

EFEITO DA APLICAÇÃO DE ROCHAS SILICÁTICAS SOBRE A COMUNIDADE MICROBIANA DURANTE O PROCESSO DE COMPOSTAGEM

**Wardsson Lustrino Borges¹, Samuel Ribeiro Passos¹, Aline Mansur
Almeida¹, Ricardo Trippia dos Guimarães Peixoto², Norma Gouvêa
Rumjanek¹ & Gustavo Ribeiro Xavier¹**

¹Embrapa Agrobiologia - BR 465, km7, Seropédica, RJ - Brasil - CEP: 23890-000
{gustavo, norma}@cnpab.embrapa.br

²Embrapa Solos – Rua Jardim Botânico, 1.024 - Jardim Botânico
Rio de Janeiro, RJ - Brasil - CEP 22460-000

Recebido 10 de julho de 2006, revisado 12 de setembro, aceito 10 de outubro

RESUMO – A aplicação de composto orgânico produz múltiplos efeitos sobre o solo e a nutrição das plantas melhorando a eficiência de uso dos nutrientes. Diferentes substratos orgânicos têm sido utilizados, no entanto, poucos são os trabalhos que testam fontes inorgânicas no processo de compostagem. O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio da técnica de DGGE o efeito da aplicação das rochas silicáticas sobre a comunidade microbiana durante o processo de compostagem. Foi observada uma alteração no perfil de bandas da comunidade bacteriana visualizado nos géis como resultado da aplicação das rochas brecha alcalina e flogopitito durante o período do estudo.

Palavras-Chave: potássio, diversidade microbiana, agricultura orgânica.

ABSTRACT – The application of organic compost produces several effects in the soil and crop nutrition improving the nutrient use efficiency. Different organic substrates had been used, however, few studies had evaluated the use of inorganic sources in the composting process. The aim of this study was to evaluate by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) the effect of the application of silicate rocks dust in the microbial community during the composting process. It was observed a change in the gel profile band of bacterial community as result of the application of silicate rocks dust.

Keywords: potassium, microbial diversity, organic agriculture.

INTRODUÇÃO

A agricultura orgânica, em expansão mundial, é uma opção para a promoção do desenvolvimento agrícola sustentável. Um dos princípios da agricultura orgânica está na substituição de fertilizantes sintéticos de alta solubilidade por outros produtos que apresentem liberação de nutrientes mais compatíveis com a demanda das culturas, evitando-se perdas por processos como a lixiviação e a volatilização.

Diversas práticas são adotadas nos sistemas orgânicos com o objetivo de evitar a utilização de insumos externos e reduzir a dependência de fontes externas de energia. Dentre estas, destaca-se o cultivo de leguminosas herbáceas para adubação verde que pode proporcionar acréscimo dos resíduos vegetais nas áreas cultivadas, o que em geral, estimula a biota do solo e melhora as características químicas e físicas do solo (Espindola *et al.*, 2005). Por outro lado, a aplicação de composto orgânico produz múltiplos efeitos sobre o solo e a nutrição das culturas através do aumento da permeabilidade do solo, agregação das partículas minerais, fornecimento de micro e macronutrientes, contribuindo para a correção da acidez, incrementando a população de organismos e melhorando a eficiência de uso dos nutrientes (Howard, 1947; Santos *et al.*, 2001).

Enriquecer o composto através da utilização de produtos alternativos ou do aproveitamento de resíduos, associada à manutenção ou otimização da qualidade nutricional, dos aspectos de fitossanidade e da segurança ambiental tem sido um desafio constante nessa área.

Diferentes substratos orgânicos, como bagaço de cana e vinhaça, por exemplo, têm sido utilizados, no entanto, poucos são os trabalhos que testam fontes inorgânicas, como no caso de resíduos da mineração.

As rochas silicáticas são oriundas de resíduos de mineração e apresentam diferentes características mineralógicas, que variam na concentração e nível de disponibilidade de macro, micronutrientes e de metais pesados. A utilização destes resíduos minerais, como fonte alternativa de potássio para uso agrícola e sua liberação para as culturas pode ser viabilizada pelas práticas de compostagem, o que representa novas oportunidades na área.

Durante o processo de compostagem o componente microbiano promove alterações termodinâmicas que atuam na decomposição e mineralização dos substratos, cujas fases críticas ocorrem no início do processo através dos microrganismos termofílicos. A sucessão microbiana ao longo da compostagem pode revelar uma diversidade de microrganismos influenciada pelo tipo, quantidade, qualidade, superfície específica e poder calorífico dos substratos utilizados (Rangel, 2004). Nesse sentido, a comunidade microbiana é resultado não somente da diversidade dos organismos que integram essa comunidade, mas também da densidade de cada população e dos efeitos de perturbações e estresses ambientais (Kennedy, 1999).

