



SUELEN DA SILVA GASPAR

**DINÂMICA MICROBIANA SOB AÇÃO DE
INOCULANTES EM COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS
ORGÂNICOS**

**LAVRAS-MG
2018**

SUELEN DA SILVA GASPAR

**DINÂMICA MICROBIANA SOB AÇÃO DE INOCULANTES
EM COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS ORGÂNICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia agrícola.

Orientadora

Prof. Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares

Co-orientadores

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

LAVRAS – MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Gaspar, Suelen da Silva.

Dinâmica microbiana sob ação de inoculantes em
compostagem de resíduos orgânicos / Suelen da Silva Gaspar. -
2018.

120 p. : il.

Orientador(a): Joyce Dória Rodrigues Soares.

Coorientador(a): Rosane Freitas Schwan, Disney Ribeiro Dias.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Compostagem. 2. Leveduras e fungos filamentosos. 3.
Resíduos orgânicos. I. Soares, Joyce Dória Rodrigues. II. Schwan,
Rosane Freitas. III. Dias, Disney Ribeiro. IV. Título.

SUELEN DA SILVA GASPAR

**DINÂMICA MICROBIANA SOB AÇÃO DE INOCULANTES
EM COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS ORGÂNICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia agrícola.

APROVADA em 21 de setembro de 2018.

Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares UFLA

Dra. Cintia Lacerda Ramos UFVJM

Dra. Maria Gabriela Pedrozo Miguel UFLA

Prof. Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares

Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

Co-orientadores

LAVRAS – MG

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por iluminar meus passos, me fortalecer em todos os momentos difíceis que enfrentei no decorrer deste trabalho e me conceder mais esta vitória.

À professora Joyce Dória Rodrigues Soares, pela orientação, apoio, atenção e confiança em mim depositada. Aos professores Rosane Freitas Schwan e Disney Ribeiro Dias pela coorientação, colaboração, apoio e paciência.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização deste trabalho.

À minha mãe, Lourdes, e à toda minha família pela compreensão, confiança e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu namorado, Mateus, pela infinita compreensão, paciência, apoio, incentivo, contribuição e dedicação. Por me fortalecer, me entender e se manter ao meu lado durante todo o trabalho, sendo minhas mãos, pernas e psicológico quando eu já não aguentava mais. Sem você não teria sido possível. Essa vitória é nossa!

À Thalissa, Marcela, Lilian, Jéssica e Aline pela amizade, incentivo, companheirismo, pelo convívio harmonioso e momentos de descontração. Pessoas que levarei por toda a vida!

À Carla e Maria Paula, por terem me acompanhado durante todo o trabalho e não terem medido esforços para ajudar, minha eterna gratidão, sem vocês esse trabalho não teria chegado ao fim.

Ao Lucas, por ter dividido esse trabalho comigo e por dividir essa caminhada ao meu lado.

À Gabi, pela dedicação, paciência, confiança e orientação.

À Fabi, pelo apoio, paciência, amizade e orientação.

À Angélica, Bia, Kelly, Josi, Suzana, Léo e Natasha por sempre estarem dispostas a ajudar, pela paciência e pelo companheirismo.

À Cidinha pela paciência e seriedade em seu trabalho. À Ivani, Rose, Paulinho pela dedicação e ajuda durante essa caminhada.

Aos professores Pedro e Fraga, por terem concedido o local em que o processo de compostagem foi realizado, pelo carinho, pela dedicação e amizade. Ao pessoal do Biodiesel, Vinícius e Vera, pela atenção, dedicação a apoio com a montagem do experimento.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, minha sincera gratidão.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin.

RESUMO

O conhecimento da composição e estrutura microbiana da compostagem é necessário para controlar o processo e determinar a qualidade do composto. Este trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica físico-química e microbiana do processo de compostagem dos resíduos orgânicos do Restaurante Universitário da Universidade Federal de Lavras - UFLA, comparar o uso de dois inoculantes para o processo, isolar, caracterizar e identificar cepas de leveduras e fungos filamentosos em diferentes tratamentos ao longo do processo de compostagem. A compostagem foi realizada no setor de Biodiesel - UFLA. Foram coletadas amostras durante o processo de acordo com as mudanças de temperatura para realização de análises físicas, químicas, contagem, isolamento e identificação de microrganismos, seguido de agrupamento dos isolados por MALDI-TOF MS e sequenciamento da região do rDNA. Os microrganismos isolados foram testados quanto à expressão de oito atividades de interesse biotecnológico e o potencial enzimático desses microrganismos foi avaliado. Foi utilizada a técnica de HPLC para identificação de metabólitos. O perfil da comunidade microbiana durante o processo de compostagem foi avaliado através da técnica de PCR-DGGE. As leveduras identificadas pertenciam às espécies *Issatchenkia orientalis*, *Myllerozyma farinosa*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida tropicalis*, *Blastobotrys raffinosisfermentans*, *Blastobotrys adenivorans*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Bipolaris sorokiniana*. As espécies *Blastobotrys adenivorans*, *Blastobotrys raffinosisfermentans* e *Bipolaris sorokiniana* ainda não haviam sido relatadas no processo de compostagem. Alguns gêneros e espécies de fungos em comum foram observadas em todos os tratamentos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus caepitosus*, *Penicillium solitum*, *Rhizopus* e *Cladosporium*. Os resultados obtidos permitem destacar os isolados das espécies *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Millerozyma farinosa* e *Aspergillus* spp. como promissores produtores de enzimas. A análise da transformação da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos orgânicos mostra como resultado complexas interações físicas, químicas e microbiológicas. A fase termófila é crucial para determinar a evolução do processo e a temperatura foi considerada um dos fatores mais importantes que impactaram o processo de compostagem devido ao seu papel crítico na seleção de vários microrganismos que degradam compostos orgânicos e promovem a maturação do composto. A detecção e quantificação dos metabólitos presentes justifica os valores de pH e caracteriza as atividades dos microrganismos ao longo do processo de compostagem. Vários isolados de leveduras e fungos exibiram capacidades metabólicas que podem encontrar muitas aplicações biotecnológicas, se destacando os isolados das espécies *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Millerozyma farinosa* e *Aspergillus* spp. como promissores produtores de enzimas. Este estudo contribui para a catalogação de microrganismos específicos no ecossistema de compostagem e reafirma o potencial da compostagem como fonte de microrganismos biotecnologicamente relevantes.

Palavras-chave: Diversidade microbiana; Identificação de microrganismos; Isolamento; Sequenciamento.

ABSTRACT

Knowledge of the composition and microbial structure of compost is necessary to control the process and determine the quality of the compost. The objective of this work was to evaluate the physicochemical and microbial dynamics of the composting process of the organic residues of the Federal University of Lavras - UFLA, compare the use of two inoculants for the process, isolate, characterize and identify strains of yeasts and filamentous fungi in different treatments throughout the composting process. Composting was performed in the Biodiesel - UFLA sector. Samples were collected during the process according to temperature changes for physical, chemical, counting, isolation and identification of microorganisms, followed by clustering of the isolates by MALDI-TOF MS and sequencing of the rDNA region. The isolated microorganisms were tested for the expression of eight activities of biotechnological interest and the enzymatic potential of these microorganisms was evaluated. The HPLC technique was used to identify metabolites. The profile of the microbial community during the composting process was evaluated through the PCR-DGGE technique. The identified yeasts belonged to the species *Issatchenkia orientalis*, *Myllerozyma farinosa*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida tropicalis*, *Blastobotrys raffinosisfermentans*, *Blastobotrys adeninivorans*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Bipolaris sorokiniana*. The species *Blastobotrys adeninivorans*, *Blastobotrys raffinosisfermentans* and *Bipolaris sorokiniana* had not yet been reported in the composting process. Some genera and species of fungi in common were observed in all treatments: *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus caepitosus*, *Penicillium solitum*, *Rhizopus* and *Cladosporium*. The results obtained allow to highlight the isolates of the species *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Milleromyza farinosa* and *Aspergillus* spp. as promising enzymes producers. The analysis of organic matter transformation during composting of organic wastes shows complex physical, chemical and microbiological interactions. The thermophilic phase is crucial to determine the evolution of the process and the temperature was considered one of the most important factors that impacted the composting process due to its critical role in the selection of several microorganisms that degrade organic compounds and promote the maturation of the compound. The detection and quantification of the present metabolites justifies the pH values and characterizes the activities of the microorganisms throughout the composting process. Several isolates of yeasts and fungi exhibited metabolic capacities that may find many biotechnological applications, especially the isolates of the species *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Milleromyza farinosa* and *Aspergillus* spp. as promising enzymes producers. This study contributes to the cataloging of specific microorganisms in the composting ecosystem and reaffirms the potential of composting as a source of biotechnologically relevant microorganisms.

Keywords: Microbial diversity; Identification of microorganisms; Isolation; Sequencing.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. Resíduos sólidos orgânicos	13
2.2. Compostagem	15
2.2.1. Aditivos.....	18
2.2.2. Temperatura	19
2.2.3. Aeração	20
2.2.4. Umidade.....	22
2.2.5. pH.....	23
2.2.6. Relação C/N.....	23
2.3. Microrganismos na compostagem	24
2.4. Aceleradores de compostagem	28
2.4.1. Inóculo comercial	30
2.4.2. Inóculo não comercial.....	32
2.5. Técnicas de identificação de microrganismos	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	49
ARTIGO 1 Dinâmica físico-química e microbiológica de compostagem de resíduos orgânicos usando diferentes inoculantes	49
ARTIGO 2 Diversidade de leveduras e fungos filamentosos em compostagem – Estudo da persistência e suas aplicações biotecnológicas em diferentes tratamentos e fases de compostagem à base de resíduos orgânicos	79

PRIMEIRA PARTE

Dinâmica microbiana sob ação de inoculantes em compostagem de resíduos orgânicos

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos foi notável a expansão da produção agrícola brasileira, assim como o aumento da população mundial, contribuindo significativamente para o aumento da produção de diferentes tipos de resíduos sólidos orgânicos. Entre os geradores de resíduos destacam-se os restaurantes (FONSECA & BORGES, 2006; OKAZAKI et al., 2008). A inadequada disposição dos resíduos sólidos orgânicos pode resultar em problemas ambientais, tais como a contaminação do solo, água e ar (BERNARDI, 2011), problemas relativos à saúde pública, associados a potencial presença de microrganismos patogênicos (MANSO e FERREIRA, 2007), propagação de maus cheiros e incêndios, transmissão de doenças, além de um resultado visual indesejável (JUAREZ et al., 2015). Sendo assim, atualmente, os resíduos orgânicos constituem um dos principais problemas a nível mundial, e dessa forma seu tratamento e eliminação de forma segura tornam-se cada vez mais importantes.

Na tentativa de minimizar esse problema, vários métodos de tratamento e disposição de resíduos orgânicos foram e vêm sendo pesquisados em todo o mundo (VERGNOX et al., 2009), destacando-se a tecnologia da compostagem que é uma das tecnologias mais aceitas para a reciclagem de resíduos orgânicos na agricultura, pois evita os inconvenientes associados à aplicação direta de resíduos ou matérias pouco estabilizadas, tais como imobilização de nutrientes e fitotoxicidade.

De modo geral, a compostagem consiste na transformação da matéria orgânica por meio da sucessão rápida de populações microbianas, em um produto bem estabilizado. Durante esse processo, uma parte da matéria orgânica é mineralizada para dióxido de carbono, ao passo que

outra parte é transformado em substâncias húmicas. A compostagem aeróbica é uma abordagem amplamente aceita para eliminar os resíduos orgânicos, podendo fornecer substância húmica para melhorar a fertilidade do solo e alguns nutrientes básicos para as plantas (ELANGO et al., 2009).

O conhecimento da composição e estrutura microbiana da compostagem é necessário para controlar o processo e determinar a qualidade do composto. Embora alguns microrganismos tenham uma presença difundida em compostos, como por exemplo espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Candida*, *Aspergillus* e *Fusarium*, outros podem ser mais ou menos abundante de acordo com a natureza das matérias-primas e as condições de compostagem. O interesse pelo estudo e identificação de microrganismos presentes em compostagem é cada vez maior, visto que esses microrganismos representam importante papel em relação à qualidade do composto e a velocidade do processo, e além disso, os microrganismos podem apresentar valores biotecnológicos e econômicos (EMBRAPA, 2002). Com o intuito de estudar e identificar os microrganismos presentes durante o processo de compostagem, técnicas dependentes de cultivo podem ser utilizadas, porém, nem sempre são eficientes, além de nem todos os microrganismos serem cultiváveis, tornando-se impossível isolar e identificar grande número de espécies (THEUNISSEN et al., 2005). Assim, a associação com técnicas independentes de cultivo permite a detecção, identificação e caracterização de microrganismos presentes em diversos ambientes, com maior precisão. Nesse contexto, a compostagem tem sido considerada uma fonte rica para o isolamento de microrganismos, tais como inoculantes para compostagem e os produtores de enzimas que hidrolizam polímeros, pois apesar de ampla investigação neste campo, o potencial deste ecossistema para a descoberta de novos microrganismos e metabólitos secundários está longe de ser plenamente explorado, uma vez que cada processo depende da matéria-prima original e pode fornecer diferentes estirpes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Resíduos sólidos orgânicos

Nos últimos 50 anos foi notável a expansão da produção agrícola brasileira. O forte investimento em uma agricultura baseada em ciência permitiu a criação de vários ambientes de inovação que promoveram tecnologias na agricultura. Os sistemas de inovação tecnológica na agricultura responderam a contextos nacionais e internacionais, cada vez mais dinâmicos e competitivos, com indiscutíveis avanços como tropicalização de cultivos e criações, diversificação, agregação de valor, produtividade, segurança e qualidade de alimentos (EMBRAPA, 2014). Uma das características dos processos produtivos, principalmente os industriais, é que no processo de produção de bens de consumo ocorre a geração de resíduos, destacando-se os resíduos sólidos orgânicos (ETHOS, 2012).

Nesse contexto, o aumento da produção tem gerado uma grande quantidade de resíduos sólidos e líquidos, que são subprodutos da atividade agropecuária, bem como da agroindustrial, constituindo assim um problema de ordem social, econômica e ambiental. Segundo a Política Nacional de Resíduos Sólidos, Lei nº 12.305 (BRASIL, 2010), define-se:

“Resíduos sólidos como todo material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estado sólido ou semi sólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d’água, ou exijam para

isso soluções técnicas ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível (BRASIL, 2010)”.

Dentro destas definições, entende-se que resíduos sólidos orgânicos é todo resíduo de origem animal ou vegetal, como frutas, hortaliças, restos de pescados, folhas, sementes, cascas de ovos, restos de carnes (BENTO et al., 2013). Entre os geradores de resíduos dessa natureza destacam-se os restaurantes pelos serviços oferecidos (FONSECA & BORGES, 2006; OKAZAKI et al., 2008). Nos restaurantes, em geral, a variedade e a quantidade de alimentos ofertados ultrapassam a necessidade de consumo, observando-se a ocorrência de sobras e de desperdício, contribuindo para um incremento na geração de resíduos sólidos (WRAP, 2013; NASPOLINI et al., 2009). De acordo com IPEA (2009), o Brasil está entre os 10 países que mais desperdiçam comida no mundo, onde aproximadamente 35% de toda a produção agrícola é descartada como resíduos sólido, e que mais de 10 milhões de toneladas de alimentos poderiam abastecer 54 milhões de brasileiros que vivem na linha da pobreza.

Devido à crescente taxa de geração de resíduos sólidos, espaço limitado de aterro e regulamentações ambientais mais rigorosas para novos aterros e incineradores, aumentaram as taxas de descarte desses resíduos em vários locais, sendo eles regulamentados ou não (SAHA et al., 2010; SHARHOLY et al., 2008). O descarte de resíduos orgânicos envolve incineração ou deposição em aterros sanitários, o que reduz a eficiência do uso da terra e causa problemas ambientais (BUSTAMANTE et al., 2013; GABHANE et al., 2012). Conforme Fiori et al. (2008), o aumento da produção de resíduos vem provocando impactos ambientais, devido a taxa de geração ser bem maior que a taxa de degradação. A inadequada disposição dos resíduos sólidos orgânicos pode resultar em problemas ambientais, tais como a contaminação do solo, água e ar (BERNARDI, 2011), problemas relativos à saúde pública, associados a potencial presença de microrganismos patogênicos (MANSO e FERREIRA, 2007), propagação de maus

cheiros e incêndios, transmissão de doenças, além de um resultado visual negativo (JUARÉZ et al., 2015). Além disso, o lixo produz um líquido de cor negro denominado “Chorume”, característico de materiais orgânicos em decomposição. A descarga deste líquido nos cursos d’água faz com que haja uma redução de oxigênio das águas, podendo provocar a morte dos organismos aeróbios (PEREIRA NETO, 2007). Sendo assim, atualmente, os resíduos orgânicos constituem um dos principais problemas a nível mundial, e dessa forma seu tratamento e eliminação tornam-se cada vez mais importantes principalmente em países em desenvolvimento devido a grave problema.

Na tentativa de equacionar esse problema, vários métodos de tratamento e disposição de resíduos orgânicos foram e vêm sendo pesquisados em todo o mundo (VERGNOX et al., 2009), destacando-se a tecnologia da compostagem, que tem sido considerada um método eficaz para transformar a matéria orgânica em um produto potencialmente seguro e estável que pode ser usado como fertilizante orgânico (CHEN et al. Al., 2014). Esse método de disposição mais apropriado para a fração orgânica de resíduos sólidos urbanos, especialmente nas grandes cidades, é considerado uma conversão biológica (MONTEJO et al., 2013; VISVANATHAN et al., 2005), onde o elevado teor de nutrientes nos resíduos vegetais pode ser reciclado com sucesso através do processo de compostagem e aplicado de forma eficiente em campos agrícolas. Dessa forma, a compostagem e os processos de digestão anaeróbica são preferidos como alternativas à incineração e pirólise para a eliminação desses dejetos orgânicos (KULCU e YALDIZ, 2004, ANTON et al., 2005). Além disso, em termos econômicos e ambientais, a compostagem é mais viável em relação à incineração no caso do tratamento final dos resíduos orgânicos (CUKJATI et al., 2012; WEI., 2014).

2.2. Compostagem

A compostagem é um processo que envolve auto aquecimento e bioconversão de resíduos orgânicos em substâncias húmicas, chamados de compostos. Constitui um dos métodos mais sustentáveis para a gestão dos resíduos sólidos orgânicos em agroecossistemas, além de ser um processo amplamente conhecido para a estabilização biológica dos resíduos orgânicos sólidos, onde envolve a degradação acelerada da matéria orgânica por microrganismos. A transformação bioquímica das biomassas orgânicas leva a um processo de humificação que se assemelha ao que ocorre no solo, pelo qual os compostos apolares se acumulam progressivamente em domínios hidrofóbicos, excluídos da água e da atividade microbiana (PICCOLO, 2016; SPACCINI e PICCOLO, 2007).

O processo envolve a biotransformação da matéria orgânica por uma complexa comunidade microbiana cujas alterações de estrutura dependem do tipo e quantidade de nutrientes, temperatura, pH, aeração e teor de água (HIRAISHI et al, 2003; ANASTASI et al., 2005; PARTANEN et al., 2010; FEDERICI et al., 2011). Nesse sentido, a matéria orgânica é transformada durante a compostagem como resultado de complexas interações entre processos químicos, físicos e biológicos (TEJADA et al., 2009). A biotransformação de materiais orgânicos em macromoléculas estáveis e complexas ocorre sob a ação de microrganismos e enzimas correspondentes (ZENG et al., 2010) e pode ser realizada tanto de modo aeróbico como de modo anaeróbico, sendo que ao final dos dois processos, o resultado será um material mais estabilizado.

É bem estabelecido que a matéria orgânica natural exerce uma influência significativa e direta sobre o crescimento das plantas, afetando os processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos na germinação de sementes, na diferenciação celular, na absorção iônica e no crescimento total das plantas (NARDI et al., 2007; CANELLAS e OLIVARES, 2014, VACCARO et al., 2015). Porém, o processo de decomposição natural é bastante demorado e a escassez de terra e grandes volumes de resíduos orgânicos exigem que esses resíduos sejam

tratados mais rapidamente, sendo assim, o processo de compostagem é uma tecnologia sustentável e de baixo custo para a reciclagem de biomassas orgânicas, enquanto seu uso na agricultura tornou-se popular como alternativa aos fertilizantes químicos e tratamentos tóxicos para controlar os patógenos do solo (HUANG et al., 2010; PANE et al., 2015). A utilização de compostos orgânicos em complementação ou substituição à adubação mineral ganha cada vez mais importância sob o ponto de vista da conservação das propriedades físicas e químicas do solo e redução do uso de adubos minerais de alta solubilidade (SOUZA e RESENDE, 2006). O processo de compostagem acontece em fases, de acordo com a Figura 1, sendo elas muito distintas umas das outras.

1ª) Fase mesofílica: Nessa fase, fungos e bactérias mesófilas (ativas a temperaturas próximas da temperatura ambiente), começam a se proliferar assim que a matéria orgânica é aglomerada na composteira, são de extrema importância para decomposição dos resíduos orgânicos. Eles vão metabolizar principalmente os nutrientes mais facilmente encontrados, ou seja, as moléculas mais simples. As temperaturas são moderadas nesta fase (cerca de 40°C) e o processo dura até que os termófilos se instalem (INSAM et al., 2001) De acordo com Kiehl (2004) esta fase é caracterizada por células microbianas em estado de latência, porém com uma intensa atividade metabólica, apresentando uma elevada síntese de enzimas.

2ª) Fase termofílica: É a fase mais longa, e pode se estender por mais de dois meses, dependendo das características do material que está sendo compostado (LÓPEZ-GONGALEZ et al, 2013). Nessa fase, entram em cena os fungos e bactérias denominados de termofílicos ou termófilos, que são capazes de sobreviver a temperaturas entre 65°C e 70°C, com influência e dependendo da maior disponibilidade de oxigênio - promovida pelo revolvimento da pilha inicial ou injeção de ar. A degradação das moléculas mais complexas e a alta temperatura ajudam na eliminação de agentes patógenos (INSAM et al., 2001; KIEHL, 2004).

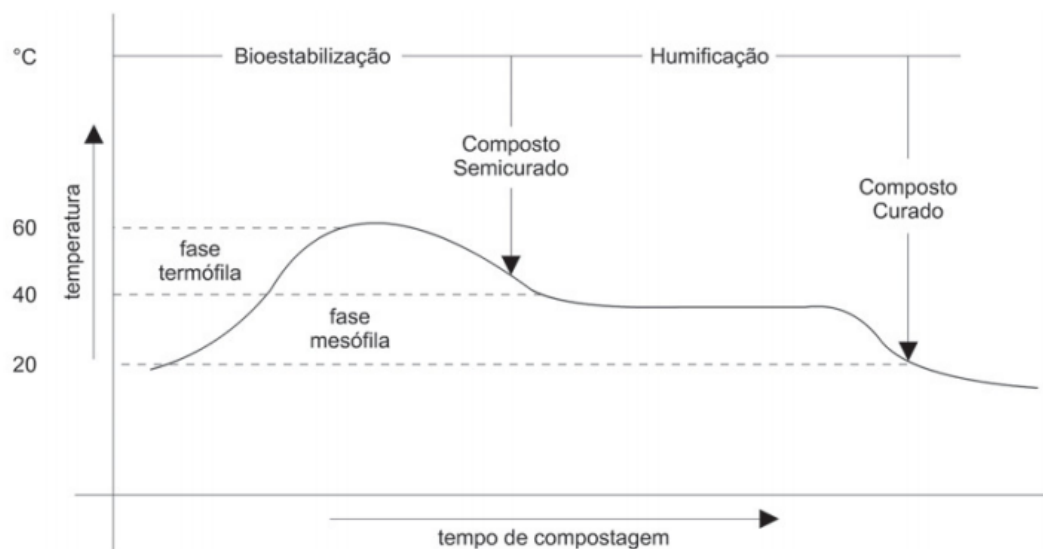


Figura 1. Fases da compostagem (D'ALMEIDA & VILHENA, 2000).

3ª) Fase da maturação: A última fase do processo de compostagem, e que pode durar até dois meses. Nessa fase há a diminuição da atividade microbiana, juntamente com as quedas de gradativas de temperatura (até se aproximar da temperatura ambiente) e acidez, antes observada no composto. É um período de estabilização que produz um composto maturado. A maturidade do composto ocorre quando a decomposição microbiológica se completa e a matéria orgânica é transformada em húmus, livre de toxicidade, metais pesados e patógenos (INSAM et al., 2001), e é acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica, como nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio, que passam da forma orgânica para a inorgânica, ficando disponíveis às plantas (KIEHL, 2004). A maturação do composto é relacionada à presença de ácidos húmicos, e o incremento no valor de substâncias húmicas durante o processo de compostagem promove a melhoria da qualidade do composto, uma vez que atuam direta ou indiretamente em propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (SENESI e PLAZA, 2007).

2.2.1. Aditivos

A literatura indica que a adição de substâncias à massa de compostagem pode acelerar o tempo de compostagem e melhorar a qualidade do produto de compostagem (GABHANE et al., 2012; KARAK et al., 2013, MAKAN, 2015). Os principais objetivos do uso de aditivos , como os resíduos de jardinagem, são corrigir o teor de água da mistura formando espaços porosos na massa de compostagem, aumentando a disponibilidade de oxigênio e reduzindo a perda de pressão estática em sistemas utilizando aeração forçada (TEIXEIRA et al., 2015); aumentar a transformação de nutrientes de resíduos orgânicos controlando o pH (COLE et al., 2016); ser usado como fonte de carbono para ajustar a relação carbono/nitrogênio (C/N) e aumentar a disponibilidade nutrientes, incluindo nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) (KUMAR et al., 2010). Mohee et al. (2015) constataram que a utilização de aditivo alternativo na compostagem de resíduos sólidos urbanos melhorou a qualidade do composto e reduziu o tempo necessário para alcançar a estabilização. Assim como, o uso de aditivos aos resíduos de solos municipais aumentou significativamente os teores de matéria orgânica e N no produto de compostagem e reduziu significativamente as perdas gasosas (KUMAR et al., 2010, MOHEE et al., 2015).

A tecnologia da compostagem é uma das melhores opções para o tratamento dos resíduos agrícolas porque é um processo favorável ao ambiente, adiciona valor para uma grande variedade de resíduos orgânicos, e o composto obtido é adequado como condicionador para solos e, assim, permite que os resíduos sejam reciclados (GUARDIA et al, 2010; VARGAS-GARCÍA et al., 2010). Atualmente, vários métodos de compostagem são aplicáveis e a seleção do método depende do investimento e do custo operacional, do tempo necessário para atingir a maturidade do composto, da disponibilidade de terra e da origem das matérias-primas.

2.2.2. Temperatura

A temperatura é o fator que determina a eficiência do processo de compostagem e está diretamente relacionada com a atividade microbiológica. Em estudos anteriores, a temperatura foi considerada um dos fatores mais importantes que impactaram o processo de compostagem devido ao seu papel crítico na seleção de vários microrganismos que degradam compostos orgânicos e promovem a maturação do composto (XIAO et al., 2009).

As baixas temperaturas representam um desafio técnico importante para a compostagem eficiente, uma vez que podem prolongar consideravelmente a fase mesofílica, encurtar a fase termofílica, afetar a secagem do material e maturidade do produto e até mesmo levar à falência do processo de compostagem em regiões frias (DAS et al. 2002). Em algumas regiões frias, a diferença de temperatura entre o ambiente externo e o sistema de compostagem pode exceder 80°C. Como o gradiente térmico afeta a taxa de transferência de calor, a grande diferença de temperatura pode essencialmente acelerar a transferência de calor do sistema de compostagem para o ambiente (WANG et al., 2013). Bernardi (2011) ressalta que o sistema em processo de compostagem deve atingir temperaturas de 40 a 60°C nos primeiros dias de atividade, como indicador de condições satisfatórias de equilíbrio de nutrientes.

2.2.3. Aeração

A aeração é um dos parâmetros chave no controle das atividades dos resíduos em compostagem, já que influencia na temperatura, umidade e fornecimento de O₂ para as atividades dos microrganismos. Na compostagem, os microrganismos predominantes são aeróbios, ou seja, necessitam do oxigênio para sobreviver e executar seu metabolismo (CARLI, 2010). Segundo Gomes (2001) o oxigênio presente na compostagem tem por finalidade manter o processo aeróbio, fornecendo o oxigênio necessário ao metabolismo durante as atividades

microbiológicas, e remover a umidade excessiva da massa de compostagem evitando temperaturas muito elevadas.

Em casos de pouca aeração, a disponibilidade de oxigênio pode baixar e a decomposição da matéria orgânica pode ser executada por microrganismos anaeróbios. Herbets et al. (2005) ressaltam que a ocorrência de processos de anaerobiose na pilha de compostagem pode gerar acidificação do material, e o produto resultante se tornará um composto de baixa qualidade. Além disso, durante o processo de degradação pode ocorrer a liberação de substâncias de odor desagradável, o que pode atrair insetos indesejáveis. Carli (2010) resalta a formação de gás sulfídrico, aminas e ácidos voláteis em processos anaeróbios de compostagem podendo gerar aspectos não desejáveis, tal como o mal cheiro. Nos processos de compostagem sem ou com pouca presença de oxigênio, a velocidade das reações são mais lentas do que em processos em aerobiose, influenciando assim, a velocidade do processo de degradação da matéria orgânica. É necessário fornecer ar a qualquer material em compostagem para assegurar o oxigênio necessário à decomposição orgânica sem que este se torne um fator limitante (GOMES, 2001; MADIGAN, 2004).

Os resíduos sólidos orgânicos produzem odores fortes devido ao metabolismo microbiano durante o processo de compostagem. Além disso, a compostagem tradicional envolve problemas como ventilação inadequada, mistura irregular e outros desafios. Estas desvantagens da compostagem podem ser reduzidas com o uso de reatores de compostagem, que podem alterar as condições de aeração e facilitar o processo de compostagem (KULCU e YALDIZ, 2014). Diversas técnicas de aeração para a compostagem de pilhas ao ar livre, incluindo aeração forçada ou passiva, têm sido amplamente investigadas na literatura (STENTIFORD, 1996, SANCHEZ-MONEDERO et al., 2001, CAYUELA et al., 2005, OGUNWANDE e OSUNADE, 2011, GETAHUN et al., 2012).

