

Isolado	Fontes de nitrogênio										
	AP (+)	N P	F N	H T	C T	V L	T N	S R	M T	A R	C N
UFLA 18A/1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 18A/1.2	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
UFLA 18I/1.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 18B/2.3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
UFLA 18C/2.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 18/3.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 18B/4.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 18E/5.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 19/1.2	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
UFLA 19/5.4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 21/4.5	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
UFLA 21A/5.2	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
UFLA 21C/5.4	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
UFLA 24B/1.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 26B/1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 27B/4.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA 27E/5.2	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
UFLA 42/1.3	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-

TABELA 8 Testes realizados para a identificação das espécies de *Streptomyces*: degradação - Caseína (CS), Amido (AM), Gelatina (GL), Xantina (XT), Tirosina (TR), Esculina (ES), crescimento em diferentes concentrações de NaCl e capacidade de redução do nitrato (RN).

Isolados	Degradação						NaCl			Redução do nitrato
	CS	AM	GL	XT	TR	ES	7%	10%	13%	
UFLA 18A/1.1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 18A/1.2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 18I/1.2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
UFLA 18B/2.3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 18C/2.3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 18/3.3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 18B/4.4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 18E/5.2	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 19/1.2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 19/5.4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 21/4.5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 21A/5.2	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 21C/5.4	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 24B/1.4	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
UFLA 26B/1.1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 27B/4.3	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 27E/5.2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UFLA 42/1.3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+

De acordo com a classificação numérica de *Streptomyces* termofílicos (Goodfellow et al., 1987) e com a classificação numérica de *Streptomyces* e gêneros relacionados (Williams et al., 1982), os isolados de *Streptomyces* mais se aproximaram dos membros do grupo A, cluster 36, com o representante *Streptomyces thermovulgaris*. Entretanto, houve algumas variações nos resultados, comparados com as chaves de identificação usadas.

Goodfellow et al. (1987) realizaram um estudo para montar uma classificação numérica com cinquenta isolados de *Streptomyces* termofílicos,

concluindo que todas as linhagens produziram esporos no micélio aéreo, bem como degradaram o Tween 80 e a caseína. Nenhum dos microrganismos produziu cadeia de esporos verticilada, micélio aéreo violeta, micélio do substrato azul, verde ou violeta, pigmentos verdes ou violeta ou melanina sobre os meios ágar peptona-extrato de levedura-ferro ou ágar tirosina. Ainda, nenhum isolado testado mostrou fragmentação ou esporos no micélio do substrato, ou degradou quitina, guanina, xantina, testosterona ou alantoína. Nesse mesmo estudo, concluiu-se que todos os microrganismos do cluster de *Streptomyces thermovulgaris* e de *Streptomyces thermoviolaceus* se posicionaram na série cinza, de acordo com a coloração da massa aérea de esporos. Todos esses resultados foram consistentes com as características dos isolados de *Streptomyces* spp. do presente trabalho.

#### **4.2.3 *Nocardia* spp.**

Os dados bioquímicos para *Nocardia* estão descritos nas Tabelas 9 e 10. Os seis isolados de *Nocardia* apresentaram micélio aéreo branco em meio ágar nutriente e, microscopicamente, formaram hifas extensas e ramificadas, e exibiram pouca fragmentação em formato de bacilos. Além dessas características, nenhum conídio ou estrutura de reprodução esteve presente nesses microrganismos. Nenhum isolado foi capaz de crescer a 55°C ou de resistir à fervura, dados que auxiliaram na eliminação da hipótese de esses microrganismos pertencerem ao gênero *Thermoactinomyces*. Todos os isolados foram negativos na coloração de álcool-ácido-resistente, o que demonstrou que não possuem ácido micólico na parede celular.