Nos últimos anos, técnicas moleculares desenvolvidas para geração de “finger printing” do DNA e identificação de mutações têm permitido acessar tanto a diversidade taxonômica como a diversidade funcional de bactérias e fungos, de forma que se tornou possível avaliar o efeito da aplicação de determinadas práticas agrícolas sobre a comunidade. Inúmeras são as aplicações advindas de

estudo da caracterização molecular das estruturas de comunidades presentes em diversos ambientes e práticas agrícolas, de tal forma que se observa uma expansão do conhecimento do que era anteriormente referido como uma “caixa preta” (Muyzer *et al.*, 1993; Ranjard *et al.*, 2000; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Weinbauer *et al.*, 2002). Dentre estas técnicas, a eletroforese em gel com gradiente desnaturante químico (DGGE) tem sido amplamente utilizada nos últimos anos e, tem sido considerada a mais promissora para os estudos da comunidade microbiana.

O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio da técnica de DGGE o efeito da aplicação de rochas silicáticas, brecha alcalina e flogopitito, sobre a comunidade microbiana durante o processo de compostagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi implantado um experimento de compostagem utilizando como substratos orgânicos cana-de-açúcar, capim napier, esterco bovino e cama de aviário na proporção de 4:4:2:1 (v/v). Os tratamentos utilizados consistiram de adição de pó-de-rochas silicáticas do tipo brecha alcalina (180 kg) ou do tipo flogopitito (60 kg), quantidade equivalente a aplicação de 10 toneladas de composto por ha, contendo 150 kg de K_2O . Além desses, um tratamento testemunha foi acrescentado ao experimento caracterizado por uma pilha formada apenas com os substratos orgânicos citados.

O experimento foi implantado no Sistema Integrado de Produção Agroecológico (SIPA - Seropédica - RJ, BR-465, km 7) no dia 24 de agosto de 2006. Os materiais foram medidos e em seguida misturados, formando uma pilha com 4,5 m³ (2x1,5x1,5). As pilhas foram revolvidas manualmente a cada

sete dias até completar cinco semanas, sendo a temperatura monitorada no dia anterior e no dia posterior ao revolvimento. De cada pilha de composto foram registradas cinco temperaturas cobrindo o terço superior e o terço médio das pilhas a 50 cm de suas extremidades.

Para avaliação do efeito da aplicação das rochas sobre a comunidade microbiana, foi utilizada a metodologia ajustada por Rangel (2004), com base no proposto por Zilli et al. (2003) que consistiu da preparação de um meio de cultivo de microrganismos utilizando o próprio composto como fonte de nutrientes. No dia da montagem das pilhas e semanalmente no dia anterior ao revolvimento foram coletadas amostras das pilhas que foram secas a 65° C em estufa de circulação forçada e, moídas até estado de talco em moinho de rolagem. Este material foi utilizado no preparo do meio de cultivo (20g do substrato, 200mL de água destilada e 3g de ágar-ágar). Após esterilização (autoclave 20 min, 120° C, 1,0 atm) o meio foi distribuído em placas de Petri em fluxo laminar horizontal.

Foram realizadas seis coletas em cada pilha (1, 8, 15, 22, 29 e 36 dias após a montagem das pilhas), em cada coleta duas amostras à 50 cm em direção ao interior pilha e à meia altura da pilha foram obtidas. Dez gramas de cada amostra foram agitados em 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) por 30 min e, 100µL do sobrenadante foi usado como inóculo para duas placas contendo o meio de cultivo. O inóculo foi espalhado sobre a superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça Drigalski. As placas foram incubadas em duas temperaturas (27° C e 55° C), por um período de 96 e 48 horas, respectivamente.

Após o aparecimento das colônias foram adicionados 3 mL de água deionizada estéril que foram espalhados sobre a superfície do meio e, em seguida 2 mL da

suspensão de células foram coletados e transferidos para dois microtubos (1 mL para cada microtubo). Os tubos foram centrifugados a 9.300G por 15 min e o sobrenadante descartado. Os tubos contendo o precipitado foram estocados a -20°C .

O DNA total foi extraído das células coletadas e lavadas com solução salina (0,85% de NaCl), acrescentando-se, em seguida às amostras 600 μL de tampão de extração (TES - 0,05M NaCl; 0,01M Tris HCl pH 8; SDS 1%). As amostras foram agitadas em vórtex e submetidas a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (5 min) e descongelamento em banho maria a 65°C por 5 min. Após o rompimento das células, foram adicionados 8,4 μL de proteinase K ($20\text{mg. } \mu\text{L}^{-1}$) seguido de incubação sob agitação à 65°C por 60 min. Em seguida, foram adicionados 600 μL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), agitando-se rapidamente. As amostras foram centrifugadas por 6 min à 7.500g e o sobrenadante transferido para um microtubo novo, acrescentando-se 600 μL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Uma nova centrifugação foi realizada por 6 min a 7.500g e ao sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado. As amostras foram mantidas a -20°C por 60 min para precipitar o DNA e, em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min à 16.100g, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi seco em centrífuga a vácuo e suspenso em 50 μL de TE e armazenado em freezer (Xavier *et al.*, 2004).

