



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

George Lucas Rodrigues Fetti

Avaliação do efeito da inoculação de fungos termofílicos em pilhas
de compostagem de lixo urbano

São José do Rio Preto
2014

George Lucas Rodrigues Fetti

Avaliação do efeito da inoculação de fungos termofílicos em pilhas
de compostagem de lixo urbano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Microbiologia Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
Co-Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

São José do Rio Preto
2014

Fetti, George Lucas Rodrigues

Avaliação do efeito da inoculação de fungos termofílicos em pilhas de compostagem de lixo urbano / George Lucas Rodrigues Fetti. -- São José do Rio Preto, 2014.

74 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Coorientador: André Rodrigues

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia microbiana. 2. Fungos termofílicos - Inoculação. 3. Adubos compostos. 4. Resíduos orgânicos como fertilizantes. I. Gomes, Eleni. II. Rodrigues, André. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 576.8.095.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

George Lucas Rodrigues Fetti

Avaliação do efeito da inoculação de fungos termofílicos em pilhas
de compostagem de lixo urbano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Microbiologia Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Azevedo Carvalho
PUC – Poços de Caldas

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
30 de junho de 2014

RESUMO

A elevada migração da população remanescente da zona rural para os grandes centros urbanos, nas últimas décadas, ocasionou uma maior produção de lixo, principalmente, os orgânicos de origem doméstica, alcançando os 55,5mi de toneladas em 2011. Considerando que aproximadamente 50% do lixo urbano no Brasil é composto de matéria orgânica, este poderia ser reaproveitado pelo processo de compostagem. A compostagem é a transformação do lixo orgânico em um produto relativamente estável e com baixa quantidade de matéria orgânica, que pode ser reaproveitado como adubo orgânico na agricultura ou como corretivo de solos degradados. Com base nessa problemática, foi proposto o presente trabalho cujo objetivo foi conhecer a microbiota fúngica das diferentes fases da compostagem, isola-los e reintroduzi-los no processo, buscando uma aceleração da biodegradação da matéria orgânica presente no lixo urbano, a fim de reduzir os custos de produção do composto orgânico, aumentar a aceitação da técnica como alternativa ambientalmente correta aos lixões à céu aberto e gerar uma diminuição na quantidade de resíduos encaminhada aos aterros sanitários. Em testes laboratoriais, o inóculo fúngico demonstrou melhorar o processo de compostagem, pela redução mais acelerada da matéria orgânica e diminuição da toxicidade do produto acabado, porém em testes em escala de pilhas o inóculo não apresentou grande variação em relação à compostagem tradicional, não degradando a matéria orgânica mais rapidamente, porém gerando diminuição acelerada da toxicidade.

Palavras-chave: *Fungos termofílicos. Compostagem. Inóculo fúngico. Aceleração. Microbiologia ambiental.*

ABSTRACT

The high migration of the remaining population from rural to large urban centers in recent decades, has led to a greater production of waste, mainly organic, home-grown, reaching 55.5 million tonnes in 2011. Whereas approximately 50% of urban waste in Brazil is composed of organic matter, this could be reused by the composting process. Composting is the transformation of organic waste into a relatively stable and low in organic matter product, which can be recycled as organic fertilizer in agriculture or as a corrective of degraded soils. Based on these problems, we proposed the present work aims to better understand the fungal microbiota of the different stages of composting, isolates them and reintroduce them in the process, seeking an accelerated biodegradation of organic matter in municipal waste in order to reduce production costs of organic compost, increase acceptance of the technique as an environmentally friendly alternative to open dumps and generate a decrease in the amount of waste sent to landfills. In laboratory tests, the fungal inoculum was shown to improve the composting process, the faster decline in organic matter and decrease in toxicity of the finished product, but in the pile scale tests inoculum showed no great variation from the traditional composting, not degrading the organic matter faster, but generating accelerated decrease of toxicity.

Keywords: Thermophilic fungi. Composting. Fungal inoculum. Composting acceleration. Environmental microbiology.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado a oportunidade de partilhar experiências, conhecimento e ter me acompanhado durante toda a minha vida.

Agradeço à minha família por sempre me apoiar em minhas decisões e por sempre me dar suporte nas horas difíceis.

Agradeço à Prof^a. Dr.^a Eleni Gomes por ter aceito me orientar, por sua paciência e auxílio durante todo o trabalho.

Agradeço à minha namorada Maria Eduarda que sempre esteve por perto e me auxiliou em minha caminhada até aqui.

Agradeço ao Prof. Dr. André Rodrigues, pela co-orientação e dedicação durante o projeto, pela disponibilização de laboratório e por sua paciência.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, em especial Fernando, Tássia, Diego, Pedro, Isabel, Isabela, Josiani, Gisele, Júnior, Janaína, Bruna P e Tássio.

À CNPQ pelo auxílio financeiro durante a realização deste sonho.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Quantidade de resíduo sólido urbano (RSU) coletado no Brasil 2010/2011. | 7 |
| Figura 2. Curva de temperatura em relação ao tempo de compostagem demonstrando as diferentes fases do processo (KIEHL, 2002) | 10 |
| Figura 3. Esquematização das amostragens: Pontos vermelhos representam os locais de coleta, na superfície S e profundidade P. | 20 |
| Figura 4. Esquema de fermentação em estado sólido e extração enzimática. (Fonte: Adaptado de EGEA, 2010). | 22 |
| Figura 5. Montagem das leiras de compostagem na empresa Constroeste Ambiental. | 25 |
| Figura 6. Distribuição dos isolados por gênero. | 31 |
| Figura 7. Número de isolados por coleta. | 32 |
| Figura 8. Filogenia para espécies de <i>Aspergillus fumigatus</i> | 33 |
| Figura 9. Filogenia para espécies de <i>Aspergillus nidulans</i> (= <i>Emericella nidulans</i>). | 34 |
| Figura 10. Filogenia para espécies de <i>Rhizomucor</i> | 35 |
| Figura 11. Filogenia para espécies de <i>Lichtheimia ramosa</i> | 35 |
| Figura 12. Perfis dos teores de matéria orgânica (A) e carbono total (B) ao longo do período de compostagem em frascos. | 43 |
| Figura 13. Teores de Nitrogênio ao longo do período de compostagem em frascos. | 44 |
| Figura 14. Relação Carbono:Nitrogênio ao longo do processo de compostagem em frascos. | 45 |
| Figura 15. Índice de germinação ao longo do período de compostagem em frascos. | 46 |
| Figura 16. Valores de pH da suspensão do material de compostagem ao longo do processo em escala laboratorial (A) e em pilhas (B). | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Teores de carbono total ao longo da compostagem laboratorial (A) e em pilhas (B). | 51 |
| Figura 18. Teores de Nitrogênio para as amostras de compostagem em escala laboratorial (A) e industrial (B). | 52 |
| Figura 19. Índice de germinação (%) das sementes após a aplicação do eluído da compostagem proveniente da escala laboratorial (A) e em pilhas (B). | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Destino final dos resíduos sólidos no Brasil. | 8 |
| Tabela 2. Cronograma de coleta. | 20 |
| Tabela 3. Parâmetros utilizados no CG/EM. | 29 |
| Tabela 4. Lista dos isolados com identificação morfológica e molecular. | 30 |
| Tabela 5. Produção de CMCase pelos isolados. | 37 |
| Tabela 6. Produção de Xilanase pelos isolados. | 39 |
| Tabela 7. Cepas selecionadas para produção do inóculo nos estudos de compostagem. .. | 40 |
| Tabela 8. Valores de pH do substrato ao longo da compostagem em escala laboratorial em frascos. | 41 |
| Tabela 9. Matéria orgânica remanescente no substrato ao longo da compostagem em frascos. | 43 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 3. OBJETIVOS | 18 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 4.6. ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS | 26 |
| 4.7. TESTES DE FITOTOXICIDADE | 27 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 5.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS | 29 |
| 5.2. PRODUÇÃO DE ENZIMAS PELOS ISOLADOS | 36 |
| 5.3. SELEÇÃO DAS CEPAS PARA OS ESTUDOS DE COMPOSTAGEM | 40 |
| 5.4. ESTUDOS DE COMPOSTAGEM ESCALA LABORATORIAL E EM PILHAS NA PLANTA INDUSTRIAL | 47 |
| 5.4.1. VARIAÇÕES DO PH | 48 |
| 5.4.2. MATÉRIA ORGÂNICA E CARBONO TOTAL | 50 |
| 5.4.3. NITROGÊNIO TOTAL | 51 |
| 5.4.4. RELAÇÃO CARBONO:NITROGÊNIO (C:N) | 53 |
| 5.4.5. TESTE DE FITOTOXICIDADE | 54 |
| 5.4.6. Análise CG/EM | 56 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |

1. INTRODUÇÃO

A elevada migração da população remanescente da zona rural para os grandes centros urbanos, nas últimas décadas, ocasionou uma maior produção de lixo, principalmente, os orgânicos de origem doméstica. Em 2011 houve uma produção de aproximadamente 55,5 mil de toneladas de lixo no Brasil, com perspectivas de crescimento acelerado a cada ano.

