

**DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS  
TERMÓFILOS EM COMPOSTO PARA  
CULTIVO DE *Agaricus brasiliensis***

**THIAGO PEREIRA SOUZA**

**2010**

**THIAGO PEREIRA SOUZA**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMÓFILOS  
EM COMPOSTO PARA CULTIVO DE *Agaricus brasiliensis***

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

Orientador

Prof. Eustáquio Souza Dias

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

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

Souza, Thiago Pereira.

Diversidade de fungos filamentosos termófilos em composto para cultivo de *Agaricus brasiliensis* / Thiago Pereira de Souza. – Lavras : UFLA, 2010.

37 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. Compostagem. 2. Identificação de fungos. 3. DGGE. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.222

**THIAGO PEREIRA SOUZA**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMÓFILOS  
EM COMPOSTO PARA CULTIVO DE *Agaricus brasiliensis***

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

APROVADA em 8 de março de 2010.

Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

UFLA

Prof. Dr. Marcos Rogério Tótola

UFV

Prof. Dr. Estáquio Souza Dias

UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

*A Deus,  
pela graça, força, paz,  
serenidade e presença  
nesta jornada.*

**Ofereço**

*Aos meus pais: Walmir  
Salvados de Souza e Janice  
Almeida Pereira Souza,  
exemplos de garra e coragem,  
enfim, exemplos. A minha avó  
Dejanira Fernandes, bússola  
para uma vida inteira. A meus  
irmãos, Michelle Pereira Souza,  
Marcelle Pereira Souza e  
Gabriel Salvador de Souza Neto,  
parte de mim, amo vocês. A  
Carolina Gusmão, minha  
amorosa companheira.*

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os professores da Microbiologia que me ensinaram e motivaram rumo a esse microcosmo.

Agradeço também ao Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias, pela confiança, disposição e boa vontade em minha orientação e também por viabilizar esse sonho e outros que estão por vir.

Agradeço aos meus queridos amigos que estiveram comigo durante todo ou parte do meu mestrado: Jessé, Luana, Fabiana, Alessandra, Cristiane, Maryeimy, Charles, Romário, Moises, Claudinelli, Cintinha, Cintião e Claudia.

Aos amigos do laboratório dos cogumelos comestíveis, Paulinho, Emerson, Pedro, Rochelle e Sandra. Obrigado a todos pela ajuda e, principalmente, por me mostrarem o que é “por a mão na massa”.

Aos colegas do Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia, especialmente ao Prof. Dr. Ludwing Heinrich Pfenning e ao Edinho, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Lavras e aos departamentos de Biologia e Fitopatologia, que me permitiram realizar este trabalho. À Capes, pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudos e também à Fapemig, pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Composto e compostagem.....	3
2.2 Microbiota da compostagem.....	7
2.3 Aplicações do composto.....	8
2.3.1 Cobertura e estabelecimento de vegetação em acostamentos e estradas.....	9
2.3.2 Supressor de doenças.....	10
2.3.3 Biorremediação com uso de composto.....	11
2.3.4 Biofiltros.....	11
2.3.5 Substrato para cogumelos.....	12
2.4 DGGE – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Substrato.....	14
3.2 Contagem e isolamento.....	14
3.3 Extração de DNA.....	15
3.4 Amplificação da região ITS via NESTED – PCR.....	16
3.5 PCR – DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	16
3.6 Sequenciamento.....	17
3.7 Análise estatística.....	17
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Densidade da comunidade fúngica.....	18
4.2 Análise por espalhamento.....	20
4.3 Análise por plaquamento de partículas.....	23
4.4 Caracterização molecular.....	25
5 CONCLUSÕES.....	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Fungos termófilos isolados através da técnica de espalhamento em cinco momentos diferentes e incubados a 45°C por até cinco dias.....	21
TABELA 2	Fungos termófilos em partículas de composto lavadas uma vez a partir de amostras obtidas durante a fase II da compostagem.....	24
TABELA 3	Fungos termófilos em partículas de composto lavadas três vezes a partir de amostras obtidas durante a fase II da compostagem.....	24

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema de processo de compostagem.....	03
FIGURA 2	Teia alimentar em pilha de composto.....	04
FIGURA 3	Diagrama de zonas em pilha de compostagem.....	05
FIGURA 4	Esquema de filtro de composto para águas pluviais.....	11
FIGURA 5	Região ribossomal normalmente amplificada para técnica de DGGE.....	13
FIGURA 6	Mudanças de temperatura na meda durante a compostagem.	19
FIGURA 7	Contagem de unidades formadoras de colônias de fungos durante a fase II da compostagem.....	19
FIGURA 8	Perfil de bandas correspondentes a região ITS de fungos obtidos por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), em diferentes momentos da fase II da compostagem.....	26
FIGURA 9	Riqueza de amplicons (Se) da região ITS de fungos presentes em composto, em diferentes momentos durante a fase II.....	27
FIGURA 10	Agrupamento hierárquico da região ITS de fungos presentes em composto para produção de <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	27
FIGURA 11	Bandas relacionadas a espécies identificadas através do Blastn.....	28

## RESUMO

SOUZA, Thiago Pereira. **Diversidade de fungos filamentosos termófilos em composto para cultivo de *Agaricus brasiliensis***. 2010. 37p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A compostagem é um processo biológico de degradação da matéria orgânica, realizada por microrganismos em condições controladas, levando à mineralização e à humificação parcial das substâncias orgânicas nela presentes. Dentre as diversas aplicações possíveis para o composto, como adubo, biofiltro e biorremediação, um de seus usos mais tradicionais é na produção de cogumelos. O estudo da microbiota presente nesse substrato pode gerar valiosas informações que contribuam para o aprimoramento da técnica de compostagem e o aumento de produtividade no cultivo de cogumelos. O sucesso na colonização e no uso do composto pelo *Agaricus brasiliensis* depende das propriedades ecológicas do substrato, usualmente referidas como "seletividade do composto". Tendo em vista a baixa quantidade de informações disponíveis em condições locais, de realidade mais rústica, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer a dinâmica dos fungos filamentosos durante a fase II da compostagem para a produção do cogumelo *A. brasiliensis*, nas condições brasileiras. Para isso, foi avaliada a densidade fúngica em cinco diferentes momentos, por meio de isolamento e identificação de fungos filamentosos utilizando técnicas de plaqueamento de partículas lavadas e espalhamento. A diversidade também foi analisada por meio da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento. Os resultados mostraram a microbiota fúngica dominante formada pelas espécies *Thermomyces ibadanensis* (espécie descrita pela primeira vez em composto), *Thermomyces lanuginosus* e, principalmente, *Scytalidium thermophilum* (isolado pela primeira vez em compostos brasileiros). Dados dos isolamentos, juntamente com os de DGGE, mostraram diminuição da diversidade fúngica, ao longo da fase II da compostagem.

**Palavras-chave:** Compostagem, *Agaricus brasiliensis*, Identificação de fungos, DGGE

---

Orientador: Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA

## ABSTRACT

SOUZA, Thiago Pereira. **Diversity of termophilic filamentous fungi into compost for breeding of *Agaricus brasiliensis***. 2010. 37p. Dissertation (Masters in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal of Lavras, Lavras, MG.\*

Composting is a biological process of degradation of organic matter carried by microorganisms under controlled conditions, leading to the mineralization and partial humification of organic substances. Among the various possible applications for compost, like organic fertilizer, biofilter and bioremediation, one of its more traditional uses is the production of mushrooms. The study of the compost microbiota can generate valuable information that contributes to the refinement of the technique of composting and increased productivity in the mushroom cultivation. The success in colonization and use of the compost by *Agaricus brasiliensis* depends on the ecological properties of the substrate, usually referred to as "selectivity of the compost". In Brazil, besides differences about climate and biodiversity, phase II of composting is carried out in a very simple way. Therefore, this work aimed to understand the dynamics of filamentous fungi during phase II of compost for *A. brasiliensis* production in Brazilian conditions. The fungal density was analysed at five different times by isolation and identification of filamentous fungi using techniques plating of washed particles and scattering. The diversity was also analyzed by electrophoresis on denaturing gradient gel (DGGE) and sequencing. *Scytalidium thermophilum* was the dominant species, followed by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermomyces Ibadannesis*, being the last one the first report in compost. DGGE analysis showed reduced fungal diversity along the phase II of composting.

**Key words:** Composting, *Agaricus brasiliensis*, Identification of fungi, DGGE

---

Major Professor: Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA

## 1 INTRODUÇÃO

Os resíduos sempre foram um grande problema que acompanha o crescimento da população humana mundial. As estimativas apontam para um aumento de até 3 bilhões de habitantes no planeta, até o ano de 2050.

Nas zonas rurais são gerados resíduos culturais que comumente não têm destino útil (Oliveira et. al., 2005). A compostagem é um processo controlado de aceleração da decomposição da matéria orgânica, realizado espontaneamente por microrganismos, levando à disponibilização de substâncias mineralizadas e humificadas no ambiente, resultando em um substrato que é quimicamente e fisicamente diferente do material inicial (ABES, 1999; Chang & Milles, 2004).

