



**Universidade Federal do Tocantins  
Câmpus de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

**ADRIANA AUGUSTA NETO**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS PARA FORMULAÇÃO DE  
INOCULANTES PARA PROCESSO DE COMPOSTAGEM DE  
CONTEÚDO RUMINAL BOVINO**

**GURUPI - TO  
2016**



**Universidade Federal do Tocantins  
Câmpus de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

**ADRIANA AUGUSTA NETO**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS PARA FORMULAÇÃO DE  
INOCULANTES PARA PROCESSO DE COMPOSTAGEM DE  
CONTEÚDO RUMINAL BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Ribeiro da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Fernando Almeida

**GURUPI - TO  
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

N469s      Neto, Adriana Augusta .  
              SELEÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS PARA  
              FORMULAÇÃO DE INOCULANTES PARA PROCESSO DE  
              COMPOSTAGEM DE CONTEUDO RUMINAL BOVINO . / Adriana  
              Augusta Neto. – Gurupi, TO, 2016.  
              67 f.

              Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do  
              Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-  
              Graduação (Mestrado) em Produção Vegetal, 2016.

              Orientador: Rubens Ribeiro da Silva

              Coorientador: Alex Fernando Almeida

              1. Atividade Enzimática. 2. Bactérias celulolíticas. 3. Fungos  
              celulolíticos. 4. Resíduo ruminal bovino. I. Título

**CDD 635**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de  
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que  
citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime  
estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da  
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

b

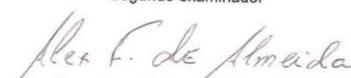
Defesa nº

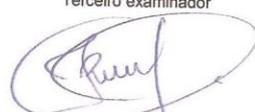
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO/TESE DE Mestrado/Doutorado,  
DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Em 15 dias do mês de Dezembro do ano de 2016, às 8 horas, no(a) Sala 15 do Bala II, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Rubens Ribeiro da Silva do Câmpus Universitário de Gurupi-To/ Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Alex Fernando Almeida, Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Junior e Prof. Dra. Cláudia Cristina Auler do Amaral Santos do Câmpus Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição do(a) DISSENTAÇÃO/TESE DE Mestrado/Doutorado de Adriana Augusta Neto, intitulada "SELEÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS PARA FORMULAÇÃO DE SUPLEMENTOS PARA PROCESSO DE COMPOSTAGEM DE CONTEÚDO RUMINAL DE BOVINOS". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-o(a) ao título de Mestre/doutor em Produção Vegetal. Não havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

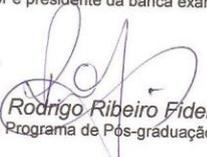
  
Dra. Cláudia Cristina Auler Do Amaral Santos  
Primeiro examinador

  
Dr. Aloísio Freitas Chagas Junior  
Segundo examinador

  
Dr. Alex Fernando Almeida  
Terceiro examinador

  
Dr. Rubens Ribeiro da Silva  
Universidade Federal do Tocantins  
Orientador e presidente da banca examinadora

15 de Dezembro de 2016.

  
Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis  
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção

Aos meus pais, Hilda Marta da Silva e Carlos José Neto e minha irmã Caroline Iolanda Neto. A minha avó e tios: Maria Conceição, Willian, Divina Aparecida, Adriano Junior, Sebastião, Batista, Wagson e Rogério.

*DEDICO*

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por uma vitória conquistada na minha vida.

A Universidade Federal do Tocantins, por possibilitar a realização do Mestrado em Produção Vegetal.

Ao professor e orientador **Dr. Rubens Ribeiro da Silva**, pelos ensinamentos, respeito e oportunidade para realização do Mestrado em Produção Vegetal, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu Co-Orientador **Dr. Alex Fernando de Almeida**, não apenas pelo conhecimento repassado a mim, mas também pela compreensão, paciência e companheirismo.

Aos colaboradores que contribuíram com este trabalho: Equipe NERO pelo apoio, a equipe LABAP que me acolheram e foram essenciais durante toda minha pesquisa e a equipe Microbio.

À Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia da UFT por ceder a estrutura dos laboratórios para a execução de parte do trabalho.

A todos os professores que ministraram disciplinas no curso de Mestrado em Produção Vegetal, pela amizade, dedicação, colaboração e pelo conhecimento transmitido.

Aos amigos: Yasmim Ramos, Eliete, Danilo Veloso, Irais Pascual, Horrana Ribeiro, Marciane Dotto, Ludielen Gomes, Tiago Alves, Adriano Mendes, Alexandra Duarte, Willani Martins, Walysson Bernardo, Paulo Ricardo, Cristian Barbosa, Angela Franciely e Kamila Pires.

Às minhas irmãs paternas Daniele Ferreira e Kamila Ferreira e sobrinhos.

Aos meus primos pelo apoio sempre e incentivo: Haysila Lourrany, Cristina Maria, Fernando Rainier, Adriano Bueno, Max Allan, Lazara Maria

Ao meu noivo Wembles Ribeiro dos Santos, pela amizade, amor, compreensão, paciência e por me ajudar com o trabalho sempre que possível.

Agradeço a todos da Universidade Federal do Tocantins que ajudaram de alguma forma nessa jornada.

A todos aos que fizeram parte desta longa jornada, os meus sinceros agradecimentos.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO GERAL

No Brasil são abatidos por ano cerca de 34 milhões de cabeças de rebanho bovino, sendo que cada animal abatido pode produzir aproximadamente 25 kg de conteúdo ruminal. Este resíduo se não disposto adequadamente pode ser considerado como um material de risco ambiental, necessitando assim de especial atenção no seu gerenciamento. Uma forma sustentável de tratamento do resíduo ruminal é a transformação deste em uma fonte orgânica de nutrientes e de microrganismos potenciais para produção de enzimas que podem ser utilizadas de diversas formas em processos biotecnológicos. O objetivo do trabalho foi a obtenção de cultura mista a partir de bactérias celulolíticas oriundas do conteúdo ruminal bovino no processo de compostagem e fungos filamentosos. Duzentas e cinquenta bactérias isoladas aos 7, 21, 39 e 62 dias ao longo do processo de compostagem foram analisadas quanto ao potencial de produzir enzimas celulolíticas. Na primeira triagem foram selecionadas 16 bactérias. Após os testes enzimáticos em meio líquido contendo Xilana e CMC para determinar Xilanase e CMCase respectivamente, os melhores resultados para CMCase foram dados pelas bactérias: 1T54(0.72 U/mL), 2T47(0.9 U/mL), 2T43.1(1.48 U/mL), 3T56.1(0.9 U/mL) e 3T32(1.12 U/mL) e para xilanase: 1T54(9.67 U/mL), 2T42.1(5.21 U/mL), 2T43.1(5.58 U/mL), 2T03(5.33 U/mL), 3T56.1(29.77 U/mL), 2T37.1(29.06 U/mL) e 3T32(5.82 U/mL). As melhores combinações entre bactérias foram 1T54+2T43.1, 2T37.1+2T47 e 3T56.1+3T32. E entre fungos e bactérias respectivamente (Bactéria+Fungo), as linhagens 2T43.1 +1T1502 e 1T54+1T1502. As linhagens de bactérias e fungos filamentosos cultivados em culturas mistas promoveram 12 combinações entre as bactérias e 14 entrelaçamentos mútuos entre 13 fungos testados. As melhores combinações entre bactérias foram: 1T54+2T43.1, 2T37.1+2T47 e 3T56.1+3T32. E entre fungos e bactérias respectivamente (Bactéria+Fungo) as 2T43.1 +1T1502 e 1T54+1T1502. As bactérias isoladas de resíduo ruminal expressaram capacidade de produção enzimáticas de CMCase e xilanase assim como apresentaram entrelaçamentos mútuos entre si e com fungos, mostrando que os isolados podem ser combinados para a formação de cultura mista e usadas para testes em leiras de compostagem como aceleradores de decomposição.

**Palavras chaves:** Atividade enzimática; Bactérias celulolíticas; Fungos celulolíticos

## GENERAL ABSTRACT

In Brazil, about 34 million head of cattle are slaughtered each year, and each slaughtered animal can produce approximately 25 kg of ruminal contents. This residue, if not disposed of properly, can be considered as an environmental risk material, thus requiring special attention in its management. A sustainable form of treatment of the ruminal residue is the transformation of this into an organic source of nutrients and potential microorganisms for the production of enzymes that can be used in various forms in biotechnological processes. The objective of the work was to obtain a mixed culture from cellulolytic bacteria derived from bovine ruminal content in the composting process and filamentous fungi. Two hundred and fifty bacteria isolated at 7, 21, 39 and 62 days throughout the composting process were analyzed for the potential to produce cellulolytic enzymes. At the first screening, 16 bacteria were selected. After the enzymatic tests in liquid medium containing Xylan and CMC to determine Xylanase and CMCase respectively, the best results for CMCase were given by the bacteria: 1T54 (0.72 U/mL), 2T47 (0.9 U/mL), 2T43.1 (1.48 U/mL), 3T56.1 (0.9 U/mL) and 3T32 (1.12 U/mL) and for xylanase: 1T54 (9.67 U/mL), 2T42.1 (5.21 U/mL), 2T43.1 (5.58 U/mL), 2T03 (5.33 U/mL), 3T56.1 (29.77 U/mL), 2T37.1 (29.06 U/mL) and 3T32 (5.82 U/mL). The best combinations among bacteria were 1T54 + 2T43.1, 2T37.1 + 2T47 and 3T56.1 + 3T32. Among fungi and bacteria respectively (Bacteria + Fungus), the strains 2T43.1 + 1T1502 and 1T54 + 1T1502. Bacteria and filamentous fungi strains cultured in mixed cultures promoted 12 combinations between bacteria and 14 mutual interlacements among 13 fungi tested. The best combinations among bacteria were: 1T54 + 2T43.1, 2T37.1 + 2T47 and 3T56.1 + 3T32. Among fungi and bacteria, respectively, (Bacteria + Fungus) the 2T43.1 + 1T1502 and 1T54 + 1T1502. Bacteria isolated from ruminal residue expressed an enzymatic production capacity of CMCase and xylanase as well as showing mutual entanglement with each other and with fungi, showing that the isolates can be combined for mixed culture formation and used for composting as well as decomposition.

**Keywords:** Enzymatic Activity; Cellulolytic bacteria; Cellulolytic fungi.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>19</b>
<b>COMPOSTAGEM DE CONTEÚDO RUMINAL BOVINO: MICROBIOTA E PROCESSOS ENZIMÁTICOS ENVOLVIDOS E DESENVOLVIMENTOS DE INOCULANTES.....</b>	<b>19</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>19</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
1.1 RESÍDUO RUMINAL .....	22
1.2 COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS ORGÂNICOS .....	23
1.3 CELULOSE .....	24
1.4 MICRORGANISMOS CELULOLÍTICAS .....	26
1.5 CELULASES.....	27
1.6 PRODUÇÃO DE CULTURA MISTA DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PARA ACCELERAR O PROCESSO DE COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS ORGÂNICOS LIGNOCELULÓSICOS .....	30
<b>2. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>31</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>37</b>
<b>TRIAGEM DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS E COMPATIBILIDADES - SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA CULTURA MISTA COM FUNGOS .....</b>	<b>37</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>37</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>39</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 TRIAGEM DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS .....	43
2.2 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS.....	44
2.3 ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	45
2.3.1 <i>Atividades de CMCase e Xilanase .....</i>	<i>45</i>
2.3.2 <i>Teste de coexistência.....</i>	<i>45</i>
2.3.2.2 <i>Teste de compatibilidade in vitro.....</i>	<i>46</i>
2.4 ESTATÍSTICA .....	47
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
3.1 <i>Etapa 1: Seleção de microrganismos produtores de enzimas extracelulares .....</i>	<i>49</i>

3.2 <i>Desenvolvimento de cultura mista para a produção de enzimas</i> .....	56
3.2.1 <i>Teste de Coexistência entre Bactérias</i> .....	56
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo 2 - Triagem de bactérias celulolíticas e compatibilidades- seleção de isolados para cultura mista com fungos.**

Tabela 1. Modelos de interação entre fungos e bactérias (Adaptado de Freitas, 2016). .....	47
Tabela 2. Atividade de celulase de Bactérias isoladas da compostagem de resíduos de frigorífico no sul do estado do Tocantins, cultivados em meios sintéticos com carboximetilcelulose de 1 a 3 dias a 30°C.....	50
Tabela 3. Produção de enzimas CMCase e Xilanase por bactérias provenientes de conteúdo ruminal bovino em meio sólido com fonte de carbono farelo de trigo .....	54
Tabela 4. Coexistência entre bactérias .....	57
Tabela 5. Bactérias que possuem coexistência com maior produção de CMCase e Xilanase .....	57
Tabela 6. Interação entre bactérias e fungos retirados de conteúdo ruminal .....	60

## LISTA DE FIGURAS

### **Capítulo 1 - Potencial celulolítico de fungos e bactérias, metodologias para triagem e desenvolvimento de inóculo: revisão.**

- Figura 1. Estruturas principais dos componentes lignocelulolíticos e seus derivados. 24
- Figura 2. Representação gráfica do modo de ação do complexo multienzimático da fibra de celulose (fonte: Lynd et al., 2002). ..... 27

### **Capítulo 2 - Triagem de bactérias celulolíticas e compatibilidades- seleção de isolados para cultura mista com fungos.**

- Figura 1. Ilustração de codificação dos isolados. .... 44
- Figura 2. Revelação enzimática (Através de halo) com corante vermelho congo .... 44
- Figura 3. Teste de coexistência entre três bactérias. .... 46
- Figura 4. Diagrama esquemático das interações entre linhagens de fungos e bactérias crescidos meio BDA em placa (Modificado de Stahl e Creisten, 1922). .. 47
- Figura 5. Bactérias que formaram halos de celulase (A) e bactérias que produziram índice enzimático acima de 2 (B) de acordo com as épocas de compostagem. .... 51
- Figura 6. Halos de hidólise enzimática dos isolados selecionados com índice enzimático acima de 2 ..... 52
- Figura 7. Testes de coexistência positivos entre os isolados com produção enzimática significativa. Os círculos vermelhos mostram o ponto de encontro entre duas bactérias, a conexão dos dois demonstra se há ou não coexistência. .... 58

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o rebanho bovino abatido em 2016 foi de aproximadamente 8 milhões de cabeças no 2º trimestre de 2016, enquanto que o estado do Tocantins contribuiu com o abate de mais 268 mil de cabeças de gado (IBGE, 2016). Cada animal pode produzir em torno de 25kg de resíduo ruminal (VASCONCELOS *et al.*, 2013), produzindo um total de 847 mil toneladas de biomassa no Brasil, 29 mil toneladas destes resíduos no estado do Tocantins. Este resíduo é gerado em larga escala de acordo com a sua demanda e crescimento do estado do Tocantins.

A indústria de abate frigorífico de bovinos e suínos é uma modalidade que está entre as que mais possuem poder de contaminação e poluição, quando não tratam seus efluentes e resíduos de maneira efetiva (MELO *et al.*, 2004).

O resíduo ruminal in natura apresenta coloração verde e se descartado no meio ambiente, sem nenhum tratamento, causa poluição e prejuízos ecológicos, tornando-se dessa forma um problema para os abatedouros de ruminantes, principalmente de bovino, devido à grande quantidade de resíduo sólido gerado no abate desses animais.

O resíduo ruminal, isto é, o bolo alimentar é encontrado em várias fases de digestão e extraído dos compartimentos ruminais dos animais abatidos, é um dos resíduos biológicos mais significativos dentre os gerados pela indústria.