O DNA extraído foi submetido à eletroforese (100 V; 30 min.) em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio, um corante fluorescente que se intercala entre as bases do DNA e, sob radiação ultravioleta permite a visualização do DNA.

Foram utilizados os iniciadores 968f-GC (5' AACGCGAAGAACCTTAC3') contendo um grampo GC (5'CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG3') e o iniciador 1401 (5'GCGTGTGTACAAGACC C3'), específicos para a região 16S do DNAr entre os nucleotídios 968 e 1401 correspondente à região variável V6 - V8 (Gelsomino *et al.*, 1999). Para otimizar a reação de amplificação (PCR) foi realizado um teste inicial com seis amostras escolhidas ao acaso em três diluições (1:10, 1:20, 1:40) de modo a se determinar a quantidade de DNA molde ótima. Posteriormente, foram selecionadas duas amostras de cada tratamento, uma de cada ponto de coleta, que foram amplificadas e analisadas por DGGE. O volume final da reação de amplificação foi de 35µL, sendo a mistura composta de tampão 1X (20mmol/L Tris-HCl; pH 8,0; 50mmol/L KCl), 1,5 mmol/L de MgCl₂, 250 mmol/L dNTPs (300mmol/L cada), 0,2 mmol/L de cada iniciador, 1,4U de DNA polimerase (*Taq* DNA polymerase, Invitrogen) e 1,0µL do DNA diluído 1:20.

A reação de amplificação foi iniciada por um período de desnaturação a 95° C por 3 min, seguido de 35 ciclos constituídos de desnaturação por 1 min a 93° C, anelamento por 1 min a 55° C e, extensão por 2 min a 72° C, seguido de um passo final de extensão a 72° C por 5 min. Cada amostra foi amplificada em triplicata que foram combinadas em um único microtubo e os amplicons resultantes foram submetidos à eletroforese (100 V; 30 min.) em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, para verificação da qualidade e quantidade das amplificações.

Posteriormente, a cada 25 µL de mistura foram adicionados 3 µL de corante

(0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol/L de EDTA, 5% de SDS) que foram submetidos à eletroforese com gradiente químico de desnaturação. O gradiente de desnaturação de uréia-formamida utilizado para as análises em DGGE variou de 45% a 65%. A eletroforese foi realizada com tampão TAE 0,5X (120 V - 70 mA) por 16 horas. Como marcador para normalização dos géis foi utilizada uma amostra formada pela mistura da amplificação do DNA de quatro microrganismos (*Sinorhizobium fredii*, *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia* sp., *Rhizobium tropici* IIA) cujas posições das bandas no gel são conhecidas.

As imagens dos géis foram digitalizadas e com o auxílio do programa Gel Compar II (*Applied Maths*) foram construídos dendrogramas de similaridade entre os tratamentos, utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard e o método de agrupamento UPGMA (“*Unweighted pair-group method*”).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade do processo de compostagem foi acompanhada a partir do monitoramento da temperatura observada no terço superior e médio das pilhas no dia anterior e no dia seguinte ao revolvimento do substrato (**Figura 1**). No início do processo a temperatura alcançou cerca de 65° C, que foi sendo gradativamente reduzida como pode ser observado na **Figura 1A**. Na quinta e sexta semanas, independente do substrato utilizado, as temperaturas registradas tanto antes quanto após o revolvimento indicam que houve uma redução da atividade da fase termofílica. Os revolvimentos semanais foram realizados no sentido de se evitar que a temperatura no interior das pilhas atingisse patamares superiores aos 60° C que poderiam influenciar na qualidade do produto final

(Figura 1).

Durante o processo de compostagem são observadas três fases: mesofílica (20 a 50° C), termofílica, que pode durar de alguns dias a diversos meses (40 a 60° C) e maturação, que dura por diversos meses (40 a 20° C). Segundo Golouke (1991) a duração das fases da compostagem depende da natureza da matéria orgânica a ser compostada e da eficiência do processo, que é determinada pelo grau de aeração e revolvimento.