O uso mais comum do composto é na horticultura e na agricultura, para estimular o crescimento das plantas, atuando como fonte de matéria orgânica, macronutrientes e micronutrientes, melhorando a estrutura física do solo, de maneira a diminuir o escoamento de água e, conseqüentemente, a erosão.

Outros benefícios também associados ao uso do composto são a estabilização do pH no solo, o aumento da capacidade de retenção de nutrientes disponíveis para as plantas, o estabelecimento de uma microbiota benéfica e a redução da necessidade de fertilizantes e pesticidas (Pearson, 2003). Além dessas, outras aplicações menos tradicionais têm sido propostas, como cobertura e estabelecimento de vegetação em acostamento de estradas, supressor de doenças, biorremediação, biofiltros e substrato para a produção de cogumelos.

Muitos trabalhos têm descrito a microbiota e os métodos de compostagem na América do Norte e na Europa, onde há disponibilidade de recursos financeiros e tecnológicos. Mas, pouco tem sido pesquisado em nossas condições e clima, em que, normalmente, a compostagem, principalmente para a produção de cogumelos, ocorre em condições menos tecnificadas e mais manuais.

Nesse contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer a dinâmica populacional dos fungos filamentosos termófilos durante a fase II da compostagem para a produção do cogumelo *Agaricus brasiliensis*. Para isso, foram utilizados dois diferentes métodos de plaqueamento para a avaliação da densidade fúngica com posterior identificação dos fungos encontrados. A diversidade também foi analisada por meio da técnica molecular de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Composto e compostagem

O processo de decomposição da matéria orgânica ocorre naturalmente, sendo regido, principalmente, por microrganismos. A compostagem é um processo de decomposição acelerada, que ocorre de maneira controlada, com o objetivo de mineralizar e humificar substâncias presentes nas matérias-primas empregadas, resultando em um substrato que é química e fisicamente diferente do material inicial (Chang & Milles, 2004; ABES, 1999) (Figura 1).

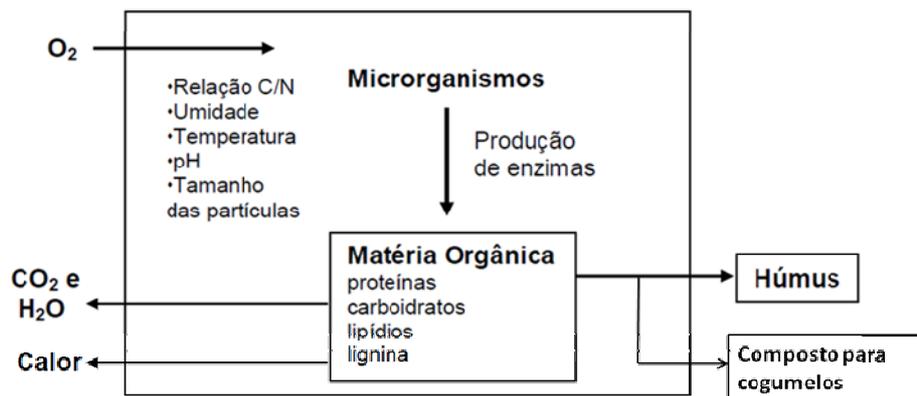


FIGURA 1 Esquema de processo de compostagem.  
FONTE: Fialho (2007).

O composto apresenta cadeia alimentar de três níveis, a saber: os consumidores de primeiro nível, considerados decompositores verdadeiros, representados pelos microrganismos como as bactérias, actinobactérias e fungos. Há pelo menos mais dois níveis de consumidores na pilha de compostagem, como os protozoários, vermes e insetos (Stoffella & Kahn, 2001) (Figura 2).

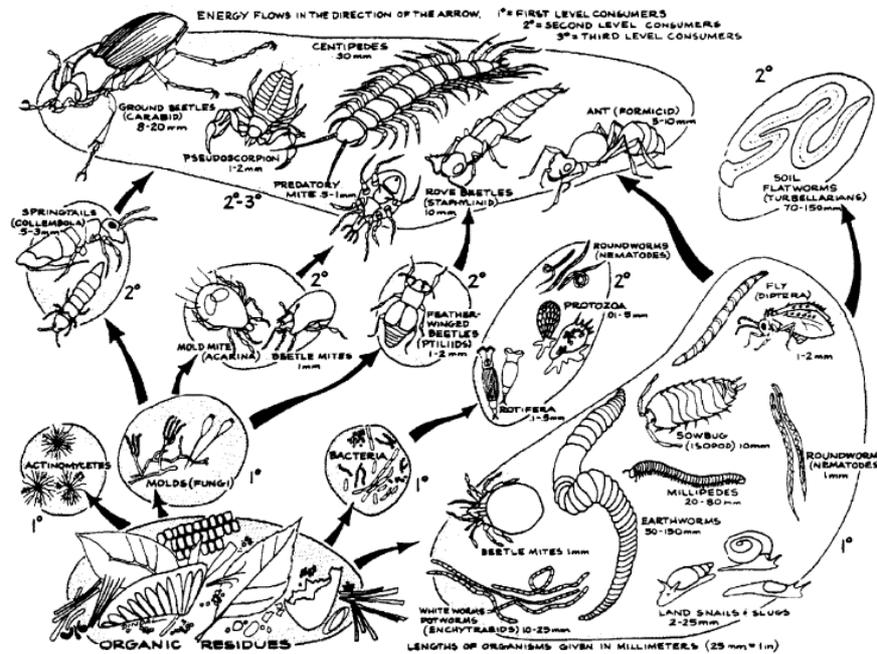


FIGURA 2 Teia alimentar em pilha de composto.  
 FONTE: Stoffella & Kahn (2001).

A compostagem é praticada desde a antiguidade de forma empírica. Somente a partir de meados da década de 1920 o assunto passou a ser objeto de pesquisas científicas.

A compostagem é, comumente, dividida em fases. O tempo e as fases do processo de compostagem variam de acordo com os ingredientes que compõem a pilha e a finalidade do produto/composto. Para a obtenção de húmus, o processo pode levar de semanas a meses, existindo quatro fases descritas. No início, tem-se a fase mesofílica (10°C -42°C), que pode durar poucas horas ou poucos dias, a qual é seguida da fase termofílica (45°C-70°C), que pode durar poucos dias, muitas semanas (restos alimentares) ou, ainda, meses (resíduos de madeira). Posteriormente ocorre uma segunda fase mesofílica, não raro com microrganismos diferentes da primeira fase mesofílica colonizando a pilha. A

quarta fase segue com a estabilização do composto, podendo durar de semanas a meses (Toumela, 2000).

Para a produção de cogumelos, a compostagem normalmente é dividida em duas fases distintas, a I e a II (Chang & Milles, 2004). Na fase I, os substratos que formam o composto são misturados regularmente, umedecidos e deixados em ambiente aberto. Durante esta etapa, o composto apresenta forte odor, dada a grande liberação de amônia ( $\text{NH}_3$ ). Os substratos mais utilizados são resíduos vegetais, sendo os principais componentes a celulose, a hemicelulose e a lignina. Os dois primeiros, por conterem carboidratos, podem ser transformados em açúcares simples que rapidamente são utilizados por bactérias e fungos. Por outro lado, a lignina é mais complexa e resistente à degradação microbiana (Epstein, 1997; Selar & Aneja, 2007).

Na pilha de compostagem existem quatro zonas relacionadas com distribuição de temperatura, aeração e ação microbiana (Lambert & Davis, 1934). Nesta fase (fase I), o reviramento é muito importante para a obtenção de aeração e condições microbiológicas adequadas em todo o volume do material em decomposição (Figura 3).

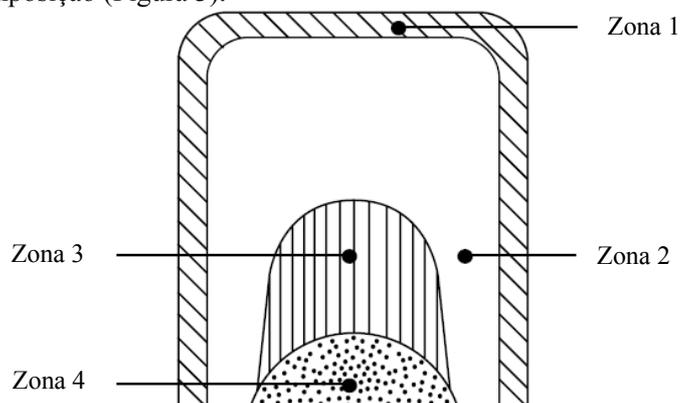


FIGURA 3 Diagrama de zonas em pilha de compostagem. Zona 1: temperatura aproximada de 35°C, bem aerado, seco e em decomposição; Zona 2: temperaturas entre 55°C e 60°C, bem aerado, decomposto, manchas brancas de fungos claramente visíveis; Zona 3: temperaturas entre 70°C e 80°C, aeração restrita; Zona 4: temperatura aproximada de 35°C, amarelo, fétido e anaerobiose.