Em grande parte das indústrias de abate frigorífico bovino, o resíduo ruminal é disposto em pátios chamados esterqueiras até a sua estabilização e também podem ter outras opções de tratamento, como o uso agrícola direto como biofertilizantes (sem tratamento de estabilização) (MELO *et al.*, 2004), biodigestores, aterros, enterramento, compostagem, queima, incineração e reciclagem (FRANCO, 2002).

Caso esse material não seja tratado, representa sério risco de poluição ambiental, em função de sua alta demanda bioquímica de oxigênio e elevado teor de nutrientes (SILVA, NUNES & MERCANTE, 2014).

O resíduo ruminal contém grande quantidade de matéria orgânica e nutriente (N e P), tais como outros resíduos orgânicos, quando em destinação inadequada sobre o solo, tornam-se potenciais poluidores dos recursos hídricos (MACHADO, 2011).

O N e P no solo oriundo de adubação orgânica tem causado preocupação, devido ao potencial que este elemento apresenta de contaminação de águas subterrâneas pela lixiviação do NO<sub>3</sub> (SANTOS, MENEZES & BENITTES, 2009).

O resíduo ruminal é composto por uma grande quantidade de forragem vegetal, que é o alimento consumido pelo animal, em vários estádios de fermentação, o qual permaneceu no rúmen mesmo após a dieta líquida de 24 horas antes do abate (MACHADO, 2011).

A forragem vegetal é um dos componentes energéticos da dieta dos ruminantes, embora apenas 50% ser digestivo e, portanto, utilizável (SILVA *et al.*, 2014), restando a fibra vegetal parte lignocelulósica de maior dificuldade de decomposição.

A parede celular vegetal é constituída por celulose, hemicelulose e lignina (FREITAS, 2016), sendo a celulose um importante componente estrutural das plantas totalizando em torno de 30-50% do peso seco da planta. O termo hemicelulose é utilizado coletivamente para denominar grupos distintos de polissacarídeos constituídos por açúcares pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glucose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila.

Com o crescente aumento das agroindústrias e conseqüentemente seus resíduos, têm-se visto cada vez mais a necessidade de tratamentos distintos a esses resíduos. Neste sentido, uma das formas de tratamento desse resíduo pode ser por meio do processo de compostagem.

O resíduo ruminal é um dos mais importantes nas indústrias frigoríficas e indica a necessidade de implantar uma gestão de resíduos que diminua o tempo de transformação.

O tratamento biológico do resíduo ruminal bovino é uma alternativa sustentável e viável de tratamento, visto que é caracterizado pelo baixo custo, rapidez na obtenção do produto final e de simples operação.

A compostagem é utilizada para transformar resíduos biodegradáveis em produtos finais, como fertilizantes e biogás devido a degradação acelerada de materiais orgânicos por uma população composta por diversos microrganismos, como fungos, bactérias e leveduras (KIMURA, 2014).

Os fatores que controlam a compostagem são bióticos e abióticos, passando por três períodos: mesofílico, termofílico e maturação, que podem chegar a 120 dias no total dependendo da forma de compostagem adotada. O processo de

compostagem é aeróbio controlado por uma variedade de enzimas como proteases, lipases, celulases e fosfatases as quais tem o poder de controlar a velocidade com que os substratos são degradados (SHI *et al.*, 2011).

A conversão da biomassa da compostagem envolve uma complexa comunidade microbiana e a hidrólise enzimática da celulose é um processo chave no ciclo global do carbono (EICHORST *et al.*, 2013). Em ambientes naturais, hidrólise da celulose é predominantemente realizada pelas comunidades microbianas.

A forragem quando ainda está no rúmen é digerida por microrganismos ruminais degradadores de fibra como bactérias celulolíticas e sacarolíticas, que se aderem ao substrato liberando enzimas (celulases) e degradando a fibra (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Os microrganismos ruminais apresentam especificidade quanto ao tipo de substrato que digerem. Manella *et al.* (2003) afirmam que as dietas à base de forragens possuem maior quantidade de carboidratos estruturais, resultando em maior atividade de bactérias celulolíticas e sacarolíticas, podendo ainda restar microrganismos que sejam resistentes a outros ambientes.

Tran *et al.* (2015) mencionam a importância do desenvolvimento de consórcios mistos microbianos que podem revelar novos mecanismos para a decomposição da celulose. Segundo os autores Eichorst *et al.* (2013) é um desafio decifrar os papéis individuais das comunidades celulolíticas naturais, porque elas são muito complexas e abrigam várias populações com nichos sobrepostos. Tendo assim, a necessidade de estudar os microrganismos e sua interação na decomposição de material orgânico rico em celulose em leiras de compostagem de resíduo ruminal bovino de frigorífico.

O conhecimento e a seleção da biomassa microbiana e sua atuação pode induzir alterações no processo de transformação da compostagem aumentando a eficiência e diminuindo o tempo de compostagem (SILVA, 2010).

Com base na necessidade de novas tecnologias aplicadas a compostagem, o trabalho tem como propósito compreender a microbiota presente na decomposição de resíduo ruminal oriundo de frigorífico em leiras de compostagem selecionando microrganismos envolvidos no processo de compostagem a fim de usa-los como inoculantes para acelerar sua decomposição.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 844–856, set. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

EICHORST, S. A.; VARANASI, P.; STAVILA, V.; ZEMLA, M.; AUER, M.; SINGH, S.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. Community dynamics of cellulose-adapted thermophilic bacterial consortia. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2573–2587, set. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12159>>. (Acesso em 23/08/2016).

FRANCO, D. A. **Animal disposal – the environmental, animal disease, and public health related implications: an assessment of options**. In: CALIFORNIA DEPARTMENT OF FOOD AND AGRICULTURE SYMPOSIUM, Sacramento, 2002. Disponível em: <http://rendermagazine.com/industry/animal-disposal/>. Acesso em: 20/01/2017.

FREITAS, G. A. **Ativação microbiana em compostagem de resíduo ruminal bovino**. 2016. Tese ( Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi-TO, Gurupi, To.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária**. 2016, 80 p. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201610.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201610.pdf) (Acesso em 23/08/2016).

KIMURA, G. K. **Investigação Do Potencial Celulolítico De Bactérias Oriundas De Processo De Compostagem**. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia molecular) – Universidade Estadual de Campinas , Instituto de Biologia, São Paulo.

MACHADO. R. J. T. **Uso De Resíduo Do Rúmeme Bovino Como Fonte De Nutrientes Na Agricultura – Benefícios Agronômicos E Conhecimento Popular**. 2011. Dissertação 9 Ciências Ambientais). Universidade do Estado de Mato Grosso, Cárceres- MT.

MELO, G. C. B., FILHO A. T., ABREU L. R., DIAS L. C., BEIRIGO E. A., SCHERER D..Congresso Brasileiro de Ciencia e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável. **Resíduos sólidos em industrias de abate frigorífico**. 2004. Costão do

Santinho, Florianópolis, SC. ICTR – Instituto de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável NISAM – UDP - Núcleo de informações em Saúde Ambiental da USP. 2004. p. 3556-3567.

SANTOS, J. C. **Perfil enzimático e análise filogenética de uma comunidade microbiana celulolítica**. 2014. Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Campus de Viçosa, Viçosa-Mg.

SANTOS, S. C. G.; MENEZES, J. F. S.; BENITTES, V. M. Lixiviação de nitrogênio em um Latossolo vermelho cultivado com soja após aplicação de dejetos líquidos de suínos. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS DE ANIMAIS. USO DOS RESÍDUOS DA PRODUÇÃO ANIMAL COMO FERTILIZANTE**, 1., 2009. Anais... Florianópolis: [s.n], 2009. p. 338-344.

SHI J<sup>1</sup>, EBRIK MA, YANG B, GARLOCK RJ, BALAN V, DALE BE, PALLAPOLU VR, LEE YY, KIM Y, MOSIER NS, LADISCH MR, HOLTZAPPLE MT, FALLS M, SIERRA-RAMIREZ R, DONOHOE BS, VINZANT TB, ELANDER RT, HAMES B, THOMAS S, WARNER RE, WYMAN CbE. Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan, pure cellulose, and switchgrass solids from leading pretreatments. **Bioresource Technology**, New York, v.102, p.80–88, Dez. 2011.

SILVA, C. D.; AZEVÊDO, A.; SILVA, M.; FILHO, M.; ARCANJO, M.; DE, M. E.; ALMEIDA, E. Valor nutritivo do capim-andropogon em quatro idades de rebrota em período chuvoso. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.** v.15. n3, p. 626–636, Setembro 2014.

SILVA, A. O., NUNES, W. A., GOMES A., MERCANTE, F. M. Efeitos do uso de composto orgânico obtido a partir de resíduos de frigorífico sobre a biomassa microbiana de solo, em cultivos de milho e mandioca. **Agroecol.** v.9, n.4, p. 1-10, Novembro, 2014.

SILVA, R.R. **Avaliação agrônômica de resíduos gerados em frigoríficos bovinos**. 2010. 90f. Tese (Tese em Agronomia) – Departamento de solos e nutrição de plantas, Universidade Federal de Viçosa.

SYED, S.; RIYAZ-UL-HASSAN, S.; JOHRI, S. A Novel Cellulase from an Endophyte, *Penicillium* Sp. NFCCI 2862. **American Journal of Microbiological Research**. v. 1, n. 4, p. 84–91, 2013. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/ajmr/1/4/4/index.html>>(Acesso em 28/10/2016).

OLIVEIRA, V. S.; SANTANA NETO, J. A.; VALENÇA, R.L. Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo – revisão de literatura.

Revista ISSN: 1983-0777 17 Vet. Not., Uberlândia, v.22, n. 2, p.1-19, jul/dez. 2016  
Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, ano XI, n. 20, 2013.

VASCONCELOS, W. A.; ANDRADE, A. P.; SANTOS, E. M.; EDVAN, R. L.; SILVA, D. S.; SILVA, T. C. Características morfogênicas e produção do capim buffel adubado com conteúdo ruminisólido. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v.14, n.1, p.01-09, 2013.

## CAPITULO I

### COMPOSTAGEM DE CONTEÚDO RUMINAL BOVINO: MICROBIOTA E PROCESSOS ENZIMÁTICOS ENVOLVIDOS E DESENVOLVIMENTOS DE INOCULANTES

Adriana Augusta Neto<sup>1</sup>; Rubens Ribeiro da Silva<sup>2</sup>;

<sup>1</sup>Mestranda em Produção Vegetal – UFT, Gurupi/TO; <sup>2</sup>Professor Orientador, UFT.

#### RESUMO

Os fungos e bactérias são microrganismos que possuem a maior influência na decomposição de resíduos vegetais através da produção de enzimas específicas e suas ações sinérgicas na biotransformação de resíduos. Objetivou-se realizar uma revisão bibliográfica sobre compostagem de resíduos orgânicos recalcitrantes, celulose, bactérias celulolíticas, celulase e cultura mista de microrganismos com potencial para acelerar o processo de compostagem de resíduos orgânicos lignocelulósicos. Os microrganismos capazes de degradar material orgânico rico em celulose são os principais agentes de decomposição de resíduo ruminal, pois possuem capacidade de produzir enzimas como celulasas, hemicelulasas e ácidos. A triagem desses microrganismos com alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas, pode levar a produção de um inóculo capaz de aumentar a eficiência de decomposição do processo de compostagem diminuindo o tempo de fermentação.

**Palavras-chave:** atividade enzimática; bactérias; fungos; celulose; inóculo.

#### ABSTRACT

Fungi and bacteria are microorganisms that have the greatest influence on the decomposition of plant residues through the production of specific enzymes and their synergistic actions in the biotransformation of residues. The aim of this work was to perform a literature review on composting of recalcitrant organic residues, cellulose, cellulolytic bacteria, cellulase and mixed culture of microorganisms with the potential to accelerate the composting process of lignocellulosic organic residues. The

microorganisms capable of degrading organic material rich in cellulose are the main agents for the decomposition of ruminal waste, since they have the capacity to produce enzymes such as cellulases, hemicellulases and acids organics. The screening of these microorganisms with high capacity of cellulolytic enzyme production may lead to the production of an inoculum capable of increasing the decomposition efficiency of the composting process, reducing fermentation time.

**Keywords:** *enzymatic activity; bacterium; fungi; cellulose; inoculum.*

## INTRODUÇÃO

Os sistemas agrícolas e industriais na região Amazônica Brasileira produzem diversos tipos de resíduos orgânicos como: víceras e ossos de peixe, cascas de frutos nativos, fibras de cacho de dendê, chifres e unhas de bovinos, casca de arroz, resíduos florestais, águas residuárias, lodo de esgoto, poda de árvores, resíduos alimentares em restaurantes, sangue em abatedouros municipais e conteúdo ruminal bovino (SILVA, 2010). Estes resíduos orgânicos se não forem dispostos de maneira correta, podem causar impactos ambientais, sendo necessária uma maneira eficaz e eficiente de tratamento antes de ser disposto no meio ambiente (KIMURA, 2014).

Frente a diversidade dos resíduos e da composição bioquímica é criada uma complexidade no processo de biotransformação durante o processo de compostagem. Os principais componentes dos resíduos orgânicos vegetais são carboidratos (celulose), proteínas, lipídeos e lignina. A lignina é uma substância amorfa, de natureza aromática e muito complexa, e faz parte da parede celular e da lamela média dos vegetais (SALIBA *et al*, 2001). A capacidade dos microrganismos para decompor o resíduo orgânico durante o processo de compostagem depende de sua habilidade em produzir as enzimas específicas necessárias para a degradação de cada resíduo (SANTOS, 2014).

O avanço no ciclo de crescimento das plantas promove o aumento nos teores de celulose, hemicelulose e lignina, elevando assim a recalcitrância do resíduo ao processo de decomposição, porém de modo geral a matéria orgânica vegetal é constituída de 40 a 60% de celulose (RATANAKHANOKCHAI *et al.*, 2013). Assim a decomposição de um material vegetal envolve pelo menos quatro grupos de

microrganismos sendo eles: celulolíticos, hemicelulolíticos, pectinolíticos e ligninolíticos (ZHAO *et al.*, 2016) que podem fragmentar o resíduo orgânico usando várias enzimas hidrolíticas ou oxidativas.

Dentre os resíduos orgânicos produzidos na Amazônia Brasileira, o conteúdo ruminal bovino é gerado em grandes quantidades. Só no ano de 2015 foram abatidas aproximadamente 13,9 milhões de reses (IBGE, 2015) resultando na produção 347 milhões de toneladas de resíduo ruminal bovino.

Esses componentes estruturais da parede celular ainda persistem em elevados teores no conteúdo ruminal no momento do abate dos bovinos oferecendo uma recalcitrância do resíduo durante o processo de compostagem. O resíduo oriundo de conteúdo ruminal bovino apresenta teores elevados de celulose, ligninas e hemicelulose contendo 783,6 g kg<sup>-1</sup> - Fibra em Detergente Neutro, 418,6 g kg<sup>-1</sup> - Fibra em Detergente Ácido e 365 g kg<sup>-1</sup> de Hemicelulose (FREITAS, 2016).

Uma das características principais da célula vegetal é a presença de uma fina, porém muito resistente, parede celular formada por uma mistura complexa de polissacarídeos e outros compostos secretados pela célula e que são dispostos e conectados de uma forma muito bem organizada através de ligações covalentes e não-covalentes (FARINAS, 2011), o que dificulta a degradação enzimática do material.

A fim de produzir inóculos com potenciais enzimáticos otimizados para hidrólise da biomassa vegetal com a descoberta de novos isolados lignocelulolíticos que tenham potencial de produção enzimática, visando à eficiência da decomposição de leiras de compostagem, é essencial ter um conhecimento detalhado da estrutura da parede celular vegetal e da dinâmica dos processos em questão.