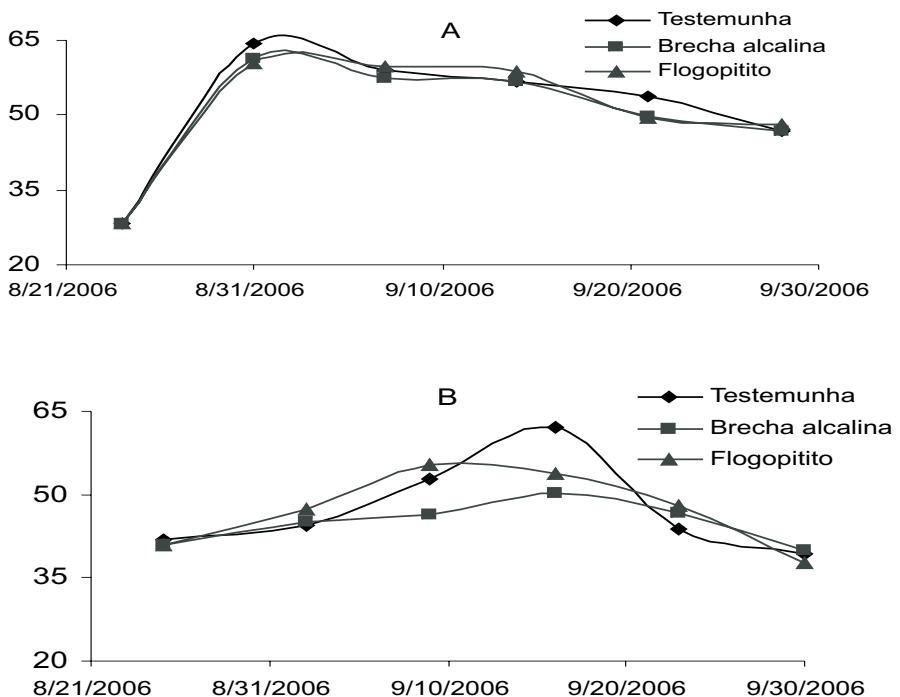


Figura 1: Dinâmica da temperatura das pilhas de composto com ou sem incorporação de rochas silicáticas. (A) temperatura nas pilhas no dia anterior ao revolvimento semanal e (B) temperatura nas pilhas no dia posterior ao revolvimento semanal.

Para a avaliação do efeito da aplicação das duas rochas silicáticas sobre a comunidade microbiana foram realizadas amostragem no período inicial do processo de compostagem (até a sexta semana), uma vez que é neste período que ocorre uma intensificação dos processos reativos compreendendo a transformação da matéria orgânica acompanhada da sucessão da microbiota responsável pela decomposição do material compostado (Golouke, 1991; Rangel, 2004).

Inicialmente a parte solúvel e as fontes mais facilmente degradáveis de carbono, tais como, monossacarídeos e lipídios, são utilizadas pelas bactérias mesofílicas, com temperaturas ótimas na faixa de 20-50° C. Como resultado desta atividade microbiana, a temperatura do composto se eleva para além da faixa mesofílica, e ocorre o domínio de bactérias termofílicas, com temperaturas ótimas entre 40-60° C (Golouke, 1991). Após a exaustão dos materiais lábeis, há uma redução na temperatura e os organismos mesofílicos continuam com a decomposição do material mais resiliente, porém, a uma taxa mais lenta.

A avaliação das comunidades microbianas a partir do enriquecimento em meio de cultivo mantido sob diferentes temperaturas de incubação pode revelar a dinâmica da comunidade microbiana específica ao longo do processo de compostagem. Os resultados obtidos por 16S rDNA-DGGE permitiram avaliar a comunidade bacteriana que predominou sob cultivo a 27° C (**Figura 2**) e a 55° C (**Figura 3**). Nesses dendrogramas foi possível observar que os agrupamentos foram influenciados pela incorporação do resíduo inorgânico e pelo tipo de rocha silicática, além do efeito do tempo de compostagem.