A fase II, por sua vez, ocorre em ambiente fechado e com temperatura controlada. O objetivo é o de eliminar insetos e pestes, como também destruir esporos e contaminantes ao *A. brasiliensis* que possam ter resistido à fase I. Outro objetivo é manter o composto em temperatura constante (45°C-55°C) para favorecer o seu condicionamento, caracterizado pela assimilação de amônia, principalmente por actinobactérias (Silva et al., 2009).

Uma série de fatores influencia o processo de compostagem, tais como temperatura, umidade, relação C/N, aeração, pH e estrutura física das matérias-primas utilizadas. Dentre eles, a temperatura funciona como o indicador mais importante de eficiência do processo de compostagem (Imbeah, 1998). A temperatura ideal possibilita a redução de perdas de nutrientes e a inativação de agentes patogênicos (Larney et al., 2003; Larney & Blackshaw, 2003; Hanajima et al., 2006; Zhang & He, 2006; Larney & Hao, 2007).

Segundo Stentiford (1996), temperaturas entre 45°C e 55°C propiciaram o máximo de biodegradação, enquanto temperaturas entre 35°C e 40°C resultaram em aumento da diversidade microbiana no composto. Acima de 40°C, os processos de nitrificação, desnitrificação e assimilação são inibidos, em decorrência da interrupção da atividade dos nitrificantes. Para uma eficiente inativação de patógenos, a temperatura no composto deve permanecer em torno de 55°C, durante 15 dias (Brito et al., 2008).

O entendimento da ação dos microrganismos presentes e a dinâmica de suas populações durante o processo de compostagem podem ajudar a garantir um composto de alta qualidade. Problemas com composto imaturo resultam, por exemplo, em mau cheiro, atração de insetos e poluição ambiental (Steger et al., 2007).

## 2.2 Microbiota da compostagem

A compostagem é um processo de autoaquecimento aeróbico conduzido pelos microrganismos presentes na matéria orgânica. A compostagem pode ser interpretada como uma sucessão de microrganismos que continuamente se adaptam à oferta de nutrientes que, por sua vez, alteram as condições ambientais (temperatura, umidade, dióxido de carbono, oxigênio, concentração de amônia, etc.) (Toumela et al., 2000).

Inicialmente, organismos decompositores mesofílicos dominam e utilizam as fontes de carbono facilmente degradáveis. A intensa atividade metabólica desses microrganismos gera calor, resultando em um aumento rápido da temperatura e provocando a redução da comunidade mesofílica e a ascensão da termofílica. Termófilos desempenham papel importante na quebra de substâncias complexas, como polissacarídeos e lignina. No final, durante a maturação, microrganismos mesofílicos reaparecem e formam uma nova comunidade microbiana (Székely et al., 2008).

A sucessão microbiana durante a compostagem e a sua diversidade têm sido estudadas em diferentes estágios e por vários métodos. Isolamentos de microrganismos a partir de compostos ainda quentes e em amadurecimento recuperaram principalmente *Bacillus* e actinobactérias (Strom, 1985; Dees & Ghiorse, 2001), mas cultivos em altas temperaturas (75°C) revelaram a presença de *Thermus thermophilus* (Beffa et al., 1996) e *Scytalidium thermophilum* (Straatsma et al., 1994a), este último apresentando relação positiva com o rendimento na produção de cogumelos, enquanto, em cultivos a partir do final da fase termofílica da compostagem, mesófilos, como *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, foram encontrados (Peters et al., 2000).

A alternância das comunidades microbianas nas diferentes etapas da compostagem foi detectada por técnicas independente de cultivo, perfis

fisiológicos de comunidades (Sharma et al., 1998), análises de ácidos graxos (Hanajima et al., 1997) e amplificação de DNA (Dees & Ghiorse, 2001).

Na fase II de compostagem, o composto passa por um tratamento térmico curto “indoor” (maturação), obtendo propriedades físico-químicas, bioquímicas e ecológicas, usualmente referidas como “seletividade do composto”, ficando pronto para o cultivo do cogumelo. A comunidade microbiana das etapas iniciais da compostagem também exerce efeito significativo na produção de cogumelos, uma vez que são esses microrganismos que direcionam a biodegradação que resultará na composição final do composto. A compostagem sofre também grande influência das alterações sazonais e qualidade das matérias-primas (Székely et al., 2008).

Determinar o grau de maturação e estabilização do composto não é tarefa fácil, uma vez que os parâmetros para tal não estão bem definidos. Têm sido propostos vários testes químicos e biológicos, como fitotoxicidade, grau de degradação da matéria orgânica, razão C/N, teor de nitrogênio, ácidos húmicos, dentre outros, mas ainda não há um índice de maturidade que possa ser utilizado (Fialho, 2007). Outra consideração que pode ser feita é a coloração do material após o processo da compostagem, que deve apresentar coloração escura, amarronzada e textura macia (Atkey & Wood, 1983).

### **2.3 Aplicações do composto**

Comumente, o composto tem sido utilizado na horticultura e na agricultura para melhorar a estrutura do solo e estimular o crescimento das plantas, atuando como fonte de matéria orgânica, macronutrientes como N, P, K, Ca e Mg e muitos micronutrientes, cuja quantidade depende da matéria-prima empregada (Oliveira et. al., 2004). Outros benefícios também estão associados ao uso do composto, como estabilização do pH no solo, aumento da capacidade de retenção de nutrientes disponíveis para as plantas, estabelecimento de uma

microbiota benéfica, redução da necessidade de fertilizantes e pesticidas e liberação lenta de nitrogênio (Pearson, 2003).

O objetivo principal do uso do composto em agricultura/horticultura é promover o crescimento e o aumento da qualidade das plantas. Entretanto, outra importante atribuição do composto é melhorar a estrutura física do solo, de maneira a diminuir o escoamento de água e, conseqüentemente, a erosão. Outras características que devem ser consideradas são a estabilidade e a concentração de sais solúveis. Um composto instável pode esgotar o nitrogênio de um solo, enquanto altas concentrações de sais podem causar fitotoxicidade (Epstein, 1997).

Além da utilização tradicional do composto para o cultivo de cogumelos e na agricultura, outras aplicações menos tradicionais têm sido propostas, como descrito a seguir.

### **2.3.1 Cobertura e estabelecimento de vegetação em acostamentos de estradas**

Para a cobertura e o estabelecimento de vegetação em acostamentos de estradas, o composto atua melhorando a estrutura física do solo, aumentando a porosidade, permitindo melhor circulação de água e gases e reduzindo a erosão. O composto, por meio da granulação de seus componentes, aumenta a capacidade de retenção de água e de agregação de partículas, principalmente em solos arenosos. Essa atividade é possibilitada pelo húmus que atua como uma “cola” que mantém as partículas do solo juntas, o que o torna mais resistente às intempéries. Com a capacidade de manutenção de água aumentada, o composto faz com que a água se desloque no solo de maneira mais homogênea, diminuindo a necessidade de irrigações, facilitando o estabelecimento da vegetação e diminuindo também os custos de manutenção desses canteiros (Environmental Protection Agency - EPA, 2008; Pearson, 2004).

### 2.3.2 Supressor de doenças

Como supressor de doenças, o composto é utilizado como medida preventiva e não curativa, não eliminando os agentes patogênicos, mas sim diminuindo sua população ou evitando seu impacto econômico negativo na cultura. Essa supressão pode ser geral ou específica. A supressão geral ocorre quando, coletivamente, diferentes grupos de microrganismos competem com os fitopatógenos por carbono, energia e nutrientes, como o nitrogênio, de forma que nenhum organismo isoladamente responde pela supressão. Por outro lado, na supressão específica, um ou mais microrganismos atuam como antagonistas ao fitopatógeno em algum momento de seu ciclo de vida.

Comumente, a supressão geral é a que mais ocorre. Os mecanismos biológicos de supressão de doenças se enquadram em quatro grandes grupos: **antagonismo** – que se refere à capacidade de um microrganismo específico benéfico de produzir antibióticos que podem matar organismos patogênicos e **competição por nutrientes e energia** – em muitos casos, patógenos são competidores ruins em relação aos micróbios benéficos. Nestes casos, os micróbios benéficos colonizam o substrato e estressam os esporos não germinados dos fitopatógenos, consumindo os nutrientes e a energia presentes no substrato; **competição pela colonização da raiz** – este é pertinente para patógenos de raiz. Alguns microrganismos benéficos têm a habilidade de colonizar as raízes das plantas antes dos patógenos, protegendo-as; **resistência sistêmica induzida (RSI) ou resistência sistêmica adquirida (RSA)** – este é o mecanismo pelo qual genes repressivos de doenças são ativados por meio da microbiota presente no composto, dando condições à planta de se defender de microrganismos causadores de doença. Na maioria dos casos, mais de um mecanismo atua simultaneamente na supressão das doenças (Alexander, 2006; EPA, 1997b; Ressetti et al., 2000).