Diante disso, objetivou-se realizar uma revisão bibliográfica sobre compostagem de resíduos orgânicos recalcitrantes, celulose, bactérias celulolíticas, celulase e cultura mista de microrganismos com potencial para acelerar o processo de compostagem de resíduos orgânicos lignocelulósicos.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Resíduo Ruminal

As agroindústrias, por processarem diferentes produtos de origem animal e vegetal, geram os mais variados resíduos, dentre eles o resíduo ruminal. O resíduo ruminal é o alimento consumido pelo animal proveniente do rúmen do bovino, o qual permaneceu no rúmen após a dieta líquida do bovino de 24h antes do abate, isto é, o bolo alimentar em várias fases de digestão extraído dos compartimentos ruminais dos animais abatidos, é um dos resíduos biológicos mais significativos dentre os gerados pela indústria.

Este resíduo é gerado em larga escala, visto que cada animal gera em torno de 25kg de resíduo ruminal bovino (MORALES *et al.*, 2006). O resíduo ruminal in natura apresenta coloração verde e se descartado no meio ambiente, sem nenhum tratamento, causa poluição e prejuízos ecológicos, tornando-se dessa forma um problema para os abatedouros de ruminantes, principalmente de bovino, devido à grande quantidade de resíduo sólido gerado no abate desses animais.

O resíduo ruminal contém grande quantidade de matéria orgânica e nutrientes (N e P), tais como outros resíduos orgânicos, quando em destinação inadequada sobre o solo, tornam-se potenciais poluidores dos recursos hídricos (MACHADO, 2011). O resíduo ruminal em sua maioria é disposto em pátios chamados de esterqueiras até a sua estabilização, porém também pode ter outras opções de tratamentos, como o seu uso agrícola direto como biofertilizantes (sem tratamento de estabilização) (MELO *et al.*, 2004), biodigestores, aterros, enterramento, compostagem, queima, incineração e reciclagem (FRANCO, 2002).

O rúmen é um dos resíduos de maior relevância gerados em frigoríficos e que requer especial atenção ao que se refere ao seu gerenciamento, caso esse material não seja tratado, representa sério risco de poluição ambiental, em função de sua alta demanda bioquímica de oxigênio e elevado teor de nutrientes (SILVA, NUNES & MERCANTE, 2014).

## 1.2 Compostagem de resíduos orgânicos

A compostagem é um processo biológico, aeróbio, controlado e desenvolvido por diversos microrganismos que transformam o resíduo orgânico em um produto final estável que pode ser usado por outros microrganismos e plantas (PEREIRA, 2012). A compostagem é regida por uma cadeia de microrganismos que juntos controlam todas as fases do processo, fazendo com que haja a conversão de um material poluente em um composto inerte, rico em nutrientes.

No processo de compostagem, os microrganismos convertem a matéria orgânica em dióxido de carbono, biomassa, calor e substâncias húmicas, reduz consideravelmente a emissão de odor, através da redução dos níveis de hidrocarbonetos biodegradáveis, e a secagem do resíduo o torna não atrativo para insetos. Após esse processo o produto final pode ser aplicado ao solo promovendo melhorias em suas características físicas, químicas e biológicas do solo (ZHAO, 2016).

O processo de compostagem possui quatro fases distintas sendo:

**Fase I:** No início do processo de compostagem o resíduo orgânico está em temperatura ambiente e apresenta-se levemente ácido. As fontes de carbono solúveis e facilmente degradáveis como os monossacarídeos, o amido e os lipídeos são utilizados pelos microrganismos neste primeiro estágio do processo de compostagem (SILVA, 2010). Na fase mesofílica, compostos facilmente degradáveis ricos em energia como açúcares e proteínas, são abundantes e degradados por fungos, actinobactérias, além de outras bactérias, considerados decompositores primários, esse período é caracterizado pela proliferação da microbiota, nessa etapa o número de organismos mesófilos é três vezes maior que o número de organismos termófilos (VILLAR et al., 2016), as bactérias mesófilas que atuam nesta fase sobrevivem em temperaturas mais amenas (de até 40°C).

**Fase II:** Na fase termofílica ocorre o aumento da taxa de biodegradação e é quando há o crescimento de organismos termófilos. As bactérias termoloterantes e termofílicas assumem o controle da degradação do resíduo e aumentam o pH do meio (KIMURA, 2014). Nesta fase há a inibição de organismos não termoloterantes (geralmente fungos).

**Fase III e IV:** A fase final ocorre um período de arrefecimento, estabilização e maturação caracterizado pela humificação do composto (VILLAR *et al.*, 2016), e é onde haverá uma diminuição da atividade microbiana.

O processo de estabilização de resíduos pela compostagem tem a capacidade de eliminar parasitas, patógenos e vírus contidos no resíduo, reduz a emissão de odores por meio da redução de níveis de hidrocarbonetos biodegradáveis (OLIVEIRA, 2003).

### 1.3 Celulose

As plantas representam o maior reservatório de carbono, sendo a celulose o polímero mais abundante e a sua degradação representa uma parte importante no ciclo do carbono (FARINAS, 2011). O principal componente de materiais lignocelulósicos é a celulose, juntamente com a lignina e a hemicelulose. A celulose tem função estritamente estrutural e é o principal componente da parede primária das plantas (EICHORST *et al.*, 2013).

A celulose pode estar presente em várias partes da planta, na folha, fruto, no caule ou nas estruturas rígidas. De modo geral, a matéria orgânica vegetal é constituída de celulose, mais abundante polímero, compreendendo de 40% a 60% do lenho maduro, 10% das folhas, 30% a 40% do caule e 90% das fibras de algodão (MESCHEDES *et al.*, 2012). A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por subunidades de glicose, unidas por ligações  $\beta$ -1,4 e cada resíduo de glicose é rotacionado a  $180^\circ$  em relação ao resíduo vizinho (FILHO, 2008).

O resíduo ruminal, possui em sua composição: 883,8 g kg<sup>-1</sup> - Matéria Seca; 816,6 g kg<sup>-1</sup> - Matéria Orgânica; 183,4 g kg<sup>-1</sup> - Cinzas; 138,6 g kg<sup>-1</sup> - Proteína Bruta; 270 g kg<sup>-1</sup> - Extrato Etéreo; 783,6 g kg<sup>-1</sup> - Fibra em Detergente Neutro; 418,6 g kg<sup>-1</sup> - Fibra em Detergente Ácido e 365 g kg<sup>-1</sup> de Hemicelulose. Composição nutricional da farinha de carne e osso (g kg<sup>-1</sup>): N - 70,0; P - 140,0; K - 6,90; Na - 49,10; Mg - 2,90; Ca - 128,40; Zn - 0,80; Cu - 0,20; Fe - 3,20; Al - 1,50.

A hidrólise completa da celulose necessita de um sistema enzimático de multicomponentes constituído por três enzimas principais (endoglucanase, e exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase) (SCIESSERE *et al.*, 2011). A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas formando açúcares que são posteriormente convertidos quimicamente ou por microrganismos, em etanol ou butanol, ou também

em vários outros produtos como acetona, ácidos orgânicos, ou glicerol (FILHO, 2008).

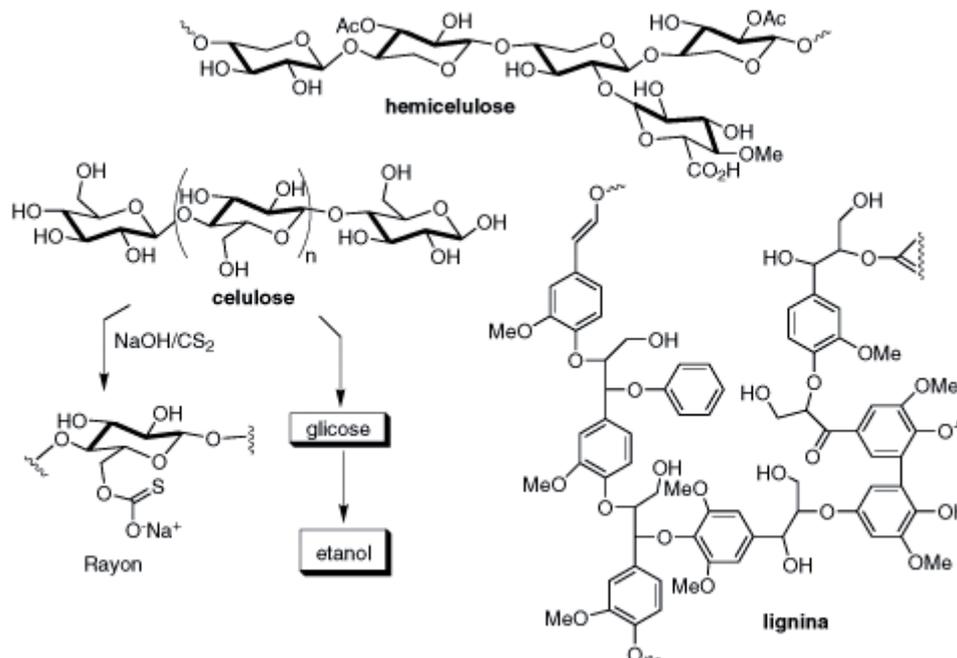
As hemiceluloses são as segundas mais abundantes e seus polímeros diferem a partir de celulose em que eles não são quimicamente homogêneos. As hemiceluloses são ramificadas em polímeros heterogêneos de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e açúcares acetilados (RATANAKHANOKCHAI *et al.*, 2013). As moléculas de hemicelulose estão dispostas de maneira quase paralelas as fibrilas de celulose e a lignina aparecem de forma aleatória, conferindo maior estabilidade à parede (FILHO, 2008).

As hemiceluloses são covalentemente ligadas a lignina, que em conjunto com a celulose formam uma estrutura altamente complexa, sendo a xilana o principal carboidrato encontrado em hemiceluloses.

Em muitas plantas, xilanos são heteropolissacáridos com as principais cadeias ligadas a unidades 1,4-  $\beta$ -D-xilopiranosose (RATANAKHANOKCHAI *et al.*, 2013).

A lignina é o terceiro polímero mais abundante na natureza. É uma molécula fenólica altamente complexa, composta por biopolímeros aromáticos com ligações amórficas, tridimensional, formado via polimerização oxidativa. Está presente nas paredes celulares das plantas e confere rigidez, impermeabilidade, resistência ao ataque microbiano e o estresse oxidativo (ZHAO *et al.*, 2016).

A figura 1 apresenta as principais estruturas envolvidas na composição estrutural de materiais vegetais.



**Figura 1.** Estruturas principais dos componentes lignocelulolíticos e seus derivados. (Fonte: FERREIRA, 2009).

#### 1.4 Microrganismos Celulolíticas

Fungos e bactérias têm sido explorados devido a sua capacidade de produzir uma longa variedade de celulases e hemicelulases (BORTOLAZZO, 2011).

Os fungos têm uma maior importância pela sua capacidade de produzir grandes quantidades de celulases que são mais fáceis de extração e purificação pela sua capacidade de crescimento e reprodução. Porém a extração de celulases a partir de bactérias tem sido muito explorada pois as bactérias possuem maior taxa de crescimento, produzem mais de uma enzima, aumentando a sinergia entre os microrganismos, podem habitar diversos ambientes (KIMURA, 2014), podem produzir linhagens resistentes às condições extremas e que podem ser utilizadas em processos de bioconversão (MAKI *et al.*, 2009).

As principais espécies de bactérias celulolíticas são *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides uccinogenes* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Acetobacter xylinum*, *Bacillus spp.*, *Cellulomonas spp.*, *Clostridium spp.* As bactérias pertencentes a *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* podem produzir celulases (SUN; CHENG, 2002).

Wenzel *et al.* (2002) confirmam em trabalho envolvendo proteínas secretadas pelas espécies de *Bacillus* que muitas delas, como *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus polymyxa* são espécies produtoras de celulasas e, portanto, apresentam grande capacidade celulolítica.

Dentre os principais gêneros de bactérias que comumente são encontrados em processos de compostagem, a prevalência do gênero *Bacillus* geralmente é observada devido à sua capacidade de produção de endósporos bacterianos que são altamente resistentes a temperaturas elevadas e a outras condições desfavoráveis que possam estar presentes em ambientes desse tipo (SILVA *et al.*, 2009).

As representantes dos gêneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Serratia* *Echerichia*, *Proteus* (SILVA *et al.*, 2009) e espécies da família *Enterobacteriaceae* também já foram encontrados nas transformações de resíduos processo de compostagem.

Gêneros bacterianos celulolíticos também incluem *Clostridium*, *Actinomyces*, *succinogenes* *Bacteroides*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, e *Methanobrevibacter ruminantium* (GUPTA, 2012). Entre os gêneros de actinobactérias mais comumente encontrados destacam-se *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonosporas* e *Micromonospora* (OLIVEIRA, 2003).

Espécies bacterianas celulolíticas e hemicelulolíticas presente no rúmem bovino segundo Oliveira (2016): *Ruminococcus albus* *Ruminococcus flavefaciens* *Bacterioides succinogenes* *Butyrivibrio fibrisolveins* *Clostridium lochheadii* *Cillobacterium cellulosolvens* *Clostridium longisporum* *Butyrivibrio fibrisolvens* *Prevotella ruminicola* *Bacterioides ruminicola* *Eubacterium xylanophilum* *E. uniformis*.

Alguns fungos conhecidos pela degradação da celulose são: celulolíticos *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus*, *Pleurotus sapidus*, *Phanerochaete carnosus*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* (FREITAS, 2016).

## 1.5 Celulasas

As celulasas realizam a bioconversão de resíduos ricos em celulose até glicose catalisando a celulose. Este processo é de suma importância na ciclagem de nutrientes, tendo em vista que cerca de 40% do material vegetal é constituído de celulose (RATANAKHANOKCHAI *et al.*, 2013).

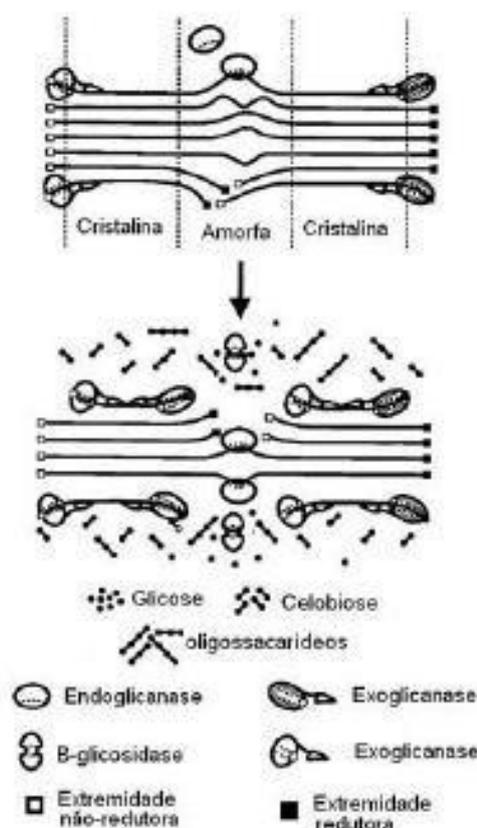
As celulases apresentam diferentes especificidades para hidrolisar as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 na celulose sendo (GUPTA, et al, 2013), assim, divididas em três classes: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases.

Os produtos gerados pela hidrólise da celulose são os açúcares (SUN; CHENG, 2002)(SUN; CHENG, 2002) (SUN & CHENG, 2002). Para Liberar açúcar pela celulose, é necessário a atividade das enzimas endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase (HASUNUMA et al., 2013).