O aumento na produção de resíduos gera discussões sobre políticas de sustentabilidade, que visam novas metodologias para minimizar a degradação ambiental, como é o caso da compostagem. Esta técnica traz solução para um grande problema enfrentado no mundo todo, a disposição final de resíduos urbanos.

A compostagem é a transformação do lixo orgânico em um produto relativamente estável e com baixa quantidade de matéria orgânica, que pode ser reaproveitado como composto orgânico na agricultura ou como corretivo de solos degradados. Considerando que aproximadamente 50% do lixo urbano no Brasil é composto de matéria orgânica, que pode ser reaproveitada pelo processo de compostagem, esta técnica reduziria pela metade a quantidade de lixo destinado aos aterros sanitários e, em alguns casos, lixões a céu aberto.

Durante o processo de compostagem, a matéria orgânica passa por três diferentes fases (mesofílica, termofílica e de maturação do composto) realizadas pela ação de bactérias e fungos. Os fungos são os organismos mais importantes durante a fase termofílica da compostagem aeróbica.

Apesar da elevada carga microbiológica presente na matéria orgânica destinada à compostagem, o processo total pode demorar até 120 dias, o que, acrescido aos custos de instalações, máquinas e mão de obra, tornam o processo desinteressante economicamente. Para que possa haver uma redução nos custos e uma maior aceitação da técnica de compostagem, é necessário uma aceleração do processo, que poderia ser obtido pela inoculação de micro-organismos iniciadores de modo a reduzir a chamada fase de atraso inicial da compostagem e também na fase termofílica, para aumentar a taxa de degradação da matéria orgânica complexa, que normalmente ocorre nessa fase.

Com base nessa problemática, foi proposto esse trabalho cujo objetivo foi conhecer a microbiota fúngica das diferentes fases da compostagem, isola-los e reintroduzi-los no processo, buscando uma aceleração da biodegradação da matéria orgânica presente no lixo urbano, de modo a reduzir os custos de produção do composto orgânico, proveniente do

processo de compostagem, aumentar a aceitação da técnica como alternativa ambientalmente correta aos lixões à céu aberto e gerar uma diminuição na quantidade de resíduos encaminhada aos aterros sanitários.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CRESCIMENTO POPULACIONAL E PRODUÇÃO DE LIXO

A quantidade de resíduos sólidos e a de lixo total produzido é diretamente proporcional ao tamanho da população e ao crescimento das cidades. Nas últimas cinco décadas houve em uma intensificação da exploração de diferentes recursos naturais, devido a uma rápida urbanização, industrialização e mudanças no estilo de vida da população, resultando em uma grande geração de resíduos sólidos (SINGH et al., 2011).

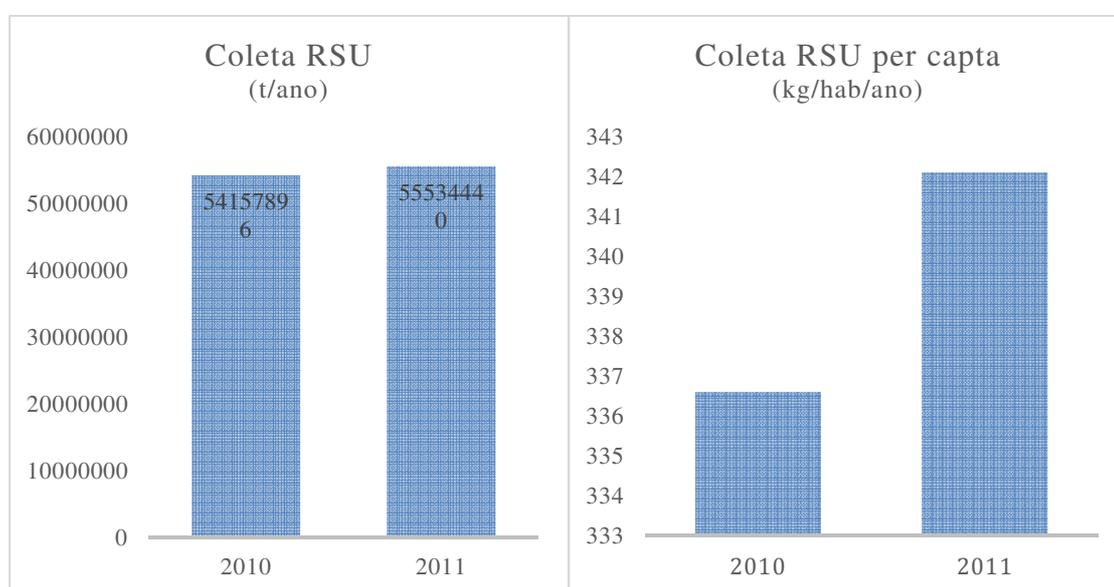


Figura 1. Quantidade de resíduo sólido urbano (RSU) coletado no Brasil 2010/2011.

Com esse grande volume de resíduos urbanos e sem uma política de manejo adequado, muitos problemas surgiram relacionados aos destinos desse material dentro dos perímetros urbanos. Segundo dados da ABRELPE (Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais) em 2011 foram gerados aproximadamente 55 mi de toneladas de lixo no Brasil (Figura 1) e, deste montante, aproximadamente 42% ainda é disposto inadequadamente.

Desde o ano de 1989, a porcentagem de resíduos destinados a vazadouros a céu aberto diminuiu significativamente, de 88,2% para 50,8% em 2008. Apesar desta aparente conscientização, ainda ocorre atualmente a disposição destes resíduos em lixões a céu

aberto, em aterros controlados ou em aterros sanitários (Tabela 1) (IBGE, 2010). Práticas condenáveis segundo os pontos de vista social, ambiental e de saúde pública (BARREIRA et al., 2006) (IBGE, 2010).

Tabela 1. Destino final dos resíduos sólidos no Brasil.

| Ano | Destino final dos resíduos sólidos (%) | | |
|------|--|-------------------|------------------|
| | Vazadouro a céu aberto | Aterro controlado | Aterro sanitário |
| 1989 | 88,2 | 9,6 | 1,1 |
| 2000 | 72,3 | 22,3 | 17,3 |
| 2008 | 50,8 | 22,5 | 27,7 |

Fonte: IBGE, Diretoria de pesquisas, Coordenação de população e indicadores sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2008.

Atualmente, diversas metodologias são apresentadas como alternativas para o tratamento dos resíduos, 1) Reciclagem – a reincorporação do resíduo em novos produtos (plástico, vidro, metal e papel) após sua utilização pelo consumidor; 2) Compostagem – um processo biológico de decomposição da matéria orgânica; 3) Tratamento de esgoto – o tratamento de efluentes líquidos com posterior liberação em rios ou mares, ou o tratamento de esgoto semissólido que pode ser utilizado para correção de solos; 4) Incineração – processo de combustão do material, gerando energia e reduzindo o volume de lixo a ser disposto e 5) Disposição em aterros sanitários – deposição do material em uma área definida (DOMINGO; NADAL, 2009; RUSHTON, 2003) seguindo as normas técnicas para impermeabilização e controle de emissões. Tais metodologias devem suprir principalmente a necessidade de diminuição no espaço de alocação dos resíduos nos aterros sanitários, ou ainda em casos mais graves, em lixões a céu aberto, que favorecem a contaminação, não só do lençol freático, mas também da população, pela proliferação de patógenos, roedores e insetos que habitam estes ambientes (BARREIRA; JUNIOR; RODRIGUES, 2006).

Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB), desenvolvida pelo IBGE em 2010, o número de municípios que apresentavam coleta seletiva e trabalho de reciclagem de materiais avançou desde o surgimento deste tipo de programa em meados de 1980. A PNSB realizada em 1989 identificou a existência de 58 programas de coleta seletiva, registrando um aumento para aproximadamente 994 programas deste tipo na PNSB de 2008, o que demonstra um aumento na implementação da coleta seletiva e o desenvolvimento de um pensamento voltado para a reciclagem e minimização na produção de resíduos (IBGE, 2010).

Apesar deste grande salto no que diz respeito ao reaproveitamento de materiais recicláveis, os resíduos orgânicos urbanos representando 51,4% de todo o lixo coletado, equivalendo a 28,5mi de toneladas por ano ainda são dispostos diretamente nos lixões, aterros controlados ou aterros sanitários (COLÓN et al., 2010). Essa deposição inadequada gera maiores gastos para os municípios pois aumenta drasticamente o volume de lixo depositado e acelera o tempo de saturação dos aterros visto que esses resíduos são facilmente biodegradados e podem gerar composto orgânico com valor agregado, uma alternativa viável e que pode gerar benefícios

A compostagem é um processo de decomposição oxidativo e controlado, que transforma resíduos orgânicos em um produto estabilizado, com propriedades e características completamente diferentes do material que lhe deu origem (REIS, 2005). Durante o processo de compostagem, a matéria orgânica passa por várias etapas de transformação por ação de diferentes grupos de micro-organismos, resultando em composto orgânico, um material com características físicas e químicas interessantes para utilização na agricultura, podendo ser utilizado como fertilizante e corretivo de solo (ANDREOLI, 2001; REIS, 2005).

2.2. COMPOSTAGEM

A compostagem pode ser dividida em duas categorias distintas, segundo a natureza do tipo de processo de decomposição. A compostagem anaeróbica ocorre na ausência de oxigênio ou quando este é limitado e, portanto, micro-organismos anaeróbicos dominam o processo e produzem metabólitos como metano, ácidos orgânicos, sulfeto de hidrogênio que na ausência de oxigênio serão acumuladas. Este processo leva a produção de odores fortes e produtos fitotóxicos, além de acarretar um tempo de duração maior, quando comparada a compostagem aeróbica (MISRA, ROY & HIRAOKA, 2003).

A compostagem aeróbica, por ocorrer na presença de oxigênio, os micro-organismos aeróbicos degradam a matéria orgânica produzindo dióxido de carbono, amônia, água, calor e húmus, um composto orgânico e estável. Ao longo da compostagem aeróbica, metabólitos intermediários também são formados porém, são degradados ao decorrer do processo, produzindo um composto com baixa fitotoxicidade. O calor metabólico gerado acelera a degradação de proteínas, gorduras e carboidratos complexos como a celulose e hemi-celulose, fazendo com que o tempo de decomposição seja menor

que o da compostagem anaeróbica e eliminando micro-organismos patogênicos (MISRA, ROY & HIRAOKA, 2003).

Portanto, o processo de compostagem aeróbica tem como principais vantagens a redução dos resíduos domiciliares que iriam para os aterros sanitários, o aumento da vida útil dos aterros e a reincorporação de nutrientes no solo (principalmente P, N e K) pela degradação da biomassa (KIEHL, 2002). Além destas vantagens ambientais, há ainda as econômicas, devido ao fato da possibilidade de comercialização do composto orgânico gerado no processo e pela geração de empregos.

O processo global de compostagem da matéria orgânica pode ser dividido em quatro principais e diferentes etapas (Figura 2). A primeira etapa, é denominada fase de atraso inicial da decomposição, onde os micro-organismos sofrem um processo de adaptação às condições das pilhas de compostagem para então iniciar suas atividades metabólicas. A segunda fase, mesofílica, corresponde a decomposição dos componentes facilmente biodegradáveis, caracterizada por uma maior atividade de bactérias, principalmente, actinomicetos. A terceira, termofílica, os materiais complexos como a lignocelulose, são degradados pela atividade de enzimas produzidas pelos micro-organismos, especialmente fungos. Na quarta e última fase, denominada de maturação ou estabilização, material entra em processo de estabilização e, denominado agora de composto orgânico, ou simplesmente composto torna-se apto para aplicação na agricultura (REIS, 2005).

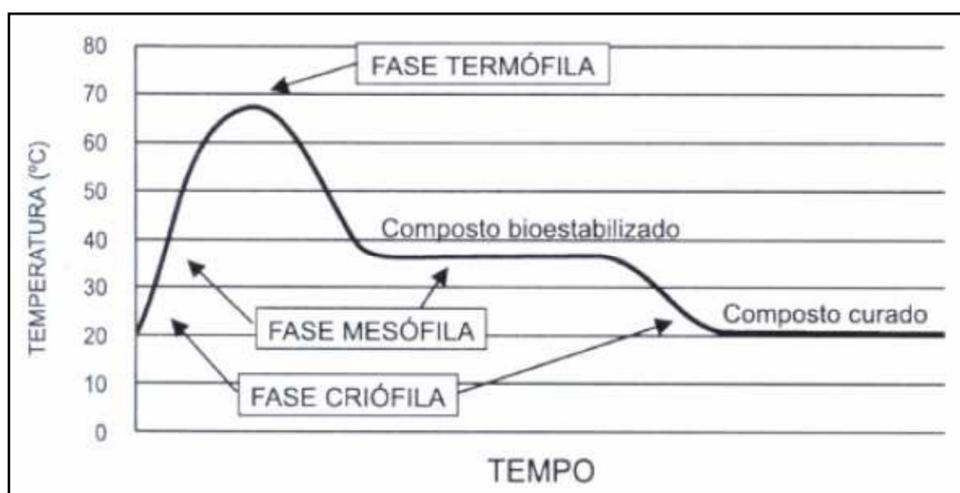


Figura 2. Curva de temperatura em relação ao tempo de compostagem demonstrando as diferentes fases do processo (KIEHL, 2002)

2.2.1- FATORES QUE INFLUENCIAM A COMPOSTAGEM AERÓBICA

Dentre os diversos fatores que podem influenciar o processo global de compostagem aeróbica, destacam-se aeração, temperatura, umidade, pH, relação C:N, proporção de lignocelulose do material e micro-organismos envolvidos.

Aeração: A compostagem aeróbica tem grande demanda de oxigênio, particularmente em seu estágio inicial quando está ocorrendo o crescimento dos micro-organismos aeróbios. A limitação do crescimento destes, resulta em uma baixa taxa de decomposição. Além de fornecimento do oxigênio, a aeração retira o excesso de calor, vapor de água e outros gases que podem ficar presos nas pilhas prejudicando o processo. Desse modo, o revolvimento das pilhas é indispensável para a condução de um processo de decomposição eficiente da matéria orgânica durante a compostagem (MISRA *et al.*, 2003).

Temperatura: Como citado anteriormente (Figura 2), o processo de compostagem envolve duas faixas predominantes de temperatura: mesofílica e termofílica. Enquanto a temperatura ideal para o início da compostagem gira em torno da temperatura ambiente (20-45°C), nos estágios subsequentes, a temperatura atinge 50-70°C inibindo os micro-organismos mesofílicos favorecendo o desenvolvimento dos termofílicos. Altas temperaturas caracterizam a compostagem aeróbica e indicam uma vigorosa atividade microbiana. Temperaturas elevadas são importantes para a eliminação de patógenos, normalmente eliminados em temperaturas acima de 55°C (MISRA *et al.*, 2003; KIEHL, 2002).