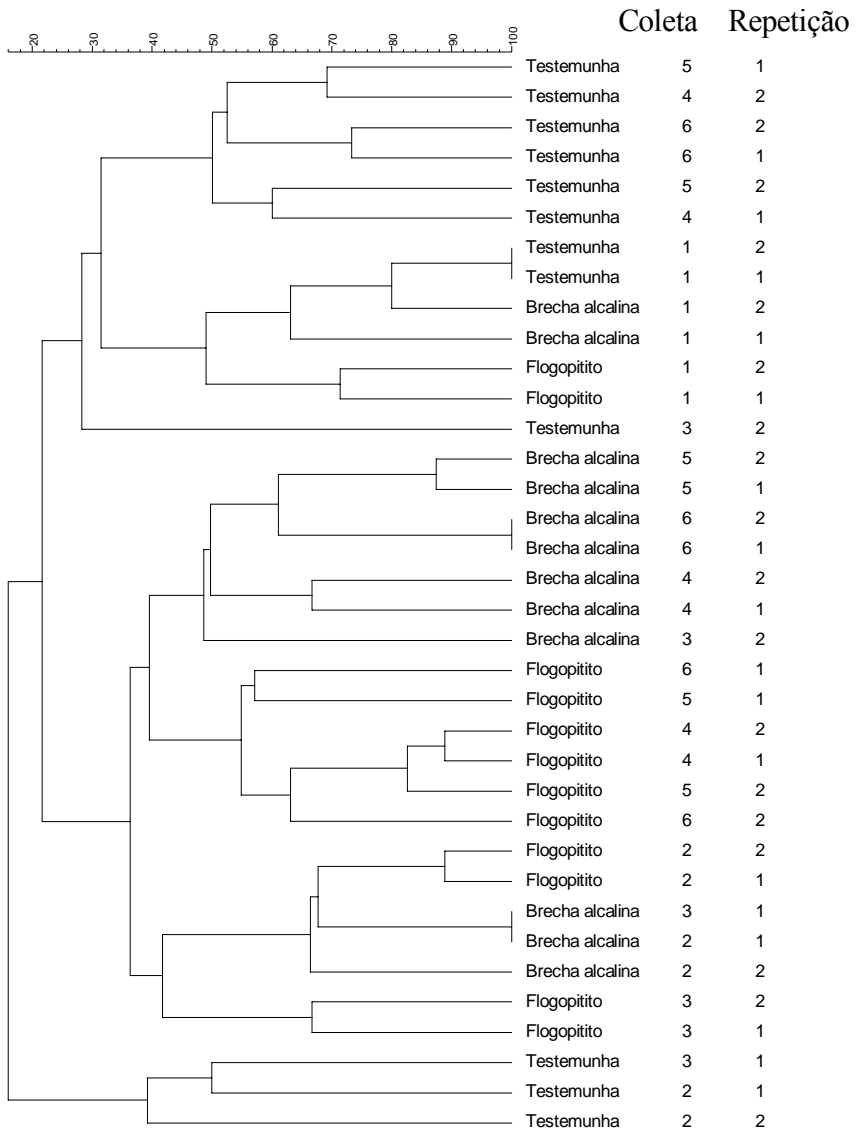


Figura 2: Dendrograma de similaridade construído com o índice de similaridade Jaccard e o método de agrupamento UPGMA mostrando o agrupamento formado entre as amostras coletadas nas três pilhas (testemunha, brecha alcalina e flogopitito) durante seis coletas e incubadas a 27° C.