Para que ocorra a hidrólise enzimática da celulose é necessário que ocorra a adsorção da enzima à superfície do substrato, com a formação de um complexo - enzima e celulose (SANTOS, 2014). A adsorção das celulases sobre o substrato promove não somente um contato físico entre estes componentes, mas em muitos casos pode desempenhar um importante papel na eficiência da hidrólise de celulose.

As endoglucanases são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações  $\beta$ - 1,4-D-glicosídicas da celulose, atuando aleatoriamente sobre regiões amorfas esobre substratos solúveis de celulose, liberando celoligosacarídeos (RUEGGER, 2004). Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), Avicel,  $\beta$ -glucana e xilana (KIMURA, 2014).

As exoglucanases conhecidas também como celobiohidrolases,  $\beta$ - 1,4 – celobiohidrolases ou Avicelases, catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4- glicosídicas na celulose e celotetraose, das extremidades com resíduos redutores e não redutores e unidades de glicose de terminais não redutores da cadeia (SUN & CHENG, 20012).



**Figura 2.** Representação gráfica do modo de ação do complexo multienzimático da fibra de celulose (fonte: LYND *et al.*, 2002).

São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases para que ocorra a hidrólise eficiente do cristal de celulose: sinergia EnG-ExG, onde a endoglucanase atua nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação das exoglucanases; sinergia ExG-ExG, onde as exoglucanases atuam na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação das endoglucanases; e sinergias ExG-BG e EnG-BG, onde a celobiose e os oligossacarídeos são liberados servindo como substratos para a  $\beta$ -glicosidase (SANTOS, 2014), o esquema de quebra da molécula é ilustrado na figura 2.

As xilanases são frequentemente classificadas de acordo com sua ação sobre substratos distintos: endo-1,4- $\beta$ -xilanase (endoxilanase) gera xilooligossacarídeos da clivagem da xilana, enquanto 1,4- $\beta$ -xilosidase produz a partir de xilose e xilobiose cadeia curta xilo-oligossacarídeos. (RATANAKHANOKCHAI *et al.*, 2013).

As celulases têm potencial para diversas aplicações por originar variados compostos. Podendo ser usadas na indústria de alimentos para a extração de suco

de frutas e vegetais, produção de cervejas (KUHAD *et al.*, 2011), extração de pigmentos, azeites de oliva e carotenóides, na estabilização da textura de néctares e purês, lavagem de tecidos (indústria do jeans), indústria de etanol (conversão de material celulósico em glicose) e além da diminuição de sua viscosidade também utilizadas na alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais, aumentando seu aroma e características voláteis (HUI, 2006).

### **1.6 Produção de cultura mista de microrganismos com potencial para acelerar o processo de compostagem de resíduos orgânicos lignocelulósicos**

O processo de compostagem pode ocorrer naturalmente com o envolvimento de microrganismos presentes nos resíduos orgânicos (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012). Contudo, quantidade insuficiente ou baixa biodegradabilidade da comunidade microbiana nativa pode levar à baixa eficiência da compostagem e qualidade indesejável do composto (XI *et al.*, 2015).

A compostagem pode ser acelerada pela adição de inóculo tanto na fase mesofílica quanto na fase termofílica, entretanto, vários estudos tem indicado que a inoculação de populações microbianas exógenas e naturais ao longo de todo o processo é mais eficiente do que o inóculo em apenas uma das fases (ZHAO *et al.*, 2013). A inoculação consiste na adição de microrganismos provenientes de cultura pura, ou inoculação em massa que consiste de grande quantidade de organismos, geralmente relacionados ao material ao qual o inóculo será aplicado.

Para que se consiga redução no tempo de transformação dos resíduos, aponta-se a inoculação como uma técnica eficiente, pois introduz população de microrganismos para iniciar e acelerado processo de decomposição do resíduo orgânico (KIMURA, 2014).

Pereira, (2012) obteve bons resultados trabalhando com a utilização de complexos enzimáticos como meio acelerador do processo de compostagem produzidos pelas bactérias *Thiobacillus ferroxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioporus*, *Thiobacillus denitrificans*, *Nitrossomonas europaea* e *Nitrobacter winogradskyi*, obtendo a compostagem completa do material oriundo de resíduo orgânico urbano, em aproximadamente 15 dias. Zhao (2016), usou como fonte de inóculo *Streptomyces sp.* e *Micromonospora sp.* em compostagem com

esterco de galinha, tendo diminuindo o tempo de compostagem em 46,31% e 49,62% e aumentando a atividade microbiana.

Tran *et al.* (2014) utilizaram a bactéria *Pediococcus acidilactici* como fonte de inóculo em leiras de compostagem com lixo alimentar que diminuiu o tempo de decomposição da matéria orgânica.

O inóculo seria, portanto, uma forma de aumentar em número e diversidade a comunidade microbiana das leiras de compostagem, além de poder direcionar para a degradação de um resíduo específico e/ou assegurar degradação mais completa dos componentes da compostagem (GHAFARI *et al.*, 2011).

## 2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resíduo ruminal é um poluente em grande demanda e o manejo mais utilizado no seu tratamento é a compostagem que passa por algumas fases até a estabilização do material. Durante as fases da compostagem os microrganismos são responsáveis pela maior parte da degradação, capazes de degradar material orgânico rico em celulose de resíduo ruminal, pois possuem capacidade de produzir enzimas como celulases, hemiceluloses e ácidos.

Os microrganismos responsáveis pela produção de enzimas celulolíticas são os fungos e as bactérias, participando ativamente em todas as fases da compostagem sendo os responsáveis pelas mudanças físico-químicas do material em decomposição e tempo de compostagem.

A triagem desses microrganismos com alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas, leva a produção de um inóculo capaz de aumentar a eficiência de decomposição no processo de compostagem e diminuição do tempo aumentando assim a efetividade da compostagem.

Dessa forma a bioprospecção dessas bactérias assim como a exploração da biodiversidade de recursos bioquímicos e genéticos se tornam valiosos comercialmente para alcançar objetivos econômicos e de conservação, como a redução do tempo da compostagem.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 844–856, set. 2012. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>(Acesso em 23/08/2016).

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Microbiologia (Madrid)**, p. 77, 2011.

EICHORST, S. A.; VARANASI, P.; STAVILA, V.; ZEMLA, M.; AUER, M.; SINGH, S.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. Community dynamics of cellulose-adapted thermophilic bacterial consortia. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2573–2587, set. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12159>>. (Acesso em 23/08/2016).

FARINAS, C. S. Documentos 54 - A parede Celular Vegetal e as Enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa instrumentação**. ed.1, 2011.

FERREIRA, S.; DUARTE, A. P.; RIBEIRO, M. H. L.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochem. Eng. J.** v.45, n.3, p.192-200, 2009.

FILHO, J. M. M. A. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana de açúcar**. 2008. Dissertação (Agronomia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-Sp.

FRANCO, D. A. **Animal disposal – the environmental, animal disease, and public health related implications: an assessment of options**. In: CALIFORNIA DEPARTMENT OF FOOD AND AGRICULTURE SYMPOSIUM, Sacramento, 2002. Disponível em: <http://rendermagazine.com/industry/animal-disposal/>. Acesso em: 20/01/2017.

FREITAS, G. A. **Ativação microbiana em compostagem de resíduo ruminal bovino**. 2016. Tese ( Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi-TO, Gurupi, To.

GHAFFARI, S.; SEPAHI, A. A.; RAZAVI, M. R.; MALEKZADEH, F.; HAYDARIAN, H. Effectiveness of inoculation with isolated *Anoxybacillus* sp . MGA110 on municipal

solid waste composting process. **African Journal of Microbiology Research**. v. 5, n. 30, p. 5373–5378, Dec. we2011.

GUPTA, P.; SAMANT, K.; SAHU, A. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. **International Journal of Microbiology**. v. 2012, p. 1–5, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/578925/>>. (Acesso em 26/10/2016).

HASUNUMA, T.; OKAZAKI, F.; OKAI, N.; HARA, K. Y.; ISHII, J.; KONDO, A. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513–522, 2013.

HUI, Y. H. **Handbook of fruits and fruit processing [Fruit Microbiology]**. 1. Ed. Iowa: Blackwell, 2006. p.3.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária**. 2015, 80 p. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201610.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201610.pdf) (Acesso em 23/08/2016).

KIMURA, G. K. **Investigação Do Potencial Celulolítico De Bactérias Oriundas De Processo De Compostagem**. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, São Paulo.

KUHAD, R. C., GUPTA, R., SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**. v. 2011, jul. 2011. doi: 10.4061/2011/280696.

LYND, L.R., WEIMER, P.J., VAN ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66, p.506–577, 2002.

MACHADO. R. J. T. **Uso De Resíduo Do Rúmeme Bovino Como Fonte De Nutrientes Na Agricultura – Benefícios Agronômicos E Conhecimento Popular**. 2011. Dissertação 9 Ciências Ambientais). Universidade do Estado de Mato Grosso, Cárceres- MT.

MAKI, M., KAN, T. L., QIN, W. The prospects of cellulose producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological sciences**. v.5, n.5, p. 500-516, 2009.

MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A.; MORAES, C. . **Teores de lignina e celulose em plantas de cana-de-açúcar em função da aplicação de maturadores** *Planta Daninha* . *Planta Daninha*. v.30, n.1, p.121-127, 2012.

MORALES, M. M.; XAVIER, C. A. M.; SILVA, A. A.; LUCAS JR., L. **Uso da compostagem para tratamento de resíduo sólido de abatedouro de bovinos**. *Rev. UNIVAP*, v. 13, p. 136-137, 2006. Disponível em: [http://www.univap.br/univap/proreitorias/cultura\\_divulgacao/revista/RevistaUnivap13.pdf](http://www.univap.br/univap/proreitorias/cultura_divulgacao/revista/RevistaUnivap13.pdf). Acesso em: 20/10/2016.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003. Dissertação (Mestrado em microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre- RS.

OLIVEIRA, SILVA *et al.* **Review carboidratos fibrosos e não fibrosos na dieta de ruminantes e seus efeitos sobre a microbiota RUMINAL**. p. 1–18, 2016.

PEREIRA, L. A. A. **Compostagem Otimizada Em Resíduos Sólidos Orgânicos Com a Utilização de Metodologia Enzimática Na Implantação De Uma Usina De Compostagem De Lixo No Município De Santa Juliana/Mg**. *Int. J. Knowl. Eng. Manage*. v.2 ,n.2, p52-58, maio de 2013.

RATANAKHANOKCHAI K., WAEONUKUL R., PASON P., TACHAAPAIKOON C., KYU K. L., SAKKA K., KOSUGI A., MORI Y. **Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization, Biomass Now - Cultivation and Utilization**. Dr. Miodrag Darko Matovic (Ed). Thailand: InTech, 2013. P.369-364, DOI: 10.5772/51820. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/paenibacillus-curdlanolyticus-strain-b-6-multienzyme-complex-a-novel-system-for-biomass-utilization>.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil**. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 2, p. 205–211, jun. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84042004000200001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042004000200001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

SALAMONI, S. P. **Produção e caracterização de celulases secretadas por streptomyces sp. isolados de processo de compostagem**. 2005. Dissertação (Mestrado em microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre- RS.

SALIBA, O.S.E, Rodriguez N. M., Morais S. A. L., Veloso D. P. REVISÃO– **Métodos De Obtenção E Caracterização Química Lignins – Isolation Methods And Chemical Characterization**. *Ciencia Rural*, v. 31, n. 5, p. 917–928, 2001.

SANTOS, J. C. **Perfil enzimático e análise filogenética de uma comunidade microbiana celulolítica**. 2014. Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Campus de Viçosa, Viçosa-Mg.

SILVA, R. R. **Avaliação agrônômica de resíduos gerados em frigoríficos bovinos**. 2010. 90f. Tese (Tese em Agronomia) – Departamento de solos e nutrição de plantas, Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, A. O., NUNES, W. A., GOMES A., MERCANTE, F. M. Efeitos do uso de composto orgânico obtido a partir de resíduos de frigorífico sobre a biomassa microbiana de solo, em cultivos de milho e mandioca. **Agroecologia**. v.9, n.4, p. 1-10, Novembro, 2014.

SCIESSERE, L.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JR, I.; SCIESSERE, L.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JR., I. Cellulase and xylanase activity during the decomposition of three aquatic macrophytes in a tropical oxbow lagoon. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, n. 3, p. 909, set. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000300009>>(Acesso em 28/10/2016).

SILVA, C.S., AZEVEDO, R.S., BRAGA, C., SILVA, R., DIAS, E.S., SCHWAN, R.F. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the productions of *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, p.590-600, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technol**. v. 83, n. 1, p. 1–11, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058826>>.(Acesso 25/10/2016).

VILLAR, I.; ALVES, D.; GARRIDO, J.; MATO, S. Evolution of microbial dynamics during the maturation phase of the composting of different types of waste. **Waste Management**, v. 54, n.3, p. 83–92, ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.011>>.( Acesso em 30/11/2016).

XI, B.D., HE, X.S., DANG, Q.L., YANG, T.X., LI, M.X., WANG, X.W., LI, D., TANG, J. Effect of multi-stage inoculation on the bacterial and fungal community structure during organic municipal solid wastes composting. **Bioresour**. v.196, p. 399–405, 2015.

ZHAO, Y.; LU, Q.; WEI, Y.; CUI, H.; ZHANG, X.; WANG, X.; SHAN, S.; WEI, Z. Effect of actinobacteria agent inoculation methods on cellulose degradation during composting based on redundancy analysis. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 196–203, nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.117>>.

## CAPITULO II

### TRIAGEM DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS E COMPATIBILIDADES - SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA CULTURA MISTA COM FUNGOS

#### RESUMO

A região Amazônia do Brasil é responsável por grande parte da produção e abate de bovinos, produzindo grande quantidade de resíduo ruminal bovino, este resíduo deve ser disposto adequadamente para que não haja a poluição dos lençóis freáticos pelas águas residuárias do resíduo ruminal bovino. A metodologia mais utilizada para dispor esse resíduo é a compostagem na qual os principais agentes de decomposição são as bactérias e fungos lignocelulolíticos. Diante disto objetivou-se avaliar a produção enzimática de CMCase e Xilanase das bactérias e o desenvolvimento de uma cultura mista a partir de bactérias e fungos celulolíticos provenientes da compostagem de conteúdo ruminal. Após a seleção das bactérias produtoras de enzimas analisar a sua compatibilidade entre si e com fungos já selecionados para futuramente desenvolver um inoculante misto. Selecionou-se apenas bactérias com índice enzimático acima de 2. As bactérias selecionadas foram cultivadas em farelo de trigo para quantificar a produção de enzimas CMCase e xilanase. Selecionadas as bactérias produtoras de xilanase 1T54(9,67 U/mL), 2T42.1(5,21 U/mL), 2T43.1(5,58 U/mL), 2T37.1(29,06 U/mL), 2T03(5,33 U/mL), 3T56.1(29,77 U/mL) e 3T32(5,82 U/mL) e para CMCase as bactérias 1T54(0,72 U/mL), 2T47(0,9 U/mL), 2T43.1(1,48 U/mL), 3T56.1(1,09 U/mL) e 3T32(1,12 U/mL) foram testadas em placas de Petri em teste de coexistência e teste de compatibilidade entre 13 fungos celulolíticos. Os ensaios foram realizados em triplicata. As bactérias que demonstraram coexistência foram: 1T54 com os isolados 2T43.1, 3T56.1 e 2T03; 2T42.1 com 2T37.1, 2T03 e 3T56.1; 2T43.1 com 2T03 e 3T32; 2T37.1 com 3T59 e 2T47; 2T03 com 3T59 e 3T32; 3T56.1 com 3T32. O teste de compatibilidade entre fungos e bactérias apresentou os seguintes resultados mútuos: 1T54 com os fungos 3T5506 e 1T1502; 2T43.1 com os fungos 2T2500 e 1T1502; 3T56.1 com 2T2500; 4T22 com 2T2500; 2T03 com fungos 3T3503, 2T2500 e 1T1502; 2T42.1 com 2T5501 e 2T2500. Os testes de compatibilidade entre os isolados demonstram que é possível a formação de um inóculo misto com diferentes isolados de fungos e bactérias com potencial enzimático, podendo assim ser testado

em leiras de compostagem para avaliar se haverá alteração no tempo de compostagem.