Umidade: A umidade é necessária para a atividade metabólica dos micro-organismos. A matéria orgânica a ser decomposta no processo deve ter sua umidade mantida entre 40-65%. Quando as pilhas se encontram excessivamente secas, a compostagem ocorre de forma mais lenta, porém, se a umidade é excessiva, acima dos 65%, ocorre a diminuição da oxigenação do material devido a compactação da matéria orgânica prejudicando o processo aeróbio e aumentando o tempo de decomposição (MISRA *et al.*, 2003; KIEHL, 2002)

pH: Apesar do efeito de tamponamento natural que ocorre na compostagem, o valor do pH não deve exceder a 8,0. Em pH mais elevados pode ocorrer a formação de gás amônia que é despreendido das leiras contaminando a atmosfera (MISRA *et al.*, 2003; KIEHL, 2002).

Nutrientes e relação C:N: Os micro-organismos requerem carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) como macronutrientes principais. É de particular importância, a relação C:N em materiais a serem compostados, alguns autores como KIEHL (2002) e RUSSO (2005) afirmam que a relação C:N deva estar entre 20:1 e 30:1 no início do processo. Quando essa relação é maior que 40:1, o crescimento dos micro-organismos é limitado pela falta de nitrogênio, resultando em um tempo maior de compostagem. Numa condição de relação C:N menor que 20:1, há uma subutilização do N presente, resultando na formação de amônia ou óxido nitroso que são liberados para a atmosfera. A relação C:N ao final do processo deve estar em torno de 10:1 e 15:1 em função do consumo destes nutrientes pelos micro-organismos ao longo da compostagem (MISRA *et al.*, 2003; KIEHL, 2002).

Composição ligno-celulósica: A lignina é um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas e tem uma estrutura química complexa que a torna extremamente resistente à degradação microbiológica (RICHARD, 1996). A lignina diminui a biodisponibilidade dos outros constituintes do resíduo vegetal como a celulose e a hemicelulose. Por outro lado, a lignina aumenta a porosidade do material, o que cria condições favoráveis à compostagem. Portanto, enquanto fungos que decompõem a lignina pode, por um lado aumentar a disponibilidade de C, acelerar a compostagem e reduzir a perda de N, por outro, pode resultar em um aumento da relação C:N e diminuição da porosidade, fazendo com que haja um prolongamento do tempo de compostagem (MISRA *et al.*, 2003; KIEHL, 2002).

2.2.2. FUNGOS FILAMENTOSOS

Uma grande variedade de micro-organismos, mesofílicos e termofílicos aeróbicos, incluindo bactérias e fungos filamentosos e leveduriformes tem sido extensivamente relatados em compostos e outros materiais orgânicos (FAURE; DESCHAMPS, 1991; STROM, 1985; TRELLO BEFFA, 1995). Como já mencionado, muitos fatores

determinam a comunidade microbiana durante a compostagem como a temperatura, pH, umidade e aeração das leiras de tratamento sendo que, sob condições aeróbicas, a temperatura é o maior fator determinante da quantidade de micro-organismos, da diversidade de espécies e a taxa de atividade metabólica (HASSEN et al., 2001; ISHII; FUKUI; TAKII, 2000; NARIHIRO, 2004; REBOLLIDO, 2008; SCHLOSS et al., 2003; XIAO et al., 2009).

Os fungos têm participação ativa durante todo o processo de compostagem, desde a fase mesofílica, quando há predominância de temperaturas mais baixas, até a fase termofílica, quando há ocorrência de temperaturas de até 70°C. Durante esta última fase os fungos atuantes serão os termofílicos, e serão os responsáveis pela degradação de resíduos mais complexos, assim como pela eliminação de organismos patogênicos não esporulados (OLIVEIRA, 2003; SILVA, 2009) .

Alguns estudos realizados em relação aos organismos envolvidos na decomposição da matéria orgânica na compostagem sugerem a presença de determinados gêneros específicos de fungos durante o processo. Dias & Carvalho (1999), isolaram grande número de fungos do gênero *Aspergillus* em pilhas de compostagem aeróbica. Em outro trabalho, realizado por Martin (2006), que analisou fungos termofílicos em pilhas de compostagem, foram encontrados os gêneros *Scopulariopsis*, *Rhizomucor*, *Chaetomium*, *Neosartorya*, com maior predominância de *Aspergillus* e *Thermomyces*.

Para que se consiga uma redução na fase de atraso inicial, acelerando o início do processo de compostagem, alguns autores apontam a inoculação como uma técnica eficiente, pois introduz uma população de micro-organismos para iniciar e acelerar o processo de decomposição da matéria orgânica (BAHERI; MEYSAMI, 2002; GAUR et al., 1982; KIEHL, 2002; MAKALY BIEY; MORTIER; VERSTRAETE, 2000).

Um inóculo é uma cultura ou mistura de várias culturas puras produzidas em laboratório, específico para a degradação de um determinado material que pode aumentar em número e diversidade a microbiota das leiras de compostagem, além de poder direcionar para a degradação de um resíduo específico e/ou assegurar uma degradação mais completa dos componentes do material em compostagem (GOMES, 2001).

O inóculo microbiológico pode ser dividido em dois grupos distintos, o de inoculação simples e o de inoculação em massa. A inoculação consiste na adição mínima de micro-organismos provenientes de cultura pura, enquanto a inoculação em massa consiste do inóculo de uma grande quantidade de organismos, geralmente relacionados ao material ao qual o inóculo será aplicado. A chamada inoculação em massa, usualmente

utilizada no processo de compostagem, apresenta vantagem na redução do período de latência.

A compostagem pode ser acelerada pela adição de inóculo tanto na fase mesofílica quanto na fase termofílica (XI, ZHANG & LIU ,2005; GOMES, 2001; NAKASAKI; AKIYAMA, 1988) entretanto, vários estudos tem indicado que a inoculação de populações microbianas exógenas e naturais ao longo de todo o processo é mais eficiente do que o inóculo em apenas uma das fase (BAHERI; MEYSAMI, 2002; ICHIDA et al., 2001; LEI; VANDERGHEYNST, 2000; MAKALY BIEY et al., 2000; XI et al., 2005; TIQUIA; TAM; HODGKISS, 1997; WEI et al., 2007).

Alguns inóculos especializados ou direcionados tem sido aplicados no dia a dia. Segundo Hatakka e colaboradores (1994) ligninases produzidas por fungos de decomposição branca aceleraram a degradação da lignina em compostagem.

Apesar da grande carga microbiológica encontrada em leiras de compostagem, o tempo total do processo pode chegar a até 4 meses (KIEHL, 2002), o que acarreta gastos com as instalações para montagem, acondicionamento e manutenção das leiras, maquinário para revolvimento e humidificação das mesmas e mão de obra para o pleno acabamento do produto. Além das vantagens econômicas, a aceitação do processo de compostagem acarreta mudanças significativas no cenário político ambiental do país e uma diminuição da utilização dos aterros sanitários, gerando economia aos municípios e uma melhor utilização dos produtos que hoje são tratados como lixo.

2.2.3. ENZIMAS LIGNOCELULÓSICAS

A matéria orgânica destinada a compostagem, na maioria das vezes, é basicamente constituída por podas de árvores, resíduos domiciliares, de jardinagem e bagaço de frutas os quais constituem a biomassa lignocelulósica.

De modo geral, a parede celular dos materiais lignocelulósicos apresentam aproximadamente 50-60 % de carboidratos na forma de celulose e hemicelulose e 20-30 % de lignina, além de uma pequena quantidade de extrativos. A celulose é uma molécula linear formada por unidades de anidro-glicose ligadas covalentemente por um átomo do carbono 4 de uma molécula ao átomo do carbono 1 da outra (ligações glicosídicas β -1 ,4) (LUNDQVIST *et al.*, 2002).