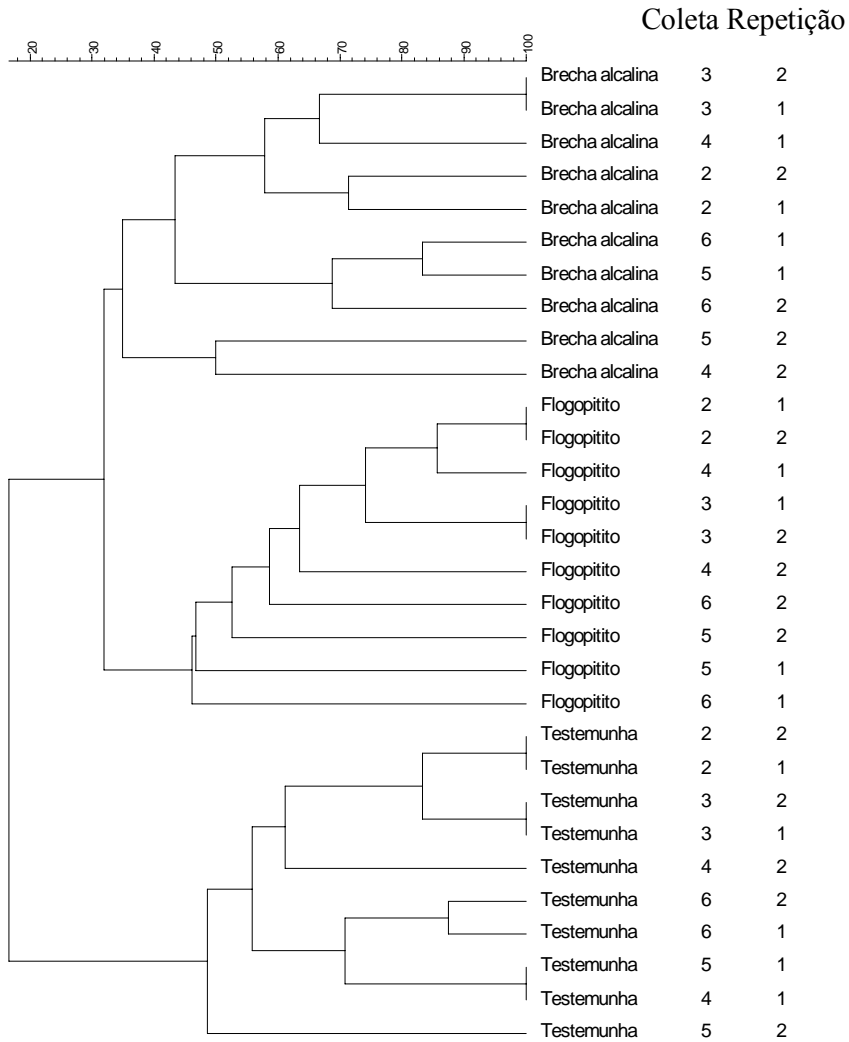


Figura 3: Dendrograma de similaridade construído com o índice de similaridade Jaccard e o método de agrupamento UPGMA mostrando o agrupamento formado entre as amostras coletadas nas três pilhas (testemunha, brecha alcalina e flogopitito) durante cinco coletas e incubadas a 55° C.

No dendrograma gerado a partir dos perfis da comunidade bacteriana enriquecida a 27° C (**Figura 2**) observam-se dois grandes grupos. O primeiro grupo formado a partir das amostras da pilha testemunha e das amostras da coleta 1 das pilhas acrescidas de ambas as rochas silicáticas. Neste grupo, um sub-grupo distinto pode ser observado, formado com todas as amostras provenientes da primeira coleta, sendo que a presença da rocha flogopitito foi capaz de induzir uma comunidade bacteriana distinta das presente nos outros dois tratamentos. Como a primeira coleta foi realizada um dia após a implantação das pilhas, estes dados indicam que as comunidades bacterianas foram similares e, que as diferenças encontradas posteriormente devam estar associadas à atividade de compostagem observada a partir da segunda coleta. Porém, mesmo nesta fase inicial já foi possível observar um efeito associado à pilha acrescida da rocha flogopitito que a diferenciou da pilha testemunha. Estas diferenças tornaram-se mais acentuadas ao longo do período de compostagem.

O segundo grupo, formado exclusivamente com as amostras provenientes das pilhas contendo os resíduos de rochas silicáticas, pôde ainda ser subdividido em função do tempo de compostagem. As amostras das coletas 2 e 3 foram agrupadas independentes do tipo de rocha utilizado enquanto as amostras das 4ª, 5ª e 6ª coletas formam um outro sub-grupo onde, no entanto, houve uma separação nítida de acordo com o tipo de rocha acrescido à pilha. O início do processo caracteriza-se pela maior abundância de espécies oportunistas que utilizam como fonte de energia compostos menores e mais facilmente metabolizáveis, o que deve ter resultado na seleção de grupos bacterianos generalistas que não são dependentes do tratamento com um tipo de rocha. Já à medida que o processo de compostagem evolui, o efeito da rocha torna-se mais

evidente, possivelmente como resultado da seleção de grupos bacterianos específicos para cada tipo de substrato.

No dendrograma gerado com os perfis da comunidade bacteriana enriquecida a 55° C (**Figura 3**), a separação entre o tratamento testemunha e os tratamentos que receberam as rochas silicáticas foi mais evidente do que a obtida anteriormente à 27° C, observando-se desde a 2ª coleta a formação de comunidades específicas encontradas em cada uma das pilhas. No dendrograma, três grupos foram formados em função de cada uma das pilhas, sendo que dentro de cada grupo, pôde ser observado um agrupamento relacionado ao período de coleta. As amostras coletadas na pilha de compostagem que não receberam as rochas silicáticas (tratamento testemunha) apresentaram cerca de 50% de similaridade entre si, enquanto as coletadas nas pilhas acrescidas de flogopitito e brecha alcalina apresentaram cerca de 35 e 45% de similaridade entre si, respectivamente. Esses dados sugerem que o tratamento testemunha foi capaz de promover uma seleção mais eficiente de microrganismos decompositores. Além disso, o enriquecimento à 55° C deve ter favorecido os microrganismos que apresentam tolerância às temperaturas mais elevadas, características da fase termofílica, que foi objeto do presente estudo. Neste sentido, é possível que a maior diferenciação encontrada entre as pilhas observada na **Figura 3** seja resultado destas populações que devem estar mais ativas durante a fase termofílica do processo.

Rangel (2004) utilizou um procedimento semelhante para avaliar a diversidade e a sucessão bacteriana durante os processos de compostagem e produção de biofertilizante. Neste trabalho foram utilizadas duas temperaturas de incubação

(28 e 55° C) para enriquecimento das comunidades microbianas. Os resultados obtidos indicaram uma influência da temperatura de incubação nos perfis gerados a partir do 16S rDNA, observando-se ainda uma distribuição das bandas diferenciada no gel desnaturante em função da temperatura de incubação. Nas amostras enriquecidas a 28° C, a maioria das bandas aparecem na parte superior do gel, ao contrário das amostras provenientes das amostras enriquecidas à 55° C, onde as bandas predominam na parte inferior do gel onde a concentração de desnaturante é mais elevada. Este resultado indica que os microrganismos que cresceram em temperaturas mais elevadas apresentam maior %GC na região do 16S rDNA analisada. Tipicamente as bactérias da fase termofílica são espécies do gênero *Bacillus*, como por exemplo, *B. subtilis*, *B. circulans* e *B. licheniformis* (Strom, 1985).