**Palavras-chave:** Celuloses; coexistências; compostagem; produção de inóculo.

## ABSTRACT

The Amazon region of Brazil is responsible for a large part of the production and slaughter of cattle, producing a large amount of bovine ruminal residue, this residue must be adequately disposed so that there is no pollution of the groundwater by the residual waters of the ruminal bovine residue. The most widely used methodology to dispose of this residue is composting in which the main decomposition agents are lignocellulolytic bacteria and fungi. The objective of this study was to evaluate the enzymatic production of CMCase and Xylanase from the bacteria and the development of a mixed culture from bacteria and cellulolytic fungi from ruminal content composting. After the selection of the bacteria producing enzymes analyze their compatibility with each other and with fungi already selected to develop a mixed inoculant in the future. Only bacteria with an enzymatic index above 2 were selected. The selected bacteria were grown on wheat bran to quantify the production of CMCase and xylanase enzymes. The xylanase producing bacteria 1T54 (9.67 U/mL), 2T42.1 (5.21 U/mL), 2T43.1 (5.58 U/mL), 2T37.1 (29.06 U/mL), 2T03 (5.33 U/mL), 3T56.1 (29.77 U/mL) and 3T32 (5.82 U/mL) and for CMCase the bacteria 1T54 (0.72 U/mL), 2T47 0.9 U/mL), 2T43.1 (1.48 U/mL), 3T56.1 (1.09 U/mL) and 3T32 (1.12 U/mL) were tested in Petri dishes in Coexistence and compatibility test among 13 cellulolytic fungi. The assays were performed in triplicate. The bacteria that showed coexistence were: 1T54 with the isolates 2T43.1, 3T56.1 and 2T03; 2T42.1 with 2T37.1, 2T03 and 3T56.1; 2Q43.1 with 2Q03 and 3Q32; 2T37.1 with 3T59 and 2T47; 2Q03 with 3Q59 and 3Q32; 3T56.1 with 3T32. The compatibility test between fungi and bacteria showed the following mutual results: 1T54 with fungi 3T5506 and 1T1502; 2T43.1 with the fungi 2T2500 and 1T1502; 3T56.1 with 2T2500; 4T22 with 2T2500; 2T03 with fungi 3T3503, 2T2500 and 1T1502; 2T42.1 with 2T5501 and 2T2500. The compatibility tests between the isolates show that it is possible to form a mixed inoculum with different fungal and bacterial isolates with enzymatic potency and can be tested in composting beds to evaluate if there is a change in composting time

**Keywords:** celluloses; coexist; composting; production inoculum.

## 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas agrícolas e industriais na região Amazônica Brasileira produzem diversos tipos de resíduos orgânicos, dentre eles o resíduo ruminal bovino. O conteúdo ruminal bovino é produzido em grandes quantidades, só no ano de 2015 foram abatidas aproximadamente 13,9 milhões de cabeça de gado resultando na produção 347 milhões de toneladas de resíduo ruminal bovino (IBGE, 2015).

Com a crescente demanda da produção de bovinos, também há o aumento de resíduos, o qual demanda uma destinação adequada por ser um potencial poluente. Este resíduo é disposto em pátios industriais chamados de esterqueiras, porém com essa disposição há a lixiviação de N e P que causa a eutrofização dos lençóis freáticos (SILVA, 2010).

A eutrofização dos lençóis freáticos pode ocorrer pela lixiviação dos nutrientes como P e N contidos nos resíduos orgânicos, que através do solo alcançar corpos de água (OLIVEIRA & BIAZOTO, 2013). O P é considerado a principal preocupação como contaminante de corpos de água superficiais, favorecendo o aumento da população de algas na água, elevando a concentração de oxigênio dissolvido na água (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2007).

O resíduo ruminal possui parede celular vegetal que é rica em lignina. Esses componentes estruturais da parede celular ainda persistem, mesmo com a digestão dos bovinos, em elevados teores no conteúdo ruminal no momento do abate dos bovinos oferecendo uma recalcitrância do resíduo durante o processo de compostagem. A compostagem pode ser usada para que haja a redução da fração biodegradável dos resíduos sólidos e tratamento dos efluentes poluentes (CHRONI *et al.*, 2009). O material obtido a partir de compostagem contém nutrientes e matéria orgânica, que pode ser utilizada para melhorar a estrutura do solo e a capacidade de retenção de água como um condicionador do solo (WEI *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2016).

A compostagem exige um tempo maior para que ocorra a degradação completa do material, além de também exigir um grande espaço, visto a grande quantidade de resíduo formada (SILVA, 2010). De um ponto de vista ecológico, a compostagem é um processo dinâmico, devido à atividade combinada de uma ampla variedade de populações microbianas, incluindo bactérias, fungos e

actinobactéria, que estão ligadas às condições ambientais consecutivas (LÓPEZ GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

A conversão da biomassa da compostagem envolve uma complexa comunidade microbiana e a hidrólise enzimática da celulose é um processo chave no ciclo global do carbono (EICHORST *et al.*, 2013). Ao longo dos anos, bactérias produtoras de celulase foram isoladas a partir de uma ampla variedade de fontes, tais como as unidades de compostagem, decomposição de material vegetal a partir de silvicultura ou resíduos agrícolas, fezes de ruminantes, solos, matéria orgânica e tripas de animais (DAR *et al.*, 2015). Gannes *et al.*, (2013) analisaram amostras de compostagem, que demonstraram uma enorme variedade de microrganismos alguns dos quais não tinham sido anteriormente relacionados com a compostagem.

A celulose é o principal componente das substâncias lignocelulolíticas. Para a sua hidrólise completa necessária um sistema enzimático multicomponente contendo três principais enzimas, tais como endoglucanase, exoglucanase e glucosidase (ZHAO *et al.*, 2016). Estas enzimas têm sido comumente estudadas a partir de fungos e bactérias. Em sistemas naturais, a hidrólise de celulose é geralmente catalisada por enzimas de comunidades microbianas complexas (EICHORST *et al.*, 2013). Os microrganismos aeróbios secretam uma combinação dessas enzimas no ambiente, que atuam em sinergia no substrato, onde suas enzimas são organizadas umas às outras de modo que sua ação seja coletiva. (SCIESSERE, 2012).

Endocelulases e exocelulases agem sinergicamente sobre a celulose para produzir celobiose, que é então clivada pela  $\beta$ -glucosidase em glicose (SYED *et al.*, 2013). Há um consenso geral de que estudar enzimas extracelulares envolvidas na decomposição, pois pode fornecer informações valiosas sobre o ciclo de nutrientes e carbono nos ecossistemas (SCIESSERE *et al.*, 2011). As enzimas celulolíticas têm demonstrado seu potencial biotecnológico em várias indústrias, incluindo alimentos, ração animal, fabricação de cerveja e produção de vinho, agricultura, refino de biomassa, papel e celulose, têxtil e de lavanderia (SYED *et al.*, 2013).

A bioprospecção com a finalidade de se obter inóculos mistos é definida como a exploração de biodiversidade para alcançar os objetivos econômicos (ACHARYA *et al.*, 2012). Tendo em vista a necessidade de encontrar novos meios para aumentar a eficiência e qualidade da compostagem os consórcios microbianos são necessários para distinguir as funções metabólicas individuais na comunidade e

desenvolver modelos mecanicistas para hidrólise da celulose (EICHORST *et al.*, 2013). Assim, bioaugmentação de microrganismos envolvidos na compostagem poderia potencialmente acelerar a biodegradação e promover o processo de humificação (ZHAO *et al.*, 2016). O presente trabalho tem como objetivo avaliar a produção enzimática e o desenvolvimento de uma cultura mista a partir de bactérias e fungos celulolíticos provenientes da compostagem de conteúdo ruminal.

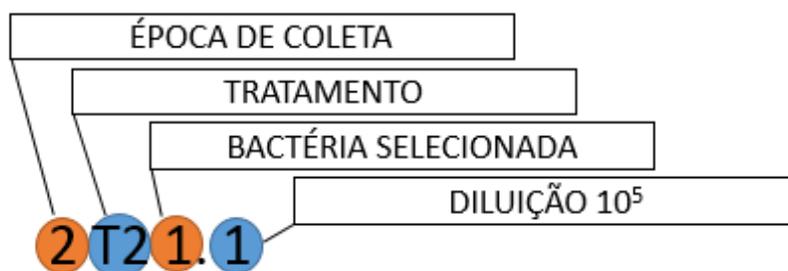
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos na Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, no laboratório de Biotecnologia/Análise de Alimentos e Purificação dos Bioprodutos (LABAP) e Laboratório de Microbiologia (MICRO BIO) da Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Universitário de Gurupi, localizado na região sudoeste do estado do Tocantins, a 280 m de altitude e em clima do tipo Aw, de acordo com classificação climática de Rubel & Kottek (2010).

As bactérias foram obtidas a partir de um trabalho anterior realizado por Freitas (2016) com leiras de compostagem de conteúdo ruminal bovino (CRB) de frigorífico enriquecido com resíduos de carne e osso (FCO), sendo essas combinações: 1m<sup>3</sup> CRB + Doses; 0, 14.2, 30.4, 42.6, 56.8, 71 kg de FCO respectivamente, sendo a coleta das amostras realizadas em 4 épocas diferentes: 7, 21, 39 e 62 dias.

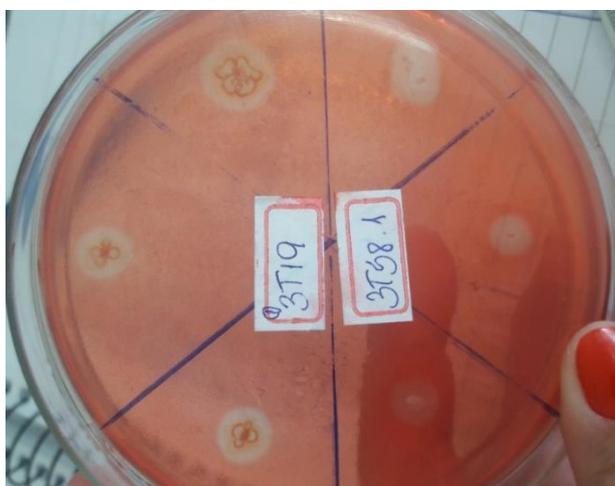
### 2.1 Triagem de microrganismos celulolíticos

As bactérias anteriormente isoladas foram avaliadas quanto às suas atividades celulolíticas em placas contendo meio ágar nutriente e suplementada com 1% de fonte de carbono carboximetilcelulose (CMC). Os isolados foram previamente ativados em meio ágar nutriente e inoculados em placa de Petri em triplicata e incubados a temperatura de 30 °C. Os isolados foram codificados de acordo com a época de coleta, tratamento e um número aleatório conforme o isolamento da colônia seguido pela sua diluição (Figura 1).



**Figura 1.** Ilustração de codificação dos isolados.

A revelação para a determinação de atividade celulolítica foi realizada pela adição de vermelho congo 0,25% (m/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, conforme método proposto por Hankin e Anagnostakis (1975) (Figura 2). A lavagem da superfície do meio foi realizada com solução de NaCl 1M no mesmo tampão e observado um halo transparente em contraste com o meio opaco da colônia. Os cultivos em que foi possível observar a formação de um halo ao redor da colônia tiveram sua atividade avaliada por meio do índice enzimático (IE), ou seja, o diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia (HANKIN E ANAGNOSTAKIS, 1977).



**Figura 2.** Revelação enzimática (Através de halo) com corante vermelho congo.

## 2.2 Seleção de bactérias celulolíticas

Os meios de cultivos foram preparados com 10 g de farelo de trigo esterilizado a 120°C por 20 minutos em saco de polietileno e tampados com rolha de algodão. Os cultivos foram inoculados com 1 mL de suspensão de células com leitura em espectrofotômetro de 0,7 a 0,8 a 540 nm, e mantidos por 6 dias em incubadora a 30°C. Após o crescimento bacteriano, foi adicionado ao cultivo 20 mL de água gelada destilada e esterilizada, e posteriormente realizou-se a filtração e congelamento do extrato para avaliação de atividade enzimática, todos os cultivos foram realizados em triplicata.

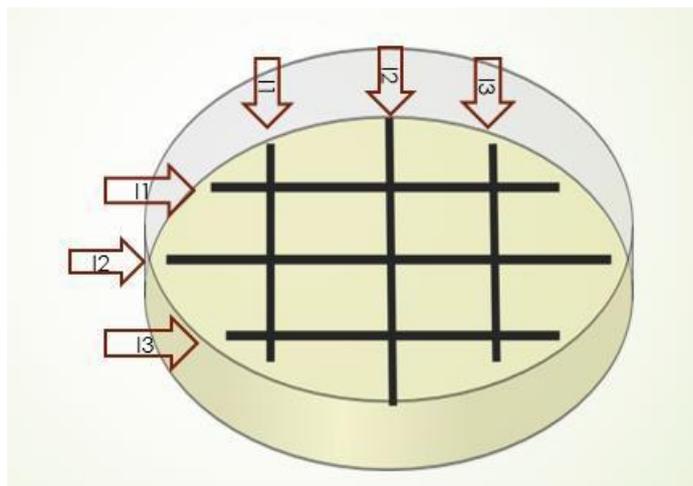
## **2.3 Análise enzimática**

### **2.3.1 Atividades de CMCase e Xilanase**

As atividades de endoglucanase e Xilanase foram determinadas utilizando 1% de carboximetilcelulose (CMC) e Xilana, separadamente, em tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,5. O meio reacional constituiu de 400  $\mu$ L do extrato enzimático, mantidos a 60°C. Após intervalos de tempos 0 (controle), 5 e 10 min, alíquotas de 200  $\mu$ L foram retiradas do meio reacional e a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu$ L de DNS e fervidas por 5 min a 100°C. As amostras foram resfriadas e adicionou-se 2 mL de água destilada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm. A liberação de açúcares redutores foi determinada de acordo com Miller (1959), utilizando-se glicose ou xilose como padrão (coeficiente de extinção molar: glicose 80,54  $M^{-1}.cm^{-1}$  ou xilose 74,27  $M^{-1}.cm^{-1}$ ). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de glicose ou xilose por min por mL.

### **2.3.2 Teste de coexistência**

Os isolados selecionados foram riscados perpendicularmente, um contra o outro, em placas contendo ágar nutriente e incubados a 30°C durante 48h para observar o antagonismo entre os isolados (GUO et al., 2010) (Figura 3). Para inoculação na placa contendo ágar nutriente, foi adicionado 20  $\mu$ L de cultivo bacteriano previamente reativado em meio líquido ágar nutriente, no canto superior da placa e inclinado a 90° para a gota dê origem a uma linha reta e uniforme até a parte inferior da placa. O mesmo movimento foi repetido de forma perpendicular sendo feito o mesmo com mais dois isolados, totalizando 3 isolados por placa.