A hemicelulose é uma mistura de vários monossacarídeos polimerizados, como glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, 4-*O*-ácido metil glucurônico e resíduos de ácido galacturônico (BALAT *et al.*, 2008). A xilana é o principal componente da hemicelulose, cuja estrutura corresponde a um polímero de D-xilose unidas por ligações β -1,4. A xilana de cereais, madeiras macias (como pinho e cedro) e gramíneas contém grandes quantidades de L-arabinose e são muitas vezes, relacionadas às arabinoxilanas (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

A lignina é um polímero fenilpropanóide amorfo composto por unidades de álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Bourbonnais, Paice, 1988; Higuchi, 2004). Entre as funções biológicas da lignina destacam-se: dar rigidez e força à parede celular secundária das plantas vasculares; conferir hidrofobicidade à parede celular, o que permite maior eficiência no transporte de água pelos tecidos vasculares das plantas e dificultar o ataque microbiano aos tecidos do vegetal (ÖNNERUD, *et al.*, 2002). A lignina é um polímero de difícil degradação, pois é interconectado por várias ligações C—C e éter, as quais não são hidrolisáveis sob condições biológicas. A estrutura predominante, perfazendo quase metade do seu total, são as de éter com ligação β -*O*-4. A lignina é racêmica e, conseqüentemente, mesmo um simples dímero com ligação β -*O*-4, com dois carbonos assimétricos, possui quatro estereoisômeros. Como o número de isômeros aumenta geometricamente com o número de sub-unidades, a lignina forma uma estrutura bem complexa e sem unidades repetitivas definidas (Hammel, Cullen, 2008).

As enzimas lignocelulósicas são as principais responsáveis pela degradação das moléculas de lignina e celulose presentes nesses resíduos sendo as enzimas celulasas (CMCase), hemicelulasas (xilanase) e ligninasas (lacase) as principais enzimas.

O termo celulasas compreende o grupo de enzimas envolvidas na degradação completa das fibras da celulose, ou seja, até a liberação de monômeros estruturais, como a glicose. Todos os organismos que degradam a celulose secretam sistemas complexos de celulasas, compostos por variedades de enzimas com especificidade e modo de ação distintos, as quais agem em sinergia hidrolisando a celulose (BÉGUIN, 1990). As celulasas hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos e a classificação das hidrolases de glicosídeos é feita com base na sua especificidade ao substrato e no seu mecanismo molecular (WOLFF, 2002).

Xilanases microbianas são os catalisadores mais utilizados para a hidrólise de xilana devido à sua alta especificidade (KULKARNI *et al.*, 1999). As xilanases são β -glucanases

(xilosidades) que hidrolizam ligações β -1,4 presentes na xilana vegetal. Devido à hemicelulose apresentar vários polímeros em sua estrutura, a sua degradação requer a presença de um complexo xilanolítico (BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005), constituído, em geral, de basicamente seis enzimas diferentes.

A lignina é degradada na natureza por vários grupos microbianos, mas principalmente, por fungos de podridão branca, na sua maioria basidiomicetos e alguns ascomicetos. Estes micro-organismos produzem um complexo enzimático com a presença das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, do qual o sucesso da degradação depende de suas ações sinérgicas (TUOMELA et al., 2000).

2.2.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DO COMPOSTO

Para que o composto orgânico gerado no processo de compostagem possa ser utilizado na agricultura, tem-se a necessidade de determinar o grau de maturação da matéria orgânica e avaliar a estabilização do processo. A estabilização da compostagem está relacionada com a atividade microbiológica sobre o material que está sendo decomposto, enquanto que a maturação está associada ao potencial efeito fitotóxico que o composto pode ter sobre o crescimento das plantas (HUE & LIN, 1995; REIS, 2005).

As principais análises que podem ser feitas no material em processo de compostagem para se avaliar o desenvolvimento do processo são a granulometria, coloração e a temperatura. A granulometria do material deve diminuir com a evolução do processo gerando, ao final, uma massa de baixa granulometria. A coloração do composto se altera formando uma massa enegrecida com coloração próxima àquela do café (KIEHL, 2002). A temperatura segue o padrão apresentado na Figura 2, e pode ser utilizada para se aferir em qual fase do processo de compostagem o material se encontra (REIS, 2005).

Dos métodos de avaliação que estão incluídos nas análises laboratoriais destacam-se o pH, umidade, quantidade de matéria orgânica, carbono total, relação C:N e testes biológicos de fitotoxicidade. Ao final do processo de compostagem o pH equilibra-se próximo a 8,0, enquanto que a umidade tende a diminuir, devido à produção de calor ao longo do processo (MISRA *et al.*, 2003; KIEHL, 2002). A quantidade de matéria orgânica sofre decaimento ao longo da compostagem devido à ação dos micro-organismos que a decompõe, juntamente com o valor de carbono total que, segundo a legislação brasileira, pode ser estimado pela porcentagem de matéria orgânica na amostra dividido pelo fator de

correção de 1,8 (MISRA *et al.*, 2003). A relação C:N pode ser utilizada para acompanhamento do processo de compostagem, evidenciando-se a necessidade de conhecimento dos valores iniciais desta relação para comparação. Os testes biológicos, ou de fitotoxicidade, podem ser realizados por meio de plantas indicadoras ou plantas teste, e demonstram o potencial tóxico do composto para estes organismos, indicando a maturação do composto pelo desaparecimento da toxicidade (MISRA *et al.*, 2003; KIEHL, 2002)

3. OBJETIVOS

3.1. GERAIS

Conhecer a microbiota fúngica termofílica envolvida na compostagem de lixo urbano, isolar esses fungos e reintroduzi-los no sistema, avaliando o efeito dessa inoculação no processo de compostagem aeróbica, com vista a diminuir o tempo global do processo, buscando redução de custos, melhor aceitação e incorporação da técnica.

3.2. ESPECÍFICOS

Isolar fungos termofílicos de amostras de material de pilhas de compostagem em diferentes fases do processo, purificar e identificar os isolados.

Inocular os fungos filamentosos isolados em diferentes etapas do processo de compostagem em ensaios em frascos de laboratório e em pilhas na estação de tratamento de lixo urbano de São José do Rio Preto.

Avaliar as variações dos parâmetros pH, carbono total, nitrogênio total, quantidade de matéria orgânica e fitotoxicidade do composto resultante da compostagem usando inoculo, e comparar com o produto atualmente produzido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM DOS FUNGOS TERMOFILICOS E TERMOTOLERANTES

Foram coletados 10g de amostras da matéria orgânica do processo de compostagem realizado na Constroeste Ambiental de São José do Rio Preto, na superfície e a 60cm de profundidade de 3 pontos de 4 leiras distintas (Figura 3) ao longo dos 4 meses de compostagem Tabela 2. O período de 4 meses foi determinado para que pudéssemos amostrar todas as fases da compostagem, o total de 4 pilhas foi selecionado para acompanhamento para que se fosse possível amostrar o maior número de fungos atuantes no processo.

Em laboratório as amostras foram homogeneizadas e, em seguida, sub-amostras de 5g foram retiradas e pré-cultivadas em erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio mínimo com sais minerais: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,14%; KH_2PO_4 - 0,2%; CaCl_2 - 0,03%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02%; Uréia - 0,03%; Peptona - 0,2%; Extrato de levedura - 0,2%; Glicose - 1,0%; Tween 80 - 0,1%; Solução de elemento traço, e 0,1%; Antibiótico - 2,0% (20 mg/L de cloranfenicol e ampicilina). Os erlenmeyers foram incubado a 45°C, sob agitação de 100 rpm por até 96 horas. Foram tomadas alíquotas de 0,1 mL de amostra sem diluição desse cultivo após 2 e 96h, diluídas até 10^{-2} e inoculadas em meio sólido de sais conforme descrito acima, acrescido de 2,5% de Agar. As colônias resultantes foram isoladas com base no morfotipo (anverso e reverso, tipo de crescimento e cor dos esporos) e, após a confirmação da pureza das culturas, foram armazenadas em criotubos contendo 1,2 mL de glicerol estéril a 20% a -80°C, e tubos de cultivo contendo óleo mineral e água destilada estéreis a 5°C.