Em um outro estudo Fracchia *et al.* (2006) avaliaram por meio de SSCP a diversidade bacteriana em amostras de composto e vermicomposto que influenciaram as comunidades microbianas. Neste trabalho quarenta e quatro seqüências parciais do 16S Rdna foram obtidas, 21 provenientes do composto e 23 do vermicomposto, dentre estas, 5 e 19, respectivamente, apresentaram maior similaridade com bactérias descritas como não cultiváveis, evidenciando, novamente, que as técnicas moleculares independentes de cultivo apresentam a vantagem de detectar microrganismos ainda não estudados pelos métodos tradicionais de cultivo.

Na **Figura 4** é apresentado um dendrograma com as amostras provenientes da segunda coleta, nas três pilhas de composto, incubadas nas duas temperaturas estudadas. Observa-se que as amostras das pilhas que receberam a aplicação

de rochas foram separadas em função da temperatura de incubação, indicando ser este o fator predominante na separação dos perfis das comunidades. Pode-se observar o aparecimento de bandas específicas nos perfis das comunidades bacterianas provenientes das pilhas acrescidas das rochas brecha alcalina ou flogopitito. As bandas a e b mostradas pelas setas são comuns aos dois tipos de rocha, porém estão presentes nas comunidades enriquecidas a 27 e 55° C, respectivamente, indicando o aparecimento de grupos distintos dependentes da temperatura de incubação. Já a banda c é predominante na comunidade bacteriana enriquecida a 55° C e proveniente da pilha contendo a rocha tipo flogopitito, sugerindo que diferenças na disponibilidade de nutrientes podem favorecer determinados grupos bacterianos.

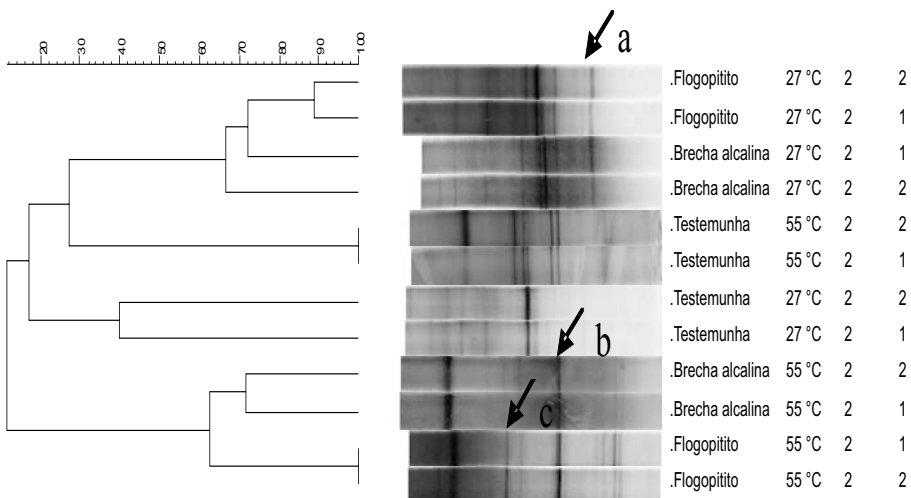


Figura 4: Perfis de bandas representativos da comunidade bacteriana e o dendrograma de similaridade (Jaccard-UPGMA) das amostras coletadas nas três pilhas de compostagem (testemunha, brecha alcalina e flogopitito) durante a 2ª coleta e incubadas a temperatura de crescimento de 27° C e 55° C.

Para o dendrograma gerado com os dados da 6ª coleta (**Figura 5**) observa-se um efeito mais acentuado da temperatura de incubação, onde as amostras de cada temperatura formaram dois grupos distintos, composto pelas amostras dos três tratamentos. Os perfis das comunidades enriquecidas a 27° C mostram um número maior de bandas do que aqueles obtidos a 55° C, talvez como consequência da redução da temperatura das pilhas o que indica o fim da fase termofílica e o início da fase de maturação, caracterizada por uma disponibilidade de compostos mais complexos que vão favorecer grupos microbianos específicos e promover um aumento da diversidade.