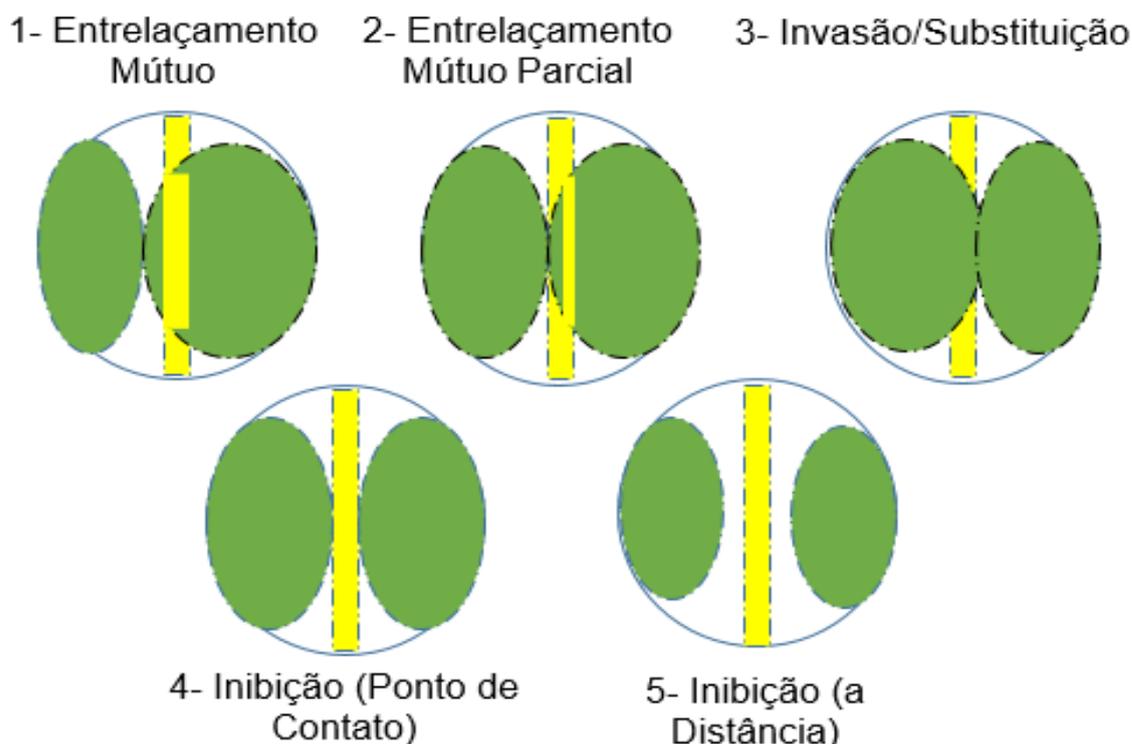


**Figura 3.** Teste de coexistência entre três bactérias.

### 2.3.2.2 Teste de compatibilidade *in vitro*

Os testes de compatibilidade entre fungos e bactérias foram realizados de duas maneiras diferentes, sendo a metodologia de confronto direto adaptada por (PODESTÁ, 2015). Alguns fungos apresentaram pouco crescimento sendo assim necessária a adaptação da metodologia. Os fungos que tiveram menor crescimento foram riscados com auxílio de alça de Drigalski nas placas em forma de cruz, e após o início do seu crescimento foi riscado o isolado de bactéria de forma que os dois isolados tivessem conexões.

A metodologia consiste na inoculação do fungo em lados opostos da placa com o auxílio de alça de drigalski e incubadas por 5 dias até seu crescimento. Uma alçada de uma colônia bacteriana forma uma risca foi realizada no centro da placa, conforme ilustra a Figura 4 e suas interações estão descritas na tabela 1. Estas foram mantidas a 30 °C por 5 dias, antes da avaliação.



**Figura 4.** Diagrama esquemático das interações entre linhagens de fungos e bactérias crescidos meio BDA em placa (Modificado de Stahl e Creisten, 1922).

**Tabela 1.** Modelos de interação entre fungos e bactérias (Adaptado de Freitas, 2016).

Interação	Definição
1- Entrelaçamento Mútuo	Crescimento de ambos microrganismos sem sinal macroscópico de interconexões.
2- Entrelaçamento Mútuo Parcial	Crescimento onde o fungo cresce acima da bactéria porém não há interação completa.
3- Invasão/Substituição	O micélio do fungo cresce sobre a bactérias podendo inibir seu crescimento.
4- Inibição (Ponto de Contato)	Os microrganismos se aproximam um do outro até com uma linha de demarcação de 1 a 2mm, entre as duas colônias.
5- Inibição (A distância)	Inibição a uma distância de até >2 mm (As bactérias apresentam crescimento desigual no centro mais próximo a colônia de fungos).

## 2.4 Estatística

As análises das amostras foram realizadas em triplicata e as médias dos valores são apresentadas com desvio-padrão. Os resultados obtidos para produção

das enzimas foram submetidos ao teste F a 95% de significância e comparados pelo teste de média scott Knott a 95% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Etapa 1: Seleção de microrganismos produtores de enzimas extracelulares

Durante o processo de compostagem de conteúdo ruminal foram realizadas quatro amostragens aos 7, 21, 39 e 62 dias. Foram isoladas e purificadas 250 isolados de bactérias e incubadas por 30°C por 5 dias (Freitas, 2016).

O isolamento das colônias foi realizado por diluições seriadas e inoculadas em meio de seleção até obtenção de culturas puras. As quantidades de isolados foram influenciadas de acordo com a composição das leiras (dimensão das partículas e relação C/N), e seu tempo de amostragem. Freitas (2016) observou o início da fase termófila, aproximadamente aos 5 dias, e o início da fase de arrefecimento aos 20 dias de compostagem, a etapa termófila excede o limite de tolerância a temperatura dos microrganismos mesofílicos e promove o desenvolvimento de microrganismos termófilos (OLIVEIRA, 2003).

Todos os 250 isolados inicialmente passaram por uma triagem em meio ágar nutriente + CMC (carboximetilcelulose). Nas Tabelas 2 são apresentados os resultados para os isolados que apresentaram ou não halo de degradação de CMC, onde 86 isolados coletados nos 4 períodos da compostagem apresentaram halos enzimáticos.

Tabela 2. Atividade de celulase de Bactérias isoladas da compostagem de resíduos de frigorífico no sul do estado do Tocantins, cultivados em meios sintéticos com carboximetilcelulose de 1 a 3 dias a 30°C

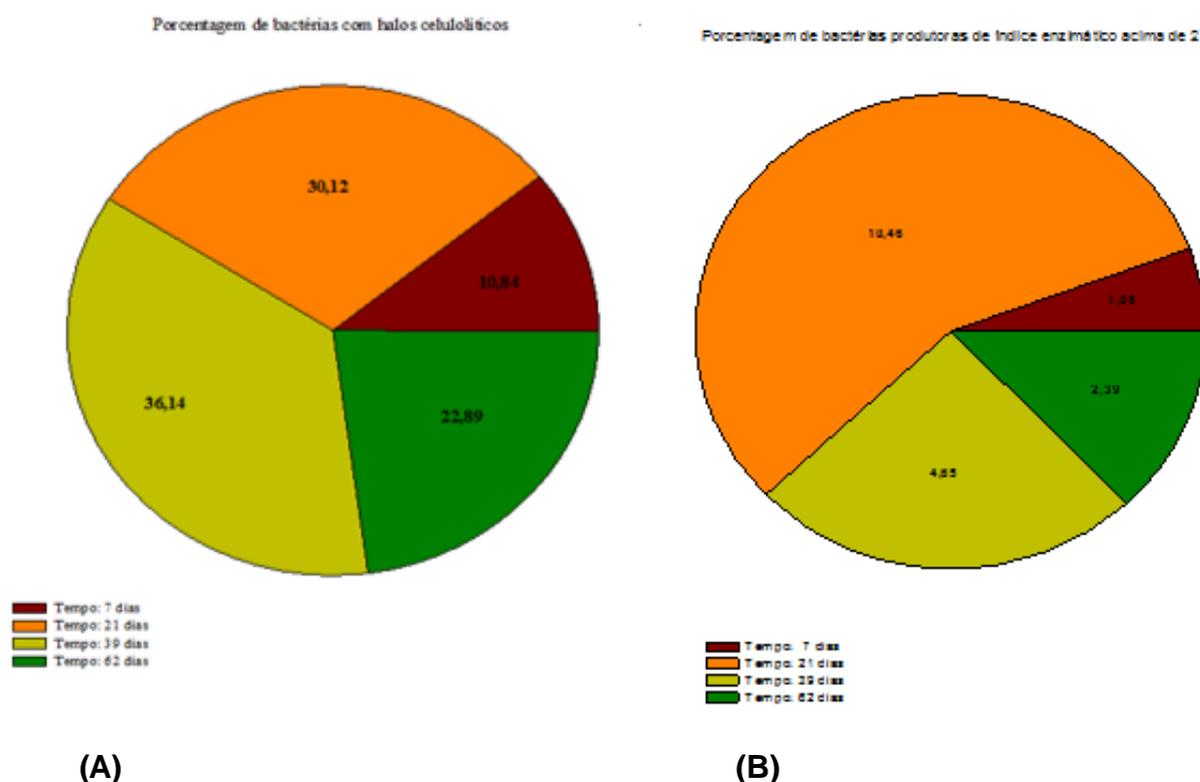
Codificação	Øc	Øh	le	Codificação	Øc	Øh	le
1T5.2	16,33	5,31	0,37	3T42	8,35	5,55	0,67
1T06.1	5,13	8,2	1,59	3T43	25,35	6,18	0,25
1T14.1	15,76	7,83	0,92	3T45	1,78	2,18	1,24
1T121	9,146	4,08	0,66	3T46	7,51	7,84	1,08
2T01	12,11	15,83	1,4	3T47	6,19	9,44	1,53
1T23.1	5,84	7,88	1,35	3T49	5,19	3,15	0,61
1T35.1	32,84	4,74	0,24	3T51	9,14	17,71	1,97
1T41.1	41,81	18,65	0,43	3T52.1	24,14	10,39	0,60
1T52	10,19	0,99	0,277	3T56.1	7,17	11,37	2,32
1T54	13,38	27,85	2,27	3T58	4,99	4,55	0,92
2T02.1	4,87	2,72	0,82	3T58.1	6,29	8,80	1,42
2T03	4,15	11,32	3,35	3T59	9,52	20,46	2,57
2T03.1	6,94	4,24	0,61	3T310	9,41	13,15	1,41
2T04	5,85	1,89	0,42	3T412	22,60	8,25	0,75
2T05	6,27	6,20	0,99	3T413	15,52	21,16	1,38
2T06.1	7,68	4,24	0,54	3T510	4,12	7,78	1,95
2T07	8,14	12,44	2,07	3T32	8,39	17,63	2,27
2T11	15,23	19,67	2,38	3T19	5,98	10,03	1,66
2T11.1	6,88	17,55	2,55	3T22.1	26,93	28,25	1,07
2T14	3,6	4,95	1,05	3T28	4,25	5,00	1,17
2T23	6,67	1,97	0,45	3T35	5,71	9,96	1,75
2T24	6,46	8,65	1,34	3T37.1	4,58	9,75	2,16
2T31	7,51	6,47	0,87	3T41.1	6,07	10,33	1,72
2T36	26,97	12,78	0,73	3T17.1	4,58	3,50	0,77
2T37	23,05	17,53	0,70	4T04	7,68	10,66	1,39
2T37.1	6,57	27,03	4,11	4T14	9,75	15,02	1,56
2T41	4,92	6,60	1,4	4T2.9	8,32	10,94	1,27
2T15	6,42	5	0,78	4T22	13,29	35,39	3,26
2T21	5,08	5,41	1,11	4T23	5,38	10,03	1,87
2T21.1	6,18	15,39	2,59	4T24	9,29	7,69	0,85
2T22	3,59	1,94	0,76	4T26	5,83	8,73	1,50
2T55	4,41	3,80	0,86	4T27	5,37	9,88	1,84
2T42.1	3,05	6,45	2,12	4T28	9,24	11,76	1,32
2T43.1	2,84	6,19	2,18	4T29	5,92	10,58	1,79
2T45	2,49	2,38	0,97	4T33	15,00	21,66	1,45
2T47	7,77	22,08	2,96	4T35	9,35	5,03	0,54
2T51	4,67	9,64	2,06	4T42	6,16	9,89	1,61
2T54	3,12	3,80	1,21	4T43.1	4,95	1,66	0,76
3T01.1	14,90	22,31	1,53	4T46	3,39	5,68	1,71
3T04.1	3,00	2,64	1,19	4T47	11,01	15,08	1,35
3T11	7,57	4,10	0,55	4T51.1	3,33	10,64	3,42
3T012	9,33	16,61	1,82	4T56	21,71	23,02	1,09
3T013	7,57	10,39	1,38	4T57	4,92	5,52	1,12

Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm); le = índice enzimático; (ND) = não produziu halo. A codificação das bactérias com início 1,2,3 ou 4, representa as épocas de coletas aos, 7,21, 39 e 62 respectivamente

Os isolados 2T37.1, 2T03, 4T51.1 e 4T22 obtiveram os maiores índices enzimáticos sendo eles 4.11, 3.35, 3.42, 3.26 respectivamente e os isolados que apresentaram menor valor foram 1T35, 1T52 e 3T43 (Tabela 2, 3 e 4).

Os valores de porcentagem dos isolados testados em cultivos em meio contendo CMC como única fonte de carbono, indicaram a presença de bactérias celulolíticas em um total de 34,4% dos isolados conforme pode ser observado na figura 5. Dessas bactérias que apresentaram a formação do halo, 30,12 % se apresentou na época de coleta de 21 dias 36,14% aos 39 dias (Figura 5 A).

López-González et al. (2015) afirmam que a biodiversidade é maior nas fases centrais de compostagem mesófilas, termofílicas compartilhado 50% das espécies. A fase termofílica dos 7 aos 21 dias apresentou 40,86% dos isolados.



**Figura 5.** Bactérias que formaram halos de celulase (A) e bactérias que produziram índice enzimático acima de 2 (B) de acordo com as épocas de compostagem.