Tabela 2. Cronograma de coleta.

| | | |
|-----------|-----------|--------------------|
| Fevereiro | 1ª Semana | Leira 1 Leira 2 |
| | 2ª Semana | Leira 3 Leira 4 |
| Março | 1ª Semana | Leira 1 Leira 2 |
| | 2ª Semana | Leira 3 Leira 4 |
| Abril | 1ª Semana | Leira 1 Leira 2 |
| | 2ª Semana | Leira 3 Leira 4 |
| Maio | 1ª Semana | Leira 1 Leira 2 |
| | 2ª Semana | Leira 3 Leira 4 |
| Junho | 1ª Semana | Leira 1 Leira 2 |
| | 2ª Semana | Leira 3 Leira 4 |

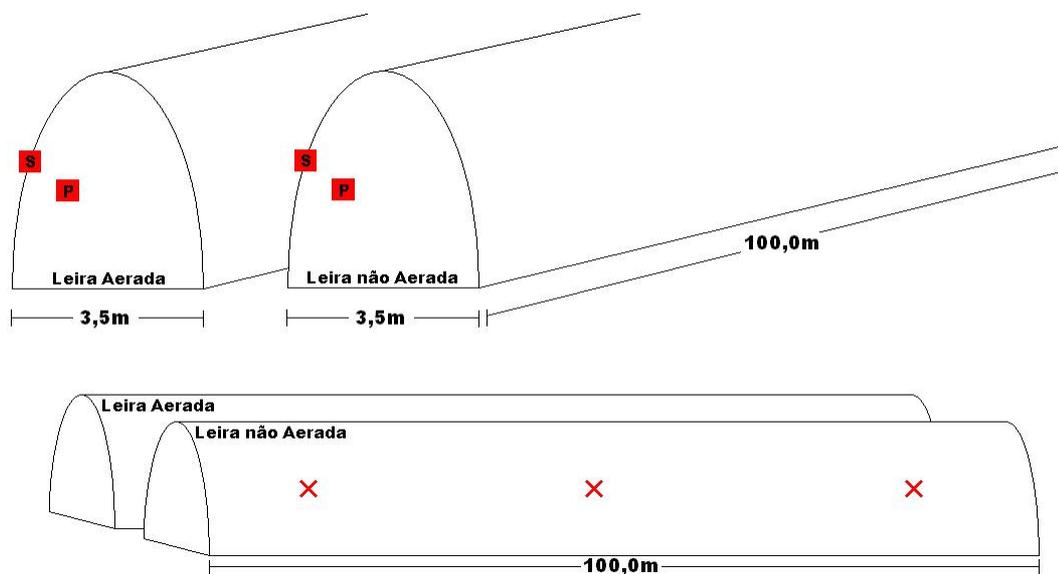


Figura 3. Esquemática das amostragens: Pontos vermelhos representam os locais de coleta, na superfície S e profundidade P.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Para a identificação dos fungos, os isolados foram cultivados em Agar Malte 2% durante 7 dias, a 45° C. Após esse período, características macrocópicas (coloração, aspecto do micélio e reverso da colônia) e microscópicas (produção de esporos, hifas e corpo de frutificação), assim como, características morfológicas e origem do isolamento foram avaliadas e catalogadas. Essa identificação foi feita com colaboração com o Prof. Dr. André Rodrigues da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Rio Claro.

Para a observação microscópica, preparações a fresco foram realizadas utilizando-se Glicerol 20% como líquido de montagem das lâminas e a identificação dos isolados em gênero e espécie seguiu chaves de identificação consideradas clássicas na literatura, Samson et al. (2000) Barron (1986), Domsch et al. (1980) e Gams, et al. (1998).

Quando a avaliação morfológica não permitiu chegar a espécie ou dúvidas a respeito dessa identificação ocorreu, foram aplicadas técnicas de biologia molecular, seguindo-se o protocolo desenvolvido pelo grupo de estudos do laboratório do professor André Rodrigues. O DNA de região específica para cada gênero, foi correlacionado com sequencias do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) através da ferramenta BLAST

4.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Os isolados em culturas puras foram avaliados quanto ao potencial de produção de enzimas degradadoras de biomassa vegetal utilizando processo fermentativo em meio sólido com resíduo lignocelulósico como substrato.

O pré-inóculo para a fermentação sólida foi produzido em erlenmeyer de 125 mL, contendo 30 mL de meio modificado de Mandels & Sternberg (1976) como descrito no item 4.1. Após 72 horas de incubação a 45±2°C, acrescentou-se 50 mL de solução nutriente mineral (0,3% de KH₂PO₄, 0,05% de MgSO₄.7H₂O, 0,05% de CaCl₂, 0,025% de Tween 80 e 0,1% de (NH₄)₂SO₄, pH 5,0) para obtenção da suspensão micelial do fungo, sendo 10 mL usados para inocular 5g de substrato constituído por mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1) contidos em embalagens de propileno fechados com tubo PVC e vedados com rolha de algodão e incubados em BOD a 45±2°C por 168 horas.

Para a extração das enzimas, foram adicionados 100 mL de água destilada ao material fermentado o qual foi homogeneizado e submetido agitação em shaker, a 50 rpm, por 30 minutos. O material foi então filtrado e centrifugado a 10.000 x g por 15 min., a 5°C e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta para quantificação da atividade enzimática. Na figura 4 é mostrado o esquema desse ensaio.



Figura 4. Esquema de fermentação em estado sólido e extração enzimática. (Fonte: Adaptado de EGEA, 2010).

4.4. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

4.4.1 XILANASE E CARBOXIMETILCELULASE (CMCase)

As atividades de xilanase e carboximetilcelulase (CMCase) foram determinadas ambas em mistura reacional contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução tampão acrescido de substrato (1,0% de xilana em tampão acetato, 0,1M e pH 5,0 para xilanase e 2,0% de CMC em tampão acetato, 0,1M e pH 5,0 para CMCase). A mistura de reação foi mantida a 60°C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 1,3-dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva padrão de xilose e glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade necessária para liberar 1,0 μ mol de açúcar redutor, por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.4.2 LACASE

A atividade de lacase foi determinada utilizando metodologia descrita por Buswell et al. (1995), baseada na oxidação do substrato sintético ABTS (2,2'-azino-bis-etilbentiazolina). A reação foi acompanhada a 420 nm, após incubação de 1 minuto a 40°C, com 0,9 ml de tampão acetato de sódio (100mM e pH 3,5), 0,03% de ABTS e 0,1 ml da solução enzimática.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μ mol de ABTS, por minuto, considerando ϵ para o ABTS oxidado de 3,6.104 M⁻¹cm⁻¹.

4.5. SELEÇÃO DOS FUNGOS E INOCULO NA COMPOSTAGEM

4.5.1-FUNGOS

Foram selecionadas 10 cepas fungos, de diferentes gêneros, com base na velocidade de crescimento e na maior produção de CMCase, xilanase e lacase.

4.5.2- ENSAIOS DE COMPOSTAGEM

A partir de material fornecido pela Empresa Constroeste foram realizados ensaios de compostagem em 3 níveis: um ensaios inicial em escala de laboratório utilizando 120g de material, um ensaios laboratorial em escala utilizando 2Kg do material e um ensaio piloto, feito na planta industrial.

4.5.2.1-Matéria orgânica para a compostagem

A matéria orgânica utilizada foi proveniente do lixo sólido urbano da cidade de São José do Rio Preto/SP, constituída, em sua maioria, por resíduos de frutas, folhas e resíduos de jardinagem. O material foi mantido nos mesmos padrões encontrados nas pilhas de compostagem da empresa Constroeste Ambiental, responsável pela captação do resíduo sólido urbano da cidade. O material obtido após a separação de inertes como plástico, vidro

e metais na planta de recebimento e separação do lixo na Empresa, foi utilizado para os ensaios de compostagem. Este foi inoculado com mistura de esporos dos fungos selecionados, incubados e o processo de biodegradação foi monitorado com base nos parâmetros químicos e físicos-químicos conforme descritos a seguir.

4.5.2.2- Teste inicial em escala laboratorial

Os fungos selecionados para o teste foram cultivados em meio salino descrito por Mandels & Sternberg (1976) com modificações, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,14%; KH_2PO_4 - 0,2%; CaCl_2 - 0,03%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02%; Uréia - 0,03%; Peptona - 0,2%; Extrato de levedura - 0,2%; Glicose - 1,0%; Tween 80 - 0,1%; Solução de Sais - 0,1%; Ágar - 2,5% até o início da produção de esporos. Após o crescimento fúngico, adicionou-se uma solução nutriente contendo KH_2PO_4 - 0,3%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05%; CaCl_2 - 0,05%; Tween 80 - 0,025%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1%; para a suspensão de esporos, que serviu de inóculo para os tratamentos.