### 2.3.3 Biorremediação com uso de composto

Esta abordagem refere-se ao uso de um sistema biológico de microrganismos em compostos maturados ou crus para sequestrar ou degradar contaminantes na água ou no solo. Os microrganismos consomem os contaminantes do solo, de águas subterrâneas e superficiais, e do ar. Os contaminantes são digeridos, metabolizados e transformados em húmus e subprodutos inertes, como dióxido de carbono, água e sal. Biorremediação por meio de composto tem provado ser efetiva em degradar ou alterar muitos tipos de contaminantes, como hidrocarbonetos clorados e não clorados, conservantes, solventes, metais pesados, pesticidas, derivados de petróleo e explosivos. Os compostos utilizados em biorremediação são adaptados ou desenvolvidos segundo problemas específicos (EPA, 1997a; Coker, 2006; Marín et al., 2006).

### 2.3.4 Biofiltros

Os biofiltros são, normalmente, utilizados para filtrar água de chuva que possa carrear contaminantes perigosos, como óleo, metais, pesticidas, fertilizantes e outros. O filtro de composto para águas pluviais (*compost stormwater filter* ou CSF), um tipo de biorremediador, é uma grande caixa de alvenaria com três defletores que permitem o fluxo de água para dentro da caixa, que é filtrada por uma camada de composto depositada no fundo (Figura 4).

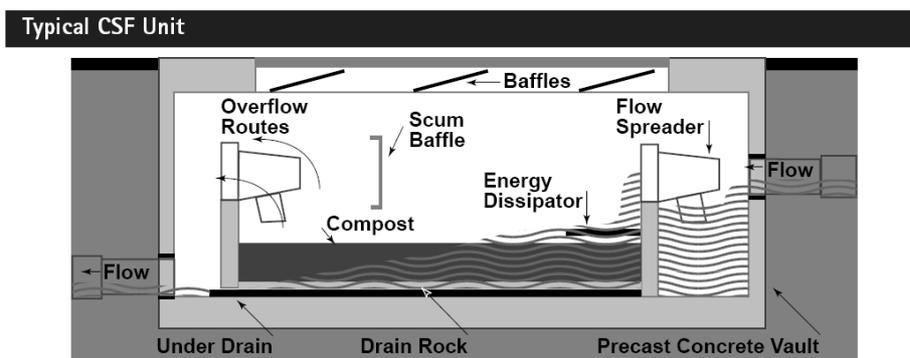


FIGURA 4 Esquema de filtro de composto para águas pluviais.

O CSF é projetado para remover detritos flutuantes, espumas de superfície, contaminantes químicos e sedimentos de águas pluviais, permitindo que a água passe através de camadas de composto especialmente preparado. A estrutura porosa do composto filtra os detritos físicos enquanto degrada os contaminantes químicos (EPA, 1997a; Epstein, 1997).

### **2.3.5 Substrato para cogumelos**

Como organismos heterotróficos, os fungos não têm habilidade de formar moléculas orgânicas para seu crescimento a partir de carbono atmosférico, como os vegetais. Suas necessidades nutricionais são supridas pelo substrato/composto, que deve apresentar condições para o crescimento e o desenvolvimento micelial, antes ou depois do processo de compostagem. O substrato/composto para cogumelos pode ser definido como um tipo de material lignocelulósico que suporta o crescimento, o desenvolvimento e a frutificação de micélio de cogumelos (Chang & Milles, 2004).

### **2.4 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante ou DGGE**

O monitoramento dos microrganismos durante o processo de compostagem é importante, uma vez que eles desempenham papéis chaves na degradação e na maturação do composto. Vários trabalhos de descrição da microbiota durante a compostagem já foram realizados com a abordagem clássica de isolamento, identificação e caracterização de microrganismos presentes no composto (Silva et. al., 2009; Salar & Aneja, 2007a; Salar & Aneja, 2007b; Lyons et. al., 2000; Straatsma et. al., 1994b). No entanto, por meio da metodologia tradicional não se podem detectar as espécies não cultiváveis e existe a possibilidade de que microrganismos de difícil cultivo sejam predominantes no processo, sobretudo no final da compostagem, quando as moléculas de fácil metabolização já foram utilizadas, restando apenas as de

difícil degradação (Ishii et. al., 2000). Neste contexto, metodologias que detectem microrganismos, independentemente de cultivo, são importantes para o melhor acompanhamento da microbiota presente durante a compostagem.

A técnica de *Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) aparece neste contexto como uma ferramenta muito utilizada para estudos de diversidade de microrganismos não cultiváveis (Peters et. al., 2000). Esta técnica é utilizada para a análise de amostras ambientais (solo, material vegetal e composto), por meio da amplificação (PCR) das regiões ribossomais dos genomas presentes (Figura 5) e posterior separação dos fragmentos amplificados, em função da sua composição nucleotídica, por meio de um gradiente de desnaturação formado por ureia e formamida (Figura 6). A técnica de DGGE foi primeiramente descrita, para análise de diversidade microbiana, por Muyzer et al. (1993), enquanto que Kowalchuk et al. (1997) foram os primeiros a usarem a técnica para análises de comunidades fúngicas causadoras de podridão de raízes em gramíneas. A partir de então, a técnica de PCR-DGGE tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada para a detecção de espécies, independente de cultivo e caracterização de populações fúngicas em amostras ambientais.

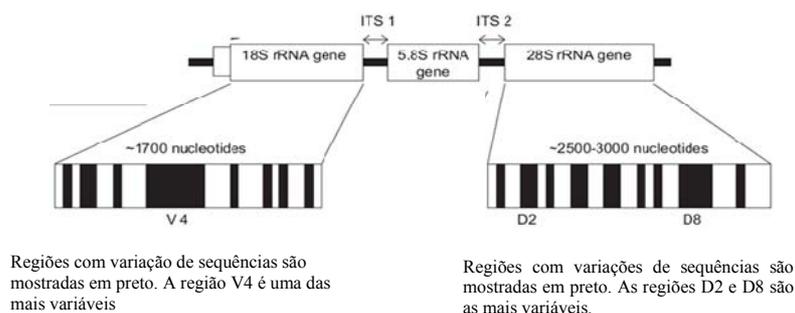


FIGURA 5 Região ribossomal normalmente amplificada para técnica de DGGE.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Substrato

O experimento foi realizado utilizando-se uma pilha de compostagem (aproximadamente 1 m de largura, 1,5 m de altura e 5 m de comprimento) montada em pátio aberto. A pilha foi composta por bagaço de cana [*Saccharum officinarum* L.] (1.000 kg) e capim-coast-cross [*Cynodon dactylon* (L.) Pers] (1.000 kg), e suplementada, ao quarto dia, com farelo de trigo (154 kg), calcário (30 kg), gesso agrícola (30 kg) e uréia (26 kg). O composto foi revirado de dois em dois dias, manualmente, e a umidade avaliada, adicionando-se água sempre que necessário para mantê-la entre 65% e 70%. A temperatura máxima alcançada durante a fase II da compostagem foi de 70°C e o pH final do produto final foi 6,7.

### 3.2 Contagem e isolamento

Para a amostragem, a pilha de compostagem foi dividida em cinco segmentos. De cada um deles foi retirada uma amostra composta (cinco pontos aleatórios misturados em uma única amostra), totalizando, por amostra, cinco pacotes que foram nomeados de acordo com o dia amostrado (1º dia: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5; 2º dia: 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5; ... 5.5) (Figura 7). As análises de isolamento e caracterização molecular foram realizadas somente na fase II de compostagem, considerando-se somente os dias finais. A compostagem durou 28 dias no total. A fase I compreendeu os 19 primeiros dias e a fase II, do 20º até o 28º. As amostragens foram realizadas em dias alternados, durante a fase II da compostagem, começando no 20º dia.

As contagens e isolamentos dos fungos foram realizados por diluições seriadas e também por plaqueamento de partículas lavadas depositadas sobre

meio sólido. Para o isolamento por diluição, uma porção de 10 g de composto foi suspensa em 180 ml de água peptonada 0,1% e agitada por dois minutos. As diluições de  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram plaqueadas (0,1 ml por placa) em triplicata em meio ágar malte 2% (20 g de malte, 17 g de ágar e 1000 ml de água destilada), acrescido de rosa de bengala (50mg/L) para retardar o crescimento dos fungos e permitir o isolamento (Anastasi et al., 2005; Salar & Aneja, 2007a). As placas foram incubadas a 45°C para o crescimento dos termófilos, resultando em 15 placas por amostra e 75 placas no total. O número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) para cada amostra foi determinado.

O isolamento por partículas foi feito de duas maneiras: lavando-se três vezes o composto, plaqueando-se os fragmentos retidos na peneira de 0,21mm e lavando-se uma vez o composto e plaqueando-se as partículas retidas na primeira peneira de 0,7 mm. Para isso, 10 g de composto foram suspensos em 180 ml de água destilada e agitados, manualmente, por 10 minutos, substituindo-se a água três vezes em um dos experimentos e uma vez em outro. As partículas foram colocadas em meio MA 2% acrescido de rosa de bengala e cloranfenicol com posterior incubação, a 45°C, por até 5 dias.

