



Qualidade Biológica da Matriz Orgânica de um Fertilizante Organomineral Submetido a Diferentes Temperaturas de Secagem ⁽¹⁾

Jean Marcel Rodrigues Pinho ⁽²⁾; Simone Santos ⁽³⁾; Cássia Naiara Soares ⁽⁴⁾; Fernando Augusto Gonçalves dos Santos ⁽⁵⁾; Christiane Abreu de Oliveira ⁽⁶⁾; Paulo Roberto Caixeta Nascentes ⁽⁷⁾.

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos da Fapemig, CNPq, Embrapa Milho e Sorgo e Empresa Valoriza Fertilizantes Ltda.

⁽²⁾ Analista; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; E-mail jean.pinho@embrapa.br; ⁽³⁾ Engenheira Ambiental; Centro Universitário de Sete Lagoas; ⁽⁴⁾ Graduanda em Engenharia Ambiental; Centro Universitário de Sete Lagoas-UNIFEM; ⁽⁵⁾ Graduando em Biotecnologia; Faculdade Ciências da Vida; ⁽⁶⁾ Pesquisador; Embrapa milho e Sorgo; ⁽⁷⁾ Engenheiro Agrônomo; Empresa Valoriza Fertilizantes Ltda.

RESUMO: O emprego de resíduos orgânicos na forma de organominerais surge como alternativa ao uso dos fertilizantes químicos. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da temperatura de secagem na população microbiana de uma matriz orgânica proveniente de compostagem que será utilizada na composição de um fertilizante organomineral comercial. Para isso, a qualidade biológica do composto submetido a três tratamentos (ausência de temperatura de secagem e nas temperaturas 257 e 302°C) foi avaliada pela determinação da atividade enzimática de fosfatases, urease e arginase, contagem da população microbiana total e identificação genética dos microrganismos predominantes isolados. As estirpes predominantes identificadas no composto após os tratamentos de secagem foram *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp independente do tratamento de secagem. A contagem de fungos e bactérias totais foi maior no composto não submetido ao processo de secagem (19,25 ufc/g composto) que também apresentou maior população de solubilizadores de fosfato (6,67 ufc/g composto), resultado corroborado pela maior atividade de fosfatase ácida em relação aos compostos submetidos à secagem a 257°C e 302°C. Em geral, não ocorreu diferença significativa entre a atividade de fosfatase ácida para as amostras submetidas a altas temperaturas de secagem. Também não ocorreu diferença significativa em relação às atividades das enzimas urease, arginase e fosfatase alcalina nos diferentes tratamentos. Destes resultados conclui-se que a ausência de altas temperaturas de secagem e consequente maior umidade final no composto orgânico, favoreceram uma maior atividade para degradação do fosforo orgânico presente no composto e uma maior população de microrganismos totais e de solubilizadores de fosfato.

Termos de indexação: Composto orgânico, população microbiana, atividade enzimática.

INTRODUÇÃO

O agronegócio constitui um dos mais importantes setores da economia nacional, devido, principalmente, à incorporação de modernas tecnologias de produção. Entretanto é um setor altamente dependente do mercado externo no que se refere à demanda por insumos químicos. A adubação fosfatada e nitrogenada por meio de fertilizantes químicos contribui para o alto custo de produção de culturas de grãos e oferece riscos de impactos negativos sobre o ambiente, tais como em ecossistemas aquáticos e na emissão de gases efeito estufa (GEE), respectivamente.

Diante desse cenário é crescente a busca por tecnologias que propiciem à agricultura brasileira maior autonomia no mercado de insumos. A produção de fertilizantes orgânicos, na forma de compostagem de resíduos agrícolas suplementados com minerais e em fosfocompostagem (compostagem de resíduos orgânicos acrescidos de fosfato natural) enriquecidos com microrganismos surge como alternativa em potencial. Têm-se nestes casos um somatório da eficiência do fertilizante orgânico com o fertilizante mineral, para a formação do organomineral, a fim de suprir de maneira adequada às exigências nutricionais de uma cultura, possibilitando aumento da produtividade agrônômica, redução do impacto ambiental da atividade agropecuária e destinação limpa para os rejeitos agrícolas gerados.

Durante o processo biológico da compostagem as substâncias orgânicas são mineralizadas, disponibilizando nutrientes em formas prontamente utilizadas pelas plantas. Isso decorre da intensa atividade de diferentes comunidades de microrganismos (termofílicos e mesofílicos) que ao longo dos diferentes estágios da compostagem se alternam e predominam no meio em virtude das características do substrato. Ao longo do processo da compostagem a medida que metabolismo microbiológico de oxidação da matéria orgânica torna-se mais intenso, a energia liberada promove um incremento da temperatura, podendo chegar

acima dos 65°C. Nestes casos a maioria dos microrganismos é eliminada, incluindo os responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, sendo necessário, portanto, um controle da temperatura a níveis desejáveis para garantir a qualidade do composto.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura de secagem e da umidade final na qualidade biológica de uma matriz orgânica de um fertilizante organomineral comercial.