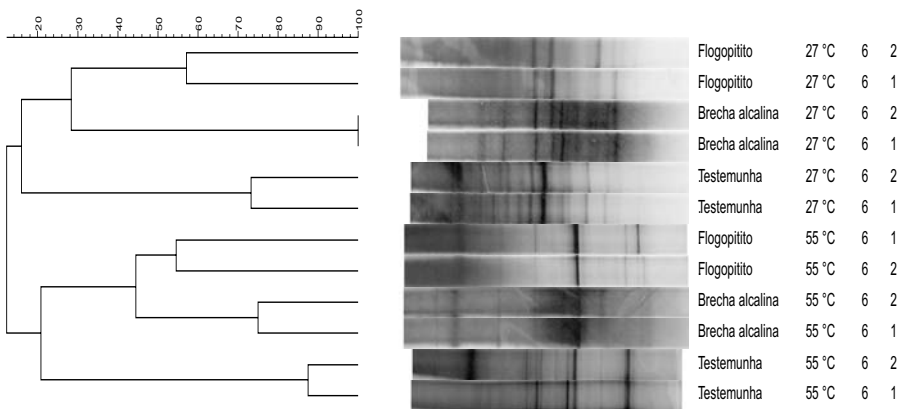


Figura 5: Perfis de bandas representativos da comunidade bacteriana e o dendrograma de similaridade (Jaccard-UPGMA) das amostras coletadas nas três pilhas de compostagem (testemunha, brecha alcalina e flogopitito) durante a 6ª coleta e incubadas a temperatura de crescimento de 27° C e 55° C.

CONCLUSÕES

A aplicação das rochas silicáticas brecha alcalina e flogopitito nos substratos para compostagem foi capaz de promover uma alteração no perfil de bandas da

comunidade bacteriana visualizados nos géis de DGGE durante o período de estudo, quando comparada com as amostras do material compostado que não recebeu aplicação de rocha. A aplicação de DGGE permitiu avaliar as alterações nos perfis das comunidades bacterianas durante o processo de compostagem e, nesse sentido, é uma contribuição para o entendimento e maximização do processo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério de Ciência e Tecnologia, fundos setoriais Mineral e do Agronegócio pelo suporte financeiro (Contratos FINEP 2883/03 e CNPq 506313/2003-4) ao Projeto “Rochas brasileiras como fontes alternativas de potássio para uso em sistemas agropecuários”. Os autores agradecem ainda ao CNPq à concessão da bolsa de Samuel Ribeiro Passos E Aline Mansur Almeida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESPINDOLA, J.A.A.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. (2005) Uso de leguminosas herbáceas para adubação verde. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Eds.). *Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p.435-448.
- FRACCHIA, L.; DOHRMANN, A.B.; MARTINOTTI, M.G.; TEBBE, C.C. (2006) Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 942–952
- GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G.; VAN ELSAS, J.D (1999)

- Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. v. 38, p. 1–15.
- GOLOUKE, C. G. (1991) Principles of composting. In: The Staff of BioCycle Journal of Waste Recycling. *The art and science of composting*. The JG Press Inc., Pennsylvania, USA, p. 14-27.
- HOWARD, A. (1947) *An agricultural testament*. 2 ed. London: Oxford University Press, 1947. 253p.
- KENNEDY, C.A. (1999) Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environmental*. v. 74, p.65-76.
- MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J.C.; SOULAS, G; CATROUX, G. (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, DC, v. 67, n. 5, p. 2354-2359.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; ULTTERLINDEN, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. Washington, DC, v.59, p. 695-700.
- RANGEL, F.W. (2004) *Aplicação do DGGE na caracterização da comunidade bacteriana durante o processo de compostagem e na produção do biofertilizante AGROBIO*. 2004, 57p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do rio de Janeiro, Seropédica.
- RANJARD, L.; POLY, F.; COMBRISSE, J.; RICHAUME, A.; GOURBIÈRE, F.; THIOLOUSSE, J.; NAZARET, S. (2000) Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial*

Ecology. v. 39, p. 263-272.

SANTOS, R. H. S.; SILVA, F. da; CASALI, V. W. D.; CONDE, A. R. (2001) Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 36, n. 11, p. 1395-1398.

STROM; P. F. (1985a) Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solidwaste composting. *Applied and Environmental Microbiology*. v50, p. 899-905.

WEINBAUER, M.G; FRITZ, I.; WENDEROTH, D.F.; HÖFLE, M.G (2002) Simultaneous extraction from bacterioplankton of total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 68, n. 3, p. 1082-1087.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G (2004) Extração de DNA de Microrganismos Associados às Plantas. Embrapa Agrobiologia, *Comunicado Técnico*, 15p.

ZILLI, J. E.; SANTOS, E. L; HAGLER, L. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G (2003) Desenvolvimento de meio de cultivo para microrganismos do solo utilizando solo como fonte de nutrientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, 2003, Florianópolis. *Resumos*. Florianópolis, SC: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. p. 130.