Os fungos foram identificados convencionalmente, de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas, depois da determinação do gênero (Ellis, 1971; Barnett & Hanter, 1987; Straatsma, 1993; Salar & Aneja, 2007b; Domsch et al., 1980; Hawksworth et al., 1995).

### **3.3 Extração de DNA**

Porções de aproximadamente 2 g, originadas de composto armazenados a -20°C, foram maceradas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Uma porção de 300 mg do macerado foi acondicionada em microtubos, procedendo-se à extração do DNA com a utilização do kit PSP<sup>®</sup>

Spin Stool DNA kit (Invitek), o qual foi purificado por meio do kit MSB<sup>®</sup> Spin PCRapace (Invitek), obedecendo às especificações do fabricante.

### **3.4 Amplificação da região ITS via NESTED – PCR**

Regiões ITS dos genomas fúngicos foram amplificadas por PCR, utilizando-se os iniciadores ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (1<sup>o</sup> round) e, posteriormente, o par ITS1F-GC (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA. 40pb GC) e ITS4 (2<sup>o</sup> round), visando alcançar o maior número possível de taxa quanto possível (Anderson et al., 2003). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Master Gradient Eppendorf, usando reações com volume de 25µl contendo, aproximadamente, 150 ng de DNA alvo, 4 pmol de cada iniciador, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), tampão a 10x e 2,5 U de taq polimerase (Fermentas<sup>®</sup>). A reação para o segundo *round* do NESTED-PCR foi realizada como descrito acima, adicionando-se 1,5 µl da reação 1 (1<sup>o</sup> round) aos demais reagentes. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C, por 10 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C, por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C, por 5 minutos. Controles negativos (sem DNA) foram feitos para todas as reações.

Todos os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e, posteriormente, corados com Syber Green e fotografados em transiluminador.

### **3.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR–DGGE)**

A DGGE foi realizada em equipamento DCode<sup>™</sup> Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), com a utilização de 20 µl de cada produto de PCR (100-200 ng de DNA), misturados a 5 µl de

tampão de carregamento para posterior aplicação no gel. Os amplicons para análise foram gerados utilizando-se os pares de iniciadores ITS1F/ITS4 (1° round) e ITS1F-GC /ITS2 (2° round). A corrida ocorreu em gel de poliacrilamida 8%, preparado com gradiente de 10% [ureia 0,7 M – formamida 4% (v/v)] a 55% [ureia 3,85 M – formamida 22% (v/v)]. A eletroforese ocorreu à temperatura constante de 60°C, a 75V, em TAE 1X por 16 horas. O gel foi corado em brometo de etídio por 20 minutos, observado em transiluminador e analisado visualmente.

### **3.6 Sequenciamento**

Bandas escolhidas para o sequenciamento foram removidas do gel de DGGE e colocadas em microtubos contendo TE e mantidas, a 4°C, por 12 horas. O DNA purificado foi amplificado utilizando-se os *primers* ITS1-F e ITS2 (sem o grampo GC) e submetidos ao sequenciamento. Sequências obtidas das amostras de compostagem foram comparadas por meio do Genbank database usando o programa BLAST (Altschuk et al., 1997). As sequências foram editadas e alinhadas utilizando-se os programas Bioedit (Hall, 1999) e Systat 11 (2004).

### **3.7 Análise estatística**

Foi realizada análise das médias encontradas para as unidades formadoras de colônia (UFC), pelo método de Scott-Knott, a 1% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Densidade da comunidade fúngica

As amostras analisadas apresentaram baixas populações de fungos, da ordem de  $10^4$  UFC/g. Em outros trabalhos há relatos de populações entre  $10^6$  e  $10^8$  UFC/g (Straatsma et al., 1994; Silva et al., 2009; Dias et al., 2009) em composto para a produção de cogumelos e matérias-primas frescas. Este fato pode ser explicado pelas altas temperaturas desenvolvidas nas Fases I e II da compostagem (Figura 6).

Na fase I, as temperaturas variaram entre 60°C e 76°C, baixando para 54°C no tempo zero da fase II. Uma vez dentro do túnel, é esperado que a temperatura do composto chegue a 60°C e se mantenha por um dia (pasteurização). Para o composto em estudo, a temperatura atingiu 70°C, permanecendo nesse patamar por dois dias. Essa elevação foi seguida de uma nova queda (45°C), seguida de elevação nos dois dias seguintes para 64°C. Segundo Metting (1993), fungos não são encontrados a temperaturas acima de 60°C na forma vegetativa. Existe, portanto, a possibilidade de que as elevadas temperaturas observadas durante a compostagem tenham apresentado efeito supressor sobre a comunidade fúngica presente, uma vez que a temperatura ideal para a fase II está no intervalo entre 45°C e 55°C, após a pasteurização a 60°C (Butler, et al., 2001; Chang & Milles, 2004; Silva et al., 2009).

A densidade da comunidade fúngica apresentou crescimento crescente a partir do primeiro tempo amostrado até o último, representando 22,8% dos microrganismos isolados a partir do composto estudado. Houve crescimento, em placa de Petri, para todos os tempos amostrados, tendo os dois últimos apresentado diferenças significativas em relação aos três primeiros (Figura 7).

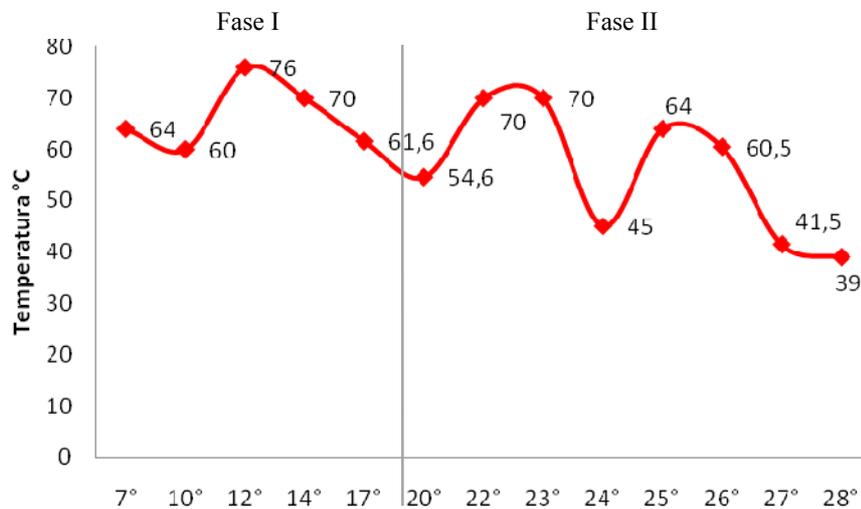


FIGURA 6 Variação da temperatura durante as fases I e II da compostagem. Coletas realizadas nos dias 20°(1), 22°(2), 24°(3), 26°(4) e 28°(5). Início da fase II no 20° de compostagem.

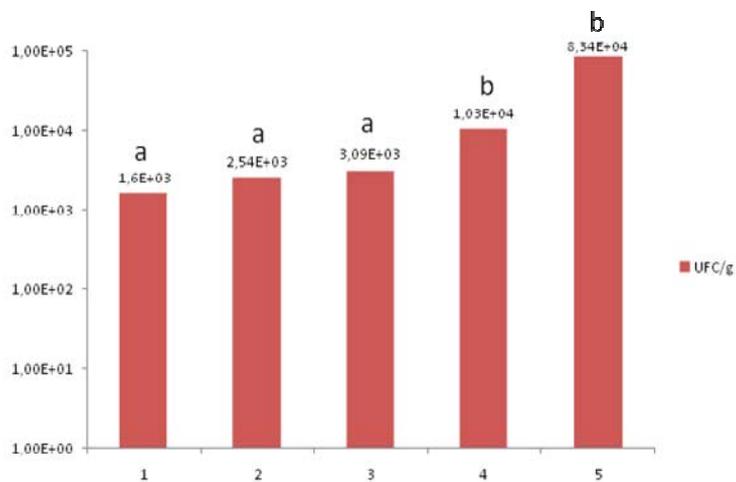


FIGURA 7 Unidades formadoras de colônias de fungos durante a fase II da compostagem. Amostras correspondem aos dias de compostagem: 20°(1), 22°(2), 24°(3), 26°(4) e 28°(5). Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 1% de probabilidade.

#### 4.2 Análise por espalhamento

O isolamento de fungos por meio do método de espalhamento mostrou espécies já esperadas em composto para cultivo de *Agaricus bisporus* e outros (Metting, 1993; Epstein, 1997), exceto pela espécie *Thermomyces ibadanensis*, para a qual não há relato (Tabela 1)

Foram observados diferentes morfotipos para algumas das espécies encontradas. Para os isolados pertencentes à espécie *Scytalidium thermophilum*, foram observados quatro morfotipos. Nas três primeiras amostras, foram observados de um a dois morfotipos e, nas duas últimas amostras, foram encontrados até quatro morfotipos. Para fungos do gênero *Penicillium*, foram observados três morfotipos. Foram ainda encontrados representantes de *T. lanuginosus*, *T. ibadanensis*, *Aspergillus* e outros não identificados (Tabela 1). Os fungos encontrados, ao serem plaqueados, tomaram as placas em poucos dias, sendo possível contar até 100 colônias por placa. As colônias, quando novas, se assemelharam muito e, por isso, foi preferido o isolamento aleatório, considerando também o fato de crescerem muito rapidamente (Straatsma et al., 1994).