2.2.4. Umidade

Na compostagem a umidade do material é o parâmetro que corresponde à disponibilidade de água para os microrganismos. O processo de assimilação de nutrientes pelos microrganismos ocorre através das suas paredes celulares, quando estes são encontrados na forma dissolvida. Assim, para que possam ocorrer as atividades metabólicas de degradação da matéria orgânica, é necessário que a umidade do meio de compostagem esteja adequada (GOMES, 2001).

Segundo Gomes (2001) a correção da umidade pode ser efetuada por simples irrigação do material com água, ou misturando outro resíduo orgânico com elevado teor de umidade. O controle da umidade deve ser executado de forma que esta atenda uma faixa entre 50 a 60%. Teores de umidade acima de 65% exercem resistência na passagem do oxigênio entre os poros, podendo gerar zonas de anaerobiose. Misturas de resíduos que apresentem baixos teores de umidade, abaixo de 40%, inibem a atividade microbiana, pois como em qualquer outro processo biológico, a água é essencial para o metabolismo, desta forma a sua escassez acaba interferindo no processo de degradação da matéria orgânica (FERNANDES e SILVA, 1996; CARLI, 2010; BERNARDI, 2011). A umidade é um parâmetro fundamental não só no processo de compostagem, mas também na qualidade do produto final, visto que um composto sem excesso de umidade é mais fácil de manusear, não desenvolve maus cheiros decorrentes na anaerobiose, sendo a secagem do composto um passo fundamental no acondicionamento e utilização do composto (HEIDEMANN et al., 2007)

Para determinar o grau de decomposição da matéria orgânica no processo de compostagem é possível utilizar alguns testes simples e rápidos que utilizam, por exemplo, a umidade como indicativo. Estes testes são importantes para a prática cotidiana de observação dos processos (KIEHL, 2004). O conhecido “teste da mão” permite avaliar e acompanhar o

processo e de acordo com Schnorr (2010), ele consiste em “umidificar e esfregar um pouco do composto entre as palmas das mãos”, assim se o composto estiver pronto, não deixará as mãos sujas, soltando-se facilmente.

2.2.5. pH

O pH pode variar no processo de compostagem, podendo determinar o predomínio de determinado grupo de microrganismo no processo (FERNANDES e SILVA, 1996). No início da compostagem a tendência é que ocorra uma leve queda no pH, resultante da formação de ácidos orgânicos na decomposição, seguido de uma rápida elevação na fase termófila, característica da hidrólise das proteínas e liberação de amônia para posterior redução e estabilização, que gira em torno do pH 7,0.

2.2.6. Relação C/N

Segundo Maragno (2007) a relação C/N é um fator determinante que afeta a qualidade do composto e do processo de compostagem, já que o principal objetivo é criar condições para fixar nutrientes de modo a serem posteriormente utilizados como adubo, sendo a relação ideal aquela em que os resíduos forneçam 30 partes de carbono para 1 parte de nitrogênio (30C:1N). Esta relação é determinada para que exista eficiência na atividade dos microrganismos existentes no processo, e desta fração, dois terços do carbono proveniente dos carboidratos da matéria orgânica, é despreendido na forma de dióxido de carbono, produto remanescente do processo de respiração para se obter energia, e o outro um terço do carbono juntamente com o nitrogênio é utilizado para constituir as células microbianas (SILVA et al., 2009; OLIVEIRA,

2008). Durante a compostagem a degradação da matéria orgânica leva a redução do carbono orgânico.

O controle desta relação se faz necessário já que seu excesso ou falta podem comprometer o processo de compostagem. A Tabela 1 apresenta diferentes tipos de resíduos ricos em carbono que podem ser usados para ajudar a manter uma relação C/N adequada.

Carli (2010) ressalta que relações muito baixas de C/N implicam na perda de nitrogênio sob forma de amônia, exigindo uma correção com a adição de resíduo rico em carbono, como por exemplo a palha de arroz. Relações de C/N muito elevadas, relacionada à escassez de nitrogênio, irão interferir na atividade metabólica dos microrganismos que encontrarão dificuldade de obter N em quantidade suficiente, prejudicando a síntese de proteínas e limitando o desenvolvimento da comunidade microbológica.

Tabela 1. Composição de alguns materiais empregados no preparo de compostos (resultados em material seco a 110°C).

MATERIAL	M.O (g/kg)	C/N	C (g/kg)	N (g/kg)	P ₂ O ₅ (g/kg)	K ₂ O (g/kg)
Palha de arroz	543,4	39/1	304,2	7,8	5,8	4,1
Capim-colonião	910,3	27/01	504,9	18,7	5,3	-
Esterco de gado	621,1	18/1	345,6	19,2	10,1	16,2
Esterco de galinha	540,0	10/1	304,0	30,4	47,0	18,9
Serrapilheira	306,8	17/1	163,2	9,6	0,8	1,9
Serragem de madeira	934,5	865/1	865,1	0,6	0,1	0,1

M.O. – matéria orgânica; C/N – relação carbono/nitrogênio.

Fonte: Kiehl 1981 e 1985.

2.3. Microrganismos na compostagem

A eficácia e velocidade do processo de compostagem dependem em grande parte das atividades metabólicas de microrganismos envolvidos em cada uma das fases. O conhecimento

da composição e estrutura microbiana do ecossistema compostagem se tornam necessários para controlar o processo, no que diz respeito à velocidade de formação do composto, e para determinar a qualidade e destino de aplicação. Embora alguns microrganismos possuam uma presença difundida em compostos, outros podem ser mais ou menos abundantes de acordo com a natureza das matérias-primas e as condições de compostagem (ANASTASI et al, 2005; PARTANEN et al, 2010).

Grandes quantidades de bactérias podem ser isoladas de diferentes fases da compostagem, sendo os gêneros mais comuns: *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Bacillus* (NAKASAKI et al., 1985; STROM, 1985).

Neto et al. (2005) ressaltam a importância de bactérias do ácido lático, responsáveis por produzir ácido lático, na inibição de organismos patogênicos que possam estar presentes na compostagem. As bactérias fermentadoras da lactose são importantes no processo de compostagem, pois decompõem, através da fermentação da matéria orgânica, os açúcares, amidos, proteínas e outros compostos orgânicos transformando em nutrientes que podem ser utilizados por outros organismos (OLIVEIRA, 2006; CARLI, 2010).

Dess e Ghiorse (2001) e Hassen et al. (2001) relataram o domínio do gênero *Bacillus* em compostagem à base de resíduos orgânicos, e segundo esses autores, a prevalência de *Bacillus* ocorre pela sua capacidade de produção de endósporos bacterianos, que são altamente resistentes à altas temperaturas e a condições desfavoráveis. Blanc et al. (1999) realizando estudos em compostagem de resíduos orgânicos, verificaram alto número de microrganismos heterotróficos, entre 10^9 e 10^{10} UFC/g e segundo os autores, estes altos índices obtidos estão relacionados com o predomínio de espécies do gênero *Bacillus* entre as bactérias identificadas.

Xie et al. (2017) identificaram espécies dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Betaproteobacterium*, *Grammaproteobacterium* e *Alphaproteobacterium* em compostagem à base de resíduos alimentares. Jurado et al. (2014), explorando a

biodiversidade da compostagem, relataram que *Firmicutes* foram representados principalmente por espécies do gênero *Bacillus* e gêneros relacionados como *Brevibacterium* e *Ureibacillus*, que foram os principais componentes da comunidade bacteriana durante todos os estágios, e além disso, os autores relataram a presença de *Proteobacterias* com espécies dos gêneros *Chelatococcus* e *Pseudoxanthomonas*. Marques (2010) relatou a ocorrência de espécies de *Salmonella*, *E. coli* e *Enterococcus* em análise de microrganismos patogênicos em compostagem de lodo do esgoto doméstico. Symanski (2005) em pesquisa com caracterização de bactérias mesófilas presentes em compostagem de resíduos orgânicos, constatou que os gêneros que apresentaram maior número de isolados foram respectivamente: *Enterobacter* (15%), *Escherichia* (14,2%), *Bacillus* (13,4%) e *Pseudomonas* (9,6%), além de *Aeromonas* spp., *Burkholderia* spp., *Citrobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Flavimonas* spp., *Klebsiella* spp., *Listeria* spp., *Micrococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Xanthomonas* spp. Taiwo e Oso (2004) detectaram uma ampla diversidade de bactérias na compostagem de lixo municipal, entre elas espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Escherichia* e *Proteus*.

A inoculação com bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Iodobacter*, contribuem na redução dos desafios encontrados em compostagem à baixas temperaturas, na degradação de compostos orgânicos e geração de calor na pilha e na estrutura e sucessão da comunidade bacteriana em compostagem (XIE et al., 2017).

As actinobactérias são tipicamente abundantes em compostagem, particularmente nos estágios termófilo e de maturação (RYCKEBOER et al., 2003; GANNES et al., 2013) e desempenham importantes funções na decomposição, relacionada à habilidade de degradar moléculas complexas, os quais fungos e bactérias não são capazes, tais como fenóis, quitina e parafinas (OLIVEIRA, 2003). Além de controlar a população de fungos e bactérias patogênicas, devido a produção de antibióticos, estes organismos têm a capacidade de solubilizar a lignina a

CO₂, sendo associado a formações de húmus (OLIVEIRA, 2006; CARLI, 2010; OSAKI, 2008; OLIVEIRA, 2003).

Os gêneros de actinobactérias geralmente isolados em compostagem são *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Micronospora* (STROM, 1985). De acordo com Silva (2010), entre os gêneros encontrados nos resíduos e no processo de compostagem, estão *Micronospora*, *Streptomyces*, *Sacchamonospora*, *Saccharopolyspora*, *Thermoactinomces* e *Thermonospora*. Jurado et al. (2014) explorando a biodiversidade da compostagem, identificou quatro gêneros de actinobactérias: *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* e *Brachybacterium*.

Os fungos filamentosos e leveduras são pouco relatados em processos de compostagem e são responsáveis por sintetizarem enzimas durante o processo. As enzimas são proteínas especiais que catalisam reações químicas em todos os sistemas biológicos, desempenham importante papel na degradação da matéria orgânica rica em carbono, tais como celulose, lignina e hexoses (CARLI, 2010; OLIVEIRA, 2006; HIGA e WIDIDANA, 1991). Desse modo, fungos filamentosos e leveduras possuem grande importância na ciclagem de nutrientes nos ambientes naturais, de forma que os mais distintos tipos de enzimas, secretadas por estes microrganismos, possibilitam a disponibilidade de nutrientes que servem de alimento para outros organismos (FARIAS, 2008).

Diferentes espécies de fungos já foram isoladas à partir de compostagem: *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomonium thermophilum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosas*, *Mucor pusilus*, *Talaromyces duponti* e *Scytalidium thermophilum* (STRAATSMA et al., 1995; FERMOR et al., 2000). Jurado et al. (2014) explorando a biodiversidade da compostagem, identificou espécies dos gêneros *Altenaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cladospodium*, *Fusarium*, *Gibellulopsis*, *Ochrocladosporium*, *Penicillium*, *Plectosphaerella* e *Scopulariopsis*. Taiwo e Oso (2004) analisando o conteúdo microbiológico

de resíduos urbanos, observaram uma ampla diversidade na constituição fúngica do composto, entre elas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichothecium* e *Rhizopus*.

Barwinski (2015) desenvolveu um consórcio de microrganismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* e *Rhodopseudomonas palustris* para utilização como inoculante para o processo de compostagem e constatou que a decomposição dos resíduos orgânicos foi acelerada com o uso do inoculante.

Said-Pullicino et al. (2007) afirmam que a sucessão microbiológica, o envolvimento de comunidades microbiológicas e suas atividades, durante as fases específicas do processo de compostagem ainda são pouco conhecidas. Em todo o processo de mineralização há um componente de imobilização, uma renovação da matéria orgânica e uma assimilação de nutrientes minerais, que promovem o crescimento e a manutenção da biomassa (AQUINO et al., 2005).

2.4. Aceleradores de compostagem

O composto orgânico é o produto final obtido após a biotransformação aeróbia de resíduos orgânicos. Esse processo ocorre naturalmente, proporcionado pelos microrganismos presentes nos resíduos e no meio ambiente, o qual pode manter uma população microbiana ativa durante a compostagem (KARNCHANAWONG & NISSAIKLA, 2014). No entanto, microrganismos externos podem ser adicionados ao processo (VARGAS-GARCIA et al., 2005). Esses microrganismos possuem alta capacidade de degradação de compostos recalcitrantes (KARNCHANAWONG & NISSAIKLA, 2014).

O uso de aceleradores em compostagem é um processo onde se utiliza, normalmente, biorreatores e um conjunto de microrganismos capazes de degradar o material à ser compostado, num prazo de tempo reduzido em relação ao que seria utilizando somente os

microrganismos originais do material orgânico. Sendo assim, é possível controlar o processo e proporcionar as condições ótimas para a obtenção de um composto com qualidade (SANCHUKI, 2011), sendo que esse processo pode levar, aproximadamente 28 dias, para a obtenção do composto já maturado e estabilizado, contra 180 dias na compostagem convencional (SANCHUKI, 2011).

Segundo Patle et al. (2014), a tecnologia de compostagem rápida envolve a inoculação dos substratos utilizados na compostagem com culturas de microrganismos degradadores. Os autores relatam que, para haver eficiência no processo, as condições precisam ser favoráveis, tais como: umidade adequada, carbono inicial adequado, quantidades de nitrogênio suficientes, e aeração. No entanto, Xi et al. (2012) afirmam que o ambiente onde ocorre a compostagem, tais como a temperatura e composição da matéria orgânica, muda regularmente no decorrer do processo, os microrganismos se adaptam a esse ambiente, mudando de acordo com ele, e a inoculação pode desempenhar um papel importante na eficiência de compostagem.

Na literatura encontram-se diversos estudos relacionados à inoculação de microrganismos na compostagem para acelerar o processo natural ou para obter um produto final de melhor qualidade. Porém, por longos anos, resultados contraditórios têm sido descrito por diferentes autores (GOLUEKE et al., 1954; RAZVI & KRAMER, 1996; OHTAKI et al., 1998; XI et al., 2005; VARGAS-GARCIA et al., 2005 e 2007; WEI et al., 2007; RAUT et al., 2008; NAIR & OKAMITSU, 2010; SANCHUKI, 2011; PAN et al., 2012; XI et al., 2012; ABDULLAH et al., 2013; FILHO, 2013; JUSOH et al., 2013; NAKASAKI et al., 2013; NORD, 2013; AWASTHI et al., 2014; PATLE et al., 2014; KARNCHANAWONG & NISSAIKLA, 2014; WANG et al., 2014a; ZHOU et al., 2015). Embora alguns estudos mostrem que a inoculação pode melhorar o processo de compostagem, outros não apresentam melhoras justificáveis. Vargas-Garcia et al. (2005) descrevem que tal controvérsia não deveria ser uma surpresa, já que há uma alta complexidade nos eventos biológicos e diversos fatores que

influenciam o processo. Sendo assim, as condições são diferentes em cada situação e, por conseguinte, a atividade microbiana também é muito diferente. Karnchanawong e Nissaikla (2014) relatam que a atividade dos microrganismos pode variar em decorrência do tamanho da pilha de compostagem. Em pilhas com maiores dimensões tem tendência de ocorrer, perto do centro, zonas anaeróbicas, por outro lado, as menores proporcionam rápida perda de calor. Estas variações podem acarretar num retardamento da decomposição dos materiais orgânicos.

2.4.1. Inóculo não comercial

Inicialmente, os Microrganismos Eficientes - EM's foram utilizados pelos praticantes da Agricultura Natural Messiânica. Este método agrícola, criado por Mokiti Okada em 1935, baseia-se no fato de trabalhar o solo seguindo os princípios da natureza. No início da década de 70 o Dr. Teruo Higa, professor da Universidade de Ryukyus (Japão) realizou pesquisas científicas com os EM's, com o objetivo de melhorar a utilização da matéria orgânica na produção agrícola em várias regiões do Japão, obtendo resultados satisfatórios (OLIVEIRA, 2006).

O preparo desse inóculo é realizado de acordo com o Caderno dos Microrganismos Eficientes - EM (COUTINHO DE ANDRADE, 2011), e pode ser observado na Figura 2.

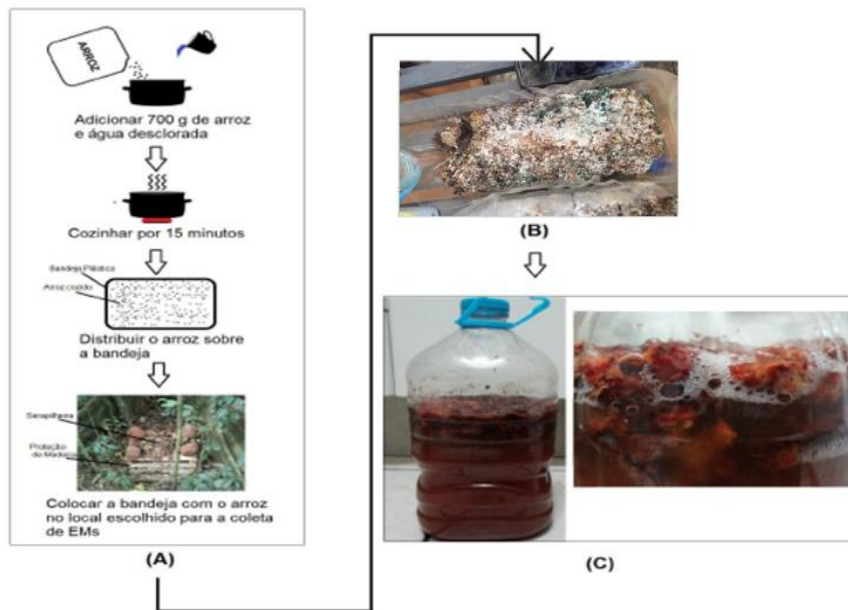


Figura 2. Processo de obtenção e ativação dos EM's. A – Procedimentos para captura dos EM's; B – Aspecto do arroz contendo os EM's antes da ativação; C – Ativação dos EM's em caldo de cana-de-açúcar. **Fonte:** Nakagawa, 2013 (com adaptações).

Para a captura dos EM's, aproximadamente 700g de arroz sem sal devem ser preparados em água destilada, e após o cozimento, ser colocado em uma bandeja de plástico com perfurações no fundo para de evitar o acúmulo de água, e coberto com tela visando proteger o conteúdo de predadores ou ação de intempéries. O recipiente deve ser colocado em mata nativa, e a serapilheira que cobre o solo deve ser colocada sobre a bandeja, de modo a aproveitar a microbiota natural do ambiente. O período de captura é de 15 dias e após esse período, os microrganismos de coloração rosada, azulada, amarelada e alaranjada seguem para o processo de ativação (COUTINHO DE ANDRADE, 2011), no qual o arroz com crescimento de microrganismos capturados é colocado em um recipiente de 20 litros, seguido de homogeneização com 1 litro de caldo de cana-de-açúcar, e em seguida, é acrescentado água destilada até completar o volume total de 20 litros. Por um período de 20 dias, o recipiente deve ser armazenado em local fresco, arejado e fechado, até os microrganismos apresentarem coloração alaranjada com cheiro doce agradável.

Os EM's consistem em uma mistura de microrganismos benéficos, que são encontrados naturalmente no ambiente e consistem basicamente em quatro tipos de microrganismos: bactérias, actinobactérias, leveduras e fungos filamentosos. Eles podem ser aplicados para aumentar a diversidade microbiana, melhorar a qualidade de solos, crescimento, rendimento e qualidade de culturas (HIGA e WIDIDANA, 1991). Os EM's podem ser utilizados em diversos processos tais como reabilitação de solos, aplicação em plantações, e principalmente no saneamento ambiental, como na decomposição de resíduos pela compostagem e efluentes, onde agem de forma a decompor a matéria orgânica, sem produção de odores, servir como predadores de microrganismos nocivos, e tornam o processo de compostagem mais rápido (4 a 6 semanas) (HIGA e PARR, 1991; BONFIM et al., 2011).

Na compostagem, a principal vantagem com o uso de EM's é a aplicação de concentrações elevadas destes organismos, executando o processo de forma mais rápida e eficiente.

2.4.2. Inóculo comercial

Atualmente no mercado, tanto nacional como internacional, há vários produtos comerciais disponíveis para serem usados no processo de tratamento de resíduos sólidos orgânicos. Os inóculos utilizados para compostagem são geralmente compostos por uma ou poucas cepas (ECHEVERRIA et al., 2012; HACHICHA et al., 2012). Patle et al. (2014) descrevem que tais inoculantes são geralmente misturas contendo microrganismos, nutrientes minerais ou formas prontamente disponíveis de carbono e enzimas, que balanceiam o pH promovendo o aumento da atividade microbiana quando o produto está em contato com os resíduos. Estes produtos consistem numa concentração de microrganismos latentes, e para que se tornem mais eficientes, devem ser ativados. Possuem a fórmula detida pelo fabricante, e além

de aceleradores de compostagem, são usados como inoculantes microbiológicos para solo, planta e composto (HIGA, 1994).

As funções da população microbiana e as características bioquímicas da maioria destes aditivos comerciais durante o processo de compostagem ainda não são bem elucidados (SASAKI et al. 2006). São chamados de microrganismos eficazes porque agem diretamente no solo, fazendo com que a sua capacidade natural tenha plena ação (FORNARI, 2002). Segundo os fabricantes, o uso deste produto biológico promove a aceleração do processo de compostagem, criando vantagens no tempo de maturação.

2.5. Técnicas de identificação de microrganismos

O interesse pelo estudo e identificação de microrganismos presentes em compostagem é cada vez maior, visto que esses microrganismos representam importante papel no funcionamento e regulação da compostagem, e, além disso, esses microrganismos podem apresentar valores biotecnológicos e econômicos (EMBRAPA, 2002). Atualmente, diversas metodologias são propostas para estudos que envolvem a ecologia microbiana de compostagem. A diversidade de microrganismos é utilizada como índice que reflete a qualidade da compostagem (TURCO et al., 1994). Por isso, ao analisar a biodiversidade, importantes considerações devem ser feitas em relação ao número e distribuição das espécies e quanto à sua diversidade funcional (YIN et al., 2000).

Os microrganismos são tradicionalmente identificados através de testes morfológicos e bioquímicos que são realizados a partir de cultivos com diferentes meios de cultura. A partir disto é possível a caracterização dos isolados bem como a estimativa da população de cada espécie isolada e identificada por testes bioquímicos, utilizando-se ou não kits comerciais. Padrões de cultivo já são preconizados para identificação de bactérias como os descritos no

“*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*” (HOLT et al., 1994), leveduras segundo Barnett et al (2000) e fungos filamentosos como descritos por Booth (1971), Nelson et al. (1983), Barnett & Hunter (1987), Klich (1993), Pitt & Hocking (1997) e Samson (2004).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi descrita por Saiki et al. (1985), e permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção, in vitro, de várias cópias de determinada região do DNA. Como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de seqüências de nucleotídeos-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de seqüências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas. Grande parte das técnicas moleculares hoje utilizadas, apropriam-se da PCR ou de suas variações para o estudo da dinâmica microbiana. O uso do RNA ribossômico como marcador filogenético tem sido muito utilizado com as vantagens de se usar informações sobre as seqüências do rRNA e sua disponibilização em bases de dados (RDP, Gen-Bank, EMBL), na maioria dos casos, acessíveis, gratuitamente, permitindo a comparação de novas seqüências obtidas com as seqüências presentes nessas bases (COUTINHO et al., 1999).

A técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) permite analisar produtos de PCR de acordo com suas seqüências de pares de bases e não com diferenças no tamanho dos produtos, permitindo assim, a determinação da diversidade genética de comunidades microbianas naturais e também a identificação filogenética (ROSADO et al., 1999). A técnica de DGGE está bem estabelecida como ferramenta molecular para estudos de microbiologia ambiental, permitindo o estudo da complexidade e do comportamento das comunidades microbianas em grande número de amostras, de maneira rápida, relativamente barata e facilmente reproduzível (MUYZER, 1999). Esta técnica pode ser usada com os mais variados propósitos, como, por exemplo, no estudo da estrutura de comunidades microbianas no ambiente, no monitoramento de mudanças ocorridas nessas comunidades em um intervalo de tempo após a introdução de um agente causador de estresse, como produtos químicos,

pesticidas e poluentes, no estudo da diversidade de genes funcionais e na análise de comunidades de outros microrganismos (MUYZER et al., 1993; AKKERMANS et al., 1995; ROSADO et al., 1998). Nos últimos anos, esta técnica vem sendo empregada para conhecer os microrganismos em diferentes comunidades, bem como para monitorar a dinâmica da população em uma comunidade. A comunidade microbiana presente em diversos compostos tem sido analisada por DGGE, incluindo resíduos de alimentos e jardim (JUAREZ et al., 2015); esterco de galinha (DIAS et al., 2010); massa seca de plantas de tomate e raspas de pinus (JURADO et al., 2014).

A técnica clássica de sequenciamento que vem sendo utilizada nas últimas décadas é conhecida como técnica de Sanger e se baseia no uso de sequências de nucleotídeos iniciadores, que se anelam com a sequência alvo, iniciando o processo de replicação do DNA por ação de uma DNA polimerase.

Além disso, técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), vem sendo cada vez mais utilizadas, comprovando sua eficácia na identificação de metabólitos microbianos (MIGUEL, 2012). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis (LANÇAS, 2009).

De um modo geral, a identificação e estudo da diversidade microbiana por meio de técnicas dependentes de cultivo excluem os microrganismos que se apresentam em baixa densidade celular e até mesmo quando se quer utilizar um meio seletivo para determinado organismo-alvo, algumas estirpes não cultiváveis, provavelmente, serão excluídas das análises (COUTINHO et al., 1999). As limitações dos métodos tradicionais, aliadas ao avanço tecnológico na área de biologia molecular, fazem com que as técnicas moleculares sejam, no momento, muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiana (ELSAS et al., 1998), sendo

que essas limitações são ainda maiores quando se quer estudar a diversidade de microrganismos associada à determinado ambiente. Sabe-se que a diversidade de microrganismos em compostagem é grande, no entanto, os meios de cultivo são, em sua maioria, seletivos a grupos particulares (EMBRAPA, 2002). Experimentos fisiológicos têm sido usados com grande sucesso na caracterização de espécies isoladas; entretanto sabe-se, hoje, que apenas uma pequena fração de microrganismos presentes no ambiente pode ser isolada e caracterizada.

Apesar das vantagens dos métodos moleculares, o isolamento dos microrganismos continua a ser uma tarefa essencial tanto para relacionar taxonomia, diversidade metabólica dos organismos e para recuperar espécies para utilização posterior. A compostagem é considerada uma fonte rica para o isolamento de microrganismos que sejam úteis como, por exemplo, inoculantes para compostagem (VARGAS-GARCÍA et al., 2006) e os produtores de enzimas que hidrolizam polímeros ou degradam compostos recalcitrantes (FEDERICI et al., 2011). Apesar da ampla investigação neste campo, o potencial deste ecossistema para a descoberta de novos microrganismos e metabólitos secundários está longe de ser plenamente explorado, considerando que cada processo de matérias-primas pode fornecer diferentes estirpes. A eficácia do tratamento por bactérias, actinobactérias, leveduras e fungos filamentosos (BELYAEVA et al., 2012) durante as fases de compostagem de resíduos específicos tem sido investigada por um número de pesquisadores usando técnicas moleculares (por exemplo, eletroforese em gel de gradiente desnaturante de reação em cadeia de polimerase (PCR-DGGE). Em comparação com as técnicas convencionais de sequenciação de DNA, o sequenciamento de alto rendimento aumentou a capacidade para a descoberta de novos genes funcionais e sequências de microrganismos previamente desconhecidos, permitindo-nos gerar uma imagem mais abrangente da biodiversidade microbiana durante a compostagem (TKACHUK et al., 2013).

As técnicas moleculares, muitas vezes, não são suficientes para resgatar a abundância total das espécies microbianas presentes em amostras ambientais, devido à sua complexidade (OGRAM, 2000). Nesse contexto, metodologias que combinam métodos tradicionais e moleculares constituem uma abordagem polifásica, essencial para uma descrição mais precisa da diversidade microbiana em compostagem.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, N. et al. Effects of bulking agents, load size or starter cultures in kitchen-waste composting. **Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.** 2:3, 2013.

AKKERMANS, A.D.L. et al. **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer, 1995.

ANASTASI, A., VARESE, G.C., MRCHISIO, V.F. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. **Mycologia** 97, 33–44, 2005.

ANTON, M.A. et al. Improving waste management in protected horticulture. **Agron. Sustain. Dev.** 25, 447–453, 2005.

AQUINO, A.M. Biomassa microbiana, colóides orgânicos e nitrogênio inorgânico durante a vermicompostagem de diferentes substratos. **Pesq. Agropec. Bras.**, 40: 1087- 1093, 2005.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4.ed. New York: Library Macmillan Company, 218 p, 1987.

BARNETT, J.A. et al. **Yeasts: characteristics and identification**. 3.ed. EUA: Cambridge University, 1139 p, 2000.

BARWINSKI, M. J. B. **Arcabouço jurídico e tecnologia para compostagem de resíduo de abatedouro**. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Mestre. 2015.

BELYAEVA, O.N., HAYNES, R.J., STURM, E.C. Chemical, physical and microbial properties and microbial diversity in manufactured soils produced from cocomposting green waste and biosolids. **Waste Manage.** 32, 2248–2257, 2012.

BENTO, A L.; TORRES, F. L.; LEMES, R. F.; MAGALHÃES, T. A. **Sistema de gestão ambiental para resíduos orgânicos sólidos**. Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL. 2013.

BERNARDI, F. H. **Uso do processo de compostagem no aproveitamento de resíduos de incubatório e outros de origem agroindustrial**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Paraná. p. 17-22, 2011.