TABELA 9 Fontes de carbono testadas para a identificação de espécies de *Nocardia*

Isolado	Fontes de Carbono						
	Adonitol	L- Arabinose	L- Raminose	D- Galactose	meso- Inositol	D- Manose	Manitol
UFLA 25A/3.1	-	+	-	+	+	+	+
UFLA 21E/1.4	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 17C/3.5	-	-	-	-	-	-	-
UFLA 25B/4.4	-	-	-	+	+	+	+
UFLA 24C/4.2	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 17D/2.2	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 10 Testes realizados para a identificação de espécies de *Nocardia*: degradação (Amido, Tirosina e Esculina), redução do nitrato, crescimento em diferentes temperaturas e resistência à fervura

Isolado	Degradação			Redução do nitrato	Crescimento		Resistência à fervura
	Amido	Tirosina	Esculina		30°C	55°C	
UFLA 25A/3.1	-	+	-	-	+	-	-
UFLA 21E/1.4	-	+	-	-	+	-	-
UFLA 17C/3.5	-	+	-	-	-	-	-
UFLA 25B/4.4	-	+	-	+	+	-	-
UFLA 24C/4.2	-	+	-	-	+	-	-
UFLA 17D/2.2	-	+	-	-	-	-	-

Com o auxílio do Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (Williams et al., 1989), a espécie em que os dados dos seis isolados mais se aproximaram foi *Nocardia orientalis*, porém, variando de duas a cinco características bioquímicas em relação à chave de identificação utilizada.

#### 4.2.4 *Streptosporangium* sp.

O isolado de *Streptosporangium* sp. (UFLA 25A/4.2) exibiu muitos esporângios, sendo um em cada extremidade de hifa (Figura 17).



FIGURA 17 Esporângios do isolado UFLA 25A/4.2 identificado como *Streptosporangium* sp.

As características referentes ao microrganismo encontram-se na tabela 6. Seu micélio aéreo possui coloração bege, enquanto que o micélio do substrato apresenta coloração bege claro, ambos em Agar Nutriente. Além disso, os esporos não exibiram motilidade, descartando a possibilidade de pertencer a outros gêneros com esporângios.

TABELA 11 Testes bioquímicos realizados para a identificação de espécie do isolado de *Streptosporangium* sp.: crescimento em fontes de carbono (*meso*-Inositol e L-Raminose), degradação do Amido e da Gelatina, redução do nitrato e motilidade

Isolado	Fontes de carbono		Degradação		Redução do nitrato	Motilidade
	<i>Meso</i> -Inositol	L-Raminose	Amido	Gelatina		
UFLA 25A/4.2	+	+	-	-	+	-

De acordo com essas características, o isolado mais se assemelhou às espécies *Streptosporangium albidum* e *S. nondiastaticum*. Porém, há algumas divergências em relação à chave de identificação do Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (Williams et al., 1989), visto que a primeira espécie citada não se desenvolve em temperaturas de 42° e 50°C, e a segunda não liquefaz a gelatina. Além disso, não foi possível testar a cor da massa de esporos no meio recomendado e a coloração bege no meio ágar nutriente não foi observada em nenhuma espécie, não podendo comparar esse parâmetro.

#### 4.3 Caracterização molecular

A reação em cadeia da polimerase foi realizada com cinco isolados do gênero *Thermoactinomyces*, cinco de *Streptomyces*, dois de *Nocardia* e um *Streptosporangium*, sendo estes escolhidos de acordo com o perfil morfológico e bioquímico.

Os produtos de amplificação dos *primers* F243 e R513 podem ser observados na Figura 18. Todas as actinobactérias (canaletas 7, 8, 10, 11, 12, 14 e 15), com exceção de uma *Nocardia* (canaleta 13), apresentaram bandas. O *primer* F242 é específico para a região 16s do rDNA de actinobactérias e o oligonucleotídeo iniciador R513 se anela a uma região conservada desse gene, sendo mais específica de bactérias gram-positivas e  $\beta$ - proteobactérias. Este par de *primers* se liga na região V3 variável do 16S rDNA, sendo, dessa forma, homólogo somente ao DNA das actinobactérias e produzindo um fragmento de 302 pb (Heuer, 1997).