Algumas espécies apareceram somente em amostras iniciais, enquanto outras só foram detectadas em amostras no meio do período da fase II, como os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* sp2.

A microbiota fúngica descrita como participante do processo de compostagem inclui mais de 35 espécies descritas (Epstein, 1997) e todas elas contribuem significativamente para a qualidade final do composto. Seus efeitos, juntamente com os de bactérias e de actinobactérias (Ryckeboer et al., 2003) sobre o crescimento micelial e sobre a produção de cogumelos, têm sido descritos em três níveis: (i) decrescendo a concentração de amônia no composto, substância que inibe o crescimento do micélio do cogumelo; (ii) imobilizando e estocando nutrientes em forma aparentemente disponível para o micélio do

cogumelo e (iii) promovendo o crescimento micelial do cogumelo, como demonstrado para vários fungos termófilos, mas, principalmente, para o fungo *Scytalidium thermophilum* (Salar & Aneja, 2007b).

TABELA 1 Fungos termófilos isolados por meio da técnica de espalhamento em cinco momentos diferentes e incubados a 45°C, por até cinco dias. Total de 263 isolados obtidos.

<i>Fungos</i>	<i>Amostras</i>				
	1	2	3	4	5
<i>Scytalidium thermophilum</i>	21	31	27	63	62
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	8	8	1	---	---
<i>Thermomyces ibadanensis</i>	6	5	---	---	---
<i>Penicillium</i> sp1.	---	3	12	---	---
<i>Penicillium</i> sp2.	---	---	2	---	---
<i>Penicillium</i> sp3.	1	---	---	---	---
<i>Aspergillus</i> sp.	---	---	11	---	---
<i>Zigomycota</i>	1	---	---	---	---
Não identificados	1	---	---	---	---

Os isolamentos mostraram predominância do fungo *Scytalidium thermophilum*, como observado também por Lyons et al. (1998), principalmente no final da compostagem, no período de condicionamento do composto. Sua presença em grande quantidade pode ser utilizada como indicador de qualidade do composto, uma vez que sua atividade e presença estão diretamente relacionadas com sua seletividade, além de ter efeito promotor de crescimento para o micélio de cogumelos do gênero *Agaricus* (Lyons et. al., 2000; Straatsma et.al., 1989). Os isolados de *S. thermophilum* apresentaram esporos do tipo II

(Straatsma et. al., 1993), possuindo esporos em longas cadeias e micélio e conídios aéreos bastante queratinizados (Salar & Aneja, 2007a).

Os fungos mais frequentes e persistentes após o *S. thermophilum* foram os do gênero *Thermomyces*. Os fungos deste gênero são termófilos, distribuídos em quatro espécies: *T. ibadanensis* Apinis & Eggins (1966), *T. lanuginosus* Tsiklinsky (1899), *T. stellatus* (Bunce) Apinis (1963) e *T. verrucosus* (Pugh et al., 1964).

A espécie *T. lanuginosus* é um saprófita comumente encontrado no solo e em restos culturais, como palha de milho e bagaço de cana. Esse fungo é um importante produtor de enzimas, dentre as quais se destacam: xilanase (Pedersen & Broadmeadow, 2000), glicoamilase termoestável (Rao et. al., 1981; Mishra et al., 1996), protease, amilase; fitiase, trealase e  $\beta$ -glicosidase, entre outras (Maheshwari et. al., 2000).

Apesar de ser capaz de produzir essa variedade de enzimas, *T. lanuginosus* não está relacionado com degradação de celulose e hemicelulose. Sua ocorrência foi relatada em associação com fungos celulolíticos, como *Chaetomium thermophile*, se desenvolvendo a partir de açúcares liberados durante a hidrólise da hemicelulose (Maheshwari et. al., 2000). A liberação intensa de enzimas degradadoras de polissacarídeos e a simultânea absorção e catabolismo dos carboidratos contribuem para o aquecimento da pilha de compostagem, tornando o ambiente favorável ao desenvolvimento de outros termófilos (Maheshwari et. al., 2000).

Outra espécie de *Thermomyces* com ocorrência frequente foi o *T. ibadanensis*, originalmente descrito por Apinis & Eggins (1966) em óleo de palmeira, na Nigéria. Em toda a literatura consultada, não há relatos de sua ocorrência em composto, podendo ser esse o primeiro relato da espécie em compostagem baseada em bagaço de cana e capim-coast-cross.

Os demais fungos encontrados nesta pesquisa (*Zigomicetos*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.) já foram relatados por outros pesquisadores como participantes ativos no processo, sendo os mesmos isolados dos mais diferentes substratos (Metting, 1993).

#### **4.3 Análise por plaqueamento de partículas**

Os isolamentos de fungos por meio da técnica de plaqueamento de partículas lavadas apresentaram resultados semelhantes ao obtido com o espalhamento. Os fungos encontrados apresentaram crescimento rápido, sendo esta uma característica comum entre as espécies presentes em composto (Straatsma et al., 1994).

As análises de partículas lavadas mostraram diferença entre as metodologias. Nas placas inoculadas com partículas que passaram por apenas uma etapa de lavagem, foram encontradas, predominantemente, três espécies de fungos, sendo elas: *Scytalidium thermophilum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Thermomyces ibadaenses*. Foram encontrados também fungos do gênero *Penicillium* e um representante do filo Zygomycota. Isolados correspondendo a 9,5% (22 isolados), dentre todos os fungos isolados, não foram identificados, mas encontram-se armazenados para futura identificação (Tabela 2). Nas placas inoculadas com partículas lavadas por três vezes, foi observada menor diversidade de fungos, sendo encontradas somente três espécies, *Scytalidium thermophilum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Thermomyces ibadanensis* (Tabela 3).

É conhecido que elevadas densidades de fungos específicos, principalmente o fungo *S. thermophilum*, são importantes para a colonização do substrato pelo micélio do cogumelo, resultando em um substrato seletivo (Straatsma et al., 1989). A obtenção de baixa diversidade nessas condições indica que o plaqueamento de partículas lavadas três vezes representa uma boa ferramenta para avaliar as espécies predominantes no composto, sobretudo para

o fungo *S. thermophilum*, o qual é apontado como uma das espécies mais importantes no processo de compostagem para o cultivo de cogumelos *Agaricus* (Straatsma et al., 1994). Portanto, com a utilização desta técnica, seria possível o monitoramento deste fungo durante a fase II, de maneira rápida e segura, uma vez que essa metodologia facilita o isolamento e a identificação deste fungo.

TABELA 2 Fungos termófilos em partículas de composto lavadas uma vez a partir de amostras obtidas durante a fase II da compostagem (total de 273 isolados obtidos).

Fungos	Dia de amostragem				
	20 <sup>o</sup>	22	24	26	28
<i>Scytalidium thermophilum</i>	14	16	18	35	25
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	10	17	9	47	3
<i>Thermomyces ibadanensis</i>	1	3	9	34	---
<i>Penicillium</i> sp.	3	1	---	---	1
Zygomycota	4	---	---	---	1
Não identificados	8	5	5	4	---

Amostras correspondem aos dias de compostagem: 20<sup>o</sup>(1), 22<sup>o</sup>(2), 24<sup>o</sup>(3), 26<sup>o</sup>(4) e 28<sup>o</sup>(5).

TABELA 3 Fungos termófilos em partículas de composto lavadas três vezes a partir de amostras obtidas durante a fase II da compostagem (total de 128 isolados obtidos).

Fungos	Amostragem				
	1	2	3	4	5
<i>Scytalidium thermophilum</i>	15	41	10	ND	17
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1	7	12	ND	6
<i>Thermomyces ibadanensis</i>	2	3	12	ND	2
Não identificados	---	---	---	ND	---

ND: Não determinado, as culturas perderam viabilidade após estocagem.

#### 4.4 Caracterização molecular

A separação dos amplicons da região ITS de fungos filamentosos por DGGE (Figura 8) permitiu a detecção de 12 bandas com diferentes mobilidades no gel de poliacrilamida. A riqueza dos amplicons (Se) para os fungos foi diferenciada em cinco momentos, durante a fase II da compostagem (Figura 9), mostrando uma diminuição no número de amplicons nos últimos dias de condicionamento do composto. O agrupamento hierárquico (Figura 10) resultou na obtenção de dois grupos, separando as três primeiras amostras das duas últimas, mostrando diferenças entre elas.

Os resultados mostram diminuição da diversidade fúngica à medida que a fase II avança. Em seu trabalho, Straatsma (1994) encontrou somente *Scytalidium thermophilum* no final da fase II. Fato similar ocorreu neste trabalho (Tabela 3).