BLANC, M. et al. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16s rDNA) methods. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 141-9, 1999.

BOOTH, C. **The genus Fusarium**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 237 p, 1971.

BRASIL. **Lei nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010**. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Diário Oficial da União, 2010.

BUSTAMANTE, M.A., et al. Recycling of anaerobic digestates by composting: effect of the bulking agent used. **J. Cleaner Prod.** 47, 61–69, 2013.

CANELLAS, L. P. & OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.1, p.3-14, 2014.

CARLI, S. T. **Uso de degradadores biológicos na aceleração do processo de compostagem dos resíduos orgânicos vegetais e palhas de embalagem** – estudo de caso Ceasa – Curitiba. Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba. p. 40-45, 2010.

CAYUELA, M.L., SANCHEZ-MONEDERO, M.A., ROIG, A. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. **Process. Biochem.** 41, 616-624, 2005.

CHEN, Y.N. et al. Nitrite reductase genes as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria during agricultural waste composting. **Environ. Biotechnol.** 98, 4233–4243, 2014.

COLE, A.J. et al. Seaweed compost for agricultural crop production. **J. Appl. Phycol.** 28, 629–642, 2016.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 491-503, 1999.

CUKJATI, N., ZUPAN, G.D., ROS, M., GRILC, V. Composting of anaerobic sludge: an economically feasible element of a sustainable sewage sludge management. **J. Environ. Manage** 106, 48-55, 2012.

DIAS, B.O. et al. Use of biochar as bulking agent for the composting of poultry manure: Effect on organic matter degradation and humification. **Bioresource Technology** 101, 1239–1246, 2010.

ECHEVERRIA, M.C. et al. Microbially enhanced composting of wet olive husks. **Bioresour. Technol.** 104, 509–517, 2012.

ELSAS, J. D. van; DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Washington, DC, v. 32, p. 133-154, 1998.

EMBRAPA. **Uso de ferramentas moleculares em estudo da diversidade de microrganismos do solo**, 2002.

EMBRAPA. **Visão 2014-2034: o futuro do desenvolvimento tecnológico da agricultura brasileira**. Editora Embrapa. 200p, 2014.

ETHOS, Instituto Ethos de Empresas e Responsabilidade Social. **Política Nacional de Resíduos Sólidos – Desafios e Oportunidades para as Empresas**. São Paulo, p. 10, 2012.

FARIAS, M. V. **Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil.** Universidade Federal de Roraima, Boa Vista. p. 12-16, 2008.

FEDERICI, E., et al. Two-phase olive mill waste composting: community dynamics and functional role of the resident microbiota. **Bioresour. Technol.** 102, 10965–10972, 2011.

FERMOR, T. et al. Microbiological properties of casing. In: GRIENSVEN, L. J. L. F. van, (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi.** Rotterdam: Balkema, p. 447-454, 2000.

FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P.. **Manual pratico para a compostagem de biossólidos.** UEL – Universidade Estadual do Paraná. Londrina. p. 9-44, 1996.

FILHO, M. V. P. **Utilização de microrganismos eficazes (EM) no processo de compostagem.** Dissertação (Mestrado Profissional em Sistemas de Produção Agropecuária). Universidade José Rosário Vellano – UNIFENAS. Alfenas - MG. 65p, 2013.

FIORI, M.G.S. et al. Análise da evolução tempo-eficiência de duas composições de resíduos agroindustriais no processo de compostagem aeróbia. **Engenh. Amb.**, 5: 178-191, 2008.

FONSECA, M.T.; BORGES, A.M. de B. Lixo e hospitalidade: o ensino consciente como estratégia para redução do volume de resíduos produzidos pela indústria de hospitalidade e ferramenta de captação profissional gerando benefício social. In: Seminário de Pesquisa em Turismo do Mercosul, **4Anais...** Caxias do Sul: UCS, 2006.

FORNARI, E. **Manual Prático de Agroecologia.** Aquariana Editora, São Paulo, 240 p, 2002.

GABHANE, J. et al. Additives aided composting of green waste: effects on organic matter degradation, compost maturity, and quality of the finished compost. **Bioresour. Technol.** 114, 382–388, 2012.

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

GETAHUN, T. et al. Effect of turning frequencies on composting biodegradable municipal solid waste quality. **Resour. Conserv. Recy** 65, 79-84, 2012.

GOLUEKE, C. G., CARD, B. J., MCGAUHEY, P. H. A critical evaluation of inoculums in composting. **Appl. Microbiol.** 2, 45–53, 1954.

GOMES, A. P. D. **Fundamentos da compostagem de resíduos sólidos.** Universidade de Aveiro Departamento de Ambiente e Ordenamento. 2001.

GUARDIA, A.D. et al. Comparison of five organic wastes regarding their behavior during composting: part 2, nitrogen dynamic. **Waste Manage.** (Oxford) 30, 415–425, 2010.

HACHICHA, R., et al. Co-composting of spent coffee ground with olive mill wastewater sludge and poultry manure and effect of *Trametes versicolor* inoculation on the compost maturity. **Chemosphere** 88, 677–682, 2012.

HASSEN, A. et al. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 80, p. 217-25, 2001.

HEIDEMANN, B. R. et al. **Compostagem acelerada: análise microbiológica do composto**. Revista Brasileira de Ciências Ambientais, nº 8, p. 2, 2007.

HERBETS, R. A. et al. **Compostagem de resíduos sólidos orgânicos, aspectos biotecnológicos**. Departamento de Bioquímica, UFSC; Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSC. 2005.

HIGA, T; PARR, J. F. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. **International Natura Farming Research Center Atami**, Japan, p. 9, 1994.

HIGA, T; WIDIDANA, G. **The concept and theories of effective microorganisms**. University of the Ryukyus, Okinawa. Japan, p. 2, 1991.

HIRAISHI, A., NARIHIRO, T., YAMANAKA, Y. Microbial community dynamics during start-up operation of flowerpot-using fed-batch reactors for composting of household biowaste. **Environ. Microbiol.** 5, 765–776, 2003.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams Wilkins, 787 p, 1994.

HUANG, D.L., et al. Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. **Biol. Technol.** 101,4062–4067, 2010.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão**. Rio de Janeiro, 2010. 219 p, 2008.

INSAM, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. **Geoderma**, v. 100, n. 3, p. 389-402, 2001.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA. (2009) Desperdício – Custo para todos – Alimentos apodrecem enquanto milhões de pessoas passam fome. *Desafios do Desenvolvimento*, ano 6, edição 54. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=1256:catid=28&Itemid=23>. Acesso em: 22 jul. 2017.

IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Diagnóstico dos resíduos sólidos urbanos. **Relatório de pesquisa**. Brasília, 82 p, 2012.

JUÁREZ M.F.D. et al. Co-composting of biowaste and wood ash, influence on a microbially driven-process. **Waste Management**, 2015.

JURADO, M. et al. Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. **Bioresource Technology** 162 (2014) 283–293, 2014.

JUSOH, M. L. C; MANAF, L. A. AND LATIFF, P. A. Composting of rice straw with effective microorganisms (EM) and its influence on compost quality. **Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering**, 10:17, 2013.

KARAK, T. et al. Evaluation of composts from agricultural wastes with fish pond sediment as bulking agent to improve compost quality. **Clean Soil Air Water** 41, 711–723, 2013.

KARNCHANAWONG, S. & NISSAIKLA, S. Effects of microbial inoculation on composting of household organic waste using passive aeration bin. **Int J Recycl Org Waste Agricult.** 7 p. 2014.

KIEHL, E.J. **Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto.** 4^a ed. E. J. Kiehl. Piracicaba. 173 p, 2004.

KLICH, M.A. Morphological Studies of *Aspergillus* Section *Versicolores* and related Species. **Mycologia**, 85:100-107, 1993.

KULCU, R., YALDIZ, O. Determination of aeration rate and kinetics of composting some agricultural wastes. **Biol. Technol.** 93, 49–57, 2004.

KULCU, R., YALDIZ, O. The composting of agricultural wastes and the new parameter for the assessment of the process. **Ecol. Eng.** 69, 220–225, 2014.

KUMAR, R. et al. Composting of sugarcane waste by-products through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. **Bioresour. Technol.** 101, 6707–6711, 2010.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, 2009.

LI, H. et al. Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. **Bioinformatics**, 25, 2009.

LI, H. & DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. **Bioinformatics**, 25:1754-60, 2009.

LIU, W.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LIU, L, et al. Comparison of Next- Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 11p, 2012.

LÓPEZ-GONZALEZ. et al. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. **Bioresource Technology** 146, 574–584, 2013.

MAKAN, A. Windrow co-composting of natural casings waste with sheep manure and dead leaves. **Waste Manage.** 42, 17–22, 2015.

MANSO, K. R. J; FERREIRA, O. M. **Confinamento de Bovinos: Estudo de gerenciamento dos resíduos**. Universidade Católica de Goiás. Goiânia. p. 4-6, 2007.

MARAGNO, Eliane Spricigo; TROMBIN, Daiane Fabris; VIANA, Ednilson. **O uso da serragem no processo de minicompostagem**. Nota técnica, Engenharia Sanitária Ambiental. 2007.

MARQUES, A. C. F. **Viabilidade de microrganismos patogênicos no processo de compostagem do lodo de esgoto doméstico**. Dissertação apresentada ao PPGECEA/UEFS para obtenção do grau de Mestre em Ciências. 2010.

MIGUEL, M. G. C. P. **Caracterização físico-química e microbiológica do alimento indígena calugi**. Tese apresentada ao programa de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2012.

MOHEE, R. et al. Assessing the potential of coal ash and bagasse ash as inorganic amendments during composting of municipal solid wastes. **J. Environ. Manage.** 159, 209–217, 2015.

MONTEJO, C., TONINI, D., MARQUEZ, M.C., ASTRUP, T.F. Mechanical-biological treatment: performance and potentials. An LCA of 8 MBT plants including waste characterization. **J. Environ. Manage** 128, 661-673, 2013.

MUYZER, G. et al. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl Environ Microbiol**, 59: 695-700, 1993.

NAIR, J. & OKAMITSU, K. Microbial inoculants for small scale composting of putrescible kitchen wastes. **Waste Management** 30:977–982, 2010.

NAKASAKI, K.; ARAYA, S.; MIMOTO, H. Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting. **Bioresource Technology** 144: p. 521–528, 2013.

NAKASAKI, K.; SASAKI, M.; SHODA, M.; KUBOTA, H. Characteristics of mesophilic bacteria isolates isolated during thermophilic composting of sewage sludge. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 1, p. 42-45, 1985.

NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R. & PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and Krebs cycle in maize seedlings. **Soil Biol. Biochem.**, 704:3138-3146, 2007.

NASPOLINI, B.F.; LUSSI, C.; BORGES, D. De S.; SOUZA, D.B.E; ROCHA, L.A. Diagnóstico e proposta de melhoria de gestão dos resíduos sólidos produzidos no Restaurante Universitário: Campus Cuiabá/ UFMT. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 25, **Anais...** Recife: ABES, 2009.

NELSON, P.E. et al. **Fusarium species – an illustrated manual for identification**. EUA: Oxford, 193 p, 1983.

NETO, F. et al. Sombreamento para produção de mudas de alface em alta temperatura e ampla luminosidade. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 133-137, 2005.

NORD, E. Qualidade química na compostagem de resíduos sólidos com inoculação biológica. **Revista de Estudos Sociais** – Ano 2013 n. 30, V. 15, p. 149. 2013.

OGUNWANDE, G.A., OSUNADE, J.A. Passive aeration composting of chicken litter: effects of aeration pipe orientation and perforation size on losses of compost elements. **J. Environ. Manage** 92, 85-91, 2011.

OHTAKI, A; AKAKURA, N; NAKASAKI, K. Effects of temperature and inoculums on the degradability of poly-ε-caprolactone during composting. **Polym Degrad Stab** 62:279–284, 1998.

OKAZAKI, W.K.; TURN, S.Q.; FLACHSBART, P.G. Characterization of food waste generator: A Hawaii case study. **Waste Management**, n. 28, n. 12, p. 2483-2494, 2008.

OLIVEIRA, E.C.A. de; SARTORI, R. H.; GARCEZ, T. B. **Compostagem**. Piracicaba, 32p. 2008.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. p. 15-19, 2003.

OLIVEIRA, Sérgio André de Souza. **Aplicação foliar de Nitrato e de Microorganismos Eficazes (EM) e seus efeitos sobre a partição de nutrientes em variedades de Milho (*Zeamays L.*) cultivadas com resíduos industriais**. UFPRJ, p. 10, 2006.

OSAKI, F. **Distribuição Espacial de Micro-organismos e Fertilidade em Solos de Dois Ecossistemas Florestais: Floresta Ombrófila Mista e Povoamento Florestal com Pinus Taeda L. em Tijucas do Sul-PR**. UFPR. Curitiba: UFPR, p. 18, 2008.

PAN, I.; DAM, B.; SEN, S. K. Composting of common organic wastes using microbial inoculants. **Biotech**. 2: p. 127–134, 2012.

PANE, C. et al. Effects of on-farm composted tomato residues on soil biological activity and yields in a tomato cropping system. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 2, 1, 2015.

PARTANEN, P., HULTIMAN, J., PAULIN, L., AUVINEN, P., ROMANTSCHUK, M. Bacterial diversity at different stages of the composting process. **BMC Microbiol.** 10, 94, 2010.

PATLE, A. V. et al. Microbial assisted rapid composting of agriculture residues. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, Volume 5, Issue 5, May- 2014.

PEREIRA NETO, J.T. **Manual de compostagem: processo de baixo custo**. UFV. Viçosa. 81 p, 2007.

PEREIRA, A. V. et al. Variação da qualidade de folhas em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim-elefante x milho (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.490-499, 2000.

PICCOLO A. In memoriam Prof. F.J. Stevenson and the Question of humic substances in soil. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 3, 23, 2016.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage. 2.ed. Cambridge: Chapman & Hall,** 593 p, 1997.

RAUT, M. P. et al. Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste – A compost maturity analysis perspective. **Bioresource Technology** 99: p. 6512–6519, 2008.

RAZVI, A. S. & KRAMER, D. W. Evaluation of Compost Activators for Composting Grass Clippings. **Compost Science & Utilization.** Vol. 4, Issue 4, 1996.

ROSADO, A.S. et al. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. **Rev Microbiologia,** 28:135-147, 1997.

ROSADO, A.S. et al. Genetic diversity of nifH sequences in Paenibacillus azotofixans strains and soil samples analysed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR- amplified gene fragments. **Appl Environ Microbiol,** 64: 2770-2779, 1998.

RYCKEBOER, J. et al. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. **Ann. Microbiol.** 53, 349–410, 2003.

SAHA, J.K., PANWAR, N., SINGH, M.V. An assessment of municipal solid waste compost quality produced in different cities of India in the perspective of developing quality control indices. **Waste Manage.** 30, 192–201, 2010.

SAID-PULLICINO, D., F.G. ERRIQUENS. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. **Bioresource Technol.,** 98: 1822-1831, 2007.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science,** Washington, DC, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SANCHEZ-MONEDERO, M. A. et al. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effect on pH, EC and maturity of the composting mixtures. **Bioresour. Technol.** 78, 301-311, 2001.

SANCHUKI, C. E. **Estudo da Compostagem Acelerada de Cama de Frango.** UFPR. Dissertação Mestrado. 99p. 2011.

SASAKI, H. et al. Effect of a commercial microbiological additive on beef manure compost in the composting process. **Animal Science Journal** 77, 545–548, 2006.

SCHNORR, S. **Estudo de caso de compostagem de resíduos de podas urbanas e vermicompostagem de esterco bovino no Centro Estadual de Educação Profissional Manoel Moreira Pena.** Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Ambiental) – Faculdade União das Américas. Foz do Iguaçu, 2010.

SENESI, N., PLAZA, C. Role of humification processes in recycling organic wastes of various nature and sources as soil amendments. **CleanAir SoilWater** 35, 26–41, 2007.

SHARHOLY, M., AHMAD, K., MAHMOOD, G., TRIVEDI, R.C. Municipal solid waste management in Indian cities - a review. **Waste Manage.** 28, 459–467, 2008.

SILVA, C.F. **Guia para identificação de bactérias através de provas bioquímicas.** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia-Laboratório de Microbiologia, 1998.

SILVA, J. G.; EIGENHEER, E. M. ; RODRIGUES, D. C. **Produção e Aproveitamento de composto orgânico a partir de resíduos de origem vegetal no campus da Universidade Federal Fluminense.** Congresso Nacional de Excelência em Gestão. Rio de Janeiro. p. 4-5, 2009.

SILVA, L. C. B. **Identificação de actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. Isolados do processo de compostagem para a produção de *Agaricus brasiliensis*.** Dissertação apresentação para obtenção do grau Mestre em Microbiologia Agrícola- Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2010.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. Manual de Horticultura Orgânica. 2 ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2006. 843p.

SPACCINI, R., PICCOLO, A. Molecular characterization of compost at increasing stages of maturity. 1. Thermochemolysis-GC-MS and ¹³C-CPMAS-NMR spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.** 55, 2303–2311, 2007.

STRAATSMA, G. et al. Microbial interactions in composts: comercial aspects. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1019-1024, 1995.

STROM, P. F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. **Applied Environmental Microbiology**, WASHINGTON, v. 50, n. 4, p. 899-905, 1985.

SYMANSKI, C. S. **Caracterização de bactérias mesófilas presentes em processo de compostagem.** Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2005.

TAIWO, L. B.; OSO, B. A. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. **African J. Biotech**, v. 3, p. 239-243, 2004.

TEIXEIRA, D.L., DE MATOS, A.T., MELO, E.D.C., 2015. Resistance to forced airflow through layers of composting organic material. **Waste Manage.** 36, 57–62, 2015.

TEJADA, M., GARCÍA-MARTINEZ, A.M., PARRADO, J. Relationships between biological and chemical parameters on the composting of a municipal solid waste. **Bioresour. Technol.** 100, 4062–4065, 2009.

TKACHUK, V.L. et al. Targeted 16S rRNA highthroughput sequencing to characterize microbial communities during composting of livestock mortalities. **J. Appl. Microbiol.** 116, 1181–1194, 2013.

TURCO, R. F.; KENNEDY, A. C.; JAWSON, M. D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison, Soil Science Society of America, p. 73-90, 1994.

VACCARO, G. L. R. et al. **Losses and Production Efficiency: an Interpretation for Critical Health Care Services**. In: IIE Anual Conference & Expo 2015 - ISERC 2015, Nashville. Proceedings.... Norcross: IIE, v. 1. p. 1-12, 2012.

VARGAS-GARCIA, M.C. et al. Effect of inoculation in composting processes: Modifications in lignocellulosic fraction. **Waste Management**. 27 1099–1107, 2007.

VARGAS-GARCIA, M.C; SUAREZ-ESTRELLA, F; LOPEZ, M; J. MORENO, J. Laboratory study of inocula production for composting processes. **Bioresource Technology** 96 797–803, 2005.

VARGAS-GARCÍA. et al. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. **Waste Manage.** (Oxford) 30, 771–778, 2010.

VERGNOUX, A., M. et al. Monitoring of the evolution of na industrial compost and prediction of some compost properties by NIR spectroscopy. **Sci. Total Environ**, 2009.

VISVANATHAN, C., TRANKLER, J., CHIEMCHAI SRI, C. Mechanical biological pretreatment of municipal solid wastes in Asia. In: **Proceedings of the International Symposium MBT**, 23e25 Nov., Hanover, Germany, pp. 99e110, 2005.

VUYST, L. et al. Biodiversity, ecological determinants, and methabolic exploitation of sourdough microbiota. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 7, p. 666-675, 2009.

XIE, X. et al. A novel method for contributing to composting start-up at low temperature by inoculating cold-adapted microbial consortium. **Bioresource Technology**, China, v. 238, p. 39-47, 2017.

WANG, K. et al. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data **Nucleic Acids Research**, 38:e164, 2010.

WANG, K. et al. The modelling of combined strategies to achieve thermophilic composting of sludge in cold region. *Int. Biodeterior.* **Biodegradation** 85, 608–616, 2013.

WANG, L.; WANG, L.; WANG, D.; LI, J. Isolation and Application of Thermophilic and Psychrophilic Microorganisms in the Composting Process. **Waste Biomass Valor** 5: p. 433–440, 2014.

WEI, Z. et al. Effect of inoculating microbes in municipal solid waste composting on characteristics of humic acid. **Chemosphere** 68: p. 368–374, 2007.

WEI, Z.M., ZHAO, X.Y., ZHU, C.W., Xi, B.D., ZHAO, Y., YU, X. Assessment of humification degree of dissolved organic matter from different composts using fluorescence spectroscopy technology. **Chemosphere** 95, 261–267, 2014.

XI, B. et al. Effect of inoculation methods on the composting efficiency of municipal solid wastes. **Chemosphere** 88: p. 744–750. 2012.

XI, B; ZHANG, G; LIU, H. Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste. **J Hazard Mater** 124:165–172, 2005.

XIAO, Y. et al. Continuous thermophilic composting (CTC) for rapid biodegradation and maturation of organic municipal solid waste. **Bioresour. Technol.** 100, 4807–4813, 2009.

YIN, B.; CROWLEY, D.; SPSROVEK, G.; MELO, W.J. de; BORNEMAN, J. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 4361-4365, 2000.

ZENG, G., et al. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting. **Bioresour. Technol.** 101, 222–227, 2010.

ZHOU, C. et al. A new strategy for co-composting dairy manure with rice straw: Addition of different inocula at three stages of composting. **Waste Management** 40 38–43, 2015.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Dinâmica físico-química e microbiológica de compostagem de resíduos orgânicos usando diferentes inoculantes

Resumo

É importante usar recursos renováveis para maximizar o rendimento das culturas e minimizar os riscos ambientais associados aos resíduos químicos. A compostagem constitui um dos métodos mais sustentáveis para a gestão dos resíduos orgânicos e que adiciona melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo. Durante a compostagem alguns parâmetros são importantes para uma boa qualidade do composto. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica físico-química e microbiana do processo de compostagem, além de comparar o uso de dois inoculantes (não comercial e comercial) para o processo de compostagem. Durante o processo foram aferidos parâmetros como temperatura, pH, umidade, carbono, nitrogênio, população de microrganismos e metabólitos. A fase termófila foi atingida no segundo dia, o composto maduro foi obtido com em média 120 dias, o pH aumentou ao longo do processo, seguindo as concentrações de ácidos, atingindo concentrações de 7,7, as populações de bactérias e actinobactérias foram superiores às populações de leveduras e fungos filamentosos durante o processo. Os tratamentos com inóculos apresentaram relação C/N adequado a um composto maturado (11/1) enquanto o composto sem inoculantes apresentou maior relação C/N (15,9/1). Assim, recomenda-se a utilização de inoculantes para redução do tempo de maturação do composto.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos, matéria orgânica, microrganismos, temperatura.

Abstract

It is important to use renewable resources to maximize crop yields and minimize the environmental risks associated with chemical residues. Composting is one of the most sustainable methods for the management of organic waste and adds to the improvement of the physical, chemical and biological characteristics of the soil. During composting some parameters are important for good compost quality. In this context, the present work had as objective to evaluate the physical-chemical and microbial dynamics of the composting process, besides comparing the use of two inoculants (non-commercial and commercial) for the composting process. During the process were measured parameters such as temperature, pH, humidity, carbon, nitrogen, population of microorganisms and metabolites. The thermophilic phase was reached on the second day, the mature compound was obtained with on average 120 days, the pH increased throughout the process, following the acid concentrations, reaching

concentrations of 7.7, populations of bacteria and actinobacteria were higher than populations of yeasts and filamentous fungi during the process. Inoculum treatments showed a suitable C / N ratio to a matured compound (11/1) while the noninoculated compound had a higher C / N ratio (15.9 / 1). Thus, it is recommended to use inoculants to reduce the maturation time of the compound.

Keywords: Organic acids, organic matter, microorganisms, temperature.

Introdução

Resíduos alimentares ou orgânicos são considerados os maiores componentes de resíduos sólidos urbano e constituem cerca de 55% dos resíduos totais nos países em desenvolvimento, enfrentando maiores desafios na gestão de desperdício de alimentos do que os países desenvolvidos (BAO et al., 2015; CERDA et al., 2018). Sendo assim, o tratamento dos resíduos orgânicos é uma questão grave e urgente, e uma vez que esses resíduos são prejudiciais à qualidade ambiental, tecnologias sustentáveis devem ser implementadas para reduzir as ameaças ambientais (NGOC et al., 2015).

Existem métodos comuns para tratamento de resíduos que têm sido aplicados em países em desenvolvimento, são estes: alimentação animal (raramente utilizado), compostagem (1% a 6%), digestão anaeróbica (<0,6%), incineração e aterros sanitários (>90%) (BAO et al., 2015). O composto produzido para uso agrícola a partir da recuperação de resíduos de alimentos tem recebido considerável interesse (LI et al., 2013). A compostagem consiste na transformação da matéria orgânica por meio da sucessão rápida de populações microbianas em um produto estabilizado, sendo considerada uma tecnologia eficaz e econômica para a reciclagem de resíduos orgânicos (ZHANG; SUN, 2018). Existem diversos estudos de materiais compostados, como por exemplo, com resíduos de biogás e estrume de vaca (ZHAO et al., 2013), lodo digerido misturado com composto maduro e serragem (HUANG et al., 2017), resíduos verdes com composto de cogumelo e biochar (ZHANG; SUN, 2014), esterco de vaca e palha de arroz (REN et al., 2016), resíduos de flores (SHARMA, D. et. Al., 2018) dentre muitos outros.

Durante a compostagem alguns parâmetros são importantes para uma boa qualidade, tais como relação C/N, disponibilidade de oxigênio, cálculo dos parâmetros que dão início ao processo de compostagem (ELIOT EPSTEIN, 2011), pH, temperatura (CHEN et al., 2014), aeração, umidade, tamanho de partícula e tempo durante a compostagem de resíduos também são parâmetros que precisam ser observados (BUENO et al., 2009). A compostagem ocorre com microbiota natural, onde estão presentes bactérias, actinobactérias, leveduras e fungos filamentosos que geralmente estão envolvidos na degradação de componentes lignocelulósicos durante a compostagem aeróbica (BOHACZ, 2016). No entanto, a adição de culturas iniciadoras no início do processo pode resultar em melhoria substancial na taxa de degradação de resíduos (ZHANG et al., 2014; ONWOSI et al., 2017; NAKASAKI; ARAYA; MIMOTO, 2013; KINET et al., 2015).

Sete matérias-primas (resíduos de frutas, resíduos vegetais, folhas, feno, jornal, palha de trigo e casca de arroz) foram utilizadas como substrato para inoculação de três isolados bacterianos, *Bacillus subtilis* B1U/1, *B. subtilis* D3L/1 e *Pseudomonas* sp. RAT/5 para a rápida degradação da celulose, hemicelulose e lignina dos resíduos orgânicos (PAN et al., 2012). Essas bactérias ou extremófilos ajudam a completar o processo de compostagem na fase mesófila (15–45 ° C), na fase termófila (45–80 ° C) e na fase hiper termófila (> 80°C). A inoculação de microorganismos extremófilos auxilia o composto a atingir a fase termofílica em menos tempo e ajuda a completar a degradação de resíduos orgânicos (RATHINAM & SANI, 2018), levando a redução do tempo de maturação do composto.

O processo de compostagem depende das combinações de massa residual e suas proporções relevantes, isto é, relação carbono: nitrogênio (C: N) e a presença ou não de inoculantes. Assim, proporções adequadas de combinação de resíduos adicionadas de agentes de inóculo são necessárias para a produção de composto amadurecido e de qualidade. Assim, a análise de metabólitos do processo de compostagem poderia ajudar a justificar alguns dos

parâmetros do processo. Com este intuito, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica físico-química e microbiana do processo de compostagem do resíduo alimentar do Restaurante Universitário da Universidade Federal de Lavras-UFLA, além de comparar o uso de dois inoculantes (não comercial e comercial) para o processo de compostagem.

2. Materiais e métodos

2.1. Preparo dos inóculos

O experimento foi realizado usando dois diferentes inoculantes, um não comercial (EM) e um comercial (Embiotic).

2.1.1. Inóculo não comercial

O preparo do inóculo não-comercial foi realizado de acordo com o Caderno dos Microrganismos Eficientes - EM (COUTINHO DE ANDRADE, 2011), e pode ser observado na Figura 1.

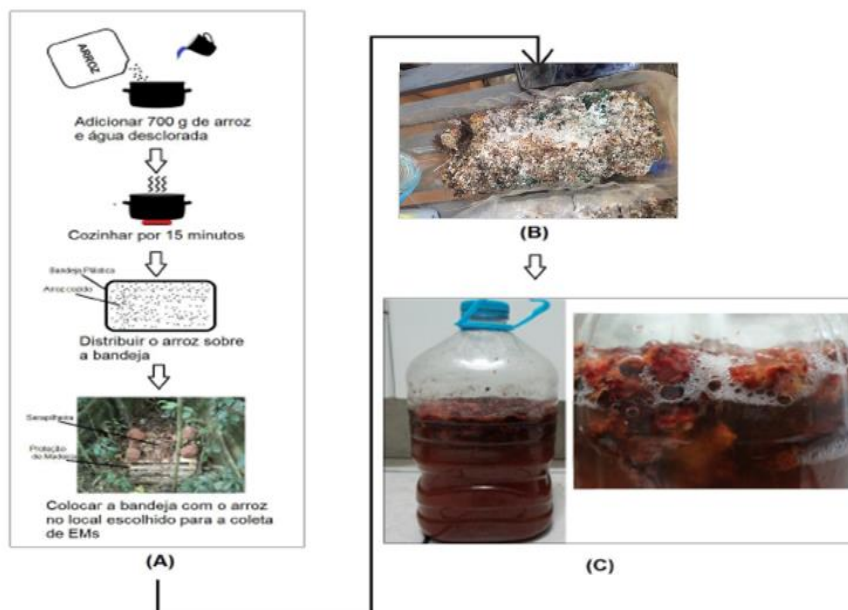


Figura 1. Processo de obtenção e ativação dos EM's. A – Procedimentos para captura dos EM's; B – Aspecto do arroz contendo os EM's antes da ativação; C – Ativação dos EM's em caldo de cana-de-açúcar. **Fonte:** Nakagawa, 2013 (com adaptações).