MATERIAIS E METODOS

Tratamentos e amostragens

A matriz orgânica analisada neste trabalho foi obtida pela compostagem de cama aviária de galinha poedeira, farinha de ossos, resíduos industriais de abatedouro e alimentos e outros resíduos industriais, que irão compor um organomineral em uma formulação contendo minerais adicionados. Este Fertilizante organomineral será comercializado pela empresa Valoriza Fertilizantes LTDA. A **tabela 1** mostra alguns dados obtidos dos laudos de análises químicas e microbiológicas realizadas na matriz orgânica compostada.

Tabela 1 – Dados químicos e microbiológicos da matriz orgânica (Valoriza Fertilizantes)*.

Determinação	Unidade	Resultado
N	%	2,0
P total	%	3,15
Relação C/N		10/1
CTC	mmol/Kg	250,0
CTC/C orgânico		12,3
pH		8,4
Umidade	%	30
Coliformes termotolerantes	NMP/g	0
<i>Salmonella</i> sp	NMP/10g	Ausente
Ovos viáveis de helmintos	Ovos/g ST	0

*Estes dados foram retirados de laudos de análises químicas (nº 92293) e microbiológicas (nº MS 263/2014) expedidos respectivamente por Unithal (MG) e IAC (SP).

A matriz orgânica foi submetida a três tratamentos em diferentes temperaturas de secagem:

Tratamento 1: - Temperatura de entrada: ± 257 °C;

- Temperatura de saída do produto: ± 35 °C

- Umidade de saída do produto: 19,35%

Tratamento 2: - Temperarura de entrada: ± 302 °C

- Temperatura de saída do produto: ± 35 °C

- Umidade de saída do produto: 9,00%

Tratamento 3:- Sem processo de secagem (umidade 30%).

Contagem de microrganismos totais

A contagem de microrganismos totais (fungos e

bactérias) foi realizada em 4 tipos de meios de cultura agar-batata-dextrose (BDA), Martin (Martin, 1950), NBRIP (Nautyal, 1999) e meio NBRIP modificado com adição de fitato (Fitato) pelo método de diluição seriada sucessivas de 10^{-1} a 10^{-7} , em triplicatas, sob agitação por 10 minutos. Aliquotas de 100 μ l de cada suspensão foram transferidas para o plaqueamento. Após cinco dias de incubação, a 28° C, foi efetuada a contagem do número de colônias em cada placa e estimada a população de células viáveis por grama de cada mistura. Os microrganismos predominantes foram isolados e purificados pela técnica de esgotamento por estrias para obtenção de colônias puras no meio de cultura BDA.

Identificação genética das estirpes

As bactérias foram identificadas com base no sequenciamento da região do gene ribossomal 16S (rRNA) amplificada pelos primers universais 968F e 1401R (Nubel et al., 1996). O DNA total foi extraído a partir de culturas enriquecidas em meio de cultura líquido soja tripcaseína), utilizando o kit "Fast DNA[®] Kit" (Q-Bio gene), de acordo com recomendações do fabricante. Os produtos da amplificação da PCR foram removidos do gel e purificados utilizando-se o kit "QIAquick Gel Extraction Kit[®]" (Qiagen). As amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI Prism 3100[®] (Applied Biosystems), sendo as sequências de nucleotídeos editadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do programa Blast N (Altschul et al., 1997).

Determinação da atividade enzimática na matriz Orgânica

Amostras da matriz orgânica nos três tratamentos, em triplicatas, foram submetidas à determinação das atividades das enzimas fosfatases (ácida e alcalina), urease e arginase, de acordo com métodos colorimétricos estabelecidos por Alef et al. (1995), Kandeler & Gerber (1988) e Alef & Kleiner (1986) respectivamente. As atividades da urease e arginase foram determinadas por meio da quantificação de amônio liberado da hidrólise dos substratos ureia (4,8g/L) e arginina (0,2g/L) respectivamente. Já as atividades das fosfatases foram determinadas quantificando p-nitrofenol liberado da hidrólise de p-nitrofenil fosfato (0,05M), em tampão de reação pH 6,5 para a enzima fosfatase ácida e pH 11,5 para fosfatase alcalina. As atividades enzimáticas na matriz orgânica foram expressas em μ g de produto liberado por hora por grama de composto (μ g de produto $h^{-1} g^{-1}$ composto), plotando as leituras das absorbâncias em curvas padrões dos respectivos substratos.