Foi realizado sequenciamento de bandas obtidas do DGGE, utilizando-se os *primers* ITS1F e ITS2. As sequências, quando comparadas às depositadas no GenBank com o auxílio do Blastn, apresentaram similaridades com as sequências de espécies dos gêneros *Scytalidium thermophilum*, *Phaeoisariopsis griseola*, *Candida tropicalis*, fungo de composto não cultivável e *Myceliophthora* sp., obtendo-se, respectivamente, 99%, 98%, 97%, 90% e 88% de identidade.

O fungo *Phaeoisariopsis griseola* é o agente etiológico da mancha-angular do feijoeiro, que pode ter chegado ao composto junto com a matéria-prima utilizada. De maneira similar, foi observada a presença da levedura *Candida tropicalis*. Entretanto, os amplicons desses fungos desaparecem logo nos primeiros dias da fase II, evidenciando o poder supressor de patógenos que a compostagem possui (Epstein, 1997). Bandas relacionadas com o fungo *Myceliophthora* sp. também foram observadas, sendo sua presença no composto apontada como causadora de queda na produção do cogumelo (Coutinho, 2000). A banda com maior intensidade, durante toda a fase II e presente no final na

compostagem, foi identificada como sendo correspondente a *Scytalidium thermophilum* (Figura 11), o que está de acordo com os resultados dos isolamentos realizados neste trabalho (Tabela 1).

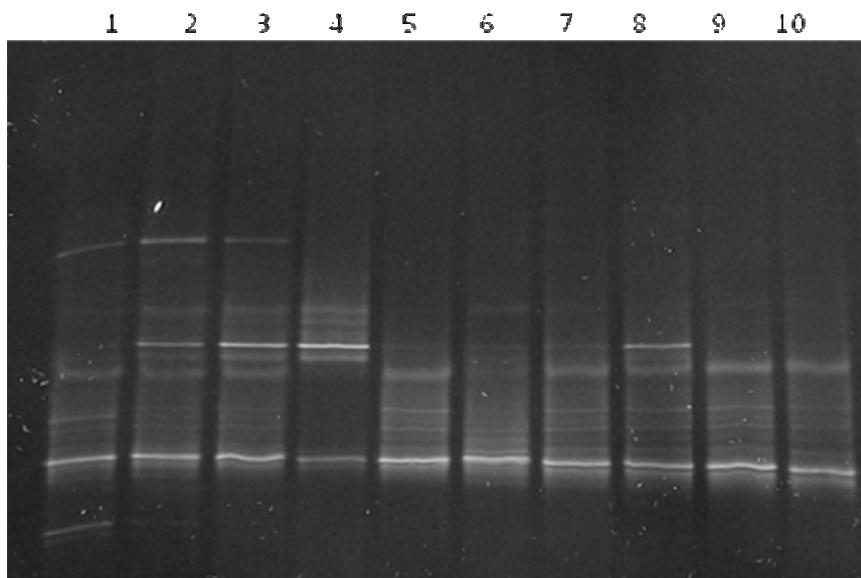


FIGURA 8 Perfil de bandas correspondentes à região ITS de fungos obtidos por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), em diferentes momentos da fase II da compostagem. Linhas 1 e 2 correspondem à primeira amostra; 3 e 4 à segunda; 5 e 6 à terceira; 7 e 8 à quarta e 9 e 10 à quinta amostra.

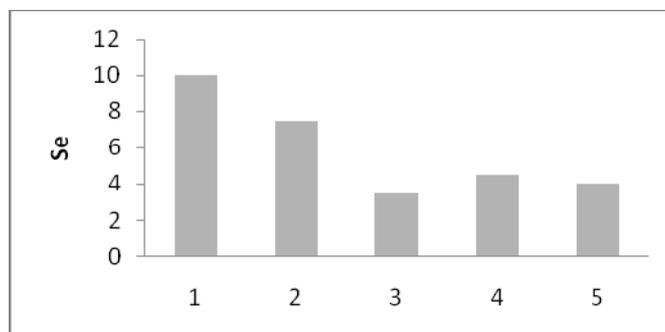


FIGURA 9 Riqueza de amplicons (Se) da região ITS de fungos presentes em composto, em diferentes momentos, durante a fase II de compostagem, com base no número de bandas obtidas por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Os dados apresentam a média de duas repetições.

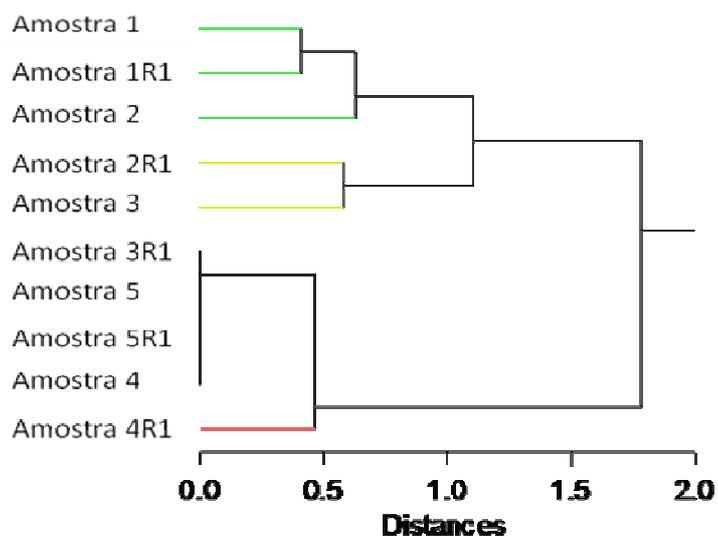


FIGURA 10 Agrupamento hierárquico da região ITS de fungos presentes em composto para a produção de *Agaricus brasiliensis*.

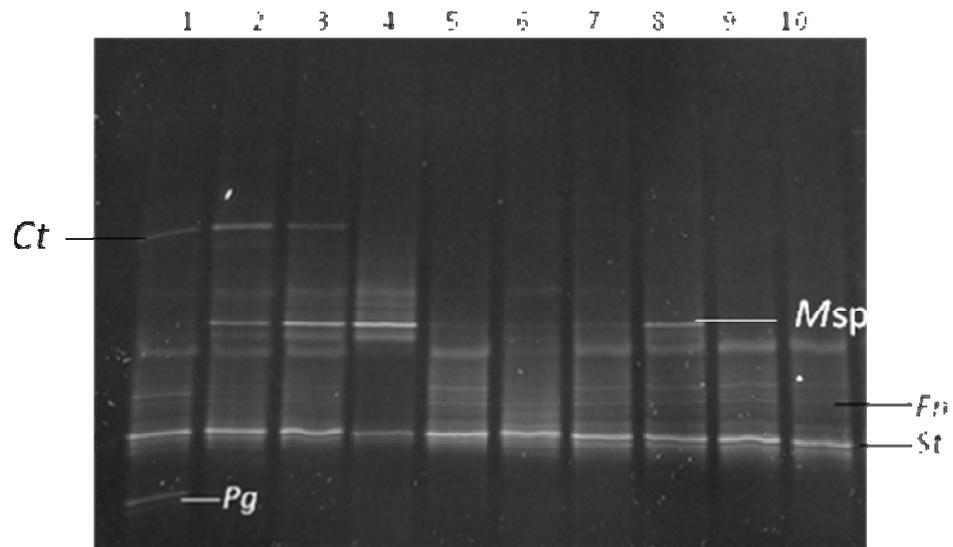


FIGURA 11 Bandas relacionadas a espécies identificadas por meio do Blastn. St – *Scytalidium thermophilum*, Pg – *Phaeoisariopsis griseola*, Ct – *Candida tropicalis*, FN – fungo não cultivável e Msp – *Miceliophthora* sp.

## 5 CONCLUSÕES

Os isolamentos mostraram predominância de três espécies de fungos filamentosos na fase II de compostagem, sendo elas *Thermomyces lanuginosus*, *Thermomyces ibadanesis* e, principalmente, *Scytalidium thermophilum*.

Existe relação inversa entre os números de lavagens e espécies recuperadas no isolamento por plaqueamento de partículas.

Análises de DGGE mostraram diminuição da diversidade fúngica com o avanço da fase II da compostagem.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, R. Compost and disease suppression: Caledonian Environment Center. **Remade Scotland Organics Fact Sheet**, Glasgow, v. 1, p. 1-5, May 2006.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

ANASTASI, A.; VARESE, G. A.; MARCHISIO, V. F. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. **Mycologia**, Lawrence, v. 97, n. 1, p. 33-34, Jan./Feb. 2005.

ANDERSON, I. A.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland: scoots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 12, p. 1121-1132, Dec. 2003.

APINIS, A. E. *Thermomyces stellatus* (Bunce). **Nova Hedgwia**, Berlin, v. 5, n. 1, p. 75, 1963.

APINIS, A. E.; EGGINS, H. O. W. *Thermomyces ibadanensis* sp.nov. from oil palm kernel stacks in Nigeria. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v. 49, n. 4, p. 629-632, Dec. 1966.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. **Manual prático para a compostagem de biossólidos**. Londrina: UEL, 1999. 84p.

ATKEY, P. T.; WOOD, D. A. An electron microscope study of wheat straw composted as a substrate for the cultivation of the edible mushroom (*Agaricus bisporus*). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 293-304, Feb. 1983.