Para a captura dos EM's, aproximadamente 700g de arroz sem sal foram preparados em água destilada, e após o cozimento, foi colocado em uma bandeja de plástico com perfurações no fundo para evitar o acúmulo de água, e coberto com tela visando proteger o conteúdo de predadores ou ação de intempéries. O recipiente foi colocado na mata nativa da UFLA, e a serapilheira que cobre o solo foi colocada sobre a bandeja, de modo a aproveitar a microbiota natural do ambiente. O período de captura foi de 15 dias e após esse período, os microrganismos de coloração rosada, azulada, amarelada e alaranjada seguiram para o processo de ativação (COUTINHO DE ANDRADE, 2011), no qual o arroz com crescimento de microrganismos capturados foi colocado em um recipiente de 20 litros, seguido de homogeneização com 1 litro de caldo de cana-de-açúcar não estéril, e em seguida, foi acrescentado água destilada até completar o volume total de 20 litros. Por um período de 20 dias, o recipiente foi armazenado em local fresco, arejado e fechado, até os microrganismos apresentarem coloração alaranjada com cheiro doce agradável.

2.1.2. Inóculo comercial

O inóculo comercial – Embiotic, foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizado isolamento e identificação dos microrganismos presentes no inóculo não comercial e no inóculo comercial.

2.2. Procedimento de compostagem

A compostagem foi realizada através de uma mistura de resíduos orgânicos que foram provenientes do Restaurante Universitário - RU, e de resíduos de jardinagem, que foram provenientes do Setor de Paisagismo, da Universidade Federal de Lavras - UFLA. O processo de compostagem foi realizado no Setor de Biodiesel da universidade e as análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Fermentações, do Departamento de Biologia - UFLA.

O processo de compostagem foi realizado em composteiras que estão representadas na Figura 2, cada composteira de alvenaria possui capacidade de 1m³, com controle de temperatura (termômetro digital PT10 modelo MPT2, Lexitron-Guemisa, Madrid, Espanha) e aeração. Foi fornecido ar forçado (6,3 m³/min) a partir do fundo da pilha através de tubos PVC de 5cm de diâmetro na base da célula de compostagem, atravessando a célula no sentido horizontal a 10cm do limite posterior, com orifícios de 1 cm de diâmetro, em 3 pontos do tubo (25cm, 50cm e 75cm), ligados à uma bomba injetora de ar Ventibras, com ventilador axial de 5 cavalos, durante 30 minutos à cada 3 dias. Este regime de aeração assegura a manutenção de no mínimo 10% de oxigênio (VARGAS-GARCÍA et al., 2010).

Foi realizada a caracterização dos resíduos para dar início ao processo com a relação C/N adequada (30:1). O teor de umidade foi controlado através do teste da mão que consiste em “umidificar e esfregar um pouco do composto entre as palmas das mãos”, se o composto estiver pronto, não deixará as mãos sujas, soltando-se facilmente, e mantido entre 50% e 60%, sendo realizadas irrigações quando necessário, para manutenção do teor de umidade ideal. O rebaixamento das pilhas foi aferido durante os tempos de amostragem com fita métrica para acompanhar o acamamento do material e a decomposição das partículas, fatores que reduzem a porosidade da pilha de compostagem, e conseqüentemente, sua altura. O pH foi determinado por meio de um pHmetro digital (Digimed Analítica, modelo AC-100).

Os resíduos orgânicos do RU foram adicionados diretamente aos resíduos do paisagismo, na proporção de 42,75Kg de resíduos do RU acrescidos de 107,25Kg de resíduos do paisagismo para cada uma das composteiras, e misturados. As culturas iniciadoras foram acrescidas de acordo com as recomendações do fabricante, com água na primeira irrigação para garantir a umidade e eficiência do processo de compostagem.

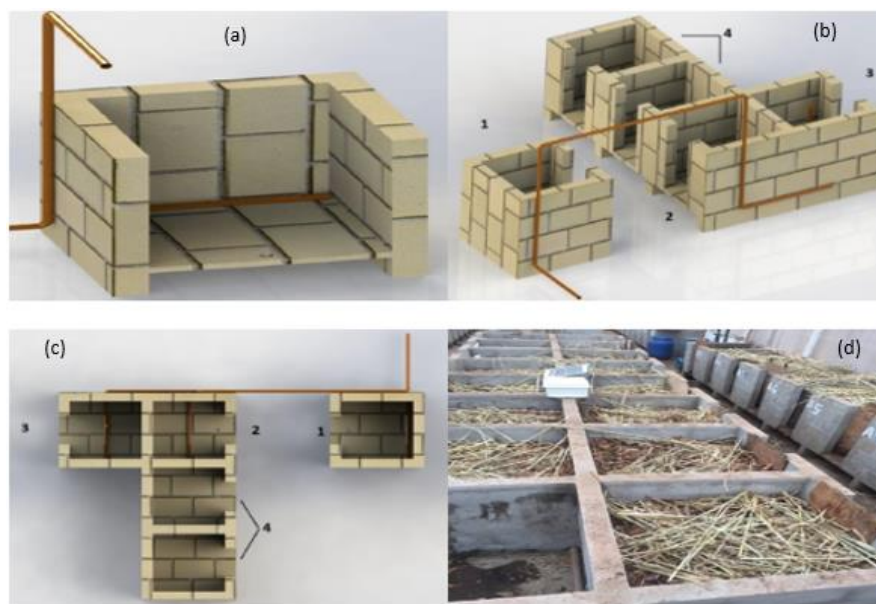


Figura 2. (a), (b), (c): representações gráficas das composteiras de alvenaria. (d) instalação do experimento. **Fonte:** Passos, 2014.

As amostras foram coletadas ao longo do processo, antes de atingir 40°C, isto é, nas fases termófilas, mesófilas e logo após a temperatura cair e passar para a fase de resfriamento e maturação nos tempos 0, 5, 10, 20, 40, 60 e 120, de acordo com as alterações das fases de compostagem que foram monitoradas pela aferição de temperatura. Para garantir uma amostra representativa, foram retiradas sub amostras de nove locais diferentes de cada composteira, sendo 3 amostras de superfície, 3 amostras do interior e 3 amostras de profundidade. As sub amostras foram misturadas em quantidades iguais, para se obter um peso de amostra final de aproximadamente 500 gramas. As amostras foram processadas à fresco.

2.3. Análises microbiológicas

Foram adicionados 25g de amostra de cada tempo de fermentação e de cada tratamento em 225 mL de água peptonada estéril em shaker com agitação de 120 rotações por minuto (rpm) durante 30 min à temperatura ambiente (LOPEZ-GONZALEZ et al., 2013). A partir da primeira diluição foram realizadas diluições seriadas até a diluição 10^7 e uma alíquota de 0,1mL foi espalhada em meio apropriado para cada grupo microbiano, de acordo com a Tabela 1. O plaqueamento foi realizado em duplicata para posterior contagem das colônias de microrganismos.

2.4. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram determinadas de acordo com o Manual de Análises Químicas de Solos (EMBRAPA, 2011). Determinou-se o teor de umidade por secagem a 105°C até ter o mesmo peso com 3 leituras seguidas. O carbono orgânico foi determinado por oxidação da matéria orgânica via úmida com dicromato de potássio em meio sulfúrico, empregando-se

como fonte de energia o calor desprendido do ácido sulfúrico e aquecimento, o excesso de dicromato após a oxidação foi titulado com solução padrão de sulfato ferroso amoniacal (sal de Mohr). O nitrogênio total (N) foi determinado usando o método Kjeldahl por câmara de difusão. O teor de matéria orgânica foi avaliado por determinação da perda por ignição a 550°C até um peso constante.

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para cada grupo de microrganismos.

Grupo de MO.	Meio de Cultura	Composição (em g L ⁻¹)	Incubação
Bactérias	Ágar Nutriente - AN	5g peptona, 3g extrato de carne, 15g ágar + 0,4% de nistatina	30°C por 48 horas
	Glucose Yeast CaCO ₃ - GYC	50g glicose, 10g extrato de levedura, 5g carbonato de cálcio, 20g ágar	
	Ágar <i>MRS</i> Lactobacillus - MRS	10g peptona, 10g extrato de carne, 5g extrato de levedura, 20g glicose, 1g tween 80, 2g fosfato de potássio dibásico, 5g acetato de sódio, 2g citrato de amônio, 0,05g sulfato de magnésio-7H ₂ O, 0,05g sulfato de manganês-7 H ₂ O, 15g ágar e 1g nistatina	
Actinobactérias	Aaronson	2g KNO ₃ , 0,8g caseína, 2g NaCl, 2g K ₂ HPO ₄ , 50mg MgSO ₄ H ₂ O, 20mg CaCO ₃ , 40mg FeSO ₄ .7H ₂ O, 15g ágar	45°C por 2 a 3 dias
Leveduras	Yeast Extract Peptone Glucose - YEPG	10 g extrato de levedura, 10g peptona bacteriológica, 20g glicose, 20g ágar com pH 3.5	28°C por 48 horas
	Ágar Dicloran Rosa Bengala - DRBC	5g digestão enzimática dos tecidos vegetais finais, 10g glicose, 1g fosfato de monopotássio, 0,5 gsulfato de magnésio, 2mg dicloran, 25mg rosa bengal, 15g ágar	
Fungos filamentosos	Potato Dextrose Ágar - BDA	200g batatas cruas, 20g dextrose, 20g ágar, 1L água destilada	25°C por 7 dias
	Dicloran Glicerol Ágar - DG18	8g glicose, 4g peptona, 0,8g fosfato de potássio dibásico, 0,4g sulfato de magnésio-7 H ₂ O, 176g glicerol, 15g ágar, 0,1g cloranfenicol	

A capacidade de troca de cátions (CTC) e a acidez trocável (H + Al) foram determinadas pelo método do KCl 1 mol L⁻¹, já a acidez potencial foi determinada com acetato de cálcio tamponado com pH 7,0 e determinado volumetricamente com solução de NaOH em presença de fenolftaleína como indicador. As quantidades de micronutrientes foram determinadas pelo Método de Mehlich.

2.5. Análises de metabólitos

Para a realização das análises cromatográficas (CLAE), o extrato aquoso foi acidificado com ácido sulfúrico 50% (v/v) (CARVALHO, et al., 2017) para posterior análise dos ácidos oxálico, cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico. As amostras retiradas nos tempos 0, 5, 10, 20, 40, 60 e 120 foram centrifugadas à 1000 rpm/10 minutos a 4°C e filtradas em membrana ultrafiltrante (nitro-celulose) de porosidade 0,20 µm. Foram utilizados 300 µl da amostra para a corrida cromatográfica, injetados automaticamente. Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão), equipado com detectores de índice de refração (modelo RID-10A) e de ultravioleta (modelo SPD-10Ai). A coluna utilizada foi o modelo Shimpack SCR-101H (SHIMADZU, 1998) usando como fase móvel 1819. Ácidos foram detectados pelo detector visível de índice de refração à 210 nm. A quantificação foi realizada a partir da comparação com curvas de calibração, determinadas utilizando-se padrões.

2.6. Delineamento experimental

O processo de compostagem consistiu em três tratamentos: controle (sem inoculação), inóculo não comercial (EM) e inóculo comercial (Embiotic), com 6 repetições de campo,

totalizando 18 composteiras. As composteiras foram distribuídas em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) no esquema de parcela subdividida no tempo. Os dados obtidos ao longo do processo de compostagem, de temperatura, umidade, rebaixamento, parâmetros físicos, químicos e microbiológicos foram submetidos a análises estatísticas através do software R (R CORE TEAM, 2018).

3. Resultados e Discussão

3.1. Cálculo de proporção de resíduos iniciais

Para o cálculo da proporção de resíduos orgânicos e resíduos do paisagismo que foram adicionados às composteiras, de modo que se fosse atingida a relação C/N ideal (30:1) para o início da compostagem, realizou-se a caracterização inicial dos componentes dos resíduos, descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização inicial dos resíduos.

Material	Carbono	Nitrogênio	Relação C/N
Resíduos Jdg.	39	0,6	65/1
Resíduos RU	35,16	2,93	12/1

*Jdg = jardinagem; RU = restaurante universitário.

3.2. Evolução dos parâmetros físico-químicos

A temperatura é um dos principais parâmetros utilizados para monitorar a compostagem e determina a taxa de decomposição da matéria orgânica (REN et al., 2016). A Figura 3 e a Tabela 3 mostram a evolução deste parâmetro e os tempos de amostragem que foram realizados

no presente estudo. O perfil térmico permitiu distinguir três fases em ambos os tratamentos: bio-oxidativa (fase mesófila e termófila), resfriamento e maturação. Não houveram diferenças significativas em relação à temperatura ao longo do processo de compostagem nos três diferentes tratamentos, sendo que o estágio bio-oxidativo durou em média 20 dias, semelhante aos resultados obtidos por Vargas-Garcia et al. (2010). A temperatura subiu logo após o início do processo de compostagem e atingiu uma média de 65°C dentro de 2 dias de processo. As irrigações foram realizadas cada vez que a temperatura diminuiu de forma constante (a cada dois dias consecutivos), para que a umidade fosse mantida no interior das composteiras. Em média, aos 63 dias, a temperatura diminuiu lentamente até 40°C e depois disso não ultrapassou este nível térmico em nenhum dos tratamentos. Durante a fase termófila, os primeiros dias atingiram maiores valores térmicos, ou seja, acima de 50°C, o que pode estar relacionado com a degradação gradual de material facilmente biodegradável ao longo do estágio bio-oxidativo. A fase termófila durou mais de 3 dias, mostrando que ambos os compostos do presente trabalho atenderam aos requisitos de saneamento com a ausência de sementes de ervas daninhas e patógenos (ZHANG et al., 2013). Além disso, Bernardi (2011) ressalta que o sistema em processo de compostagem deve atingir temperaturas de 40 a 60°C nos primeiros dias, como indicador de condições satisfatórias de equilíbrio de nutrientes. O final da fase bio-oxidativa exibiu flutuações na temperatura e foi seguido por uma fase de resfriamento (média de 77 dias) em que a temperatura era cerca de em média 40°C (Tabela 2). O composto necessita de um longo tempo para obter a temperatura ambiente devido ao componente recalcitrante do substrato. O mesmo foi observado por Huang et al. (2017) em que após a fase termófila, uma fase mesófila estável foi mantida entre 30 e 40°C até o final do processo de compostagem.

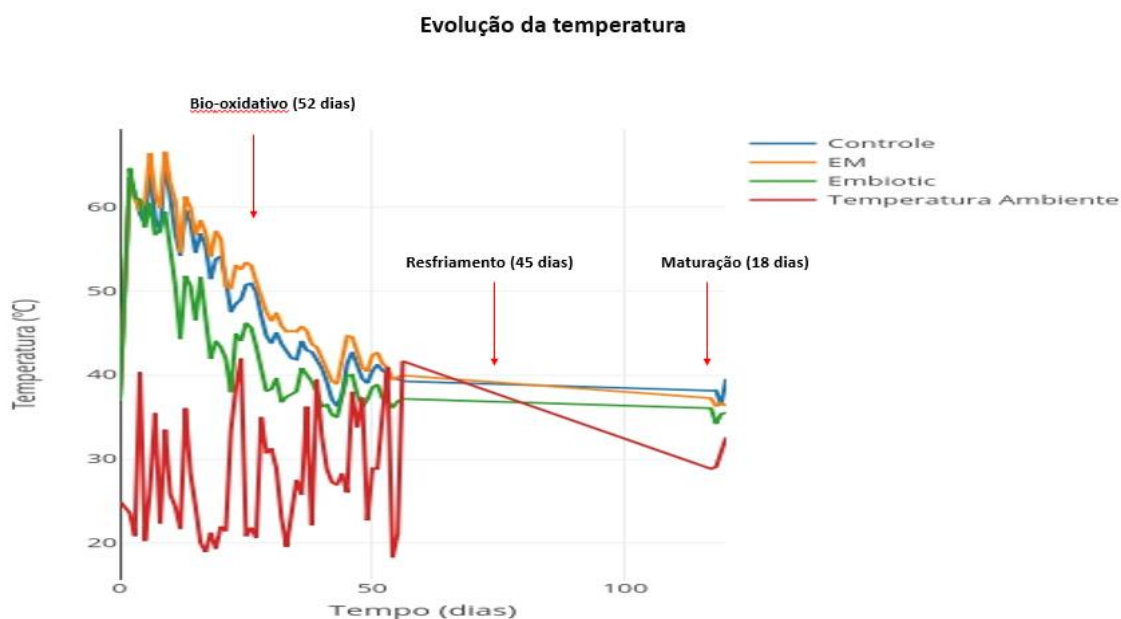


Figura 3. Mudanças na temperatura (C°) dos três tratamentos durante o processo de compostagem.

A maturação se estendeu por 23 dias, e o composto final foi obtido após uma média 120 dias em ambos os tratamentos. Observa-se que no tratamento controle e EM, as temperaturas eram cerca de 4 a 5°C maiores do que no tratamento Embiotic durante todo o processo, o que levou à estabilização do composto inoculado com o tratamento Embiotic com alguns dias de antecedência. Apesar disso, não houveram diferenças estatísticas entre os valores em comparação aos outros tratamentos. O tratamento EM manteve as maiores temperaturas durante todo o processo, porém na fase de resfriamento e maturação sua estabilidade ocorreu anteriormente ao tratamento controle. Em comparação ao tratamento controle, as culturas iniciadoras apresentaram vantagens em relação a maior taxa de degradação de resíduos e o processo aconteceu de forma similar em ambos os tratamentos durante o processo de compostagem. Os estudos realizados sobre a adequação de diferentes inoculantes são inconclusivos e escassos, o que provavelmente está associado ao complexo processo de compostagem e à complexa natureza dos resíduos orgânicos (CERDA et al., 2018). Wang et al. (2017) revelaram que pode não ser necessário adicionar inoculantes comerciais para melhorar

a compostagem de resíduos orgânicos, devido à ligeira melhoria no tempo e na qualidade do composto final e provaram que a adição de composto maduro como iniciador gerou melhorias no composto acabado em comparação com o uso de inoculantes comerciais. Nair & Okamitsu (2010) relataram que a inoculação com microbiota lignocelulósica não foi eficaz na compostagem de resíduos de cozinha em pequena escala e não foram observadas diferenças significativas com o controle.

O pH inicial foi em torno de 5,42; 5,04 e 5,19, nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente, e aumentou desde o início da compostagem. Na fase de resfriamento atingiu valores de 8,96; 9,04 e 8,96 (tratamento controle, EM e Embiotic, respectivamente), que foi mantido até o início da maturação, onde houve uma leve queda no pH de ambos os tratamentos (7,47; 7,70 e 7,66). De acordo com a temperatura, aos 20 dias de compostagem, o tratamento Embiotic já havia entrado na fase mesófila, apresentando uma pequena vantagem em relação aos tratamentos controle e EM que ainda permaneciam na fase termófila. Apenas duas diminuições de pH foram observadas ao longo do processo de compostagem, sendo na passagem da fase termófila para a mesófila nos tratamentos controle e EM, e ao final da maturação em ambos os tratamentos. Essas mudanças estavam relacionados à produção de ácidos orgânicos ou pela volatilização e pelo consumo de amônio (RASHAD; SALEH; MOSELHY, 2010). A compostagem de resíduos orgânicos frequentemente encontra o problema de baixos níveis de pH, o que atrasa a compostagem, já que o baixo pH inibe a atividade de microrganismos (CHEUNG; HUANG; YU, 2010). Enquanto o aumento do valor do pH pode ter ocorrido devido à hidrólise de proteínas, produção de amônia pela amonificação para posterior redução e estabilização, e decomposição de ácidos orgânicos (LIU et al., 2011). O pH do composto final estava dentro do intervalo 7,40-8,0 em ambos os tratamentos, elucidando o composto maduro, assim como em estudo anterior (MAKAN; MOUNTADAR, 2012).

A Figura 4 apresenta o gráfico de dispersão das variáveis umidade e rebaixamento para os diferentes tipos de tratamento e tempos do processo de compostagem. Pode-se verificar que a variável rebaixamento tende a diminuir, no decorrer do tempo e entre os tratamentos. Já a variável umidade apresentou uma queda, porém não constante, no decorrer do tempo. Todas as composteiras possuíam 1 m³, ou seja, 100cm de altura, sendo que no final do processo as alturas eram de 53 cm, 51,4 cm e 50,6 cm nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente, assim como era esperado, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos.

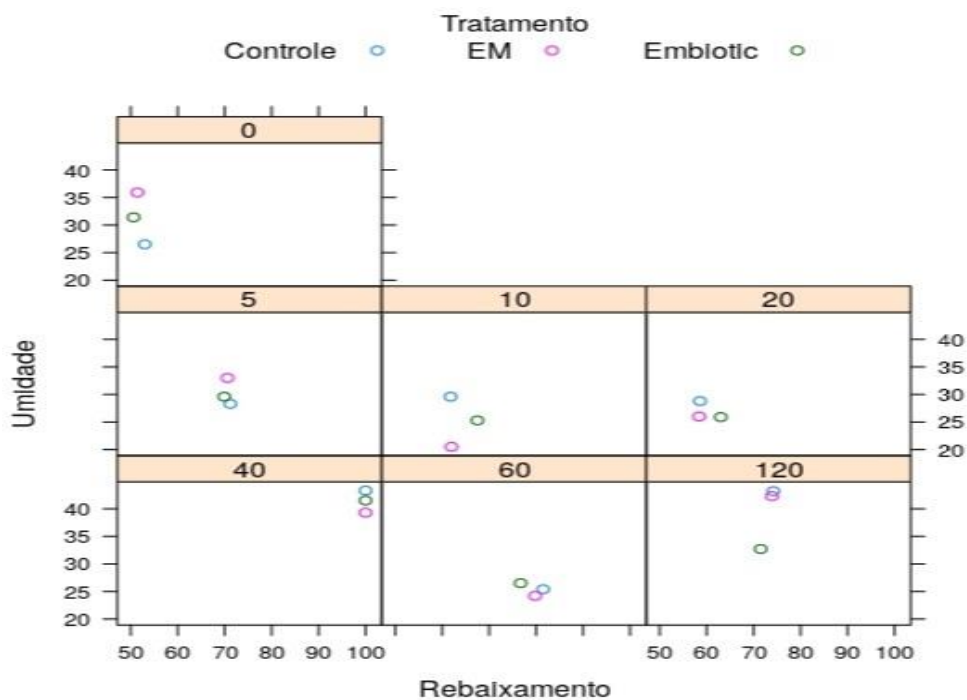


Figura 4. Gráfico de dispersão das variáveis rebaixamento (cm) e umidade (%).

O processo de assimilação de nutrientes pelos microrganismos ocorre através das suas paredes celulares, assim, para que possam ocorrer as atividades metabólicas de degradação de matéria orgânica, é necessário que a umidade do meio esteja adequada (GOMES, 2001). Apesar da irrigação periódica, a umidade não se manteve sempre ao redor 50% a 60% que era o ideal, mas ao redor de 40%. De acordo com Bernardi (2011), misturas de resíduos que apresentam

baixos teores de umidade, inibem a atividade microbiana, pois em qualquer outro processo biológico, a água é essencial para o metabolismo. Porém, ainda assim, por meio de irrigações periódicas, foi garantido um valor que não restringiu as atividades biológicas, como pode ser observado na Figura 6, que mostra a população de microrganismos presentes durante o processo, e em conjunto com a aeração forçada permitiu a disponibilidade de oxigênio.

O presente trabalho fez uso de um bioreator construído em blocos de alvenaria com sistema de injeção de ar que mostrou ser eficiente na manutenção dos teores de oxigênio no interior das pilhas. A aeração é um dos parâmetros chave no controle das atividades dos resíduos que estão sendo compostados, já que influencia na temperatura, umidade e fornecimento de O₂ para as atividades dos microrganismos. Na compostagem, os microrganismos predominantes são aeróbios, ou seja, precisam de oxigênio para sobreviver e executar seu metabolismo (CARLI, 2010). O oxigênio presente na compostagem também tem como finalidade remover a umidade excessiva da massa de compostagem evitando temperaturas mais elevadas (GOMES, 2001). A compostagem tradicional envolve problemas como ventilação inadequada, mistura irregular e outros desafios, e essas desvantagens podem ser reduzidas com o uso de reatores que ajudam a controlar o processo e proporcionar condições ótimas para obtenção de um composto de qualidade (SANCHUKI, 2011; KULCU e YALDIZ, 2014).

Além disso, o torneamento da pilha durante o estágio de degradação é a chave para manter a diversidade microbiana e, até certo ponto, o perfil populacional presente no início do processo (ANTUNES et al., 2016). A redução na altura da pilha de compostagem pode ser um indicativo de evolução do processo, devido à decomposição do material de origem em partículas menores, o que implica na redução da porosidade da pilha.

Alguns dos principais objetivos da utilização de substratos variados, como no presente trabalho, resíduos de jardinagem e resíduos de restaurantes, é o ajuste da relação C/N e aumento a disponibilidade de nutrientes. Carbono e nitrogênio usados por microrganismos para produção

de energia e seu crescimento levaram a mudanças na relação C/N durante o processo de compostagem assim como também foi observado por Karadag et al. (2013).

Tabela 3. Amostras coletadas e parâmetros físico-químicos avaliados durante o processo de compostagem.

Amostra	Dias de amostragem	Fase	Temperatura (C°)	pH	C (%)	N (%)	C/N
Controle	0	Material cru	37,0	5,42	21.6	0.9	24.1/1
EM	0	Material cru	37,0	5,04	21.8	0.9	24.2/1
Embiotic	0	Material cru	37,0	5,19	24.5	0.9	27.2/1
Controle	5	Termófila	57,9	6,32	nm	nm	nm
EM	5	Termófila	60,3	5,61	nm	nm	nm
Embiotic	5	Termófila	57,5	6,47	nm	nm	nm
Controle	10	Termófila	65,4	7,95	nm	nm	nm
EM	10	Termófila	62,8	7,47	nm	nm	nm
Embiotic	10	Termófila	55,1	7,73	nm	nm	nm
Controle	20	Termófila	54,1	8,24	nm	nm	nm
EM	20	Termófila	56,2	8,27	nm	nm	nm
Embiotic	20	Mesófila	43,3	7,85	nm	nm	nm
Controle	40	Mesófila	40,8	8,03	nm	nm	nm
EM	40	Mesófila	41,9	8,18	nm	nm	nm
Embiotic	40	Mesófila	36,2	8,15	nm	nm	nm
Controle	60	Resfriamento	41,7	8,96	20.2	1.2	16.8/1
EM	60	Resfriamento	40,7	9,04	19.1	1.2	15.9/1
Embiotic	60	Resfriamento	36,6	8,96	15.4	1.2	12.8/1
Controle	120	Produto final	39,5	7,47	19.1	1.2	15.9/1
EM	120	Produto final	36,3	7,70	13.6	1.2	11.3/1
Embiotic	120	Produto final	35,5	7,66	14.2	1.2	11.8/1

*nm = não mensurado.

Durante a compostagem, a degradação da matéria orgânica leva a redução do carbono, que diminuiu moderadamente na fase de resfriamento nos tratamentos controle (de 21.6% para 15.2%) e EM (de 21.8% para 19.1%), enquanto que no tratamento Embiotic a queda foi acentuada (de 24.5% para 15.4%) (Tabela 2). Já na fase de maturação, houve queda do C total (20.2% para 19.1%; 19.1% para 13.6%; e 15.4% para 14.2%, nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente). Em temperaturas mais altas e pH na faixa alcalina, são relatadas grandes perdas da fração N, principalmente quando há pouca resistência à degradação (WANG et al., 2015). Porém, no presente estudo, a evolução do N seguiu uma tendência constante e aumentou durante a fase de resfriamento e maturação com valor de 1.2% em ambos os

tratamentos. Com isso, observa-se que não houve perdas de N durante o processo de compostagem e a relação C/N decresceu ao longo do tempo nos tratamentos EM e Embiotic, atingindo um valor final de 11.3/1 e 11.8/1, respectivamente, que deixa explícito a estabilização do material compostado quando houve inoculação, ou seja, a presença de inóculos microbianos tende a reduzir a maturação do composto. Apesar do tratamento Embiotic ter apresentado grande perda de C até a fase de resfriamento, o produto final não apresentou diferenças significativas em relação ao tratamento EM. Entretanto, a relação C/N do tratamento controle apresentou níveis altos no final do processo, o que mostra que o processo de compostagem não foi satisfatório. Essa relação C/N alta no final do processo pode ser consequência da degradação de compostos orgânicos, que reduziu a massa seca (SAID-PULLICINO; ERRIQUENS; GIGLIOTTI, 2007).

A Figura 5 mostra o grau de contribuição de cada variável físico-química para a variabilidade dos dados. Neste gráfico, quanto mais forte a cor da variável, maior é sua contribuição para a explicação da variabilidade dos dados. De um modo geral, as variáveis sódio, acidez total, índice de saturação de bases, cobre, manganês e capacidade de troca iônica foram as variáveis que mais contribuíram para explicação da variabilidade dos dados. Os teores de matéria orgânica apresentaram valores iniciais de 29.0%, 21.8% e 24.5% e finais de 19.1%, 13.6% e 14.2%, nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente, mostrando queda ao longo do processo. Em relação aos macronutrientes, os teores de fósforo aumentaram ao longo do processo de compostagem, chegando à 423.3 mg/dm³, 545.9 mg/dm³ e 577.4 mg/dm³ nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. Os valores iniciais de K nos tratamentos controle, EM e Embiotic foram de 5,982.7 cmol/dm³, 4,582,9 cmol/dm³, e 4,136.6 cmol/dm³, já os valores finais foram um pouco maiores, com 6.060,5 cmol/dm³, 4,796,3 cmol/dm³ e 5.233,6 cmol/dm³. Os valores de Ca se mantiveram constantes, com média inicial de 10.1 cmol/dm³ e final de 10.5 cmol/dm³. Os valores de Mg aumentaram com variação de 3.4

cmol/dm³ a 3.6 cmol/dm³. O contrário ocorreu com os valores de S e Na, que decresceram em ambos os tratamentos ao longo do processo.