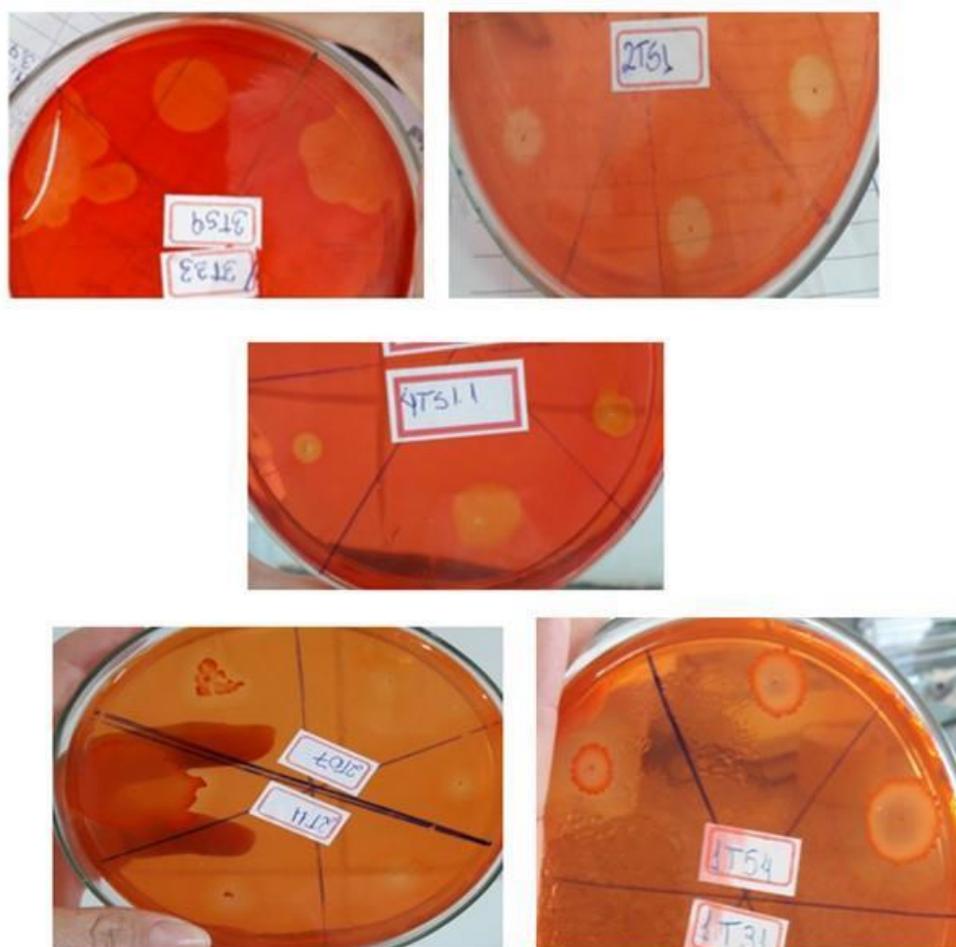
Das bactérias que formaram halos enzimáticos, apenas 11 isolados obtiveram índice enzimático acima de 2, sendo elas separadas de acordo com a época de compostagem. A fase de arrefecimento aos 29 dias é o período com maior porcentagem de halos médios (Figura 5 B).

No presente trabalho os isolados apresentaram halos variando de 0,25 mm a 28 mm, 36 isolados apresentaram halos translúcidos acima de 10 mm. Kimura (2014) trabalhando com bactérias celulolíticas isoladas de leiras de compostagem de

material orgânico da Fundação Parque Zoológico de São Paulo obteve dentre 135 linhagens de isolados, 10 que apresentaram halos translúcidos com diâmetros entre 13 mm e 19 mm, as quais foram avaliadas quanto a atividade celulotica em ensaios quantitativos monitorados durante 7 dias.

A formação de halo enzimático foi observada em 33% das 250 bactérias isoladas e destas apenas 6,4% apresentaram índice enzimático acima de 2 e foram selecionadas para os demais testes, sendo elas: 1T54, 2T51, 2T47, 2T42.1, 2T43.1, 2T37.1, 2T21.1, 2T11.1, 2T11, 2T07, 2T03, 3T59, 3T56.1, 3T32, 4T51.1 e 4T22. Os isolados foram identificados de acordo com a sua época de amostragem, tratamento, código de sequência e diluição.

Dar et al., (2015) estimaram o potencial de degradação de celulose dos isolados de bactérias positivos por cálculo o índice enzimático, isto é, a razão entre o diâmetro da zona de folga para o diâmetro da colônia que também pode ser chamado de índice enzimático.



**Figura 6.** Halos de hidólise enzimática dos isolados selecionados com índice enzimático acima de 2.

Na primeira coleta apenas 15% apresentaram a formação de halo enzimático em placas contendo ágar nutriente o isolado 1T54 apresentou índice enzimático acima de 2.

A maioria dos isolados foram retirados da fase termofílica das leiras (7 aos 39 dias), totalizando 53%, e destes, 58% apresentaram halo em placa com meio CMC, sendo responsável os isolados pertencentes a fase termofílica por 81% dos isolados com índice enzimático acima de 2. A fase de maturação apresentou 23% de isolados com produção de halo enzimático, porém apenas dois isolados (4T51.1 e 4T22) apresentaram IE acima de 2.

Diante disso, pode-se afirmar que a fase termofílica é responsável por maior atividade microbiana por decompor grande parte do conteúdo ruminal bovino. Chroni et al. (2009) notaram que os números da maioria dos grupos microbianos aumentaram após o final da fase termofílica, embora em alguns casos, as contagens de isolados de certos grupos diminuíram novamente no final do processo, podendo indicar o esgotamento de substratos específicos ou uma intolerância ao menor teor de umidade.

Em trabalho com bactérias celulolíticas oriundas de sistemas digestivos de invertebrados foram encontrados valores de halos com diâmetro de 50 e 45 mm e valores de índice enzimático de 9 e 9,8, respectivamente (GUPTA *et al.*, 2012).

Testando diferentes isolados Salamoni (2005) obteve os maiores halos das espécies *Streptomyces cyaneus*, *Streptomyces rochei*. Outras espécies pertencentes a *Streptomyces griseoviridis* apresentaram valores de 17 a 28 mm de diâmetro e uma linhagem isolada no trabalho que não foi identificada, apresentou o maior halo (48 mm), nas demais linhagens as medidas variaram de 27 a 48 mm.

As atividades de CMCase e xilanase apresentaram diferenças estatísticas entre si. Os isolados que apresentaram maior atividade enzimática de CMCase foram 2T43.1 e 3T32 e para enzima xilanase 3T56.1 e 2T37.1. Os isolados 2T11.1, 2T21.1, 2T51 e 4T51.1 não apresentaram atividades enzimáticas nas condições apresentadas para CMCase. Para a enzima xilanase não houve produção apenas para o isolado 3T59.

Devido à ligação entre a atividade enzimática e a degradação de diferentes frações de matéria orgânica, os ensaios enzimáticos podem ser usados para estimar as taxas de degradação de partículas (SCIESSERE *et al.*, 2011). A degradação da matéria orgânica está associada a produção enzimáticas de microrganismos, essas

enzimas tem o poder de romper ligações cristalinas e amorfas das cadeias de celulosas e lignocelulosas (SANTOS, 2014).

**Tabela 3.** Produção de enzimas CMCCase e Xilanase por bactérias provenientes de conteúdo ruminal bovino em meio sólido com fonte de carbono farelo de trigo.

Identificação	le	CMCase U/mL	Xilanase U/mL
1T54	2,27	0,72 d	9,67 b
2T03	3,35	0,4 c	5,33 b
2T07	2,07	0,17 c	1,22 a
2T11	2,38	0,26c	1,57a
2T11.1	2,55	0	0,087 a
2T21.1	2,59	0	2,29 a
2T37.1	4,11	0,14 c	29,06 c
2T42.1	2,13	0,2 c	5,21 b
2T43.1	2,19	1,48 e	5,58 b
2T47	2,97	0,9d	1,95 <sup>a</sup>
2T51	2,06	0	0,28 <sup>a</sup>
3T32	2,27	1,12e	5,82b
3T56.1	2.,32	0,9 d	29,77 c
3T59	2,57	0	0
4T22	3,26	0,59 d	0,37 a
4T51.1	3,42	0	2,65 a

Condições de cultivos: 48horas de incubação a 30°C. ND (não foi dectado no meio testado). A codificação das bactérias com início 1,2,3 ou 4, representa as épocas de coletas aos, 7,21, 39 e 62 respectivamente.

As linhagens que tiveram estatisticamente maior produção de CMCCase foram 2T43.1(1,48 U/mL) e 3T32 (1,12 U/mL). De todos os isolados avaliados, 31% não apresentaram atividade enzimática. Alguns isolados produziram halos enzimáticos em meio sólido, porém não obtiveram atividade enzimática em meio liquido. As bactérias precisam produzir enzimas extracelulares para quebrar compostos estruturais em moléculas menores que possam ser assimiladas (SCIESSERE, *et al.*, 2011). Os isolados que não apresentaram atividade enzimática provavelmente não apresentaram habilidade para produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato (TUOMELA *et al.*, 2000).

Resultados semelhantes foram relatados com *Acinetobacter anitratus* e *Branhamella* sp. cultivadas em meio básico com glicose e CMC como únicas fontes de carbono separadamente. A enzima CMCCase mostrou máxima atividade de 0,48 U/ml de CMC. GUPTA *et al.*, 2012 testando o potencial celulolíticos de *Branhamella* sp., teve atividade máxima da enzima CMCCase foi de 2,56 U/ml (GUPTA *et al.*, 2012).

Eichorst et al. (2013) citam que as bactérias termofílicas em consórcios têm ampla capacidade para decompor substratos com resíduos de plantas.

Algumas espécies que não demonstraram capacidade de produção devido as condições utilizadas ou meio de cultura, pois podem variar dependendo do seu suplemento de carbono

Nos experimentos realizados por Salamoni (2005) na produção de celulases em temperatura de 30 °C, a máxima atividade foi de 3,9 U/mL com CMC e 3,6 U/mL com palha de milho como fonte carbono. Nos ensaios com palha de aveia, a produção máxima de celulases foi de 2,61U/mL, nos experimentos realizados à temperatura de 35 °C.

Na produção de xilanase, a bactéria 2T37.1 (29,06 U/mL) e a 3T56.1 (29,77 U/mL) foram superiores que as demais, porém os isolados 2T03 (2,33 U/mL), 1T54 (9,67 U/mL), 2T42.1 (5,21 U/mL), 2T43.1 (5,58 U/mL) e 2T32 (5,82 U/mL) também apresentaram bons resultados na produção dessas enzimas.

Os isolados que demonstraram alta produção das duas enzimas testadas CMCase e Xilanase respectivamente foram 1T54 (0.72 e 9.67 U/mL), 2T43.1 (1.48 e 5,58 U/mL), 3T32 (1.12 e 5.82 U/mL) e 3T56.1 (0.9 e 29.77 U/mL), sendo demonstrada na tabela.

Os isolados obtiveram diferentes níveis de produção enzimática, dentre eles os que produziram maior índice enzimático foram: 4T22 (3.26 IE) que obteve boa produção enzimática em CMCase e a 2T37.1 (4.11 IE) que obteve a maior produção de Xilanase, sendo que esta última foi coletada no período termófilo da leira, podendo então ser um isolado termófilo. As bactérias termófilas, podem reduzir a fase termofílica aumentando assim a degradação da matéria orgânica complexa que ocorre nesta fase (ZHANG et al., 2014).

Todos os isolados foram incubados a 50°C para confirmar a possibilidade de serem termotolerantes. Apenas o isolado 2T47 não foi capaz de crescer a essa temperatura, sendo todos os outros termotolerantes (resultados não apresentados).

Sciessere et al., (2012) obtiveram em detritos de *Salvinia s. p.*, *E. azurea* e *C. giganteus* atividade de xilanase mais elevada, cita que ocorreu pelo fácil acesso dos microrganismos neste componente em relação à celulose.

## 3.2 Desenvolvimento de cultura mista para a produção de enzimas

### 3.2.1 Teste de Coexistência entre Bactérias

O teste de coexistência entre os isolados de bactérias foi conduzido para determinar se os isolados selecionados são compatíveis *in vitro*. O objetivo do teste é encontrar os isolados que não mostrassem antagonismo quando cultivados em cultura mista. Desta forma, os mesmos poderiam ser utilizados posteriormente em ensaios de co-cultivo para a formulação de um inoculante misto, o que é vantajoso, pois multi-espécies de bactérias podem apresentar uma melhor colonização nas leiras de compostagem como também podem combinar diferentes mecanismos de ação de forma sinérgica. Desta forma podem ser combinadas entre si, para que produza um inoculante misto com alta capacidade de decomposição celulolítica.

A inoculação de cultura mista em leiras de compostagem tem efeito em diferentes materiais na degradação da celulose e da relação entre inoculantes e actinobactérias (ZHAO *et al.*, 2016). Além disso, a inoculação pode distintamente acelerar a degradação da matéria orgânica (MO) (especialmente celuloses) e assegurar a eficiência da degradação do material que compõe a compostagem. Entre as 16 bactérias que foram selecionadas, cinco isolados demonstraram potencial para CMCase: 1T54, 2T43.1, 2T47, 3T32 e 3T56.1, e sete para xilanase: 1T54, 2T03, 2T37.1, 2T42.1, 2T43.1, 2T42.1, 3T32 e 3T56.1. O teste de coexistência foi realizado para avaliar os isolados de bactérias e verificar a interação entre eles.

Na Tabela 4 são apresentados os isolados que apresentaram coexistência. Pode se observar que dentre os isolados que foram superiores tanto em CMCase quanto em xilanase, os que tiveram coexistência entre si foram: 1T54 com 2T43.1 e 3T56.1; 2T43.1 com 3T32; 3T32 com 3T56.1. Já os isolados superiores apenas em CMCase foram: 2T43.1, 1T54 e 3T56.1 que combinaram entre si; 3T32 coexistiram com 2T43.1 e 3T56.1 em separados.

Para a produção de xilanase, os isolados 1T54, 2T03, 2T37.1, 2T42.1, 2T43.1, 3T32 e 3T56.1 apresentaram produção significativa sendo que estes puderam coexistir com: 1T54 com 3T56.1, 2T03 e 2T43.1 isolados; 2T03 com 3T32, 2T42.1 e 2T43.1; 2T37.1 com 2T42.1; 2T43.1 com 2T03 e 3T32; 3T56.1 com 3T32 e 2T42.1.

**Tabela 4.** Coexistência entre bactérias

Espécies em interação		Espécies em interação	
CMCase		Xilanase	
1T54	2T43.1 3T56.1 4T22	1T54	2T43.1 3T56.1 2T03
2T43.1	3T32	2T43.1	3T32 2T03
2T47	4T22	2T47	2T37.1
3T56.1	3T32	3T56.1	3T32 2T42.1
		3T32	2T03
		2T42.1	2T37.1 2T03

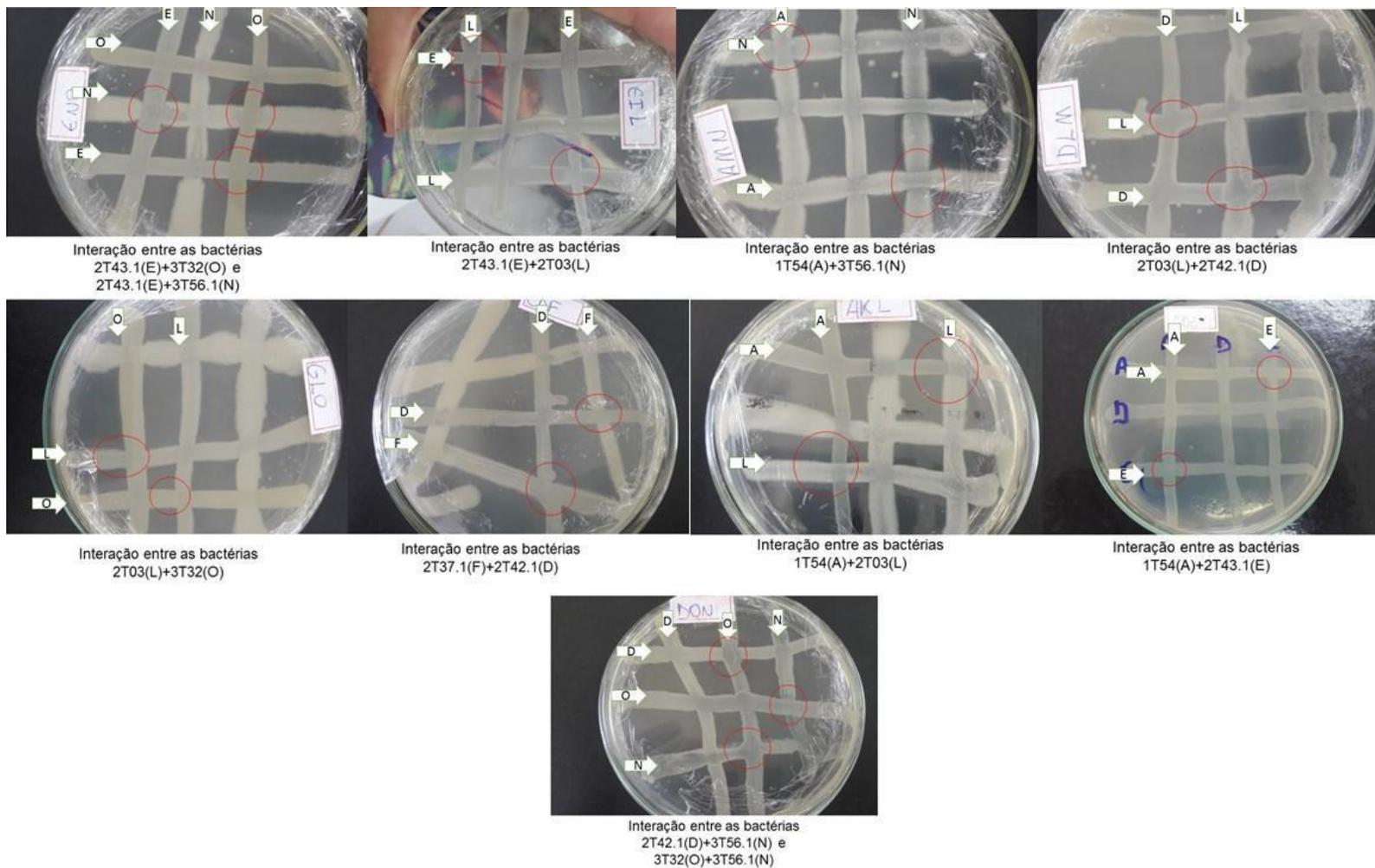
A codificação das bactérias com início 1,2,3 ou 4, representa as épocas de coletas aos, 7,21, 39 e 62 respectivamente. \*índice Enzimático.