Análise estatística

Os dados das determinações enzimáticas foram



realizados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra. A análise de variância foi realizada, utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010) e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de compostagem deve garantir por meio do tratamento termofílico, a eliminação de microrganismos patogênicos que podem estar presentes no material inicial submetido ao tratamento (Heck et al., 2013). A ausência de coliformes termotolerantes, *Sallmonelas* e ovos de helmintos no composto utilizado neste trabalho (tabela 1), asseguraram a sua qualidade microbiológica.

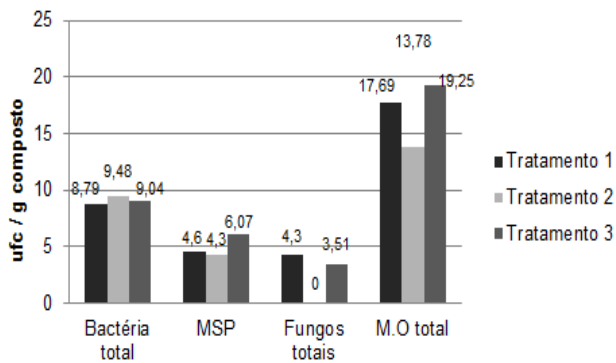


Figura 1- Efeito dos tratamentos de secagem sobre a população total de fungos e bactérias e de microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP), em unidades formadoras de colônias (ufc) / g de composto. M.O total (microrganismos totais). Tratamento 1 (257°C). Tratamento 2 (302°C). Tratamento 3 (sem secagem).

Neste trabalho, praticamente não houve diferença entre o crescimento de bactérias nos três tratamentos, ou seja, a temperatura de secagem não afetou a população de bactérias do composto (Figura 1). A população de fungos ocorreu em maior número nas amostras dos tratamentos 1 e 3, ao passo que na amostra do tratamento 2 não ocorreu crescimento de fungos, provavelmente devido ao menor índice de umidade no composto (9%) decorrente da maior temperatura de secagem (302°C). O maior número de microrganismos solubilizadores de fosfato ocorreu na amostra do tratamento 3 (6,07 ufc/g de composto), com ausência de temperatura de secagem. Em geral, o número de microrganismos total, foi maior na amostra do tratamento 3 (19,25 ufc/g de composto). Os microrganismos predominantes isolados foram do gênero *Bacillus* (*B. megaterium* e *Bacillus sp*) independente do tratamento de secagem (Tabela 2).

Tabela 2- Identificação genética dos microrganismos predominantes, isolados no composto submetido a diferentes temperaturas de secagem.

Amostra*	Descrição	Ident.	Acesso ncbi
Tratamento1	<i>B. megaterium</i>	96%	FJ976554.1
Tratamento 2	<i>B. megaterium</i>	99%	EU194337.1
Tratamento 3	<i>Bacillus sp</i>	97%	AY242540.1

*Amostras submetidas a 3 tratamentos de temperaturas de secagem, 1= 257°C, 2=302°C, 3 = ausência de secagem.

No caso da espécie *B. megaterium*, identificada no composto deste trabalho (amostras dos tratamentos 1 e 2), há relatos que mostram a sua capacidade fosfolubilizadora (Kumar et al., 2014; Seoud & Megeed, 2012). Então, a predominância do gênero *Bacillus* no composto objeto deste estudo é um dado interessante do ponto de vista da composição do organomineral e do seu potencial como biofertilizante.

Os microrganismos são reconhecidos por sua habilidade em promover transformações bioquímicas dos nutrientes, através da produção de enzimas, podendo disponibilizar elementos nutritivos de interesse às plantas, principalmente N, P e S.

As enzimas do grupo fosfatase desempenham papel-chave na mineralização e ciclagem de P, catalisando a hidrólise de P orgânico e, desta forma, tornando-o disponível para absorção pelas plantas (Alef et al., 1995). Analisando a figura 2A observa-se que o composto do tratamento 3 apresentou maior atividade de fosfatase ácida com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos compostos dos tratamentos 1 e 2, que por sua vez não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si. Estes dados de certa forma corroboram com o maior número de microrganismos solubilizadores de fosfato presente no composto do tratamento 3. As altas temperaturas de secagem empregadas nos tratamentos 1 e 2 influenciaram negativamente na atividade da enzima. Para a atividade da enzima fosfatase alcalina (Figura 2B) não foi observado diferença significativa em relação aos diferentes tratamentos de secagem do composto. Observa-se no tratamento 3 que a atividade da fosfatase alcalina foi menor em relação à atividade da fosfatase ácida. Talvez, neste caso, o pH 8,4 do composto (Tabela 1) tenha interferido, já que fosfatases alcalinas apresentam pH ótimo de atividade em torno de 11,5 (Alef et al., 1995). As enzimas urease e arginase estão envolvidas na ciclagem do nitrogênio. Sabe-se que a atividade da arginase correlaciona-se positivamente com a taxa de N potencialmente mineralizável (Alef & Kleiner, 1986) que, por sua vez representa o pool de nitrogênio disponível às plantas. Os resultados apresentados na figura 3, mostram que os tratamentos de secagem não influenciaram

significativamente ($p < 0,05$) na atividade das enzimas, embora a atividade de urease tenha maiores valores