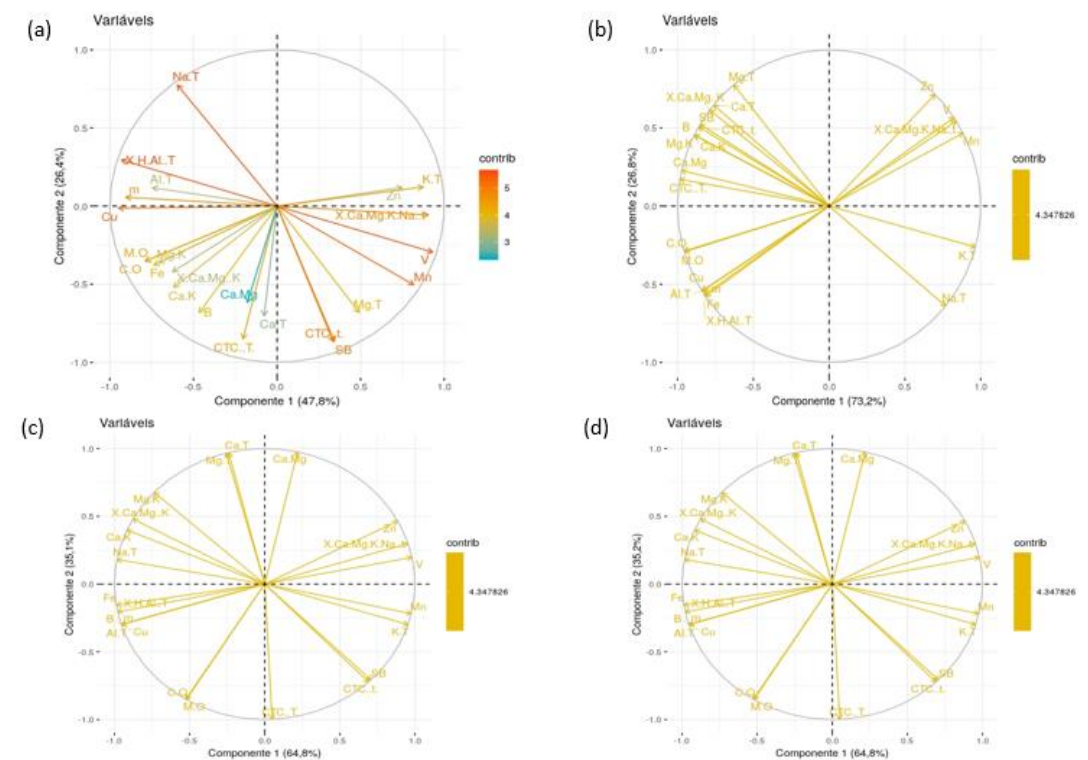


Figura 5. Grau de contribuição de cada variável físico-química para a variabilidade dos dados. (a) compostagem de modo geral, (b) controle, (c) inóculo não comercial, (d) inóculo comercial.

Sobre os micronutrientes, os valores de B se mantiveram constantes em ambos os tratamentos ao longo do processo, na média de 1,7 mg/dm³. Os valores de Zn seguiram um aumento constante com valores finais de 12.3 mg/dm³, 13.4 mg/dm³, 14.0 mg/dm³ nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. Os valores de Mn tiveram um aumento significativo, com valores iniciais de 87.5 mg/dm³, 61.6 mg/dm³ e 44.2 mg/dm³ e finais de 94.0 mg/dm³, 80.6 mg/dm³ e 84.2 mg/dm³. O contrário ocorreu com o Cu que teve os valores iniciais em ambos os tratamentos de em média 2.1 mg/dm³, com decréscimo atingindo um teor de em média 0.9 mg/dm³ no produto final, e os valores de Fe apresentaram uma média de 52.1 mg/dm³ e decresceu para 26.5 mg/dm³. Os nutrientes não são voláteis, portanto, o aumento do conteúdo

total de P e K, por exemplo, foi derivado principalmente da perda de massa de compostagem devido à biodegradação de conteúdo orgânico, ou seja, o conteúdo desses nutrientes aumenta a atividade metabólica dos microrganismos durante a compostagem e, assim, aumenta o processo de decomposição dos resíduos orgânicos (SUDHARSAN VARMA et al., 2015). Dessa forma, quanto maior a taxa de decomposição, maiores os teores de nutrientes no final da compostagem e melhor a qualidade do biofertilizante (ZHOU; SELVAM; WONG, 2018). Isso mostra que o aumento dos teores desses elementos em ambos os tratamentos no presente processo de compostagem, indicaram uma taxa de decomposição satisfatória, apesar da diminuição dos teores de alguns nutrientes, que não foram significantes.

A maturidade do composto ocorre quando a decomposição microbiológica se completa e é acompanhada da mineralização desses componentes da matéria orgânica, que passam da forma orgânica para a inorgânica ficando disponíveis para as plantas e, portanto, promove a melhoria da qualidade do composto, bem como seu valor nutritivo como um biofertilizante, uma vez que atua direta ou indiretamente em propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (GOU et al., 2017). Os resíduos de jardinagem eram de cor castanha clara com grande tamanho de partículas e os resíduos orgânicos apresentavam mal cheiro. As amostras finais de composto mostraram cor marrom-escura, produto solto e granular sem odor e sem presença de mosquitos, indicando que o processo de compostagem ocorreu de maneira satisfatória.

3.2. Comunidades microbianas

As comunidades de microrganismos sofreram alterações durante o processo de compostagem, como mostra a Figura 6. As populações de bactérias e actinobactérias foram superiores às populações de leveduras e fungos filamentosos durante todo o processo, e é sabido que em relação a diversidade de bactérias em processos de compostagem, a diversidade de

leveduras e fungos é sempre menor (DE GANNES; EUDOXIE; HICKEY, 2013). A população de bactérias no inóculo não comercial (EM) foi de 5.322 UFC log.g⁻¹, sendo que no inóculo comercial a contagem foi superior, com 6.799 UFC log.g⁻¹. O mesmo ocorreu com a população de actinobactérias, que foi de 3.939 UFC log.g⁻¹ no inóculo EM e de 6.431 UFC log.g⁻¹ no inóculo Embiotic. A contagem de leveduras no inóculo EM foi de 5.530 UFC log.g⁻¹, inferior a contagem de leveduras no inóculo Embiotic que foi de 8.092 UFC log.g⁻¹. Não foi observado o crescimento de fungos em ambos os inóculos. A população de microrganismos no inóculo controle se mostrou superior ao inóculo EM.

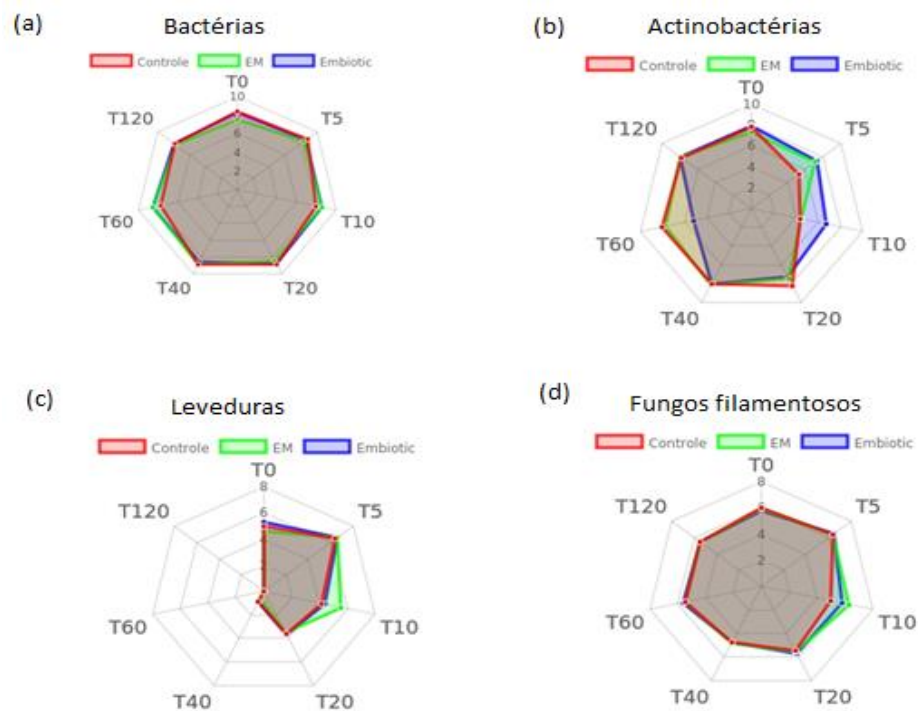


Figura 6. Variações das contagens microbianas (média de UFC log.g⁻¹) de (a) bactérias, (b) actinobactérias, (c) leveduras e (d) fungos ao longo do tempo.

As populações de bactérias foram semelhantes em ambos os tratamentos durante todo o processo, com população inicial de em média 8.097 UFC log.g⁻¹, que se manteve estável durante todo o processo de compostagem, sem diferenças significativas entre os tratamentos, na fase de

maturação os níveis diminuíram levemente, com população média entre os tratamentos de 7.873 UFC log.g⁻¹ (Fig 6a).

As populações iniciais de actinobactérias não foram significativamente diferentes entre os tratamentos, com população média de 7.720 UFC log.g⁻¹ (Fig. 6b). Alguns dias após o início do processo, na fase termófila, a contagem da população de actinobactérias no tratamento controle foi inferior à população dos tratamentos EM e Embiotic, com populações de 5.257 UFC log.g⁻¹, 7.068 UFC log.g⁻¹ e 7.344 UFC log.g⁻¹, respectivamente. Durante essa fase ocorreu a diminuição da população de actinobactérias, chegando à 4.359 UFC log.g⁻¹, 4.447 UFC log.g⁻¹ e 6.693 UFC log.g⁻¹, nos tratamentos controle, EM e Embiotic, mostrando que a população de actinobactérias era sensível à altas temperaturas. Apesar disso, López-González et al. (2015) relataram que muitos microrganismos podem retardar sua taxa de crescimento ou parar diretamente de crescer, mas não perdem sua capacidade de crescer sob a alta temperatura, ou seja, acima de 50°C. Na fase mesófila, as populações se mantiveram estáveis entre os tratamentos, com populações de em média 8.066 UFC log.g⁻¹. Já no período de resfriamento as populações foram maiores no tratamento controle em relação aos tratamentos EM e Embiotic, com populações de 8.037 UFC log.g⁻¹, 7.710 UFC log.g⁻¹ e 5.168 UFC log.g⁻¹, respectivamente. Durante a maturação, a contagem das populações se manteve alta, porém estáveis em ambos os tratamentos, com média de 7.908 log.g⁻¹. Alguns autores também relataram maior população de actinobactérias na fase de maturação em comparação com a fase termófila (WANG et al., 2017). Além disso, os efeitos da temperatura e do pH possivelmente influenciaram as actinobactérias a decompor o material orgânico (ORRICO JUNIOR et al., 2018).

No início do processo, as composteiras que receberam o inóculo comercial apresentaram uma contagem maior de leveduras (5.392 UFC log.g⁻¹) em relação ao tratamento controle (5.008 UFC log.g⁻¹) e EM (4.598 UFC log.g⁻¹) (Fig 6c). Na fase termófila a contagem da população de leveduras atingiu os valores máximos, apresentando similaridade em ambos os tratamentos,

com contagens de 6.426 UFC log.g⁻¹, 6.558 UFC log.g⁻¹, 6.630 UFC log.g⁻¹ nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. A contagem da população de leveduras foi decrescendo ao longo do processo, e se tornou nulo nas fases de resfriamento e maturação. Liu et al. (2018) estudaram a sucessão microbiana durante a compostagem e relataram que a maioria das leveduras foram eliminadas quando a temperatura excedeu 50°C, que corresponde a fase inicial, semelhante aos nossos resultados encontrados. Portanto, sabe-se que temperaturas altas tendem a inativar leveduras, o que pode ter ocorrido após a fase termófila (LIU et al., 2018).

A contagem da população de fungos filamentosos no início do processo foi superior no tratamento controle (6.055 UFC log.g⁻¹) e similar entre os tratamentos EM (5.907 UFC log.g⁻¹) e Embiotic (5.774 UFC log.g⁻¹). Na fase termófila a população de fungos atingiu seu valor máximo, com contagem de 6.378 UFC log.g⁻¹, 6.396 UFC log.g⁻¹ e 6.502 UFC log.g⁻¹ nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. Durante a fase mesófila, houve decréscimo da população de fungos, apresentando populações de 4.708 UFC log.g⁻¹, 4.820 UFC log.g⁻¹ e 4.723 UFC log.g⁻¹, nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. Ao longo das fases de resfriamento e maturação a população de fungos aumentou e se manteve constante (Fig 6d). A população de fungos apresentou níveis mais baixos nas matérias-primas e aumentou quando a fase termófila foi atingida. O que mostra que apesar da comunidade fúngica ter se mostrado sensível à temperatura, ela se adaptou bem à altas temperaturas em ambos os tratamentos. Uma vez que a população sofreu declínio após a fase termófila, de modo que a dinâmica dessas populações dependiam da temperatura, duração de cada fase e de fatores ambientais e nutricionais.

Apesar do inóculo Embiotic ter apresentado um maior número de microrganismos, isso não influenciou no processo de compostagem. As comunidades de bactérias, actinobactérias, leveduras e fungos filamentosos foram similares ao longo do processo em ambos os tratamentos. Xi et al. (2012) afirmam que os fatores que influenciam a compostagem, tais como

a temperatura e a composição da matéria orgânica, muda regularmente no decorrer do processo, os microrganismos se adaptam à esse ambiente, mudando de acordo com ele, e a inoculação pode desempenhar um papel importante na eficiência da compostagem. Embora alguns estudos mostrem que a inoculação pode melhorar o processo de compostagem, outros não apresentam melhoras justificáveis. Vargas-Garcia et al. (2010) descrevem que tal controvérsia não deveria ser uma surpresa, já que há uma alta complexidade nos eventos biológicos e diversos fatores que influenciam o processo. Sendo assim, as condições são diferentes em cada processo de compostagem, devido às diferentes matérias-primas, tipos de reatores, forma de aeração, dentre outros, e, por conseguinte, a atividade microbiana também é muito diferente.

3.3. Análises de metabólitos

As variáveis ácido succínico, málico, láctico e tartárico são as variáveis que mais contribuem para explicação da variabilidade dos dados, assim como pode ser observado na Figura 7. Sunderbeg et al. (2011) demonstraram que quatro tipos de ácidos orgânicos eram característicos do desperdício alimentar e consequentemente de resíduos orgânicos, sendo eles: ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico.

Não foi detectada a presença de ácido oxálico ao longo do processo de compostagem em nenhum dos tratamentos. O ácido cítrico esteve presente apenas no início do tratamento controle do processo de compostagem, com concentração de 0,119 g/l. No tratamento EM, além de estar presente no início do processo, apresentou uma baixa concentração na fase mesófila, com 0,012 g/l. Por outro lado, no tratamento Embiotic, houve a presença de ácido cítrico apenas na fase termófila, com concentração de 0,053 g/l.

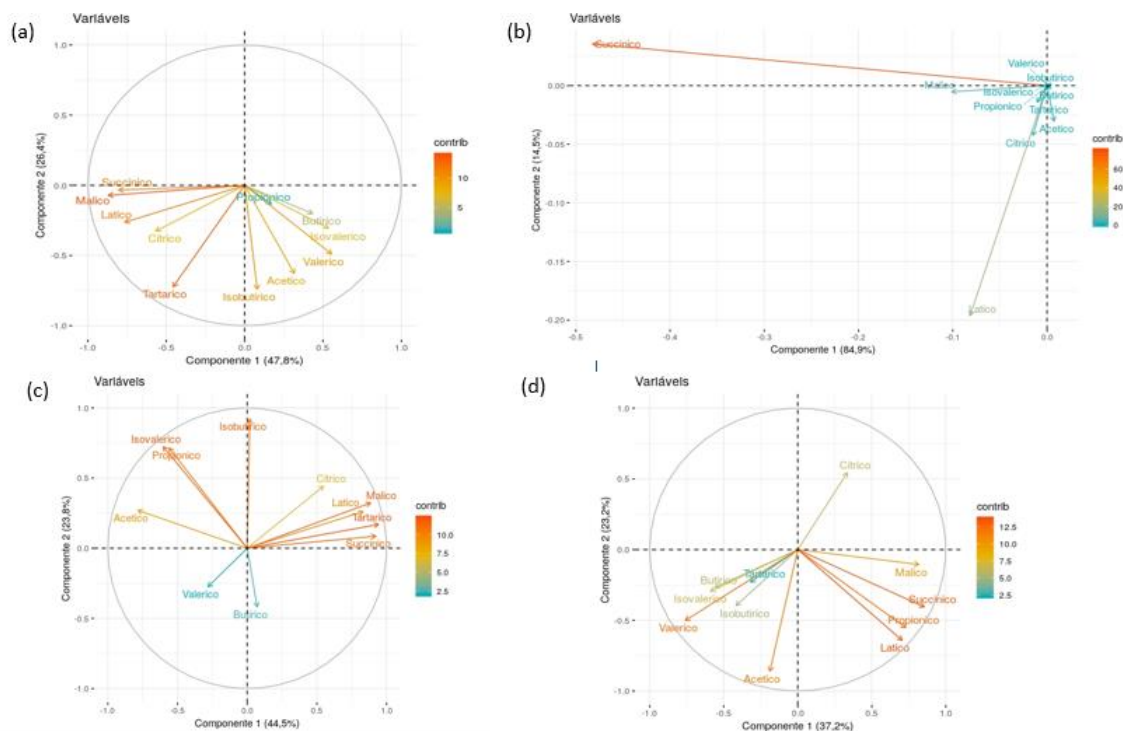


Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) dos ácidos identificação pela cromatografia líquida (HPLC). (a) compostagem de modo geral, (b) controle, (c) inóculo não comercial, (d) inóculo comercial.

O ácido tartárico esteve presente em todos os tratamentos até a fase mesófila, com concentrações médias de 0,20 g/l; 0,016 g/l e 0,21 g/l nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. O ácido málico esteve presente durante todo o processo, com exceção ao período de resfriamento em ambos os tratamentos, e no período de maturação do tratamento Embiotic. As concentrações de ácido málico decresceram ao longo do processo, com concentrações iniciais de 0,150 g/l; 0,273 g/l e 0,307 g/l e finais de 0,002 g/l e 0,004 g/l nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. O ácido succínico apresentou concentrações de 0,6 g/l; 1,3 g/l e 2,8 g/l nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente, com decréscimo dos níveis até uma média dos tratamentos de 0,051 g/l no final do processo. As concentrações de ácido láctico sofreram modificações ao longo do processo e também houve decréscimo nas concentrações, de em média 0,510 g/l no início para 0,065 g/l no final do processo. O ácido acético foi detectado no tratamento controle a partir da fase

mesófila até o final do processo, enquanto que nos outros tratamentos este ácido esteve presente em todas as fases, e suas concentrações se mantiveram estáveis em todos os tratamentos ao longo do processo, com média de 0,042 g/l. Os ácidos propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico, apresentaram baixas concentrações, sem diferenças significativas, em torno de 0,010 g/l no início de ambos os tratamentos e não foram detectados durante as fases de resfriamento e maturação.

Em todos os tratamentos o ácido succínico se apresentou em maiores concentrações. No tratamento controle o ácido succínico foi o que mais contribuiu para a variabilidade dos dados. Além disso, nos tratamentos EM e Embiotic outros ácidos tiveram concentrações elevadas, sendo no tratamento EM os ácidos tartárico, málico, propiônico, succínico, isobutírico e isovalérico, e no tratamento Embiotic, o ácido láctico.

Em caso de pouca aeração, pode ocorrer a diminuição da disponibilidade de oxigênio e a decomposição da matéria orgânica pode ser realizada por microrganismos anaeróbios. Entretanto, a ocorrência de processos de anaerobiose na pilha de compostagem pode gerar acidificação do material (HERBERTS et al., 2005). Nesse contexto, observa-se que durante as duas quedas de pH (Tabela 2) que ocorreram ao longo do processo de compostagem houve uma maior produção de ácidos (Fig 7). Todos os ácidos tiveram tendência decrescente ao longo do processo até o final da compostagem, que pode ser causada principalmente degradação de microrganismos (NAKASAKI et al., 2013; WEI et al., 2018). As produções de ácido seguiram os valores de pH, mostrando que as maiores concentrações de ácidos foram encontradas no início do processo de compostagem, e ao longo do tempo, as concentrações de ácidos diminuíram, e conseqüentemente houve uma elevação no valor do pH. Os resultados acima sugerem que a população e diversidade de microrganismos pode variar em relação a degradação de diferentes ácidos orgânicos nas diversas etapas da compostagem.

4. Conclusões

A análise da transformação da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos orgânicos mostra como resultado complexas interações físicas, químicas e microbiológicas. Os tratamentos com inóculos apresentaram vantagens em relação à qualidade do produto final em comparação com o tratamento controle, apesar do tempo de compostagem ter sido semelhante. A quantificação dos metabólitos presentes contribuiu para justificar os valores de pH e caracterizar as atividades dos microrganismos, além de sua maior ou menor abundância de acordo com as populações, ao longo do processo de compostagem.

5. Referências

- ANTUNES, L. P. et al. Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–13, 2016.
- ARUN, C.; SIVASHANMUGAM, P. Identification and optimization of parameters for the semi-continuous production of garbage enzyme from pre-consumer organic waste by green RP-HPLC method. **Waste Management**, v. 44, p. 28–33, 2015.
- BAO, N. et al. An overview of food waste management in developing countries: Current status and future perspective. **Journal of Environmental Management**, v. 157, p. 220–229, 2015.
- BOHACZ, J. Lignocellulose-degrading enzymes, free-radical transformations during composting of lignocellulosic waste and biothermal phases in small-scale reactors. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 744–754, 2016.
- BUENO, P. et al. Modelling of parameters for optimization of maturity in composting trimming residues. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5859–5864, 2009.
- CERDA, A. et al. Composting of food wastes: Status and challenges. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 57–67, 2018.
- CHEN, Y. et al. ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY Nitrite reductase genes as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria during agricultural waste composting. **Environmental biotechnology**, v. 98, p. 4233–4243, 2014.
- CHEUNG, H. N. B.; HUANG, G. H.; YU, H. Microbial-growth inhibition during composting of food waste: Effects of organic acids. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5925–5934, 2010.

COUTINHO DE ANDRADE, M. **CADERNO DOS MICRORGANISMOS EFICIENTES (EM) Instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://estaticog1.globo.com/2014/04/16/caderno-dos-microrganismos-eficientes.pdf>>. Acesso em: 7 ago. 2018.

Documentos 132 2 a edição revista Manual de Métodos de Análise de Solo Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Solos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [s.l: s.n.].

ELIOT EPSTEIN. **INDUSTRIAL COMPOSTING Environmental Engineering and Facilities Management.** [s.l: s.n.].

FREITAS SCHWAN, R. et al. **Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations** *Antonie van Leeuwenhoek*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1023%2FA%3A1010225117654.pdf>>. Acesso em: 6 ago. 2018.

GOU, C. et al. Inoculation with a psychrotrophic-thermophilic complex microbial agent accelerates onset and promotes maturity of dairy manure-rice straw composting under cold climate conditions. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 339–346, 2017.

HUANG, Y.-L. et al. Aerobic composting of digested residue eluted from dry methane fermentation to develop a zero-emission process. **Waste Management**, v. 61, p. 206–212, 2017.

KARADAG, D. et al. Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 77, p. 85–90, 2013.

LI, Z. et al. Experimental and modeling approaches for food waste composting: A review. **Chemosphere**, v. 93, p. 1247–1257, 2013.

LIU, D. et al. Changes in biochemical and microbiological parameters during the period of rapid composting of dairy manure with rice chaff. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9040–9049, 2011.

LIU, L. et al. Succession and diversity of microorganisms and their association with physicochemical properties during green waste thermophilic composting. **Waste Management**, v. 73, p. 101–112, 2018a.

LIU, Y. et al. Dynamics of bacterial composition and the fate of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during the co-composting with gentamicin fermentation residue and lovastatin fermentation residue. **Bioresource Technology**, v. 261, p. 249–256, 2018b.

LOPEZ-GONZALEZ, J. A. et al. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 574–584, 2013.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. A. et al. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 406–416, 2015.

MAKAN, A.; MOUNTADAR, M. Effect of C/N ratio on the in-vessel composting under air pressure of organic fraction of municipal solid waste in Morocco. **Waste Management**, v. 14, p. 241–249, 2012.

MENG, X. et al. Effect of pig manure on the chemical composition and microbial diversity during co-composting with spent mushroom substrate and rice husks. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 22–30, 2018.

NAKASAKI, K.; ARAYA, S.; MIMOTO, H. Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 521–528, 2013.

NAKASAKI, K.; HIRAI, H. Temperature control strategy to enhance the activity of yeast inoculated into compost raw material for accelerated composting. **Waste Management**, v. 65, p. 29–36, 2017.

NGOC, Q. et al. Inoculation of lactic acid bacterium accelerates organic matter degradation during composting. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 377–383, 2015.

ORRICO JUNIOR, M. A. P. et al. Crude glycerin in co-composting with laying hen manure reduces N losses. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 5, p. 361–367, set. 2018.

Pan, I., Dam, B., Sen, S.K., 2012. Composting of common organic wastes using microbial inoculants. *3 Biotech* 2, 127–134.

RASHAD, F. M.; SALEH, W. D.; MOSELHY, M. A. Bioconversion of rice straw and certain agro-industrial wastes to amendments for organic farming systems: 1. Composting, quality, stability and maturity indices. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5952–5960, 2010.

REN, G. et al. Evaluation of microbial population dynamics in the co-composting of cow manure and rice straw using high throughput sequencing analysis. **Microbial Biotechnology**, p. 32–101, 2016.

SAID-PULLICINO, D.; ERRIQUENS, F. G.; GIGLIOTTI, G. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1822–1831, 2007.

Sharmaa, D., Yadavb, K.D., Kumar, S. 2018. Biotransformation of flower waste composting: Optimization of waste combinations using response surface methodology. *Bioresource Technology* 270 (2018) 198–207

SHIMADZU. **C160-E009A**. [s.l: s.n.].

SRIDEVI, V. D.; REMA, • T; SRINIVASAN, • S V. Studies on biogas production from vegetable market wastes in a two-phase anaerobic reactor. **Clean Technology Environmental**, v. 17, p. 1689–1697, 2015.

SUDHARSAN VARMA, V. et al. Potential of waste carbide sludge addition on earthworm

growth and organic matter degradation during vermicomposting of agricultural wastes. **Ecological Engineering**, v. 83, p. 90–95, 2015.

SUNDBERG, C. et al. Characterisation of source-separated household waste intended for composting. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2859–2867, 2011.

TIAN, X. et al. Fungal community and cellulose-degrading genes in the composting process of Chinese medicinal herbal residues. **Bioresource Technology journal**, n. 241, p. 374–383, 2017.

VARGAS-GARCÍA, M. C. et al. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. **Waste Management**, v. 30, p. 771–778, 2010.

VOBĚRKOVÁ, S. et al. Effect of inoculation with white-rot fungi and fungal consortium on the composting efficiency of municipal solid waste. **Waste Management**, v. 61, p. 157–164, 2017.

WANG, K. et al. Transformation of organic matters in animal wastes during composting. **Journal of Hazardous Materials**, v. 300, p. 745–753, 2015.

WANG, X. et al. Effects of the feeding ratio of food waste on fed-batch aerobic composting and its microbial community. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 397–404, 2017.

WANG, X.; SELVAM, A.; WONG, J. W. C. Influence of lime on struvite formation and nitrogen conservation during food waste composting. **Bioresource Technology journal**, n. 217, p. 227–232, 2016.

ZHANG, J. et al. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2950–2956, 2011.

ZHANG, J. et al. Phanerochaete chrysosporium inoculation shapes the indigenous fungal communities during agricultural waste composting. **Biodegradation**, v. 25, p. 669–680, 2014.

ZHANG, L. et al. Effects of brown sugar and calcium superphosphate on the secondary fermentation of green waste. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 68–75, 2013.

ZHANG, L.; SUN, X. Changes in physical, chemical, and microbiological properties during the two-stage co-composting of green waste with spent mushroom compost and biochar. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 274–284, 2014.

ZHANG, L.; SUN, X. Effects of bean dregs and crab shell powder additives on the composting of green waste. **Bioresource Technology journal**, v. 260, p. 283–293, 2018.

ZHAO, H.-Y. et al. Microbial Community Dynamics During Biogas Slurry and Cow Manure Compost. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 6, p. 1087–1097, 2013.

ZHOU, Y.; SELVAM, A.; WONG, J. W. C. Chinese medicinal herbal residues as a bulking agent for food waste composting. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 182–188, 2018.

ARTIGO 2

Diversidade de leveduras e fungos filamentosos em compostagem – Estudo da persistência e suas aplicações biotecnológicas em diferentes tratamentos e fases de compostagem à base de resíduos orgânicos

Resumo

O conhecimento da composição e estrutura microbiana da compostagem é necessário para controlar o processo e determinar a qualidade do composto. Este trabalho teve como objetivo estudar e conhecer a biodiversidade microbiana em diferentes tratamentos: controle, inóculo comercial e inóculo não comercial, durante o processo de compostagem. Foram coletadas amostras para realização de contagem, isolamento e identificação de microrganismos, agrupamento dos isolados por MALDI-TOF e sequenciamento da região do rDNA. A comunidade microbiana foi avaliada durante o processo de compostagem pela análise das sequências das bandas de DGGE, além de ter sido avaliada as atividades de relevância biotecnológica e o potencial enzimático dos isolados. A contagem da população de fungos filamentosos foi superior à de leveduras durante o processo. As espécies *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Millerozyma farinosa* e *Aspergillus* spp. foram identificados como promissores produtores de enzimas. Este estudo reafirma o potencial da compostagem como fonte de microrganismos biotecnologicamente relevantes.