As interações entre microrganismos no ambiente podem ser muito importantes, e, quando não se deseja utilizar somente um microrganismo, pode-se fazer uso de dois tipos de culturas: culturas de populações mistas ou culturas de comunidades microbianas (OGUNSEITAN, 2005). Estas culturas mistas podem conter mais de um isolado, utilizando os isolados superiores para uso na produção do inoculante, desde que eles tenham compatibilidade conforme a tabela 5.

**Tabela 5.** Bactérias que possuem coexistência com maior produção de CMCase e Xilanase

xilanase	CMCase Combinacões
1T54 (9,67U/mL)	2T43.1 (1,48 U/mL) 3T56.1 (0,9 U/mL)
2T42.1 (5,21 U/mL)	3T56.1(0,9 U/mL)
2T43.1 (5,58 U/mL)	3T32 (5,82 U/mL) 1T54 (0,72 UmL)
2T37.1 (29,06 U/mL)	2T47 (0,9 U/mL)
2T03 (5,33 U/mL)	3T32 (5,82 U/mL) 1T54 (0,72 U/mL) 2T43.1 (1,48 U/mL)
3T56.1 (29,77 U/mL)	3T32 (1,12 U/mL)
3T32 (5,82 U/mL)	3T56.1 (0,9 U/mL) 2T43.1 (1,48)

\*Coexistência entre bactérias que tiveram alta produção de CMCase e Xilanase. A identificação das bactérias com início 1,2,3 ou 4, representa as épocas de coletas aos, 7,21, 39 e 62 respectivamente. \*índice Enzimático.



**Figura 7.** Testes de coexistência positivos entre os isolados com produção enzimática significativa. Os círculos vermelhos mostram o ponto de encontro entre duas bactérias, a conexão dos dois demonstra se há ou não coexistência.

### 3.2.2 Teste de compatibilidade entre fungos e bactérias

Um dos princípios básicos para o sucesso da tecnologia de construção de inoculantes mistos é a avaliação da compatibilidade entre os isolados envolvidos, uma vez que o contato entre eles pode resultar em interações antagônica, sinérgica ou neutra. As bactérias podem apresentar atividades antagonistas por meio da produção de enzimas líticas, metabólicos secundários como sideróforos, antibióticos ou antifúngicos. Entre as interações negativas, a categoria mais conhecida e mais estudada da comunicação bactéria-fungo é antibiose, uma guerra química que é tipificada pela difusão de moléculas prejudiciais de uma linhagem para a outra (ZHAO *et al*, 2016).

As bactérias analisadas neste trabalho foram confrontadas em avaliação de compatibilidade com fungos filamentosos selecionados conforme suas produções de FPase e xilanase Freitas (2016), visando assim a possibilidade de uma futura formulação de um inóculo mais completo. Para este estudo, os testes de confronto direto em placas foram utilizados para se verificar o tipo de interação entre eles.

Nestes testes, conforme apresentado na tabela 10, os isolados bacterianos proporcionaram diversos níveis de redução no crescimento fúngico, gerando colônias com menor diâmetro, houve muita diversidade entre as interações e crescimento do micélio.

**Tabela 6.** Interação entre bactérias e fungos retirados de conteúdo ruminal

Espécies em Interação							
Bactéria	Fungo	Tipo de Interação		Bactéria	Fungos	Tipo de Interação	
1T54	3T5506	Entrelaçamento Mútuo			1T3500	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
	1T1502	Entrelaçamento Mútuo			3T5506	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
2T47	2T2500	Entrelaçamento Parcial	Mútuo	2T42.1	2T2500	Entrelaçamento Mútuo	
	1T1502	Entrelaçamento Parcial	Mútuo		1T2506	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
3T56.1	2T2500	Entrelaçamento Mútuo			2T4504	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
2T03	3T3503	Entrelaçamento Mútuo			1T5501	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
	2T2500	Entrelaçamento Mútuo			2T5501	Entrelaçamento Mútuo	
	1T1502	Entrelaçamento Mútuo		3T32	3T3503	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
	2T4504	Entrelaçamento Mútuo			2T4504	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
	1T3506	Entrelaçamento Mútuo			2T5501	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
	2T5501	Entrelaçamento Parcial	Mútuo		3T5506	Entrelaçamento Parcial	Mútuo
2T37.1	3T5506	Entrelaçamento Parcial	Mútuo	2T43.1	2T2500	Entrelaçamento Mútuo	
4T22	2T2500	Entrelaçamento Mútuo			1T1502	Entrelaçamento Mútuo	
	1T3506	Entrelaçamento Mútuo		2T5501	Entrelaçamento Mútuo		

Geralmente, a degradação de um substrato complexo, como folhas, tecidos microbianos mortos ou exoesqueletos de insetos processa-se mais rapidamente na presença de uma comunidade microbiana do que na presença de uma única população (Zhao et al, 2013). Os testes foram realizados com 11 fungos e 9 bactérias com altos valores de CMCase e xilanase para as bactérias e FPase e xilanase para os fungos conforme a tabela 11. As bactérias selecionadas para CMCase foram 1T54, 2T43.1, 2T47, 3T32, 3T56.1 e 4T22, e para xilanase 1T54, 2T03, 2T37.1, 2T42.1, 2T43.1, 3T32 e 3T56.1.

Os fungos foram obtidos de um trabalho realizado por Freitas (2016), que selecionou 11 fungos filamentosos com potencial lignocelulolítico.

Para as combinações com bactérias potenciais para a produção de CMCase e xilanase foram observadas 7 combinações mutualísticas com os fungos (suas eficiências enzimáticas dos fungos entre parênteses, seguindo a formação de Bactéria+Fungo): 1T54 + 3T5506 (Fpase e Endoglucanase), 1T54 + 1T1502 (Xilanase, Endoglucanase e Exoglucanase); 2T43.1 + 2T2500 (Exoglucanase), 2T43.1+1T1502 (Xilanase,Endoglucanase e Exoglucanase); 3T56.1+ 2T2500 (Exoglucanase); 4T22 + 2T2500 (Exoglucanase) e 4T22+1T3506 (Endoglucanase e exoglucanase); 2T03 + 3T3503 (Endoglucanase), 2T03 + (Exoglucanase), 2T03 +1T1502 (Xilanase, Endoglucanase e Exoglucanase); 2T42.1 + 2T5501 (Xilanase e Exoglucanase) e 2T42.1 + 2T2500 (Exoglucanase).

Entre todas as 99 combinações tanto para CMCase e Xilanase, apenas 27% apresentaram compatibilidade mútua e parcial.

#### 4. CONCLUSÕES

As bactérias que foram isoladas das leiras de compostagem de conteúdo ruminal tiveram grande potencial celulolítico, apresentando 55% dos índices enzimáticos acima de 1,2 e 36% dos halos de degradação foram selecionados aos 39 dias, podendo ser a melhor época para obtenção de bactérias celulolíticas em compostagem de conteúdo ruminal. Os isolados bacterianos que obtiveram índices enzimáticos acima de 2 foram: 1T54, 2T51, 2T47, 2T42.1, 2T43.1, 2T37.1, 2T21.1, 2T11.1, 2T11, 2T07, 2T03, 3T59, 3T56.1, 3T32, 4T51.1 e 4T22. Os que apresentaram maiores índices enzimáticos foram 2T03 (3,35), 2T37.1(4,11), 4T22(3,26) e 4T51.1(3,42).

As bactérias que apresentaram potencial enzimático para CMCcase e xilanase foram: 1T54(0,72 e 9,67 U/mL), 2T43.1(1,48 e 5,58 U/mL), 3T56.1(0,9 e 29,77 U/mL) e 3T32(1,12 e 5,82 U/mL).

Sendo as melhores combinações entre bactérias 1T54+2T43.1, 2T37.1+2T47 e 3T56.1+3T32. E entre fungos e bactérias as 2T43.1 +1T1502 e 1T54+1T1502, estes microrganismos tiveram altos níveis enzimáticos em diferentes enzimas e demonstraram compatibilidade nos testes, podendo produzir um inóculo eficiente na produção.

A compatibilidade entre fungos e bactérias e entre as bactérias mostram que podem ser formulados inóculos bacteriológicos e mistos que interajam de maneira mutualística no seu crescimento e também para ser utilizado como acelerador de decomposição de conteúdo ruminal.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 844–856, set. 2012. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. (Acesso em 23/08/2016).

CHRONI, C.; KYRIACOU, A.; MANIOS, T.; LASARIDI, K.-E. Investigation of the microbial community structure and activity as indicators of compost stability and composting process evolution. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 15, p. 3745–3750, ago. 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.016>>. (Acesso em 12/09/2016).

DAR, M. A.; PAWAR, K. D.; JADHAV, J. P.; PANDIT, R. S. Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 98, p. 73–80, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.11.016>>. (Acesso em 24/10/2016).

DE GANNES V., EUDOXIE G., HICKEY W. J. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing. **Bioresour.** v.133, p.573–580, 2013.

EICHORST, S. A.; VARANASI, P.; STAVILA, V.; ZEMLA, M.; AUER, M.; SINGH, S.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. Community dynamics of cellulose-adapted thermophilic bacterial consortia. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2573–2587, set. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12159>>. (Acesso em 23/08/2016).

FREITAS, G. A. **Ativação microbiana em compostagem de resíduo ruminal bovino**. 2016. Tese ( Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi-TO, Gurupi, To.

FIGUEIRÊDO, M.C.B.; TEIXEIRA, A.S.; ARAÚJO, L.F.P.; ROSA, M.F.; PAULINO, W.D.; MOTA, S.; ARAÚJO, J.C. Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização. **Revista Engenharia Sanitária e ambiental**. v.12, n.4, Rio de Janeiro. 2007. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S14131522007000400006&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S14131522007000400006&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 11 nov 2011.

GUPTA, P.; SAMANT, K.; SAHU, A. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. **International Journal of Microbiology**. v. 2012, p. 1–5, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/578925/>>. (Acesso em 26/10/2016).

HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, Lawrence, v. 67, p. 597-607, 1975.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cellulase activity of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, London, v. 98, n. 1, p. 109–115, 1977.

HASSEN, A., BELQUITH, K., JEDIDI, N., CHERIF, A., CHERIF, M., BOUDABOUS, A. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. Bioresource technology. **Bioresour Technol.** v.80, n.3, p.217- 225, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária**. 2015, 80 p. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201610.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201610.pdf) (Acesso em 23/08/2016).

KIMURA, G. K. **Investigação Do Potencial Celulolítico De Bactérias Oriundas De Processo De Compostagem**. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia molecular) – Universidade Estadual de Campinas , Instituto de Biologia, São Paulo.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. A. A.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; VARGAS-GARCÍA, M. C. C.; LÓPEZ, M. J. J.; JURADO, M. M. M.; MORENO, J. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. **Bioresource Technology**. v. 175, p. 406–416, jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.123>>(Acesso em 25/10/2016).

OGUNSEITAN, O. Microbial Diversity: Biochemical cycling of carbon and nitrogen. **Blackwell Publishing**. Oxford, p. 292, 2005. P.112-157.

OLIVEIRA, E. DA S.; BIAZOTO, C. D. DOS S. Avaliação dos impactos ambientais causados pelos aviários no município de Assis Chateaubriand, no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 2, p. 24–30, 2013.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003. Dissertação (Mestrado em microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre- RS.

PODESTÁ, G. S. **Interação entre Pochonia chlamydosporia e rizobactérias no controle de Meloidogyne javanica**. Tese (Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 2015.

RUBEL, F. & KOTTEK, M. Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. **Meteorologische Zeitschrift**. v. 19, p.135-141, 2010.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205–211, jun. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84042004000200001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042004000200001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. (Acesso em 26/10/2016).

SALAMONI, S. P. **Produção e caracterização de celulases secretadas por streptomyces sp. isolados de processo de compostagem**. 2005. Dissertação (Mestrado em microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre- RS.

SANTOS, J. C. **Perfil enzimático e análise filogenética de uma comunidade microbiana celulolítica**. 2014. Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Mg.

SILVA, R.R. **Avaliação agrônômica de resíduos gerados em frigoríficos bovinos**. 2010. 90f. Tese (Tese em Agronomia) – Departamento de solos e nutrição de plantas, Universidade Federal de Viçosa.

SCIESSERE, L.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JR, I.; SCIESSERE, L.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JR., I. Cellulase and xylanase activity during the decomposition of three aquatic macrophytes in a tropical oxbow lagoon. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, n. 3, p. 909, set. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000300009>>(Acesso em 28/10/2016).

SYED, S.; RIYAZ-UL-HASSAN, S.; JOHRI, S. A Novel Cellulase from an Endophyte, Penicillium Sp. NFCCI 2862. **American Journal of Microbiological Research**. v. 1, n. 4, p. 84–91, 2013. Disponível em:

<<http://pubs.sciepub.com/ajmr/1/4/4/index.html>>(Acesso em 28/10/2016).

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. Amsterdam, v 72, p. 169-83, 2000.

ZHANG, X.; ZHONG, Y.; YANG, S.; ZHANG, W.; XU, M.; MA, A.; ZHUANG, G.; CHEN, G.; LIU, W. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. **Bioresource Technology**, New York, v.170, 183–195, 2014.

ZHAO, Y.; LU, Q.; WEI, Y.; CUI, H.; ZHANG, X.; WANG, X.; SHAN, S.; WEI, Z. Effect of actinobacteria agent inoculation methods on cellulose degradation during composting based on redundancy analysis. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 196–203, nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.117>>.

WEI, Y., WEI, Z., CAO, Z., ZHAO, Y., ZHAO, X., LU, Q., WANG, X., ZHANG, X. A regulating method for the distribution of phosphorus fractions based on environmental parameters related to the key phosphate-solubilizing bacteria during composting. **Bioresour.** v. 211, p.610–617, 2016.