Foram conduzidos testes em escala laboratorial para se avaliar o potencial do inóculo fúngico no processo de compostagem. Para este experimento, foram utilizados, 6 erlenmeyers de 1L contendo 120g de matéria orgânica descrita no item 4.5.2.1, sendo 3 frascos para controle (sem adição dos fungos) e 3 experimentais (experimento em triplicata). Os frascos foram incubados a $45 \pm 2^\circ\text{C}$, por 30 dias, sendo os erlenmeyers aerados e retirando-se 5g de amostra a cada sete dias. A umidificação dos frascos foi realizada sempre que necessário, com a adição de aproximadamente 5 mL de água destilada autoclavada. O experimento consistiu na inoculação única de um total de 10^7 esporos, aproximadamente 360 μL da suspensão homogeneizada dos fungos selecionados para o tratamento.

Para avaliação da interferência do inóculo na maturação do composto, foram avaliados os parâmetros pH, carbono total, nitrogênio total, matéria orgânica e fitotoxicidade.

4.5.2.3-Compostagem laboratorial em escala e na planta industrial

Após o teste inicial, foram realizados os testes em escala industrial e laboratorial aumentada. Os testes em escala laboratorial aumentada foram conduzidos em 6 recipientes plásticos contendo 2 kg de matéria orgânica, sendo 2 frascos para controle (sem adição dos fungos), 2 frascos com adição de inóculo único (suspensão de todos os fungos na primeira semana de compostagem) e mais 2 recipientes experimentais (com inoculação sequencial, ao longo de duas semanas). Os frascos foram incubados a $45\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 30 dias, sendo os recipientes aerados e amostrados (aproximadamente 10g de amostra) a cada duas semanas. A umidificação dos frascos foi realizada sempre que necessário, com a adição de aproximadamente 10 mL de água destilada autoclavada. O experimento consistiu na inoculação única de um total de 10^7 esporos, aproximadamente 4mL da suspensão homogênea dos 10 fungos selecionados para o tratamento.

Para os ensaios de compostagem em escala industrial, foram montadas 3 leiras experimentais no pátio de compostagem da Constroeste Ambiental com aproximadamente 2,0 m x 2,0 m x 1,5 m (Largura x Largura x Altura). Os tratamentos experimentais se dividiram em inóculo único e inóculo sazonal, sendo uma leira Controle (LC), uma leira com o Tratamento 1 (T1) e uma leira com o Tratamento 2 (T2) (Figura 5). Os experimentos tiveram duração de 2 meses, sendo as coletas realizadas a cada duas semanas.



Figura 5. Montagem das leiras de compostagem na empresa Constroeste Ambiental.

A leira T1: recebeu inóculo único, consistindo em uma quantidade de 10^7 esporos para cada 100g de matéria orgânica. Foram inoculados aproximadamente 4L de suspensão de esporos, adicionado uma semana após a montagem das leiras.

A leira T2: recebeu inóculo sazonal, sendo os fungos isolados durante a fase mesofílica inicial foram adicionados uma semana após a montagem das leiras e o restante dos fungos foram adicionados 2 semanas após a montagem da mesma, totalizando ao final os mesmos 10^7 esporos e, aproximadamente, 4L de inóculo.

Durante o acompanhamento do processo de compostagem, as leiras experimentais foram submetidas às mesmas condições de temperatura e umidade das leiras da Empresa Constroeste Ambiental dentro do mesmo pátio. As temperaturas foram mantidas preferencialmente entre 45-65°C durante a fase termofílica. O controle da temperatura e a aeração das leiras foram efetuados pelo revolvimento semanal com o auxílio de pá carregadeira.

Para o controle de umidade, foram realizados peso seco da matéria orgânica e quando constatado a baixa umidade das leiras, estas foram umidificadas para a manutenção de um processo de compostagem de qualidade. A umidade nas leiras de compostagem permaneceu entre os 40-60% com um ótimo de 55%.

Para avaliar a interferência do inóculo na maturação do composto orgânico gerado no processo de compostagem, foram acompanhados durante o processo os parâmetros pH, matéria orgânica, carbono total, nitrogênio total, fitotoxicidade, o declínio da temperatura ao final do processo.

Para a coleta de amostras, foram retirados material da superfície (até 10cm de profundidade) e do interior das leiras (entre 50 e 60cm de profundidade a partir da superfície) de 3 pontos distintos da pilha.

4.6. ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS

pH: Diluiu-se 1g de amostra em 10mL de água destilada (proporção 1:10 p/v). A medição do pH foi realizada em pHmetro Digimed (DM20), calibrado com tampão 4 e 7.

Nitrogênio amoniacal total: Para análise de nitrogênio total foi utilizada a técnica de micro Kjeldahl, onde uma amostra de 0,3 g foi misturada com 3 mL de ácido sulfúrico

concentrado e 1 g de mistura catalítica composta por ZnSO₄ – 0,96%; CuSO₄ – 0,04%, em um tubo de micro Kjeldahl. A mistura foi aquecida a 350°C com auxílio de bloco digestor até sua digestão completa e após este procedimento foi realizada a destilação da mesma em recipiente contendo 10mL de solução de ácido bórico a 2% e titulada com solução de HCl 0,02M utilizando-se vermelho de metila e verde de bromocresol como indicadores.

Matéria orgânica: A quantidade de matéria orgânica foi aferida por combustão da amostra a 550°C durante 4h. A quantidade de matéria orgânica foi aferida por comparação entre a massa do material seco a 105°C por 24 horas e a massa final do material após combustão.

Carbono total: A quantidade de carbono total da amostra foi avaliada dividindo-se a porcentagem de matéria orgânica encontrada na amostra pelo fator de correção de 1,8 (MISRA *et al.*, 2003).

4.7. TESTES DE FITOTOXICIDADE

Os testes de fitotoxicidade foram conduzidos com sementes de alface. Um total de 50 sementes de alface foi adicionados em placa de petri forrada com papel filtro e 5 mL de sobrenadante obtido de uma suspensão do composto após os tratamentos, em água destilada, na proporção 1:10 (p/v). A porcentagem de germinação e o crescimento das raízes foram aferidos após um período de 48h de incubação a 28°C ± 2°C. A taxa de germinação foi calculada segundo a equação descrita por Nasreen & Qazi (2012):

$$\text{Índice de Germinação} = \frac{\% \text{ de germinação} \times \text{Média de crescimento das raízes (cm)}}{\% \text{ de germinação} \times \text{Média de crescimento das raízes em H}_2\text{O}}$$

4.8. ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS NO EXTRATO LÍQUIDO DA SUSPENSÃO DO COMPOSTO POR CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS -CG/EM

O extrato aquoso utilizado nos testes de germinação foram submetidos a análises em Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrofotômetro de Massas (CG/EM). As amostras foram submetidas a dois tratamentos para posterior injeção no aparelho. Em um primeiro momento foi utilizado o extrato puro diluído na razão 1:10 e 1:50 ($V_{\text{extrato}}:V_{\text{metanol}}$) em metanol PA 99,5%. Após diluída a amostra em vaio específico, as amostras foram injetadas no CG/EM.

Em um segundo estudo, foi realizada a concentração das amostras, após centrifugação a 10.000 g, a 4°C e 10min. Após centrifugadas, as amostras foram filtradas em membrana de 0,22µm e o extrato resultante foi passado em cartucho SPE, para posterior suspensão do material retido no cartucho em metanol PA 99,5% para injeção no CG/EM.

Os parâmetros utilizados na calibração do aparelho (Tabela 3) foram retirados do artigo de Nascimento Filho, I.; Mühlen, C.; Caramão, E. B. (2001), que estudaram compostos orgânicos presentes em lixiviados de aterros sanitários.