As amostras de *Thermoactinomyces* (canaletas 3, 4, 5, 6 e 9) não apresentaram nenhum produto de amplificação, o que confirmou que estes não pertencem à classe *Actinobacteria*.

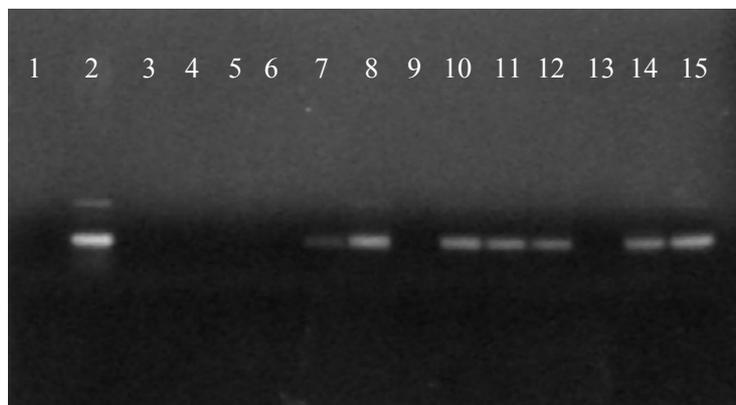


FIGURA 18 Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA com os oligonucleotídeos F243 e R513. 1- Branco; 2- Controle positivo (*Streptomyces sp.*); 3- *Thermoactinomyces sp.* (UFLA 17A/1.1); 4- *Thermoactinomyces sp.* (UFLA 17B/4.5); 5- *Thermoactinomyces sp.* (UFLA 43A/3.3); 6- *Thermoactinomyces sp.* (UFLA 43A/1.3); 7- *Streptomyces sp.*(27B/4.3); 8- *Streptomyces sp.* (UFLA 42/1.3); 9- *Thermoactinomyces sp.* (UFLA 43/5.1); 10- *Streptomyces sp.* (UFLA 18B/2.3); 11- *Streptomyces sp.*(UFLA 21/4.5); 12- *Streptomyces sp.*(UFLA 18E/5.2); 13- *Nocardia sp.* (UFLA 17C/3.5); 14- *Nocardia sp.* (UFLA 25A/3.1); 15- *Streptosporangium sp.* (UFLA 25A/4.2)

## 5 CONCLUSÕES

Os gêneros *Thermoactinomyces* e *Streptomyces* predominaram durante a fase II da compostagem.

As variações de temperatura influenciaram na densidade populacional. O crescimento foi favorecido quando a temperatura foi elevada de 45°C para 60°C. Entretanto, a 70°C o crescimento da população ficou restrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. M. Estratégias para o isolamento de actinomicetos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, 1998. p. 351-367.

BARI, Q. H.; KOENING, A. Effect of air recirculation and reuse on composting of organic solid waste. **Resource Conservation & Recycling**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 93-111, June 2001.

BEFFA, T.; BLANC, M.; LYON, P. F.; VOGT, G.; MARCHIANA, M.; FISCHER, J. L.; ARAGNO, M. Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 °C). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1723-1727, May 1996.

BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. **Manual do cultivo de *Agaricus blazei* Murr. "Cogumelo-do-Sol"**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1998. 44 p.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC, 2004. 480p.

CIFTCIOGLU, N.; KAJANDER, E. O. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. **Pathophysiology**, Baltimore, v. 4, n. 4, p. 259-270, Jan. 1998.

COLAK, M. Temperature profiles of *Agaricus bisporus* in composting stages and effects of different composts formulas and casing materials on yield. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 3, n. 9, p. 456-462, Sept. 2004.

CROSS, T. Thermophilic actinomycetes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 31, p. 36-53, 1968.

DÉPORTES, I.; BENOIT-GUYOD, J. L.; ZMIROU, D. Hazard to man and the environment posed by use of urban waste compost: a review. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 197-222, Nov. 1995.

DIAS, E. S.; ABE, C.; SCHWAN, R. F. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 545-549, set./out. 2004.