BARNET, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated general of imperfect fungi**. 4. ed. New York: Macmillan, 1987. 218 p.

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

BRITO, L. M.; COUTINHO, J.; SMITH, S. R. Methods to improve the composting process of the solid fraction of dairy cattle slurry. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, n. 18, p. 8955-8960, Dec. 2008.

BUTLER, T. A.; SIKORA, L. J.; STEINHILBER, P. M.; DOUGLAS, L. W. Compost age and sample storage effects on maturity indicators of biosolids compost. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 30, n. 6, p. 2141-2148, Nov. 2001.

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

COKER, C. Environmental remediation by composting. **Biocycle**: journal of waste recycling, Emmaus, v. 47, n. 12, p. 18, Dec. 2006.

COUTINHO, L. N. Doenças fúngicas e fungos competidores em cogumelos comestíveis do gênero *Agaricus*. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 3., 2000, Mogi das Cruzes. **Anais...** Mogi das Cruzes: Instituto Biológico, 2000. p. 237.

DEES, P. M.; GHIORSE, W. C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. **FEMS Microbiol Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 207-216, Feb. 2001.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic, 1980. v. 1, 859 p.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 507 p.

ELLIS, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Compost use on state highway applications**. Washington, 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Innovative uses of compost:** bioremediation and pollution prevention. Washington, 1997a. (EPA530-F-97-042).

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Innovative uses of compost:** disease control for plants and animals. Washington, 1997b. (EPA530-F-97-044).

EPSTEIN, E. **The science of composting**. Boca Raton: CRC, 1997. 487 p.

FIALHO, L. L. **Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos**. 2007. 170 p. Tese (Doutorado em Ciências/Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

HALL, T. A. Bioedit a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 95-98, Jan. 1999.

HANAJIMA, D.; KURODA, K.; FUKUMOTO, Y.; HAGA, K. Effect of addition of organic waste on reduction of Escherichia coli during cattle feces composting under composting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 1011-1018, Mar. 1997.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & bisbys dictionary of the fungi**. 8. ed. Wallingford: CAB International, 1995. 616 p.

HELLMANN, B.; ZELLES, L.; PALOJARVI, A.; BAI, Q. Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow high-moisture condition. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, n. 14, p. 1626-1630, Sept. 2006.

IMBEAH, M. Composting piggery waste: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 197-203, Mar. 1998.

ISHII, K.; FUKUI, M.; TAKII, S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 5, p. 768-777, Nov. 2000.

KIRK, P.; COOPER, J. **CABI Bioscience data base: index of fungorum**. Cambridge: Cambridge University, 2009.

KOWALCHUK, G. A.; GERARDS, S.; WOLDENDORP, J. W. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 10, p. 3858-3865, Oct. 1997.

LAMBERT, E.; DAVIS, A. C. Distribution of oxygen and carbon dioxide in mushroom compost heaps as affecting microbial thermogenesis, acidity and moisture therein. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 48, n. 3, p. 251-253, 1934.

LARNEY, F. J.; BLACKSHAW, R. E. Weed seed viability in composted beef cattle feedlot manure. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, n. 3, p. 1105-1113, May 2003.

LARNEY, F. J.; HAO, X. A review of composting as a management alternative for beef cattle feedlot manure in southern Alberta, Canada. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 98, n. 17, p. 3221-3227, Dec. 2007.

LARNEY, F. J.; YANKE, L. J.; MILLER, J. J.; MCALLISTER, T. A. Fate of coliform bacteria in composted beef cattle feedlot manure. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, n. 4, p. 1508-1515, July 2003.

LYONS, G. A.; MCKAY, G. J.; SHARMA, H. S. S. Molecular comparison of *Scytalidium thermophilum* isolates using RAPD and ITS nucleotide sequence analyses. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 12, p. 1431-1438, Dec. 2000.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 3, p. 461-488, Sept. 2000.

MARÍN, J. A.; MORENO, J. L.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 17, n. 3, p. 251-261, June 2006.

METTING JÚNIOR, F. B. **Soil microbial ecology**: applications in agricultural and environmental management. New York: Marcel Dekker, 1993. 646 p.

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

MISHRA, R.; MAHESHWARI, R. Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: their purification, properties, action on starch and response to heat. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 21, n. 5, p. 653-672, Dec. 1996.

MOUCHACCA, J. Thermophilic fungi and applied research: a synopsis of name changes and synonymies. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 8/9, p. 881-888, Sept. 2000.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITIERTLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

OLIVEIRA, A. M. G.; AQUINO, A. M.; CASTRO NETO, M. T. **Compostagem caseira do lixo orgânico doméstico**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. (Circular Técnica, 76).

OLIVEIRA, F. N. S.; LIMA, H. J. M.; CAJAZEIRA, J. P. **Uso da compostagem em sistemas agrícolas orgânicos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. (Documentos, 89).

PEARSON, P. R. **Using compost mulch to establish roadside vegetation**. 2003. 70 p. Thesis (Ph.D. in Civil Engineering) - Tech University, Texas.

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

PUGH, G. J. F.; BLAKEMAN, J. P.; MORGAN, J. *Thermomyces verrucosus* sp.nov and *T. lanuginosus*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 47, n. 1, p. 115-121, Mar. 1964.

RAJASEKARAN, A. K; MAHESHWARI, R. Thermophilic fungi: an assessment of their potential for growth in soil. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 18, n. 3, p. 345-354, Sept. 1993.

RAO, V. B.; SASTRI, N. V. S.; RAO, P. V. S. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochemical Journal**, London, v. 193, n. 2, p. 379-387, Feb. 1981.

RESSETTI, R. R.; SOCCOL, V. T.; KASKANITZIS NETO, G. Aplicação da vermicompostagem no controle patogênico do composto de lodo de esgoto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 13., 2000, Recife. **Anais...** Recife: CBEQ, 2000. CD-ROM.

SALAR, R. K.; ANEJA, K. R. Significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation: effects on growth and yield of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. **Journal of Agricultural Technology**, Washington, v. 3, n. 2, p. 241-253, Oct. 2007a.

SALAR, R. K.; ANEJA, K. R. Thermophilic Fungi: taxonomy and biogeography. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Washington, v. 3, n. 1, p. 77-107, Jan. 2007b.

SHARMA, S.; RANGGER, A.; INSAM, H. Effects of decomposing maize litter on community level physiological profiles of soil bacteria. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, n. 3, p. 301-310, May 1998.

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

SIQUEIRA, F. G. **Efeito do teor de nitrogênio, inoculantes e métodos de compostagem para cultivo de *Agaricus blazei***. 2006. 124 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STEGER, K.; JARVIS, A.; VASARA, T.; ROMANTSCHUK, M.; SUNDH, I. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. **Research in Microbiology**, Paris, v. 158, n. 7, p. 617-624, Jun. 2007.

STENTIFORD, E. T. Composting control, principles and practice. In: DEBERTOLDI, M.; SEQUI, P.; LEMMES, B.; PAPI, T. (Ed.). **The science of composting**. London: Chapman Hall, 1996. p. 49-59.

STOFFELLA, P. J.; KAHN, B. A. **Compost utilization in horticultural cropping systems**. Boca Raton: CRC, 2001. 432 p.

STRAATSMA, G.; GERRITS, J. P. G.; AUGUSTIJN, M. P. A. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; VOGELS, G. D.; GRIENSVEN, L. J. L. D. van. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 12, p. 1471-1477, Dec. 1989.

STRAATSMA, G.; OLIJNSMA, T. W.; GERRITS, J. P.; AMSING, J. G. O. P. D. C.; LEO; GRIENSVEN, L. J. L. D. van. Inoculation of *Scytalidium thermophilum* in button mushroom compost and its effect on yield. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 9, p. 3049-3054, Sept. 1994a.

STRAATSMA, G.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 3, p. 321-328, Mar. 1993.

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

STROM, P. F. Identification of thermophilic bacteria in solidwaste composting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 4, p. 906-913, Apr. 1985.

SYSTAT SOFTWARE INC. **SYSTAT 11**. California, 2004.

SZÉKELY, A. J.; SIPOS, R.; BERTA, B.; VAJNA, B.; HAJDÚ, C.; MÁRIALIGETI, K. DGGE and T-Rflp analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. **Mycological Research**, Cambridge, v. 57, n. 3, p. 522-533, Apr. 2008.

TSIKLINSKY, P. *Thermomyces lanuginosus*. **Annales de l'Institut Pasteur/Actualités**, Paris, v. 13, p. 500-505, 1899.

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

WANG, C. M.; SHYU, C. L.; HO, S. P.; CHIOU, S. H. Species diversity and substrate utilization patterns of thermophilic bacterial communities in hot aerobic poultry and cattle manure composts. **Bioresource Technology**, Essex, v. 54, n. 1, p. 1-9, Jul. 2007.

ZHANG, Y.; HE, Y. Co-composting solid swine manure with pine sawdust as organic substrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 96, p. 2024-2031, Nov. 2006.