Palavras-chave: Isolamento, identificação, microbiota, sequenciamento, técnicas moleculares.

Abstract

Knowledge of the composition and microbial structure of compost is necessary to control the process and determine the quality of the compost. The objective of this work was to study and to know the microbial biodiversity in different treatments: control, commercial inoculum and non commercial inoculum during the composting process. Samples were collected for counting, isolation and identification of microorganisms, clustering of isolates by MALDI-TOF and sequencing of the rDNA region. The microbial community was evaluated during the composting process by the analysis of the sequences of the DGGE bands, in addition to evaluating the activities of biotechnological relevance and the enzymatic potential of the isolates. The count of the filamentous fungi population was higher than that of yeasts during the process. The species *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Millerozyma farinosa* and *Aspergillus* spp. were identified as promising

enzyme producers. This study reaffirms the potential of composting as a source of biotechnologically relevant microorganisms.

Keywords: Isolation, identification, microbiota, sequencing, molecular techniques.

1.Introdução

Nos últimos 50 anos foi notável o aumento da produção agrícola brasileira, assim como o aumento da população mundial, contribuindo significativamente para o aumento da produção de diferentes tipos de resíduos sólidos orgânicos, sendo que entre os maiores geradores de resíduos orgânicos destacam-se os restaurantes (OKAZAKI; TURN; FLACHSBART, 2008). A inadequada disposição desses resíduos pode resultar em problemas ambientais (OLIVEIRA, 2014) e relacionados à saúde pública, (MANSO; FERREIRA, 2007), além de um resultado visual indesejável (JUAREZ et al., 2015). Sendo assim, os resíduos orgânicos constituem um dos principais problemas a nível mundial, e dessa forma seu tratamento e eliminação de forma segura tornam-se cada vez mais importantes.

Na tentativa de minimizar esse problema, métodos de tratamento e disposição de resíduos orgânicos foram e vêm sendo pesquisados em todo o mundo (LIU et al., 2018), destacando-se a tecnologia da compostagem que é considerada uma abordagem amplamente aceita para eliminar os resíduos orgânicos (ELANGO et al., 2009), sendo uma tecnologia sustentável pois limita a poluição ambiental e o produto final pode ser utilizado como fertilizante de plantas (REN et al., 2016).

O conhecimento da composição e estrutura microbiana da compostagem é necessário para controlar o processo e determinar a qualidade do composto. Os microrganismos geralmente estão envolvidos na degradação de componentes durante a compostagem (BOHACZ, 2016). Embora alguns microrganismos tenham uma presença

difundida em compostos, como por exemplo espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Candida*, *Aspergillus* e *Fusarium*, outros podem ser mais ou menos abundante de acordo com a natureza das matérias-primas, as condições de compostagem e o uso de inóculos (XIE et al., 2017; MEGHARAJ et al., 2011). O interesse pelo estudo e identificação de microrganismos presentes em compostagem é cada vez maior, visto que esses microrganismos representam importante papel em relação à qualidade do composto e a velocidade do processo. Além disso, de poderem apresentar potencial biotecnológico e econômico (EMBRAPA, 2011). Nesse contexto, a compostagem tem sido considerada uma fonte rica para o isolamento de microrganismos, com aplicação para serem usados para compostagem, os produtores de enzimas que hidrolizam polímeros e metabólitos secundários está longe de ser plenamente explorado, uma vez que cada processo depende da matéria-prima original e pode fornecer diferentes estirpes.

Para identificar os microrganismos presentes durante o processo de compostagem, técnicas dependentes de cultivo podem ser utilizadas, porém nem sempre são eficientes, além de nem todos os microrganismos serem cultiváveis, tornando-se impossível isolar e identificar grande número de espécies (THEUNISSEN et al., 2014). Por esta razão, a associação de técnicas dependentes e independentes de cultivo permite a detecção, identificação e caracterização de microrganismos presentes em diversos ambientes, com maior precisão. Existem poucos relatos sobre a identificação de leveduras e fungos filamentosos em compostagem de resíduos orgânicos, com isso, os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar diferentes cepas destes microrganismos por métodos dependentes e independentes de cultivo (PCR-DGGE) com diferentes inoculantes ao longo do processo de compostagem utilizando os resíduos sólidos orgânicos do Restaurante Universitário, e avaliar a utilização dos resíduos orgânicos para

compostagem sob dois tipos de inoculantes (não comercial e comercial) sobre a dinâmica da comunidade microbiana na compostagem de resíduos orgânicos.

2. Material e Métodos

2.1. Compostagem e amostragem

A compostagem foi realizada através de uma mistura de resíduos orgânicos provenientes do Restaurante Universitário - RU, e de resíduos de jardinagem provenientes do Setor de Paisagismo, da Universidade Federal de Lavras - UFLA. O processo de compostagem foi realizado no Setor de Biodiesel da Universidade e as análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Fermentações, do Departamento de Biologia - UFLA.

O processo de compostagem consistiu em três tratamentos: controle, inóculo não comercial (EM) e inóculo comercial (Embiotic), com 6 repetições de campo, totalizando 18 composteiras que foram distribuídas em blocos inteiramente casualizados. As amostras foram coletadas ao longo do processo, de acordo com as alterações das fases de compostagem que foram monitoradas pela aferição de temperatura, como pode ser visualizado na Tabela 1.

O preparo do inóculo não-comercial foi realizado de acordo com o Caderno dos Microrganismos Eficientes (COUTINHO DE ANDRADE, 2011) e a reativação do inóculo comercial – Embiotic, foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foram realizados o isolamento e identificação dos microrganismos presentes tanto no inóculo não comercial, quanto no inóculo comercial.

Tabela 1. Amostras coletadas durante o processo de compostagem.

Amostra	Dias de amostragem	Fase	Temperatura (C°)
Controle	0	M	37,0
EM	0	M	37,0
Embiotic	0	M	37,0
Controle	5	TER	57,9
EM	5	TER	60,3
Embiotic	5	TER	57,5
Controle	10	TER	65,4
EM	10	TER	62,8
Embiotic	10	TER	55,1
Controle	20	TER	54,1
EM	20	TER	56,2
Embiotic	20	MÊS	43,3
Controle	40	MÊS	40,8
EM	40	MÊS	41,9
Embiotic	40	MÊS	36,2
Controle	60	COL	41,7
EM	60	COL	40,7
Embiotic	60	COL	36,6
Control	120	PF	39,5
EM	120	PF	36,3
Embiotic	120	PF	35,5

M: mistura inicial; TER: termófila; MÊS: mesófila; COL: resfriamento; PF: produto final.

2.2. Métodos analíticos – análises físico-químicas

As metodologias utilizadas para as análises físico-químicas de umidade foram determinadas de acordo com o Manual de Análises Químicas de Solos (EMBRAPA, 2011).

2.3. Contagem, isolamento e identificação de leveduras e fungos filamentosos

Foram adicionados 25g de amostra de cada tempo de fermentação e de cada tratamento em 225 mL de água peptonada, em shaker com agitação de 120 rotações por minuto (rpm) durante 30 min à temperatura ambiente (LOPEZ-GONZALEZ et al., 2013). A partir da primeira diluição, foram realizadas diluições seriadas, em água peptonada estéril até a diluição 10^7 . Uma alíquota de 0,1mL foi espalhada em meio apropriado para

cada grupo microbiano, como mostra a Tabela 2. O plaqueamento foi realizado em duplicata.

Tabela 2. Meios de cultura utilizados para cada grupo de microrganismos.

Grupo de MO.	Meio de Cultura	Composição (em g L ⁻¹)	Incubação	Isolamento
Leveduras	Yeast Extract Peptone Glucose - YEPG	10 g extrato de levedura, 10g peptona bacteriológica, 20g glicose, 20g ágar com pH 3.5	28°C por 48 horas	YEPG
	Ágar Dicloran Rosa Bengala - DRBC	5g digestão enzimática dos tecidos vegetais finais, 10g glicose, 1g fosfato de monopotássio, 0,5 gsulfato de magnésio, 2mg dicloran, 25mg rosa bengal, 15g ágar		
Fungos filamentosos	Potato Dextrose Ágar - BDA	200g batatas cruas, 20g dextrose, 20g ágar, 1L água destilada	25°C por 7 dias	MA (em g L ⁻¹ : 20g extrato de malte, 20g ágar)
	Dicloran Glicerol Ágar - DG18	8g glicose, 4g peptona, 0,8g fosfato de potássio dibásico, 0,4g sulfato de magnésio-7 H ₂ O, 176g glicerol, 15g ágar, 0,1g cloranfenicol		

A partir da contagem total foram selecionadas para análise da morfologia de colônias de leveduras, as placas que apresentaram contagem entre 30 e 300 colônias. E para análise da morfologia das colônias de fungos, as placas com contagem entre 15 e 150 colônias. Em seguida foi determinado o número de isolados através do cálculo da raiz quadrada do número total de isolados de cada morfotipo conforme mencionado no *Bacteriological Manual for Foods* (ANDREWS, W. H. & HAMMACK, 1972).

Os parâmetros utilizados na caracterização da morfologia das colônias de leveduras foram forma, tamanho, superfície, bordas e perfil e características

microscópicas. Para a caracterização morfológica celular e avaliação da pureza dos isolados foram realizados esfregaços em lâminas de vidro com uma alçada dos isolados puros com uma gota de água destilada, em seguida foi adicionado o corante azul de metileno (20 mL de ácido láctico, 40mL de glicerina, 20 mL de água e 0,05g de azul de Trypan ou azul de metileno). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico utilizando a objetiva de 40x e as leveduras foram classificadas de acordo com a sua morfologia celular como elipsoides, globulosas ou cilíndricas e de acordo com o tipo de reprodução como brotamento ou fissão binária, além de ser observada a presença ou ausência de pseudo-hifas. Os isolados de leveduras foram preservados em criotubos contendo 1,0mL de meio caldo YEPG acrescido de 1,0mL de glicerol (40%) e depositados na Coleção de Microrganismos da Microbiologia Agrícola (CCMA) com os códigos 1458 à 1504.

A análise da morfologia das colônias de fungos filamentosos observou-se cor da colônia, cor do micélio, cor do reverso, ausência ou presença de estrias. Após as observações os fungos filamentosos foram agrupados de acordo com as suas características macroscópicas. Para a identificação dos gêneros de fungos filamentosos foram feitas lâminas à fresco com o corante azul de metileno e observadas as estruturas morfológicas microscópicas (seriação, forma e tamanho da vesícula e de conídios, comprimento e textura da estipe). Posteriormente, esses fungos foram repicados em meios específicos, de acordo com os gêneros encontrados. Os fungos identificados como pertencentes ao gênero *Cladosporium* foram repicados em meio MEA (em g L⁻¹: 20g extrato de malte, 1g peptona bacteriológica, 20g glicose, 20g ágar) e incubados a 25°C por 7 dias. Os fungos identificados como pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram repicados em meio CYA (em g L⁻¹: 1g K₂HPO₄, 10mL, concentrado de Czapek, 5g extrato de levedura, 1mL solução metálica, 20g ágar) e no meio MEA e

incubados nas temperaturas 25°C e 37°C por 7 dias. Após o período de incubação foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos e a partir destas características utilizou-se a chave de identificação para os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* proposta por Klich, M. A. (2002) e as descrições do gênero *Cladosporium* citadas por Bensch et al. (2012), para identificação a nível de espécie.

A purificação e isolamento dos fungos filamentosos foram realizadas no Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia, e a identificação foi realizada no laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos - UFLA. Os isolados de fungos filamentosos foram preservados de acordo com a técnica de preservação em papel de filtro (BATISTA et al., 2016) e mantidos sob congelamento no Laboratório de Fermentações /DBI-UFLA.

2.4. Identificação dos isolados

2.4.1 Agrupamento dos isolados por MALDI-TOF

Isolados purificados foram submetidos a análises do seu perfil de proteínas ribossomais a fim de realizar um agrupamento e posterior identificação das espécies, obtendo ao final colônias que posteriormente foram analisadas em triplicata no equipamento ultrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics; Bremen, Germany).

As colônias de leveduras foram repicadas em placas de Petri com meio YEPG por 24 horas e aproximadamente 1 µg de biomassa de cada isolado foi transferido para um eppendorf contendo 6 µL de uma solução de ácido fórmico 25%. As amostras foram agitadas em vórtex para permitir a homogeneização das células e após a agitação, 0,5 µL

da amostra foi colocado sobre a placa de aço inoxidável de MALDI-TOF MS (FlexiMass Shimadzu Biotech, Buckinghamshire, UK).

Os fungos filamentosos foram crescidos em meio MA por 3 dias à 25°C e aproximadamente 0,5 µg de micélio ou uma mistura de micélio/espóra da colônia em crescimento foi transferida diretamente da placa de cultura para a placa de MALDI-TOF MS.

Posteriormente, 0,5 µL da solução de matriz α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, Fluka; Buchs, Switzerland) saturada em uma solução orgânica, foi adicionada sobre as amostras de leveduras e fungos filamentosos e misturado suavemente. As placas com as amostras secas foram analisadas em MALDI-TOF MS.

Os espectros de massa foram analisados pelo software MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para a possível identificação microbiana comparando com o banco de dados.

2.4.2. Sequenciamento da região do rDNA

Representantes de cada grupo gerado pelo MALDI-TOF foi levado para sequenciamento. A identificação dos isolados foi determinada com base no sequenciamento parcial do gene rDNA 18S (eucariotos). Para a extração do DNA das leveduras, as colônias foram suspensas em 500 µL de água ultrapura estéril e o DNA foi extraído de acordo com o kit QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN). A região ITS de leveduras foi amplificada usando primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

Para a extração do DNA de fungos, foi utilizado o protocolo de extração manual fenol:clorofórmio. A região Calmodulina foi amplificada usando o primer CMD5 -

Forward (5' CCGAGTACAAGGAGGCCTTC 3') and CMD6 - Reverse (5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3').

Os produtos da PCR foram certificados de sua pureza e enviados para sequenciamento. Os resultados das sequências foram comparados com o GenBank (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para identificação das espécies de microrganismos.

2.5. Avaliação do perfil da comunidade microbiana durante o processo de compostagem

Os diferentes tempos de amostragem da compostagem (0, 5, 10, 20, 40, 60 e 120) foram usados para avaliação da diversidade da comunidade de microrganismos eucarióticos através da técnica de PCR-DGGE.

2.5.1. Extração do DNA total e amplificação por reação da cadeia em polimerase (PCR)

As amostras que foram retiradas de acordo com as mudanças de fases da compostagem, foram diluídas em água destilada (25 gramas de amostra + 225mL de água destilada estéril), e o DNA foi extraído de acordo com o Kit QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit.

Após a extração, as amostras foram submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR). O produto da PCR foi checado em gel de agarose 1%. As reações para amplificação da comunidade de eucariotos utilizaram primers da região rRNA 18S (NL1 com grampo GC e LS2). Para a amplificações a PCR usou o volume final de reação de 25 µl que continha: 17,2 µl de água MilliQ estéril, 5 µl de Tampão Master Mix 5X (Promega), 0,5 µl de dNTP's, 0,5 µl de cada primer rRNA 18S, 0,1 µl de Taq DNA

polimerase (Invitrogen), 0,25 µl de MgCl₂ e 1 µl de DNA. O termociclador foi programado da seguinte maneira: Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 etapas de desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento dos primers a 55°C por 1 minuto e extensão da fita de DNA a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 7 minutos e 4°C como temperatura de armazenamento.

2.5.2. Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os produtos da PCR foram analisados por DGGE, utilizando um sistema vertical DCode (Bio-Rad). Os produtos de PCR foram aplicados na quantidade de 10 µl e 10 µl de corante da corrida (2% de azul de bromofenol, 2% de xileno cianol, glicerol 100% e água MilliQ) em gel de poliacrilamida 8% (m/v) em tampão 0,5X TAE com gradiente de desnaturação variando de 40 a 60% (100% correspondeu a 7 M de uréia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em uma voltagem constante de 150V por 4 horas, com uma temperatura constante de 60°C. Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000 (v/v)). A imagem foi capturada e fotografada em Transluminador.

2.5.3. Análise por sequenciamento das bandas de DGGE

As bandas diferentes e constantes foram excisadas dos géis de DGGE com uma lâmina estéril e o DNA foi eluído em água ultrapura estéril. O DNA foi reamplificado usando a mesma condição de PCR descrita para a realização do DGGE das amostras. Os produtos de PCR foram sequenciados pela Macrogen e as sequências obtidas foram

alinhas com o banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (National Centre for Biotechnology Information, Maryland, USA).

2.6. Análises de atividade biotecnológica

Os microrganismos isolados foram testados quanto à capacidade de produzir oito enzimas importantes para a compostagem: atividades ligninolítica, celulolítica, hemicelulolítica, amilolítica, pectinolítica, proteolítica, lipolítica e de amonificação. Os testes foram realizados em placas com meio sólido contendo o substrato apropriado para a atividade específica. No caso das leveduras, cada isolado foi padronizado em 3 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) a 10^7 células/mL, de acordo com a escala de McFarland, a partir do isolado cultivado em meio YEPG e incubado à 28°C por 48 horas. Em cada placa das enzimas a serem avaliadas foram inoculadas alíquotas de 10uL de células de leveduras à 10^7 .

Em relação aos fungos, pedaços de 6 mm de diâmetro de uma colônia crescida por 3 dias em MA, foram colocados no centro das placas contendo as enzimas específicas. Os meios inoculados foram incubados a 28°C e 25°C, para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Na Tabela 3 podem ser visualizados os meios específicos utilizados para cada enzima.

Para revelação das atividades celulolítica, hemicelulolítica, amilolítica e proteolítica foi utilizado solução de iodo e os resultados observados foram com base na presença e ausência de halo claro ao redor das colônias de leveduras e fungos filamentosos.

Tabela 3. Atividades enzimáticas e seus respectivos meios de cultura, tempos de incubação e modo de revelação.

Atividade	Meio (em g.L ⁻¹)	^a TI	Revelação	Autor
Lignolítica	1g KH ₂ PO ₄ ; 0,5g C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆ ; 0,5g MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,01CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,01g extrato de levedura; 0,001g CuSO ₄ .5H ₂ O; 0,001g Fe ₂ (SO ₄) ₃ ; 0,001g MnSO ₄ .4H ₂ O; 0,1g Azure-B; 20g ágar.	7	Descoloração em torno da colônia cultivada com Azure-B	(WIDIASTUTI; WULANINGTYAS, 2008)
Celulolítica	2g carboximetilcelulose; 2g NaNO ₃ ; 0,5g MgSO ₄ ; 1g K ₂ HPO ₄ ; 0,5g KCl; 0,2g peptona; 20g ágar	7	Solução de iodo	(KASANA et al., 2008)
Hemicelulolítica	6,7g YNB; 10g xilana; 20g ágar	5	Solução de iodo	(KASANA et al., 2008)
Amilolítica	10g peptona; 10g extrato de levedura, 20g aido solúvel, 20 g ágar	3	Solução de iodo	(REMPEL et al., 2018)
Pectinolítica	5g glicose, 5g ácido poligalacturônico, 6g KH ₂ PO ₄ ; 1g extrato de levedura; 2g (NH ₄)SO ₄ ; 15g ágar + 1ml/1L (FeSO; MgSO ₄ ; CaCl ₂ ; H ₃ BO ₃ ; MnSO ₄ ; ZnSO ₄ .7H ₂ O; CuSO ₄ .5H ₂ O; MoO ³)	5	solução de bromide hexadeciltrimetilamônio 1%	(FERREIRA et al., 2013)
Proteolítica	10g extrato de levedura; 20g glicose; 20g peptona; 20g ágar; 20g caseína	3	Solução de iodo	(SCATAMBURLO et al., 2015)
Lipolítica	10g peptona; 5g NaCl; 0,01 CaCl ₂ ; 20g ágar	5	Halo claro e cristalizado	(FUCIÑOS et al., 2005)
Amonificação	CYA + 10g asparagina; 0,09g vermelho de fenol	15	Halo de coloração rosada	(JANA; ROY, 1985)

^a: TI = tempo de incubação em dias.

2.7. Determinação enzimática

A determinação enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975), segundo a fórmula:

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Para a avaliação do potencial enzimático, é recomendado um índice enzimático > 2,0. Dessa forma, os isolados que exibirem os maiores IE são os que possuem maior atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA et al., 2006).

2.8. Análises estatísticas

Os dados de contagem das populações, abundância relativa e atividade enzimática foram submetidos à análises estatísticas através do software R (R CORE TEAM, 2018).

3. Resultados e discussão

3.1. Análises do composto

Os parâmetros físico-químicos foram analisados nas amostras coletadas e apesar da irrigação periódica, a umidade não se manteve ao redor de 40%, mas ainda assim foi garantido um valor que não restringiu as reações biológicas, e a aeração forçada permitiu a disponibilidade de oxigênio nas composteiras. A Figura 1 apresenta o gráfico de dispersão das variáveis umidade e rebaixamento para os diferentes tipos de tratamento e fases do processo de compostagem. A variável umidade apresentou uma queda no

decorrer do tempo. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos. Todas as composteiras possuíam 100cm de altura, sendo que no final do processo as alturas eram de 53 cm, 51,4 cm e 50,6 cm nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. Pode-se verificar que a variável rebaixamento tende a diminuir, no decorrer do tempo e entre os tratamentos. A redução na altura da pilha de compostagem pode ser um indicativo de evolução do processo, devido à decomposição do material de origem em partículas menores, o que implica na redução da porosidade da pilha.

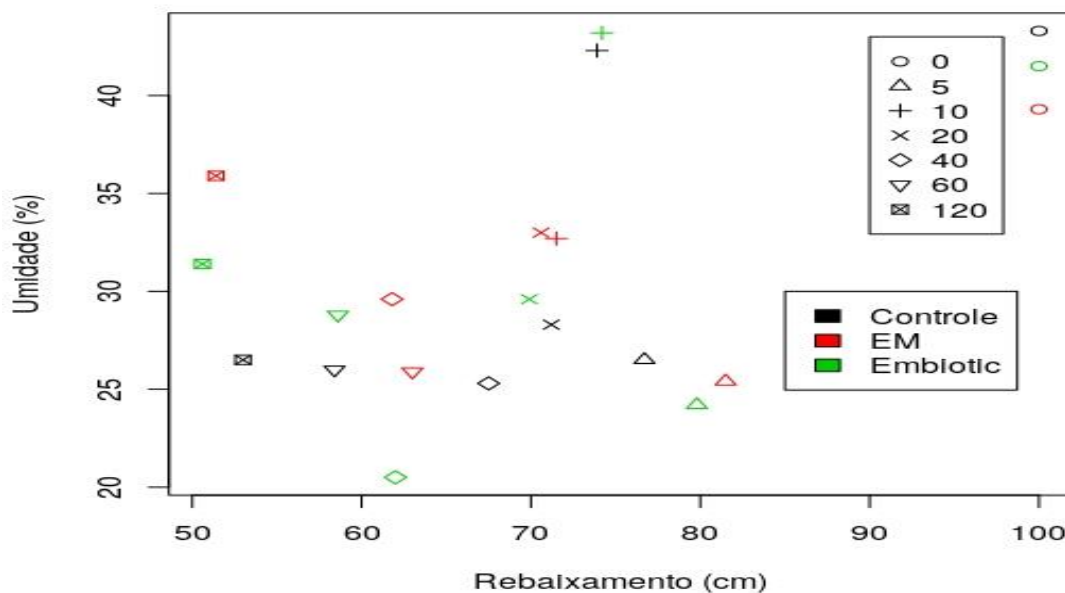


Figura 1. Dispersão das variáveis umidade (%) e rebaixamento (cm) para os diferentes tipos de tratamento e tempos de amostragem.

3.2. Análises microbiológicas

A população de leveduras no inóculo EM foi de 5.530 UFC log.g⁻¹, inferior a contagem e abundância de leveduras no inóculo Embiotic que foi de 8.092 UFC log.g⁻¹ (Fig 2a). Não foi observado o crescimento de fungos em ambos os inóculos adicionados ao composto (Fig 2b). As comunidades de leveduras e fungos sofreram alterações durante

o processo de compostagem. As contagens totais de leveduras e fungos filamentosos e sua abundância relativa em relação à contagem total são apresentados na Figura 2c e d.

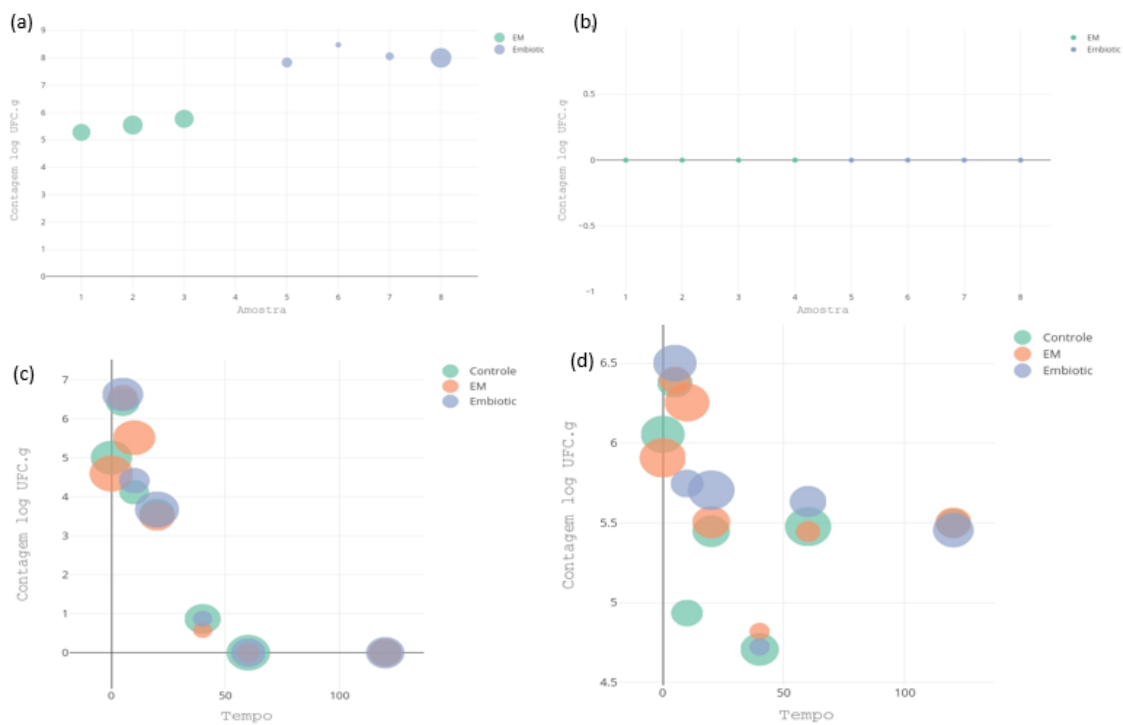


Figura 2. Contagens de colônias (Log UFC g⁻¹) e abundância relativa [(contagem de isolados/contagem total de grupos) x 100] dos isolados onipresentes em cada tratamento ao longo do processo de compostagem (ver Tabela 1 para características da amostra). Tamanhos de bolha (diâmetro) representam abundância relativa (%); bolha de abundância máxima é incluída como referência. Cada gráfico mostra a população dos isolados dos inóculos e dos grupos de microrganismos analisados em cada tratamento ao longo do processo de compostagem: (a) população de leveduras nos inóculos; (b) população de fungos nos inóculos, (c) leveduras ao longo do processo de compostagem; (d) fungos ao longo do processo de compostagem.

As contagens da comunidade de fungos filamentosos foram superiores à da comunidade de leveduras durante todo o processo de compostagem. No início do processo, as composteiras que receberam o inóculo comercial apresentaram uma contagem superior de leveduras (5.392 UFC log.g⁻¹) em relação ao tratamento controle (5.008 UFC log.g⁻¹) e EM (4.598 UFC log.g⁻¹), respectivamente. Na fase termófila a contagem da população de leveduras atingiu os valores máximos, apresentando

similaridade em ambos os tratamentos, com contagens de 6.426 UFC log.g⁻¹, 6.558 UFC log.g⁻¹, 6.630 UFC log.g⁻¹ nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. A contagem da população de leveduras foi decrescendo ao longo do processo, e se tornou nulo nas fases de resfriamento e maturação. Essa dinâmica de crescimento é típico de leveduras, que geralmente estão associadas ao início do processo de compostagem devido as condições ambientais com grande disponibilidade de oxigênio e baixo pH, por exemplo (LANGARICA-FUENTES et al., 2014). Além disso, alguns microrganismos selvagens presentes na matéria-prima ou provenientes do entorno, não são competitivos o suficiente para permanecer durante todo o processo seja pela falta de capacidade metabólica ou pela incapacidade de se adaptar às condições ambientais em constante mudança no processo de compostagem (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2015). A contagem de leveduras associada ao processo de decomposição da matéria orgânica em solos florestais obtiveram resultados semelhantes ao deste estudo (ZHANG et al., 2014).

A contagem da população de fungos filamentosos no início do processo foi estatisticamente maior no tratamento controle (6.055 UFC log.g⁻¹) e similar entre os tratamentos EM (5.907 UFC log.g⁻¹) e Embiotic (5.774 UFC log.g⁻¹). Na fase termófila a população de fungos atingiu seu valor máximo, com contagem de 6.378 UFC log.g⁻¹, 6.396 UFC log.g⁻¹ e 6.502 UFC log.g⁻¹ nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. Os fungos termófilos são considerados chave para a degradação de frações poliméricas (SUNDBERG et al., 2011). Durante a fase termófila pode ocorrer uma maior contagem de fungos filamentosos pois estes possuem esporos que são mais resistentes à altas temperaturas. Na fase mesófila, houve declínio da população de fungos, apresentando populações de 4.708 UFC log.g⁻¹, 4.820 UFC log.g⁻¹ e 4.723 UFC log.g⁻¹, nos tratamentos controle, EM e Embiotic, respectivamente. Ao longo das fases de resfriamento e maturação a população de fungos aumentou e se manteve constante em

ambos os tratamentos. É normal que os fungos aumentem durante a fase de maturação da compostagem, como resultado da quebra de substratos e da presença de fatores ambientais favoráveis (MENG et al., 2018). A população de fungos apresentou contagens mais baixas nas matérias-primas, porém, aumentou quando a fase termófila foi atingida, o que mostra que a comunidade fúngica se adaptou bem à altas temperaturas em ambos os tratamentos. Apesar de a comunidade fúngica ter se mostrado sensível à temperatura, uma vez que a população sofreu declínio após essa fase termófila, de modo que a dinâmica dessas populações dependia da temperatura, duração de cada fase e de fatores ambientais e nutricionais.