DIAS, E. S.; LABORY, C. R. G.; HERRERA, K. M. S.; ALVES, A. A.; TORRES, G. A.; RINKER, D. L. Cytological studies of *Agaricus brasiliensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 2473-2479, Jan. 2008.

FERGUS, C. L. Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. **Mycologia**, New York, v. 56, p. 267-284, 1964.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; KATAKURA, R.; EBINA, T. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete *Agaricus blazei* Murrill. **Anticancer Research**, Kapandriti, v. 19, n. 1A, p.113-118, Jan./Feb. 1999.

GOODFELLOW, M.; LACEY, J.; TODD, C. Numerical classification of thermophilic streptomycetes. **Journal of General Microbiology**, London, v. 143, n. 10, p. 3135-3149, June, 1987.

GOODFELLOW, M.; SIMPSON, K. E. Ecology of Streptomycetes. **Frontiers in Applied Microbiology**, Cochín, v. 2, p. 97-125, 1997.

GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SAIZ-JIMENEZ, C. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 36, n. 1/2, p. 115-122, May 1999.

GUIMARÃES, S. E. **Estudo da microbiota durante a fase II da compostagem para produção do substrato de cultivo do cogumelo *Agaricus blazei***. 2006. 69p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HASSEN, A.; BELGUITH, R.; JEDIDI, N.; CHERIF, A.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p.217-225, Dec. 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, Aug. 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, T. S. **Bergey's manual of determinative bacteriology: the actinomycetes**. 9. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. p. 2300-2648.

HONGJUAN, Z.; RACHEL, L. P.; DAVID, I. E.; GARETH, W. G.; ROYSTON, G. The rapid differentiation of streptomyces using fourier transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 213-218, Mar. 2006.

HOPWOOD, D. A.; KIESER, T.; BIBB, M. J., BUTTNER, M., CHATER, K. F. **Practical Streptomyces genetics**. Baltimore: The John Innes Centre, 2000.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanism in tumorbearing mice. **Anticancer Research**, Kapandriti, v. 17, n. 1A, p.277-284, Jan./Feb. 1997.

ITOH, H.; ITO, H.; AMANO, H.; NODA, H. Inhibitory action of a (1(6)-beta-D-glucan protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murril ("Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. **Japanese Journal of Pharmacology**, Kyoto, v. 66, n. 2, p. 265-271, Oct. 1994.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 186, n. 2, p. 267-273, Mar. 1989.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems and Environmental**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65 - 76, June 1999.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1985. 429p.

KLEN, J.G.; WETZLER, T.F. The microbiology of spent mushroom compost and its dust. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, n. 8, p. 748-753, Aug. 1981.

LACEY, J. Thermoactinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. v. 4, p. 2573-2585.

LACEY, J. Actinomycetes in composts. **Actinomycetes in composts**, Koge, v. 4, n. 2, p.113-121, Sept. 1997.

LECHEVALIER, M. P. P.; LECHEVALIER, H. A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 20, n. 4, p. 435-443, Oct. 1970.

LEWIN, B. **Genes VII**. New York: Oxford University, 2000. 980p.

LIANG, C.; DAS, K. C.; MCCLENDON, R. W. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p.131-137, Jan. 2003.

MACFADDIN, J. M. Q. **Biochemical tests for Identification of medical bacteria**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2000. 912p.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment: a review. **Gene**, Viena, v. 115, n. 1/2, p. 189-192, June 1992.

MCKINLEY, V. L.; VESTAL, J. R. Biokinetic analyses of adaption and succession: microbial activity in composting municipal sewage sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 5, p. 933-941, May 1984.

MELO, G. M. P. de; MELO, V. P. de; MELO, W. J. de. **Compostagem**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007. 10p.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, New York, v. 11, n. 1, p.167-172, Feb. 1995.

MUTITO, E. W.; MUIRU, W. M.; MUKUNYA, D. M. Evaluation of antibiotic metabolites from actinomycete isolates for the control of late blight of tomatoes under greenhouse conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, Beijing, v. 7, n. 3, p. 284-290, 2008.