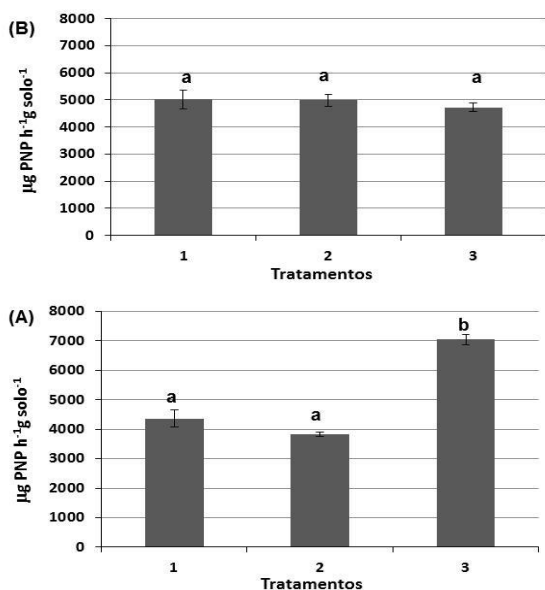


Figura 2 – Atividade enzimática de fosfatase ácida (A) e básica (B), em amostra do composto nos três tratamentos de secagem: 1 (257°C), 2 (302°C), 3 (sem secagem). Média de três repetições seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, $p < 0,05$.

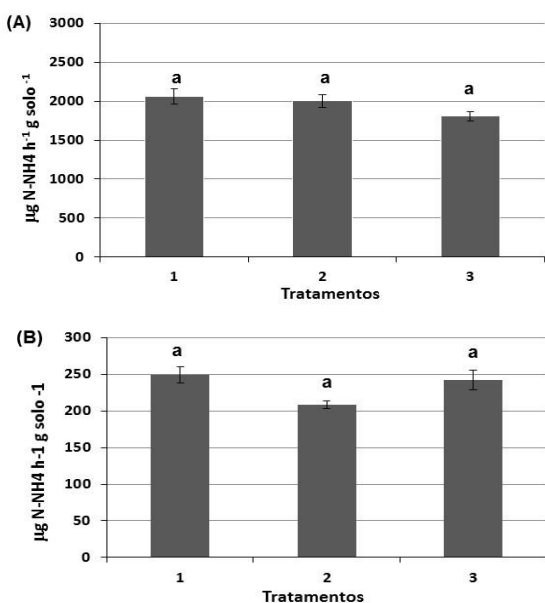


Figura 3 - Atividade enzimática de urease (A) e arginase (B), em amostra do composto nos três tratamentos de secagem: 1 (257°C), 2 (302°C), 3 (sem secagem). Média de três repetições seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, $p < 0,05$.

CONCLUSÕES

De maneira geral, não ocorre efeito das altas temperaturas na ciclagem de N e na população de

bactérias totais. A ausência de altas temperaturas de secagem e consequente maior umidade final no composto orgânico, favorecem uma maior atividade de fosfatase ácida para degradação do fósforo orgânico presente no composto e uma maior população de microrganismos totais e de solubilizadores de fosfato.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Milho e Sorgo, ao CNPq, à Fapemig pelo suporte financeiro e à Empresa Valoriza Fertilizantes Ltda pelo suporte técnico e colaboração.

REFERÊNCIAS

- ABOU-EL-SEOUD & ABDEL-MEGEED, A. Impact of rock materials and biofertilizations on P and K availability for maize (*Zea Maize*), under calcareous soils conditions. *Saudi Journal of biological Sciences*, 19:55-63, 2012.
- ALEF, K.; KLEINER, D. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potential in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 18:233-235, 1986.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P.; TRAZAR-CEPEDA, C. Phosphatase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995, 335-344p.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, London, 25: 3389-3402, 1997.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: sistema de análise de variância: versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.
- HECK, K.; DE MARCO, E. G.; HAHN, A. B. B. et al. Temperatura de degradação de resíduos em processo de compostagem e qualidade microbiológica do composto final. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17:54-59, 2013.
- KANDELER, E. & GERBER, H. Short term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Solis*, 6:68-72, 1988.
- KUMAR, A.; KUMAR, A.; PRATUSH, A. Molecular diversity and functional variability of environmental isolate of *Bacillus* species. *Springer Plus*, 3(312): 1-11, 2014.
- MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, 69:215-232, 1950.
- NAUTIYAL, C. S. Na efficient microbiological grown medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-270, 1999.
- NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, Washington, 178:5636-5643, 1996.