O tratamento Embiotic apresentou uma maior abundância e população de leveduras, seguido do tratamento EM, isso não influenciou no processo de compostagem (Fig. 2c). A abundância e a população de fungos se mantiveram constantes ao longo do processo (Fig. 2d). Pode ser observado que não houveram diferenças significativas nas populações de leveduras e fungos nos diferentes tratamentos, ou seja, o agrupamento das amostras de diferentes tratamentos de acordo com o critério térmico mostrou a quase completa ausência de diferenças na estrutura da comunidade microbiana. Nota-se que existem divergências entre resultados positivos e negativos em relação ao uso de inoculantes, Nakasaki & Hirai (2017) usou a levedura *Pichia kudriavzevii* como inóculo para compostagem de resíduos orgânicos, levando a eliminação da fase lag e a estimulação da microbiota, no entanto, isso não afetou a qualidade do composto final. Em contrapartida, foi relatado que vários benefícios foram obtidos usando um inóculo comercial contendo em sua composição bactérias do ácido lático e leveduras, como redução no tempo do processo, aumento da degradação e melhoria na qualidade do composto final (MANU; KUMAR; GARG, 2017).

Quando se fala em diversidade microbiana, é necessário o uso de pelo menos dois meios de cultura para o cultivo de cada grupo de microrganismos. O uso de diferentes meios é importante para isolar e identificar diferentes grupos de microrganismos. O meio YEPG é usado para avaliar o crescimento de leveduras, o meio DRBC é um meio seletivo, enquanto o meio BDA é usado para crescimento de fungos filamentosos no geral e o meio DG18 para fungos filamentosos com baixa atividade de água (PFANNEBECKER, SCHIFFER-HETZ, FROHLICH, & BECKER, 2016). Sendo assim, a Figura 3 mostra a população e abundância relativa de microrganismos em diferentes meios ao longo do processo de compostagem. A Fig 3a mostra que a população e abundância de leveduras foram constantes nos diferentes meios, e não houve crescimento de leveduras no meio DG18. Não foi observado o crescimento de fungos em nenhum dos meios de cultura, em ambos os inóculos, como pode ser visualizado na Fig 3b.

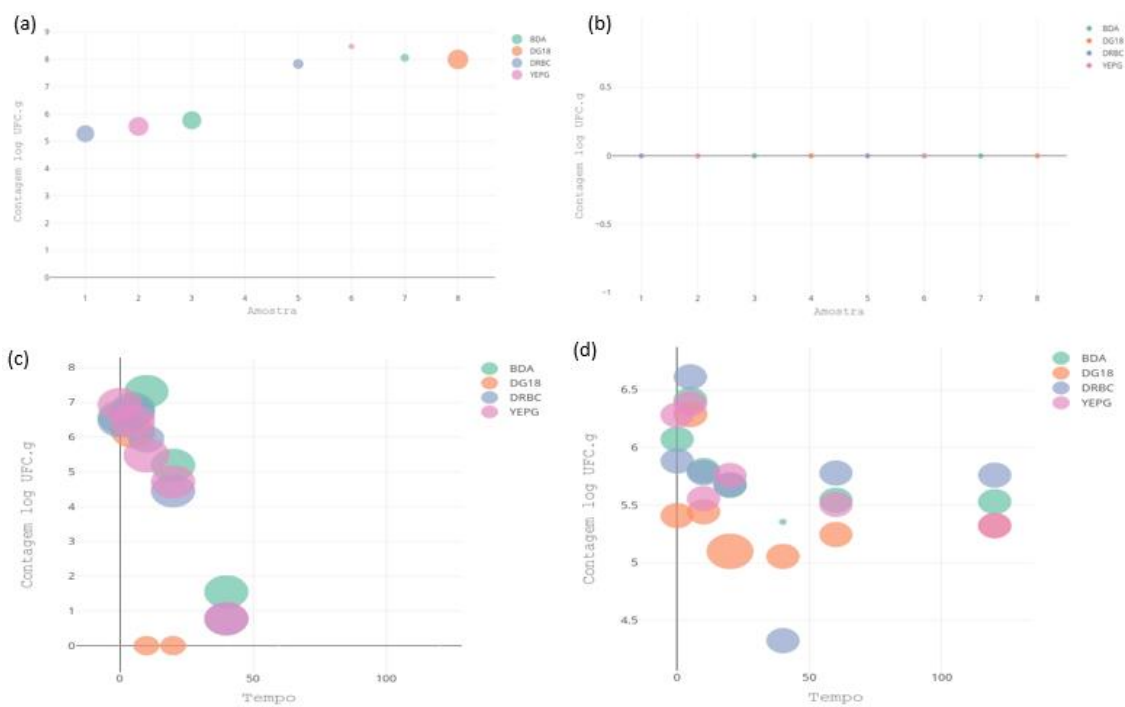


Figura 3. Contagens de colônias (Log UFC g^{-1}) e abundância relativa [(contagem de isolados/contagem total de grupos) $\times 100$] dos isolados onipresentes em cada meio de cultura ao longo do processo de compostagem (ver Tabela 1 para características da amostra). Tamanhos de bolha (diâmetro) representam abundância relativa (%); bolha de abundância máxima é incluída

como referência. Cada gráfico mostra a população dos isolados dos inóculos e dos grupos de microrganismos analisados em cada meio de cultura ao longo do processo de compostagem: (a) população de leveduras nos inóculos; (b) população de fungos nos inóculos, (c) leveduras ao longo do processo de compostagem; (d) fungos ao longo do processo de compostagem.

De acordo com a Fig 3c, as leveduras cresceram bem nos meios BDA, DRBC e principalmente no meio YEPG onde foram observadas maiores populações e abundância, porém houve pouco crescimento no meio DG18. A Fig. 3D mostra que não houveram diferenças discrepantes entre as populações de fungos nos diferentes meios. Tanto a população de leveduras quanto a de fungos filamentosos se mantiveram constantes em relação à abundância relativa no decorrer do processo. Nesse contexto, embora não exista uma composição e uma dinâmica única da comunidade, uma comunidade fúngica mais complexa e diversificada é geralmente encontrada nas fases iniciais da compostagem, enquanto os estágios posteriores costumam ser caracterizados por formas mais homogêneas (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2015).

3.3. Identificação de microrganismos presentes nos inóculos e ao longo do processo de compostagem

Apesar do fato de que a compostagem é um processo de desenvolvimento natural, tem sido relatado que a adição de inoculantes pode resultar no aumento da taxa de degradação da matéria orgânica. Esses inoculantes podem ser uma cepa específica (HOU et al., 2017), um mix comercializado de várias espécies (MANU; KUMAR; GARG, 2017), ou até mesmo composto maduro (KINET et al., 2015). De um modo geral, o processo de compostagem é realizado com diferentes microrganismos visando degradar a matéria orgânica, sendo que o monitoramento da sucessão desses microrganismos é fundamental para o gerenciamento eficaz do processo de compostagem, taxa de

biodegradação e qualidade do composto, uma vez que o aparecimento de alguns microrganismos reflete a maturidade do mesmo (JURADO et al., 2014).

A Figura 4 apresenta a identificação dos microrganismos presentes nos inóculos que foram adicionados ao composto. A espécie *Pichia kudriavzevii* foi detectada em ambos os inóculos. No inóculo não comercial foram detectadas além desta, as espécies de leveduras *Candida tropicalis*, *Candida inconspicua*, *Millerozyma farinosa* e *Blastobotrys adenivorans* (Fig. 4a). No inóculo comercial foram encontrados um número inferior de espécies, sendo identificadas como *Hanseniaspora opuntiae* e *Wickerhamomyces anomalus* (Fig. 4b).

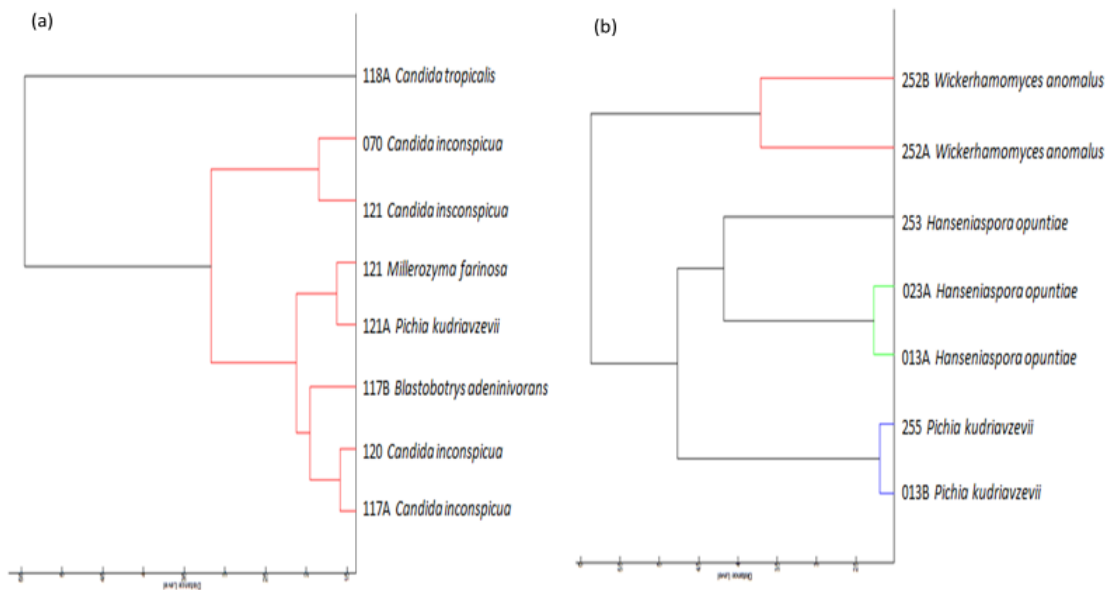


Figura 4. Dendrograma de leveduras presentes nos inóculos. (a) inóculo não comercial, (b) inóculo comercial.

A levedura *Pichia kudriavzevii* pode degradar ácidos orgânicos e, assim, aumentar o valor do pH do material de compostagem, dessa forma a proliferação de bactérias é promovida e consequentemente a degradação vigorosa da matéria orgânica é alcançada (NGOC et al., 2015). Choi & Park (1998) inocularam a levedura termófila,

Kluyveromyces marxianus em compostagem de resíduos orgânicos sob condições controladas de temperatura de 50°C e a levedura reduziu a acidez e aumentou a comunidade bacteriana termófila durante o processo de compostagem. Um consórcio de bactérias psicotróficas e fungos celulolíticos termofílicos, com as espécies de *Aspergillus niger* e *Penicillium commune*, foi inoculado em compostagem de palha de arroz e resíduos de laticínio, acelerando do início e a maturidade da compostagem sob condições de clima frio (GOU et al., 2017). Barwinski (2015) desenvolveu um consórcio de microrganismos com *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* e *Rhodopseudomonas palustris* para utilização como inoculante no processo de compostagem e constatou que a decomposição dos resíduos orgânicos foi acelerada com o uso desse. O efeito de vários aditivos em compostagem de resíduos verdes foram úteis para facilitar o processo de compostagem, e refletiu também sobre a taxa de degradação da matéria orgânica e a qualidade do composto acabado (GABHANE et al., 2012). A levedura *Pichia kudriavzevii* foi utilizada como inóculo em compostagem de ração de coelhos, e degradou rapidamente os ácidos orgânicos presentes no material levando a um aumento no pH e causando aumento das bactérias mesófilas e termófilas, e apesar da levedura ter morrido com o aumento da temperatura do composto, ela afetou as fases iniciais de compostagem antes do fase termófila e acelerou o processo de compostagem (NAKASAKI; ARAYA; MIMOTO, 2013; NAKASAKI; HIRAI, 2017). Uma avaliação da influência nas atividades enzimáticas microbianas e na qualidade do composto verificou que a adição de fungos aos resíduos sólidos urbanos poderia ser uma estratégia útil, e em comparação com a amostra do controle, ela acelera a degradação dos resíduos (VOBĚRKOVÁ et al., 2017).

Embora alguns estudos mostrem que a inoculação pode melhorar o processo de compostagem, outros não apresentam melhoras justificáveis, assim como o presente trabalho. Vargas-Garcia et al. (2005) descrevem que tal controvérsia não deveria ser uma

surpresa, já que há uma alta complexidade nos eventos biológicos e diversos fatores que influenciam o processo. Sendo assim, as condições são diferentes em cada situação e, por conseguinte, a atividade microbiana também é muito diferente.

A identificação de leveduras e fungos presentes nos diferentes tratamentos ao longo do processo de compostagem são apresentados na Tabela 2 e Figura 5, respectivamente. Alguns gêneros e espécies de fungos em comum foram observadas em todos os tratamentos, sendo eles: *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus caepitosus*, *Penicillium solitum*, *Rhizopus* e *Cladosporium*.

Nos tratamentos controle e Embiotic foram observadas 14 diferentes espécies de fungos filamentosos, superior aos resultados encontrados no tratamento EM, em que foram observados 10 microrganismos. Os quatro fungos filamentosos que estavam presentes apenas no tratamento controle e Embiotic foram *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp., *Penicillium solitum* e *Emericella* spp. Observa-se que a diversidade de fungos foi similar entre os tratamentos e não causou divergências na qualidade do produto final. A Figura 5 apresenta fotos das características das colônias e reverso, das estruturas microscópicas dos fungos que foram identificados nesse estudo.

3.4. *Microrganismos persistentes durante o processo de compostagem*

Durante o processo de compostagem, a comunidade de microrganismos foi analisada de modo a revelar leveduras e fungos que persistiam ao longo do processo. O critério utilizado para selecionar microrganismos persistentes em cada tratamento foi a sua detecção em 2 ou mais tempos de amostragem que foram realizados durante o processo. A Tabela 3 apresenta a identificação das espécies de leveduras e fungos

filamentosos com base na similaridade de sequências e mostra os diferentes microrganismos que foram isolados em cada tratamento. Dentre a ampla coleção de isolados obtidos ao longo do processo de compostagem (1.060 isolados, sendo 363 leveduras e 697 fungos) apenas 3 isolados de leveduras em cada tratamento foram detectados em 2 ou mais tempos de amostragem.

A espécie *Issatchenkia orientalis* foi persistente em ambos os tratamentos, além das espécies *Blastobotrys adenivorans* e *Pichia kudriavzevii* no tratamento controle, *Blastobotrys adenivorans* e *Millerozyma farinosa* no tratamento EM e *Pichia kudriavzevii* e *Candida tropicalis* no tratamento Embiotic. As leveduras foram representadas principalmente pelas espécies *Issatchenkia orientalis*, *Millerozyma farinosa* e *Wickerhamomyces anomalus*, que estiveram presentes nas fases termófilas de todos os tratamentos. Algumas espécies de leveduras encontradas não haviam sido relatadas em outros processos de compostagem, sendo elas *Blastobotrys adenivorans*, *Blastobotrys raffinosisfermentans* e *Bipolaris sorokiniana*. *Blastobotrys* é um anamórfio de *Saccharomycetales*, e atualmente não é identificado usando diagnósticos padrão (JAHN, BAETIING, M., EGLI, & TAMM, 2018). *Bipolaris sorokiniana* é uma espécie responsável por 22% de perda de rendimento em lavouras de trigo de regiões quentes e úmidas, causando a doença da mancha (MANGHWAR, 2018).

Fungos do gênero *Aspergillus* spp. persistiram em todos os tratamentos, além do gênero *Rhizopus* que persistiu nos tratamentos controle e EM, e a espécie *Aspergillus fumigatus* persistiu nos tratamentos EM e Embiotic. Os fungos filamentosos foram representados principalmente pelo gênero *Aspergillus* spp. que além de estar presente em ambos os tratamentos, predominaram em todos os tempos de amostragem.

Resultados semelhantes foram obtidos em processo de compostagem lignocelulósica à base de resíduos de plantas de tomateiro secos ao sol e lascas de madeira

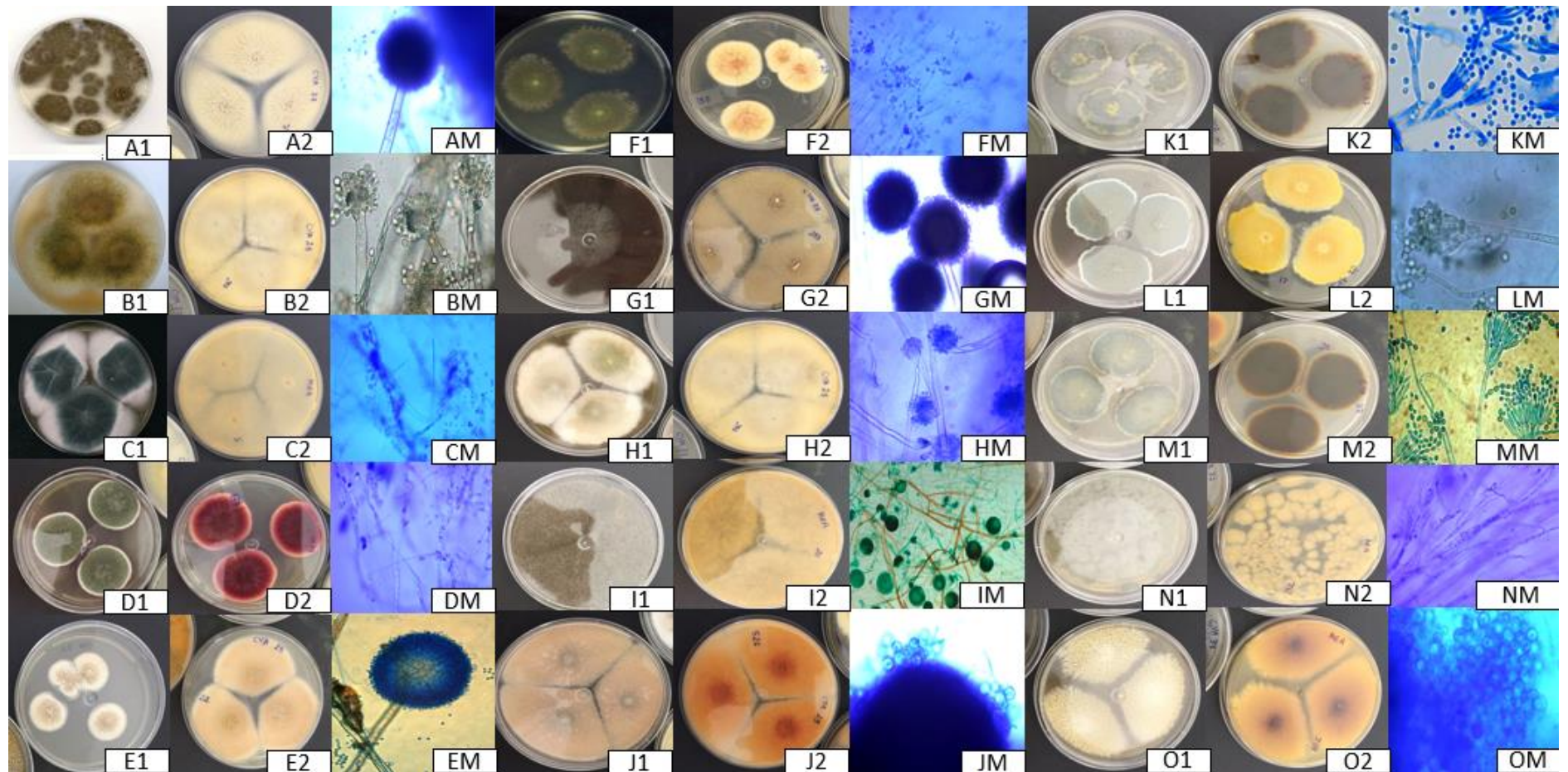


Figura 5. Fotografias de fungos – 1: colônia frontal; 2: colônia reversa; M: foto microscópica. A: *Aspergillus tubigenensis*; B: *Aspergillus oryzae*; C: *Aspergillus fumigatus*; D: *Aspergillus* spp.; E: *Aspergillus ochraceus*; F: *Aspergillus caepitosus*; G: *Aspergillus niger*; H: *Aspergillus parasiticus*; I: *Rhizopus*; J: *Emericella* sp.; K: *Penicillium citrinum*; L: *Penicillium solitum*; M: *Penicillium implicatum*; N: *Penicillium* spp.; O: *Cladosporium*.

Tabela 3. Microrganismos persistentes isolados da compostagem nas diferentes fases.

Tratamento	Classe	Número de acesso	Espécie	S	Fases							
					M	MES	TER	COL	MAT	PF		
Controle	Levedura	KY363457.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100%	+	+	+	-	-	-		
		KY104528.1	<i>Millerozyma farinosa</i>	99%	-	-	+	-	-	-		
		MF033428.1	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	95%	-	-	+	-	-	-		
		KY981526.1	<i>Candida tropicalis</i>	99%	-	-	+	-	-	-		
		KY101759.1	<i>Blastobotrys raffinosifermentans</i>	100%	-	-	-	+	-	-		
		KY101745.1	<i>Blastobotrys adeninivorans</i>	99%	-	+	+	-	-	-		
		KY911185.1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99%	-	+	+	+	-	-		
		KY649574.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99%	-	-	+	-	-	-		
		Inóculo comercial		KY363457.1	<i>Pichia fermentans</i>	99%	-	+	-	-	-	-
KY911185.1	<i>Pichia kudriavzevii</i>			99%	-	+	+	+	-	-		
KY363457.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>			100%	+	+	+	-	-	-		
KY949478.1	<i>Candida tropicalis</i>			99%	+	+	+	-	-	-		
KY104528.1	<i>Millerozyma farinosa</i>			99%	-	-	+	-	-	-		
KT809049.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			99%	-	-	+	-	-	-		
Inóculo não comercial		KY101759.1	<i>Blastobotrys raffinosifermentans</i>	100%	-	-	-	+	-	-		
		KY101745.1	<i>Blastobotrys adeninivorans</i>	99%	-	+	+	-	-	-		
		KY104528.1	<i>Millerozyma farinosa</i>	99%	+	+	+	-	-	-		
		AF336842.1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100%	+	+	+	-	-	-		
		JX174415.1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99%	-	-	+	-	-	-		
		KY497945.1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99%	-	-	+	-	-	-		
		KY363462.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99%	-	-	+	-	-	-		
		Controle	Fungo	-	<i>Aspergillus spp.</i>		+	+	+	+	+	+
-	<i>Penicillium s. citrina</i>				+	+	-	-	-	-		
-	<i>Mycelia sterilia</i>				+	+	-	-	-	-		
-	<i>Penicillium solitum</i>				+	+	-	-	-	-		
-	<i>Rhizopus</i>				+	+	-	-	+	-		
-	<i>Penicillium fase sexuada</i>				+	+	-	-	-	-		
-	<i>Aspergillus caepitosus</i>				-	-	+	-	-	+		
-	<i>Emericella spp.</i>				-	-	-	+	+	-		
Inóculo comercial				-	<i>Aspergillus ochraceus</i>		+	+	+	-	-	+
				-	<i>Penicillium implicatum</i>		+	+	-	+	-	-
				-	<i>Fase sexuada</i>		+	+	-	-	-	+
				-	<i>Aspergillus fumigatus</i>		-	-	+	-	-	-
				-	<i>Aspergillus parasiticus</i>		-	-	+	-	-	-
				-	<i>Aspergillus spp.</i>		-	-	+	+	+	-
Inóculo não comercial		-	<i>Aspergillus oryzae</i>		+	+	+	+	+	+		
		-	<i>Aspergillus (fase sexuada)</i>		+	+	-	-	+	-		
		-	<i>Aspergillus fumigatus</i>		+	+	+	+	-	+		
		-	<i>Rhizopus</i>		+	+	+	+	+	+		
		-	<i>Aspergillus sp.</i>		-	-	+	-	-	-		
		-	<i>Aspergillus niger</i>		-	-	+	+	-	+		

^a N = Número de acesso

^b S = Similaridade

^c Fases em que cada isolado foi detectado (+) (ver na Tabela 1 as características de cada amostra): M, mistura inicial; MES, mesófila; TER, termófila; COL, resfriamento; MAT, maturação; PF, produto final.

de pinho, em que nas primeiras fases do processo foram encontradas espécies de leveduras *Candida railenenses*, *Candida sequanensis*, *Pichia fermentans* e fungos *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium solitum* e *Penicillium citrinum* (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Em estudo com metaproteômica, os gêneros mais abundantes foram *Saccharomyces*, *Candida* e *Schizosaccharomyces*, além de também terem sido detectados gêneros de *Kluyveromyces*, *Pichia*, e *Aspergillus* (NAKASAKI; HIRAI, 2017).

Diferentes espécies de fungos já foram isoladas a partir de compostagem: *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomonium thermophilum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosas*, *Mucor pusilus*, *Talaromyces duponti* e *Scytalidium thermophilum* (FERMOR, 2011). Jurado et al. (2014) explorando a biodiversidade da compostagem, identificou espécies dos gêneros *Altenaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Gibellulopsis*, *Ochrocladosporium*, *Penicillium*, *Plectosphaerella* e *Scopulariopsis*. Taiwo e Oso (2004) analisando o conteúdo microbiológico de resíduos urbanos, observaram uma ampla diversidade na constituição fúngica do composto, entre elas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichothecium* e *Rhizopus*. Em estudo com compostagem à base de resíduos orgânicos foram detectadas espécies do gênero *Aspergillus* (ZHAO et al., 2017). Em compostagem à base de palha de trigo para produção de cogumelos, também foram detectadas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (ZHANG et al., 2014). Em compostagem de material lignocelulósico foram detectados os gêneros *Candida* e espécies de *Aspergillus fumigatus* (JURADO et al., 2014). Em compostagem com estrume de bovino e restos de construção também foram detectados fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (HOLMAN et al., 2016).

Em observações microscópicas, foram detectadas Células de Hülle em espécies do gênero *Aspergillus* durante todo o processo de compostagem, como ilustra a Figura 6.

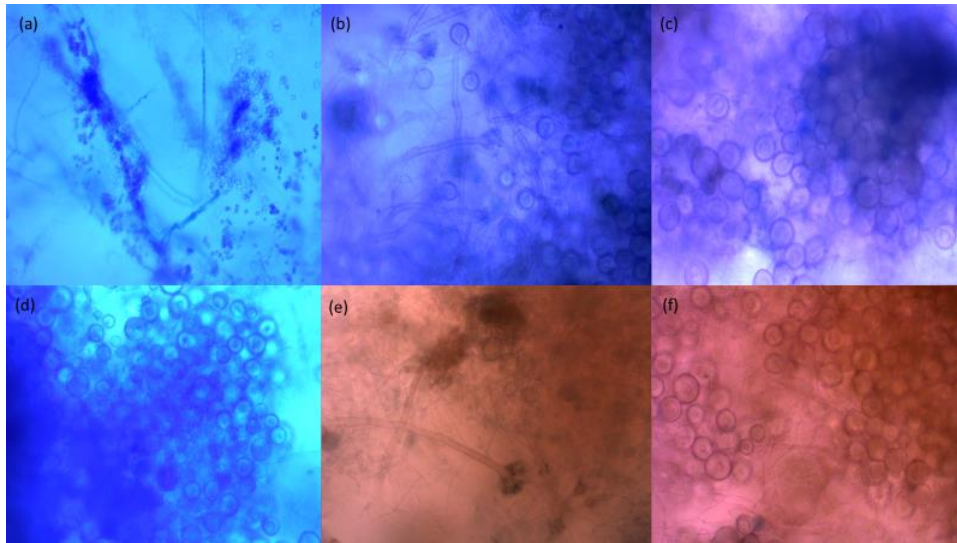


Figura 6. Corpos de frutificação sexuais fechados (cleistotéquias) cercados por células Hülle. (a) *Aspergillus fumigatus*, (b, c, d, e, f) *Aspergillus* spp.

3.5. Avaliação do perfil da comunidade microbiana nos diferentes tratamentos ao longo do processo de compostagem

O *fingerprint* do DGGE é apresentado na Figura 7. O sequenciamento para identificação das bandas demonstrou 81-100% de similaridade com sequências do GenBank de acordo com a Tabela 4. No tratamento controle, a banda 17 (*Giardia intestinalis*) persistiu nos tempos 60 e 120, a banda 18 e 24 se apresentaram apenas aos 60 dias de amostragem, a banda 19 esteve presente nos tempos 5, 10 e 120.

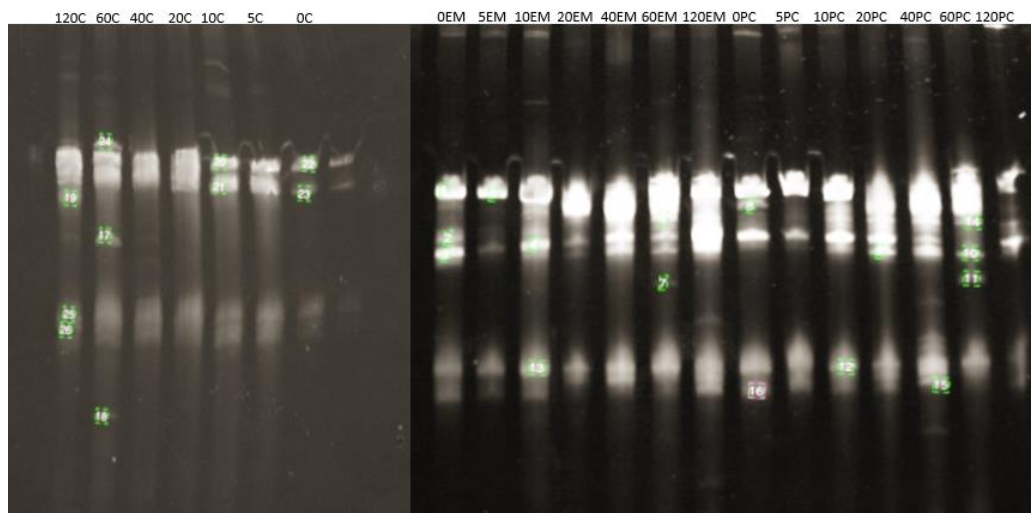


Figura 7. Bandas do DGGE de fragmentos de 18S rDNA amplificados do tratamento controle (pistas 120C a 0C), produto não comercial (pistas OEM a 120EM), produto comercial (faixas OPC a 120PC). As faixas marcadas foram extirpadas e sequenciadas. O gradiente da uréia e formamida variou de 40% a 60%.