NEEFS, J. M., PEER, Y. V. de; RIJK, P.; CHAPELLE, S.; WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 3025-3049, July 1993.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. **Yakugaku Zasshi**, Tokyo, v. 114, n. 5, p.342-350, May 1994.

OUHDOUCH, Y.; BARAKATE, M.; FINANCE, C. Actinomycetes of moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. **European Journal Soil Biology**, Montaigne, v. 37, n. 2, p. 69-74, Apr./June 2001.

PEREIRA NETO, J. T. **Tratamento e destinação de resíduos provenientes de empreendimentos agrícolas**. Viçosa, MG: Abeas, 1996. 77p.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE C. C. Succession of microbial communities during hot composting as detected by pcr–single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 930-936, Mar. 2000.

PIEPERSBERG, W. Streptomyces and corynebacteria. In: REHM, H. J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH, 1993. p. 434-468.

RAHMAN, A. A.; AZAM, T. M. Z.; GAFUR, M. A. *In vitro* antibacterial principles of two flavonoids and extracts from *Clerodendrum indicum* linn. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Dacca, v. 3, n. 10, p. 1769-1771, 2000.

RYCKEBOER, J.; MERGAERT, J.; VAES, K.; KLAMMER, S.; DE CLERCQ, D.; COOSEMANS, J.; INSAM, H.; SWINGS, J. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 53, n. 4, p. 349-410, Dec. 2003.

SATHI, Z. S.; RAHMAN, M. A. A.; GAFUR, M. A. Identification and *in vitro* anti microbial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Dacca, v. 4, n. 12, p. 1523-1525, 2001.

SCHRIJVER, A.; MOT, R. Degradation of pesticides by actinomycetes. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 25, n. 2, p. 85-119, June 1999.

SILVA, C. F.; AZEVEDO, R. S.; BRAGA, C.; SILVA, R. da; SOUZA DIAS, E.; SCHWAN, R. F. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus Brasiliensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 590-600, set. 2009.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 16, n. 3, p. 313 - 40, July 1966.

SONG, J.; WEON, H. Y.; YOON, S. H.; PARK, D. .; GO, S. J.; SUH, J. W. Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 202, n. 1, p. 97-102, Aug. 2001.

STRAATSMA, G.; SAMSON, R. A.; OLIJNSMA, T. W. ; OP DEN CAMP, H. J. M.; GERRITS, J. P. G.; GRIENSVEN, L. J. L. D. van. Ecology of thermophilic fungus in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and *Agaricus bisporus* mycelium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 454-458, Feb. 1994.

SULTAN, M. Z.; KHATUNE, N. A.; SATHI, Z. S.; BHUIYAN, S. A. M. D.; SADIK, G. M.; CHOUDURY, M. A.; GAFUR, M. A.; RAHMAN, A. A. M. D. In vitro antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 1, 2/4, p. 100-106, 2002.

THAMBIRAJAH, J. J.; ZULKALI, M. D.; HASHIM, M. D. Microbiological and biochemical changes during the composting of oil palm empty-fruit-bunches: effect of nitrogen supplementation on the substrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 52, n. 2, p. 133-144, 1995.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environmental: a review. **Bioresource Technology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 169-183, Apr. 2000.

UNAOGU, I. C.; GUGNANI, H. C.; LACEY, J. Occurrence of thermophilic actinomycetes in natural substrates in Nigeria. **Antonie van leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 1-5, Mar. 1994.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M. H.; SNEATH, P. H. A.; SACKIN, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, n. 6, p. 1743-1813, June 1982.

WILLIAMS, S. T.; VICKERS, J. C. Detection of actinomycetes in natural environment, problems and perspectives. In: OKAMI, Y.; BEPPU, T.; OGAWARA, H. **Biology of actinomycetes**. 88. ed. Tokyo: Japan Scientific Societies, 1988. p. 265-270.

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. v. 4.

## ANEXOS

		<b>Página</b>
ANEXO 1A	Meio Aaronson .....	63
ANEXO 2A	Ágar nutriente .....	63
ANEXO 3A	Ágar tirosina (ISP7) .....	63
ANEXO 4A	Ágar amido sais minerais (ISP4) .....	64
ANEXO 5A	Ágar glicerol asparagina (ISP5) .....	64
ANEXO 6A	Agar extrato de levedura-extrato de malte (ISP2) .....	64
ANEXO 7A	Meio base para utilização de fontes de carbono (ISP9) ...	64
ANEXO 8A	Meio base para utilização de fontes de nitrogênio .....	65
ANEXO 9A	Caldo nitrato .....	66
ANEXO 10A	Meio para degradação da xantina .....	66
ANEXO 11A	Meio para degradação da tirosina .....	66
ANEXO 12A	Meio para degradação da caseína .....	67
ANEXO 13A	Ágar esculina .....	67
ANEXO 14A	Meio para degradação do amido .....	67
ANEXO 15A	Gelatina nutriente .....	67
ANEXO 16A	Caldo BHI com NaCl .....	68
ANEXO 17A	Caldo nutriente .....	68
ANEXO 18A	Meio SIM .....	68
ANEXO 19A	Tampão SET .....	68
ANEXO 20A	Lisozima (10 mg/mL) .....	69
ANEXO 21A	SDS (10%) .....	69
ANEXO 22A	Proteinase K (20 mg/mL) .....	69
ANEXO 23A	NaCl 5M .....	69
ANEXO 24A	Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1) .....	69
ANEXO 25A	Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) .....	69
ANEXO 26A	TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) .....	70

ANEXO 27A	Desoxinucleotídeos .....	70
ANEXO 28A	Gel de agarose 0,8% .....	70
ANEXO 29A	Brometo de etídeo .....	70

**ANEXO 1A Meio Aaronson g/l**

KNO <sub>3</sub>	2,0 g
Caseína	0,8 g
NaCl	2,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	50,0 mg
CaCO <sub>3</sub>	20,0 mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	40,0 mg
Ágar	15,0 g

**ANEXO 2A Ágar nutriente g/l**

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Ágar	15,0 g

**ANEXO 3A Ágar tirosina g/l (ISP7)**

Glicerol	15,0 g
L-tirosina	0,5 g
L-asparagina	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Solução traço	1,0 ml
Agar	15,0 g

**\*Solução traço g/100ml**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,11 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,79 g

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,15 g

**ANEXO 4A Ágar amido sais minerais (ISP4)**

Amido 10,0g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0g  
CaCO<sub>3</sub> 2,0g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0g  
NaCl 1,0g  
Agar 15,0g

**ANEXO 5A Ágar glicerol asparagina g/l (ISP5)**

Glicerol 10,0 g  
L-asparagina 1,0 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 g  
Solução traço 1,0 ml  
Agar 15,0 g

**ANEXO 6A Ágar extrato de levedura-extrato de malte g/l (ISP2)**

Extrato de levedura 4,0 g  
Extrato de malte 10,0 g  
Dextrose 4,0 g  
Ágar 15,0 g

**ANEXO 7A Meio base para a utilização de fontes de carbono g/l (ISP9)**

**Solução basal**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,64 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,38 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,65 g

MgSO <sub>4</sub>	1,0 g
Solução I	1,0 ml
Agar	15,0 g

**\*Solução I – solução de Pridham and Gottlieb g/100ml**

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,64 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,11 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,79 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,15 g

- Controle positivo: adiciona-se 1 ml de uma solução de glicose 10% (concentração final 1%).
- Controle negativo: nenhuma fonte de carbono é adicionada.
- Fonte de carbono a ser testada: adiciona-se 1 ml de uma solução 10% (concentração final de 1%).