Tabela 4. Identificação baseada no BLAST com comparação no GenBank das bandas obtidas por PCR- DGGE usando primers universais para eucariotos.

Bandas ^a	Tratamento	Identificação	Similaridade	Nº de Acesso ^b
1	EM	ni	ni	ni
2	EM	<i>Saccharomycopsis amapae</i>	85%	KY106288.1
3	EM	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100%	KY296068.1
4	EM	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99%	KY296068.1
5	EM	<i>Bullera alba</i>	100%	KY106261.1
6	Embiotic	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	100%	KT803489.1
7	EM	ni	ni	ni
8	EM	ni	ni	ni
9	Embiotic	ni	ni	ni
10	Embiotic	<i>Aspergillus oryzae</i>	93%	MH279400.1
11	Embiotic	<i>Desertispora omaniana</i>	100%	MG459208.1
12	Embiotic	<i>Yarrowia</i> sp.	97%	KY657083.1
13	EM	<i>Bullera alba</i>	99%	KY106259.1
14	Embiotic	<i>Aspergillus</i> sp.	87%	JF412773.1
15	Embiotic	<i>Glomus</i> sp.	92%	KP756529.1
16	Embiotic	ni	ni	ni
17	Controle	<i>Giardia intestinalis</i>	81%	LC329325.1
18	Controle	ni	ni	ni
19	Controle	ni	ni	ni
20	Controle	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	97%	JQ770176.1
21	Controle	ni	ni	ni
22	Controle	ni	ni	ni
23	Controle	ni	ni	ni
24	Controle	ni	ni	ni
25	Controle	ni	ni	ni
26	Controle	ni	ni	ni

*ni: não identificados

^aA numeração das bandas está indicada no gel do DGGE, apresentado na Figura 10.

^bO número de acesso das sequências e as possíveis identificações são encontradas no BLAST.

As bandas 20 (*Mycoplasma gallisepticum*), 21, 22, 23, 25 e 26 persistiram durante todo o processo de compostagem. No tratamento EM as bandas 1, 3 (*Pichia kudriavzevii*), 4 (*Pichia kudriavzevii*), 5 (*Bullera alba*) e 13 (*Bullera alba*) foram identificadas em todos os tempos de amostragem, a banda 2, identificada como *Saccharomycopsis amapae*, foi detectada nos tempos 0 e 10, a banda 7 apenas no tempo 60, e a banda 8 nos tempos 60 e 120. No tratamento Embiotic, a banda 6 (*Thermomyces lanuginosus*) não foi detectada apenas no tempo 5, as bandas 9 e 10 (*Aspergillus oryzae*) foram detectadas nos tempos 10, 20, 40 e 60, a banda 11 (*Desertispora omaniana*) apenas no tempo 60, as bandas 12 (*Yarrowia* sp), 14 (*Aspergillus* spp.) e 15 (*Glomus* spp.) foram detectadas em todos os tempos ao longo do processo, e a banda 16 foi detectada até os 20 dias de amostragem. A diversidade microbiana no processo de compostagem se difere em ambos os tratamentos, porém não influencia no tempo de degradação da matéria orgânica e na qualidade do produto final.

Normalmente, as diferenças de intensidade de bandas entre as espécies não podem ser usadas como um indicador para a abundância de espécies, mas se a intensidade de uma dada banda aumenta ou diminui em diferentes amostras, indica um aumento ou diminuição relativa na abundância desta espécie (ZHANG et al., 2011b). Nos últimos anos, esta técnica vem sendo empregada para conhecer os microrganismos em diferentes comunidades, bem como para monitorar a dinâmica da população em uma comunidade. A comunidade microbiana presente em diversos compostos tem sido analisada por DGGE, incluindo resíduos de alimentos e jardim (JUARÉZ et al., 2015); esterco de galinha (DIAS et al., 2010); massa seca de plantas de tomate e raspas de pinus (JURADO et al., 2014).

3.6. Microrganismos biotecnologicamente relevantes

Os isolados de leveduras e os fungos foram testados quanto à expressão das atividades ligninolítica, celulolítica, hemicelulolítica, amilolítica, pectinolítica, proteolítica, lipolítica e de amonificação e os resultados são apresentados na Figura 7. Do total de 363 isolados de leveduras, 47 apresentaram algum tipo de atividade biotecnologicamente relevante e foram encontrados principalmente nas fases iniciais do processo de compostagem, sendo que o número de isolados com algum tipo de atividade biotecnológica prevaleceu no tratamento Embiotic (46,8%), seguido dos tratamentos controle (31,9%) e EM (21,3%). As espécies que apresentaram capacidade ligninolítica (7,84%) foram identificadas como *Issatchenkia orientalis* e *Candida tropicalis*. A levedura *Issatchenkia orientalis* é termotolerante, e tem boas tolerâncias à etanol e inibidores lignocelulósicos (KWON et al., 2011). A degradação da biomassa lignocelulósica ocorre de forma sinérgica e sequencial, sendo a hemicelulose degradada preferencialmente a celulose e lignina (CERDA et al., 2018).

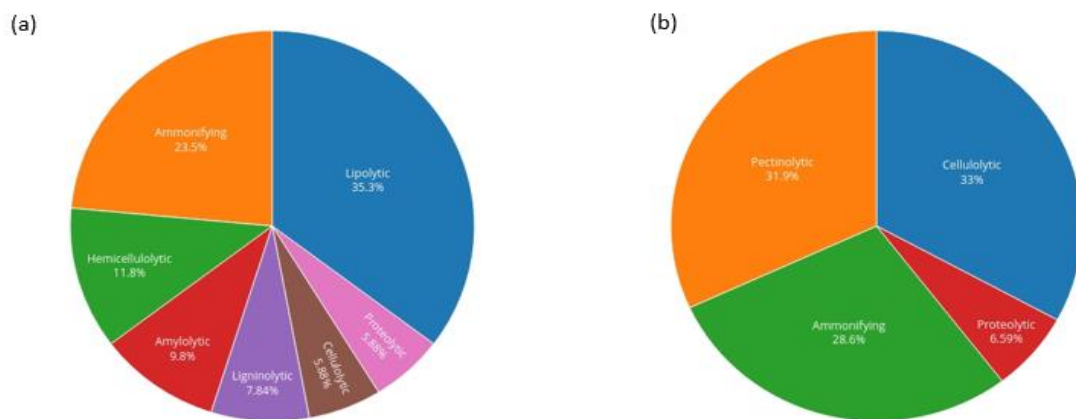


Figura 7. Atividades de relevância biotecnológica dos isolados oriundos do processo de compostagem. (a) leveduras, (b) fungos.

Apenas a espécie *Candida tropicalis* apresentou capacidade celulolítica (5,88%), *Millerozyma farinosa* capacidade hemicelulolítica (11,8%), *Issatchenkia orientalis* capacidade amilolítica (9,8%) e *Millerozyma farinosa* capacidade proteolítica (5,88%). A capacidade

lipolítica (35,3%) foi representada pelas espécies *Candida tropicalis*, *Millerozyma farinosa* e *Candida inconspicua*. Apesar da maior atividade lipolítica pelas leveduras, a quantidade de espécies com atividades de amonificação (23,5%) foram superiores as demais atividades, sendo identificadas como positivas para a atividade as espécies *Candida tropicalis*, *Millerozyma farinosa*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Wickerhamomyces anomalus*.

Nenhum dos isolados de fungos filamentosos exibiram atividade lipolítica, hemicelulolítica, amilolítica e lipolítica. Os fungos que apresentaram ambas as capacidades celulolítica (33%), pectinolítica (31,9%) e de amonificação (28,6%) foram identificados como *Aspergillus* spp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus caepitosus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Mycellia sterilia*, *Aspergillus oryzae*, e *Emericella* spp. Fungos identificados como *Aspergillus fumigatus* apresentaram capacidade celulolítica e de amonificação. Além dos fungos citados anteriormente, *Rhizopus*, *Penicillium* spp. e *Penicillium citrinum* também apresentaram atividade celulolítica e pectinolítica acrescidos de *Penicillium solitum* nessa última atividade. A capacidade proteolítica (6,5%) foi detectada apenas em *Aspergillus oryzae*, *Penicillium solitum*, *Aspergillus niger* e *Mycellia sterilia*. Nota-se que os únicos fungos que apresentaram as quatro atividades foram *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium solitum* e *Mycellia sterilia*. Não houveram diferenças significativas em relação à presença de algum tipo de atividade nos diferentes tratamentos e tempos de amostragem.

Os isolados que exibiram atividade de amonificação podem estar ligados à presença de atividade proteolítica, uma vez que as proteínas são degradadas em aminoácidos (proteólise) e depois em NH₄ por microrganismos amonificadores heterotróficos. Ambas as atividades proteolíticas e de amonificação levariam à liberação de nitrogênio amoniacal total durante a compostagem. As atividades apresentadas pelos isolados podem ser visualizadas na Figura 8.

Lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres carboxílicos e possuem a capacidade de catalisar vários outros tipos de biotransformações como esterificação e

transesterificação em ambientes com baixo teor de água. Suas aplicações potenciais incluem modificação de açúcares e síntese de ésteres de sabor para a indústria alimentícia. As lipases são produzidas por muitos microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, embora espécies de *Candida*, *Pseudomonas*, e *Rhizopus* sp. se destacam como fontes da maioria das preparações enzimáticas disponíveis comercialmente (SHARMA; CHISTI; CHAND BANERJEE, 2001).

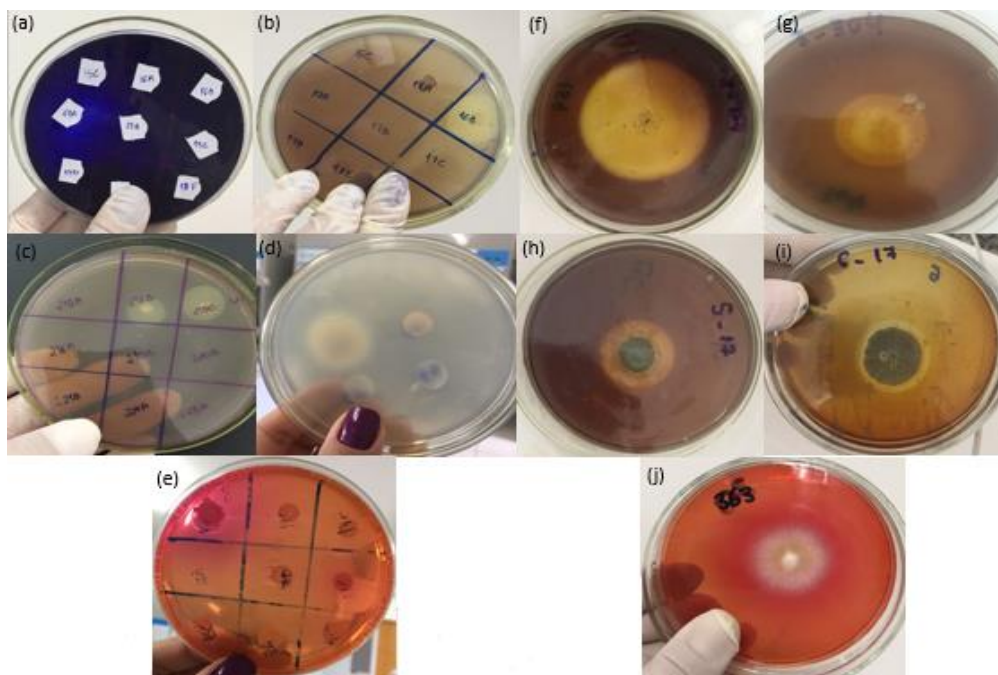


Figura 8. Halos resultantes da atividade enzimática positiva de alguns microrganismos. Leveduras: (a) *Issatchenkia orientalis* - lignolítica; (b) *Candida tropicalis* – celulolítica; (c) *Issatchenkia orientalis* – hemicelulolítica; (d) *Millerozyma farinosa* – proteolítica; (e) *Candida tropicalis* – amonificação. Fungos: (f) *Aspergillus* sp. – celulolítica; (g) *Aspergillus* sp. – hemicelulolítica; (h) *Penicillium solitum* – pectinolítica; (i) *Penicillium solitum* – proteolítica; (j) *Aspergillus* sp. – amonificação.

As principais enzimas que degradam a lignina extracelular são a lacase, a peroxidase de manganês e a lignina peroxidase. No presente trabalho foi utilizada a lacase que é uma polifenol oxidase contendo cobre e que catalisa a redução do oxigênio em água acompanhado pela oxidação de um substrato fenólico ao radical fenoxil (WIDIASTUTI; WULANINGTYAS, 2008). A lignocelulose é degradada principalmente por fungos, incluindo *Penicillium*

expansum, *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* (FENG et al., 2011). Os microrganismos celulolíticos desempenham um papel importante na biosfera, reciclando a celulose que é o carboidrato mais abundante produzido pelas plantas. O termo "celulases" refere-se a um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise da celulose em açúcares e são necessárias em grandes quantidades devido à sua aplicação em indústrias têxteis e na produção de detergentes, alimentos, ração animal, biocombustível, papel e celulose, farmacêutica e gerenciamento de resíduos (KASANA et al., 2008). Na compostagem as enzimas são importantes porque a biotransformação de materiais orgânicos ocorre sob a ação de microrganismos e enzimas correspondentes que podem melhorar e acelerar os processos de degradação refletindo de forma direta no produto final (ZHANG; SUN, 2016). De acordo com Kiehl (2004) a fase mesófila do processo de compostagem é caracterizada com a mais intensa atividade metabólica e elevada síntese de enzimas. Embora a composição específica de ambas as comunidades não tenha sido relatada para os ecossistemas de compostagem, é bem sabido que a maioria dos microrganismos do solo expressa ambas as atividades (VRANOVÁ; FORMÁNEK; REJSEK, 2013).

Muitas espécies apresentaram algum tipo de atividade enzimática, mas apenas alguns se mostraram com potencial produtores de enzimas. Os isolados com alto potencial para produção de enzimas, ou seja, $IE > 2,0$ estão apresentados na Tabela 5. *Issatchenkia orientalis* foi a espécie de leveduras com maior potencial enzimático na atividade lignolítica ($IE = 4,2$). Em relação as atividades celulolítica e amilolítica, a espécie *Candida tropicalis* se destacou, com $IE = 4,7$ e $2,8$ respectivamente. A espécie *Millerozyma farinosa* apresentou $IE = 2,0$; $4,5$ e $3,3$ para as atividades hemicelulolítica, proteolítica e lipolítica, respectivamente. *Aspergillus* spp. apresentou alto potencial enzimático para a atividade celulolítica com $IE = 5,0$. Os resultados obtidos permitem destacar os isolados das espécies *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Millerozyma farinosa* e *Aspergillus* spp. como promissores produtores de enzimas, uma vez que os isolados apresentaram valores de $IE > 2,0$.

Tabela 5. Índices enzimáticos de leveduras e fungos.

	Teste	Fase	Espécie	IE ^b
Leveduras	Lignolítico	M	<i>Issatchenkia orientalis</i>	4,2
		M	<i>Issatchenkia orientalis</i>	4,0
		TER	<i>Issatchenkia orientalis</i>	2,0
	Celulolítico	M	<i>Candida tropicalis</i>	4,7
		MES	<i>Blastobotrys raffinosifermentans</i>	2,0
	Hemicelulolítico	M	<i>Millerozyma farinosa</i>	2,0
		MES	<i>Blastobotrys adeninivorans</i>	2,0
	Proteolítico	M	<i>Millerozyma farinosa</i>	4,5
		M	<i>Pichia kudriavzevii</i>	4,0
		M	<i>Pichia kudriavzevii</i>	3,7
	Lipolítico	M	<i>Candida tropicalis</i>	2,1
		M	<i>Millerozyma farinosa</i>	3,3
		M	<i>Candida tropicalis</i>	2,0
		M	<i>Candida tropicalis</i>	2,1
		M	<i>Candida tropicalis</i>	2,0
		M	<i>Candida tropicalis</i>	2,0
		M	<i>Candida tropicalis</i>	2,4
		M	<i>Candida tropicalis</i>	2,0
	Amonificação	M	<i>Candida tropicalis</i>	2,8
M		<i>Candida tropicalis</i>	2,4	
M		<i>Candida tropicalis</i>	2,0	
Fungos	Celulolítico	M, MES, MAT	<i>Aspergillus (fase sexuada)</i>	2,0
		M, MES, MAT	<i>Rhizopus</i>	2,7
		M, MES	<i>Penicillium citrinum</i>	2,0
		M, MES, MAT	<i>Rhizopus</i>	2,3
		M, MES, TER	<i>Aspergillus ochraceus</i>	2,2
		M, MES, COL	<i>Penicillium implicatum</i>	2,2
		M, MES, TER, COL, MAT, PF	<i>Aspergillus spp.</i>	2,0
		TER	<i>Aspergillus caepitosus</i>	3,0
		M, MES, TER, COL, MAT, PF	<i>Aspergillus spp.</i>	2,3
		TER	<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,3
		M, MES, TER, COL, MAT, PF	<i>Aspergillus spp.</i>	5,0
		M, MES, TER, COL, MAT, PF	<i>Aspergillus spp.</i>	2,6
		M, MES, TER, COL, MAT, PF	<i>Aspergillus spp.</i>	3,4

M: mistura inicial; TER: termófila; MÊS: mesófila; COL: resfriamento; PF: produto final.

^bÍndice enzimático.

De forma geral, os isolados que apresentaram algum tipo de atividade de relevância biotecnológica possuem uma gama de atividades metabólicas e capacidades

fisiológicas que os tornam potencialmente adequados para uma ampla variedade de aplicações, tais como a produção de enzimas e a melhoria do processo de compostagem, incluindo o menor tempo do processo (JURADO et al., 2014).

4. Conclusão

Uma gama de espécies de leveduras e fungos filamentosos atuam no processo de degradação de resíduos orgânicos. Vários isolados de leveduras e fungos exibiram capacidades metabólicas que podem encontrar muitas aplicações biotecnológicas, se destacando os isolados das espécies *Issatchenkia orientalis*, *Candida tropicalis*, *Millerozyma farinosa* e *Aspergillus* spp. como promissores produtores de enzimas. O uso de inoculantes durante o processo pouco afeta a diversidade microbiológica. Este estudo reafirma o potencial da compostagem como fonte de microrganismos biotecnologicamente relevantes.

5. Referências

- ADAMS, J. D. W.; FROSTICK, L. E. Analysis of bacterial activity, biomass and diversity during windrow composting. **Waste Management**, v. 29, p. 598–605, 2008.
- ANDREWS, W. H. & HAMMACK, T. **Bacteriological Analytical Manual (BAM) BAM Chapter 10: Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm279535.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2018.
- ANTUNES, L. P. et al. Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–13, 2016.
- BARWINSKI, M. J. B. **Arcabouço jurídico e tecnologia para compostagem de resíduo de abatedouro**. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Mestre. 2015.

BATISTA, L. R. et al. **Manual sobre a coleção de culturas de microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos/UFLA (CCDCA/UFLA): programa de preservação de microrganismos para indústria de alimentos.** Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, 72: 1-401, 2012.

BOHACZ, J. Lignocellulose-degrading enzymes, free-radical transformations during composting of lignocellulosic waste and biothermal phases in small-scale reactors. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 744–754, 2016.

CARVALHO, B. F., ÁVILA, C. L., BERNARDES, T. F., PEREIRA, M. N., SANTOS, C., & SCHWAN, R. F. (2017). Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, pp. 589-600.

CERDA, A. et al. Composting of food wastes: Status and challenges. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 57–67, 2018.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 175–178, 1998.

COUTINHO DE ANDRADE, M. **CADERNO DOS MICRORGANISMOS EFICIENTES (EM) Instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://estaticog1.globo.com/2014/04/16/caderno-dos-microrganismos-eficientes.pdf>>. Acesso em: 7 ago. 2018.

DE GANNES, V.; EUDOXIE, G.; HICKEY, W. J. Insights into fungal communities in composts revealed by 454-pyrosequencing: Implications for human health and safety. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. JUN, p. 1–9, 2013.

Documentos 132 2 a edição revista Manual de Métodos de Análise de Solo Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Solos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [s.l: s.n.].

ELANGO, D. et al. Thermophilic composting of municipal solid waste. **Applied Energy**, v. 86, p. 663–668, 2009.

FENG, Y. et al. Degradation of raw corn stover powder (RCSP) by an enriched microbial consortium and its community structure. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 742–747, 2011.

FERMOR, T. et al. Microbiological properties of casing. In: GRIENSVEN, L. J. L. F. van, (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi.** Rotterdam: Balkema, p. 447-454, 2000.

FERNANDEZ-DELGADO JUAREZ, M. et al. Co-composting of biowaste and wood ash, influence on a microbially driven-process. **Waste Management**, v. 46, p. 155–164, 2015.

FERREIRA, C. et al. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 235–247, 2013.

FUCIÑOS, P. et al. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 233–241, 2005.

GABHANE, J. et al. Additives aided composting of green waste: Effects on organic matter degradation, compost maturity, and quality of the finished compost. **Bioresource Technology journal**, v. 114, p. 382–388, 2012.

GERKE, J.; BAYRAM, Ö.; BRAUS, G. H. Fungal S-adenosylmethionine synthetase and the control of development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 6, p. 443–454, 2012.

GOU, C. et al. Inoculation with a psychrotrophic-thermophilic complex microbial agent accelerates onset and promotes maturity of dairy manure-rice straw composting under cold climate conditions. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 339–346, 2017.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n.3, p. 597-607, nov-dec. 1975.

HOLMAN, D. B. et al. Effect of co-composting cattle manure with construction and demolition waste on the archaeal, bacterial, and fungal microbiota, and on antimicrobial resistance determinants. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–21, 2016.

HOU, N. et al. Role of psychrotrophic bacteria in organic domestic waste composting in cold regions of China. **Bioresource Technology**, v. 236, p. 20–28, 2017.

JANA, B. B.; ROY, S. K. **DISTRIBUTION PATTERNS OF PROTEIN MINERALIZING AND AMMONIFYING BACTERIAL POPULATIONS IN FISH-FARMING PONDS UNDER DIFFERENT MANAGEMENT SYSTEMS** *Aquaculture*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://ac-els-cdn.ez26.periodicos.capes.gov.br/0044848685900420/1-s2.0-0044848685900420-main.pdf?_tid=6d437d21-3264-48ce-835c-aa568da320bb&acdnt=1533772999_602139be81ab2779011dfb80eaba7c83>. Acesso em: 8 ago. 2018.

JURADO, M. et al. Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 283–293, 2014.

KASANA, R. C. et al. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial

Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Microbial Biotechnology**, n. 57, p. 503–507, 2008.

KINET, R. et al. Thermophilic and cellulolytic consortium isolated from composting plants improves anaerobic digestion of cellulosic biomass: Toward a microbial resource management approach. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 189, p. 138–144, 2015.

KLICH, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau vöör Schimmelcultures**, pp.116, 2002.

KWON, Y. J. et al. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8099–8104, 2011.

LANGARICA-FUENTES, A. et al. Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, n. 2, p. 296–308, 2014.

LEMOIS, L. N. **Reconstrução e análise de genomas de bactérias de compostagem a partir de dados metagenômicos**. 2015.

LIU, D. et al. Metaproteomics reveals major microbial players and their biodegradation functions in a large-scale aerobic composting plant. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 950–960, 2015.

LIU, L. et al. Succession and diversity of microorganisms and their association with physicochemical properties during green waste thermophilic composting. **Waste Management**, v. 73, p. 101–112, 2018.

LOPEZ-GONZALEZ, J. A. et al. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 574–584, 2013.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. A. et al. Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 187, p. 305–313, 2015a.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. A. et al. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 406–416, 2015b.

MANSO, K. R. DE J.; FERREIRA, O. M. **CONFINAMENTO DE BOVINOS: ESTUDO DO GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.abccriadores.com.br/images/upload/confinamento de bovinos.pdf](http://www.abccriadores.com.br/images/upload/confinamento_de_bovinos.pdf)>. Acesso em: 8 ago. 2018.

MANU, M. K.; KUMAR, R.; GARG, A. Performance assessment of improved composting system for food waste with varying aeration and use of microbial inoculum. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 167–177, 2017.

MASUO, S. et al. Spatial heterogeneity of glycogen and its metabolizing enzymes in *Aspergillus nidulans* hyphal tip cells. **Fungal Genetics and Biology**, v. 110, n. November 2017, p. 48–55, 2018.

MEGHARAJ, M. et al. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. **Environment International**, v. 37, p. 1362–1375, 2011.

MENG, X. et al. Effect of pig manure on the chemical composition and microbial diversity during co-composting with spent mushroom substrate and rice husks. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 22–30, 2018.

MUNTANJOLA-CVETKOVIĆ, M.; VUKIĆ, V. V. Influence of light on hülle cell and aleuriospore formation in *Aspergillus*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 58, n. 1, p. 67-IN11, 1972.

NAIR, J.; OKAMITSU, K. Microbial inoculants for small scale composting of putrescible kitchen wastes. **Waste Management**, v. 30, p. 977–982, 2010.

NAKASAKI, K.; ARAYA, S.; MIMOTO, H. Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 521–528, 2013.

NAKASAKI, K.; HIRAI, H. Temperature control strategy to enhance the activity of yeast inoculated into compost raw material for accelerated composting. **Waste Management**, v. 65, p. 29–36, 2017.

NEHER, D. A. et al. Changes in bacterial and fungal communities across compost recipes, preparation methods, and composting times. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

NGOC, Q. et al. Inoculation of lactic acid bacterium accelerates organic matter degradation during composting. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 377–383, 2015.

OKAZAKI, W. K.; TURN, S. Q.; FLACHSBART, P. G. Characterization of food waste generators: A Hawaii case study. **Waste Management**, v. 28, p. 2483–2494, 2008.

OLIVEIRA, P. D. C. UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA AMBIENTAL COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA AMBIENTAL. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5747/1/CM_COEAM_2014_2_15.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2018.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Hidrolíticas Extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amozomas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853–860, out-dez. 2006.

PORT, J. A. et al. Metagenomic Profiling of Microbial Composition and Antibiotic

- Resistance Determinants in Puget Sound. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- R CORE TEAM . R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2018.
- REMPEL, A. et al. Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. 2018.
- REN, G. et al. Evaluation of microbial population dynamics in the co-composting of cow manure and rice straw using high throughput sequencing analysis. **Microbial Biotechnology**, p. 32–101, 2016.
- SCATAMBURLO, T. M. et al. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. **Journal of Dairy Science**, 2015.
- SENA, A. R., KOBLITZ, M. G. B.; GOES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de gungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, jul-dez. 2006.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND BANERJEE, U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. v. 19, p. 627–662, 2001.
- SUNDBERG, C. et al. Characterisation of source-separated household waste intended for composting. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2859–2867, 2011.
- TAIWO, L. B.; OSO, B. A. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. **African J. Biotech**, v. 3, p. 239-243, 2004.
- TERRA, M. F. **Atividades enzimática de fungos filamentosos isolados de cavernas da caatinga brasileira**. 2008. 60p. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- THEUNISSEN, T. W. et al. Cell Stem Cell Correction Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. **STEM**, v. 15, p. 523, 2014.
- TIAN, X. et al. Fungal community and cellulose-degrading genes in the composting process of Chinese medicinal herbal residues. **Bioresource Technology journal**, n. 241, p. 374–383, 2017.
- VOBĚRKOVÁ, S. et al. Effect of inoculation with white-rot fungi and fungal consortium on the composting efficiency of municipal solid waste. **Waste Management**, v. 61, p. 157–164, 2017.
- VRANOVÁ, V.; FORMÁNEK, P.; REJSEK, K. Proteolytic activity in soil : A review Proteolytic activity in soil : A review. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 23–32, 2013.
- WANG, X. et al. Effects of the feeding ratio of food waste on fed-batch aerobic composting and its microbial community. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 397–404,

2017.

WIDIASTUTI, H.; WULANINGTYAS, A. Activity of Ligninolytic Enzymes during Growth and Fruiting Body Development of White Rot Fungi *Omphalina* sp. and *Pleurotus ostreatus*. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 15, n. 4, p. 140–144, 2008.

XIE, X. Y. et al. A novel method for contributing to composting start-up at low temperature by inoculating cold-adapted microbial consortium. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 39–47, 2017.

ZEYAUULLAH, M. et al. Metagenomics -An advanced approach for non- cultivable micro-organisms. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 4, n. 3, p. 49–54, 2009.

ZHANG, J. et al. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2950–2956, 2011a.

ZHANG, J. et al. Phanerochaete chrysosporium inoculation shapes the indigenous fungal communities during agricultural waste composting. **Biodegradation**, v. 25, p. 669–680, 2014a.

ZHANG, L.; SUN, X. Improving green waste composting by addition of sugarcane bagasse and exhausted grape marc. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 335–343, 2016.

ZHANG, L.; SUN, X. Effects of bean dregs and crab shell powder additives on the composting of green waste. **Bioresource Technology journal**, v. 260, p. 283–293, 2018.

ZHANG, Q. et al. Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8899–8906, 2011b.

ZHANG, X. et al. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 183–195, 2014b.

ZHAO, K. et al. Development of a novel compound microbial agent for degradation of kitchen waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 442–450, 2017.

ZHOU, Y.; SELVAM, A.; WONG, J. W. C. Effect of Chinese medicinal herbal residues on microbial community succession and anti-pathogenic properties during co-composting with food waste. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 190–199, 2016.