**ANEXO 8A Meio base para utilização de fontes de nitrogênio g/l**

Glicose	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
NaCl	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
Ágar	15,0 g

- Controle positivo: adiciona-se 0,1 g de l-asparagina ou prolina.
- Controle negativo: nenhuma fonte de nitrogênio é testada.
- Fonte de nitrogênio de nitrogênio a ser testada: adiciona-se 0,1 g

**ANEXO 9A Caldo nitrato g/l**

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Nitrato de potássio	1,0 g

**ANEXO 10A Meio para degradação da xantina g/l****Meio basal:**

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	900,0 ml

**Suspensão:**

Xantina	0,5 g
Água destilada	100,0 ml

\* Misturar o meio basal e a solução depois de autoclavar.

**ANEXO 11A Meio para degradação da tirosina g/l****Meio basal:**

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	900,0 ml

**Suspensão:**

Xantina	0,4 g
Água destilada	100,0 ml

\* Misturar o meio basal e a solução depois de autoclavar.

#### **ANEXO 12A Meio para degradação da caseína g/200ml**

##### **Solução A:**

Leite em pó desnatado	10,0 g
Água	90,0 ml

##### **Solução B:**

Agar	3,0 g
Água	97,0 ml

\* Após autoclavar, misturam-se as duas soluções

#### **ANEXO 13A ágar esculina g/100ml**

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Esculina	0,1 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Ágar	14,5 g

#### **ANEXO 14A Meio para degradação do amido g/l**

Amido	1,0 g
Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
NaCl	0,5 g
Agar	18,0 g

#### **ANEXO 15A Gelatina nutriente g/l**

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Gelatina	120,0 g
Água destilada	1.000 mL

**ANEXO 16A Caldo BHI (Himedia, Mumbai, Índia) – Infusão de cérebro e coração – com NaCl**

Meio comercial: pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante

\* Preparar caldo BHI adicionando NaCl nas seguintes concentrações: 1%, 7%, 10% e 13%.

**ANEXO 17A Caldo nutriente**

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Água destilada	1.000,0 ml

**ANEXO 18A Meio SIM (Himedia, Mumbai, Índia) – (Sulfato/Indol/Motilidade ágar)**

Meio comercial: pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante

\* Preparar o meio SIM, distribuindo 3 mL em tubos de ensaio, sendo que a solidificação deve ser no sentido vertical.

**ANEXO 19A Tampão SET (75mM NaCl, 25mM EDTA, 20mM Tris, pH 7.5)**

NaCl 1M	7,5 mL
EDTA 0.5 M	5,0mL
Tris 1M	2,0 mL
Água	85,5 mL

**\*EDTA 0,5 M:**

EDTA	18,6 g
Água	100,0 mL

**\*Tris 1M**

Tris	12,1 g
Água	100,0 mL

**ANEXO 20A Lisozima (10 mg/mL)**

Lisozima	0,01g
Água	1,0mL

**ANEXO 21A SDS (10%)**

SDS	10,0g
Água	100,0 mL

**ANEXO 22A Proteinase K (20 mg/mL)**

Proteinase K	0,02 g
Água	1,0 mL

**ANEXO 23A NaCl 5M**

NaCl	29,22 g
Água	100 mL

**ANEXO 24A Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1)**

Fenol	48,0 mL
Clorofórmio	48,0 mL
Álcool isoamílico	2,0 mL

**ANEXO 25A Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)**

Clorofórmio	96,0 mL
Álcool isoamílico	4,0mL

**ANEXO 26A TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)**

Tris	1.,0 mL
EDTA	0,2 mL
Água	98,8 mL

**ANEXO 27A Desoxinucleotídeos**

dATP	5,0 µl
dTTP	5,0 µl
dCTP	5,0 µl
dGTP	5,0 µl
Água MiliQ	180,0 µl

**ANEXO 28A Gel de agarose 0,8%**

Agarose	0,8 g
TAE 1X	100mL
Brometo de etídeo	5µL

**\*TAE 1X**

TAE 50X	20,0 mL
Água	980,0 mL

**\*TAE 50 X**

Tris	240,0 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0.5M	100,0 mL
Água para completar	1000,0 mL

**ANEXO 29A Brometo de etídeo**

Brometo de etídeo	0,50 mg
Álcool etílico	1000,0 mL