Tabela 3. Parâmetros utilizados no CG/EM.

| Parâmetro | Condições |
|------------------------------|-------------------------------|
| Temperatura do injetor | 280°C |
| Temperatura da interface | 280°C |
| Temperatura inicial | 70°C (3min) |
| Rampa de aquecimento 1 | 3°C/min |
| Temperatura final 1 | 200°C |
| Rampa de aquecimento 2 | 10°C/min |
| Temperatura final 2 | 280°C |
| Tempo final | 5 min |
| Fluxo de gás de arraste (He) | 1 mL/min |
| Coluna | HP-1, 30m x 0,25mm x 0,25mm |
| Modo de análise | SCAN (varredura de espectros) |
| Modo de ionização | Impacto eletônico a 70eV |
| Modo de injeção | Split (1:50) |

Fonte: Retirado de Nascimento Filho, I.; Mühlen, C.; Caramão, E. B. (2001)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Foram realizadas 10 coletas, distribuídas em duas coletas mensais por 5 meses, resultando no isolamento de 38 fungos termofílicos ou termotolerantes. As cepas isoladas foram identificadas como pertencentes a 4 gêneros distintos, *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia* e *Paecilomyces*. A Tabela 4 apresenta todos os 38 fungos, seus códigos em coleção, coleta em que foram isolados e sua identificação taxonômica, que, quando possível, se estendeu ao nível de espécie. Os códigos em coleção foram definidos pelas iniciais do nome do coletor GF, seguido do tempo em meses da coleta (1 a 5) e número do isolado para cada tempo de coleta.

Todos os gêneros isolados (Tabela 4) são citados na literatura como fungos presentes no processo de compostagem. O trabalho de Martin (2006) realizado nas pilhas de compostagem da planta de tratamento de lixo orgânico da Empresa Constroeste

Construtora e Participações LTDA relata a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizomucor*, com uma dominância de fungos do gênero *Aspergillus*, o que corrobora os resultados encontrados no presente trabalho, cujos fungos do gênero *Aspergillus* da seção fumigati representam aproximadamente 65% dos fungos isolados (Figura 6).

A presença de fungos dos gêneros *Paecilomyces* e *Lichtheimia* (sinônimo de *Absidia*) em pilhas de compostagem são corroboradas pelos dados de literatura, como descrito no trabalho de Anastasi (2005).

Tabela 4. Lista dos isolados com identificação morfológica e molecular.

| Código do isolado | Identificação POR PCR | Identificação Morfológica | Região utilizada para amplificação / identificação molecular¹ |
|--------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---|
| GF 1.1 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia corimbifera</i> | ITS |
| GF 1.2 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia corimbifera</i> | ITS |
| GF 1.4 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 1.5 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia ramosa</i> | ITS |
| GF 2.1 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia corimbifera</i> | ITS |
| GF 2.2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 2.3 | <i>Paecilomyces</i> sp. | <i>Paecilomyces</i> sp. | TUB |
| GF 2.4 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sp. | TUB |
| GF 2.6 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 2.10 | <i>Rizhomucor miehei</i> | <i>Rizhomucor miehei</i> | ITS |
| GF 2.11 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 2.12 | <i>Rhizomucor pusillus</i> | <i>Rizhomucor</i> sp. | ITS |
| GF 2.14 | <i>Aspergillus nidulans</i> | <i>Aspergillus</i> sp. | TUB |
| GF 3.1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 3.2 | <i>Rhizomucor pusillus</i> | <i>Rizhomucor miehei</i> | ITS |
| GF 3.3 | <i>Rhizomucor pusillus</i> | <i>Rizhomucor miehei</i> | ITS |
| GF 4.1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 4.2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 4.3 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 4.4 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 4.5 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 4.6 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 4.7 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 5.1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 5.2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 5.5 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 5.6 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 5.7 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia</i> sp. | ITS |
| GF 5.8 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB |
| GF 5.9 | <i>Paecilomyces</i> sp. | <i>Paecilomyces</i> sp. | TUB |

¹ Região do genoma utilizada no presente trabalho: ITS: *internal transcribed spacer*; TUB: beta tubulina.

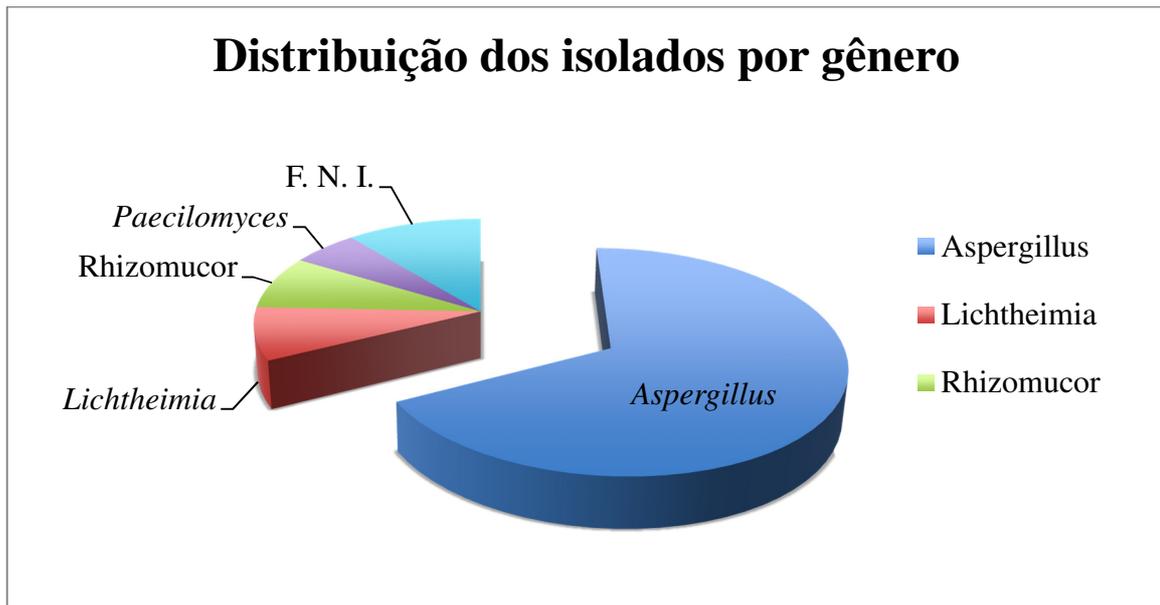


Figura 6. Distribuição dos isolados por gênero.

Ao longo dos 5 meses de amostragem (coletas de 1 a 5), houve variação no número de fungos isolados por coleta. Na primeira coleta, foram isoladas 5 cepas aumentando para 13, na segunda, com redução na 3^a, 4^a e 5^a coletas (Figura 7). Ao longo do processo de compostagem, ocorre uma variação na temperatura das leiras, que se inicia próxima a temperatura ambiente, se elevando até valores próximos aos 70°C, e depois se estabilizam em temperaturas por volta dos 40°C (KIEHL, 2002;). Esta variação da temperatura gera também uma variação na comunidade de micro-organismos atuantes no processo de compostagem.



Figura 7. Número de isolados por coleta.

Quando considerado o ponto de coleta das amostras, o número de isolados obtidos indicou que 71% foram provenientes da superfície da leira de compostagem, sugerindo que, além da temperatura, o fator oxigenação pode estar interferindo microbiota.

A identificação dos isolados utilizando técnicas de biologia molecular foi utilizada para validação dos resultados obtidos através das técnicas morfológicas de identificação. (Tabela 4). Todos os isolados cujas identificações foram feitas com essa técnica mostraram 98% ou mais de similaridade com sequências já catalogadas no banco de dados.

As filogenias representativas a cada um dos gêneros de fungos presentes no processo de compostagem, *Aspergillus fumigatus* (Figura 8), *Aspergillus nidulans* (Figura 9), *Rhizomucor* (Figura 10) e *Lichtheimia ramosa* (Figura 11) foram montadas e os isolados foram incluídos, para que a comprovação da proximidade das cepas isoladas com os fungos catalogados no banco de dados do NCBI. A maior proximidade dos isolados com os fungos catalogados no banco de dados do NCBI demonstram maior similaridade entre os organismos, validando a identificação realizada.

A. fumigatus

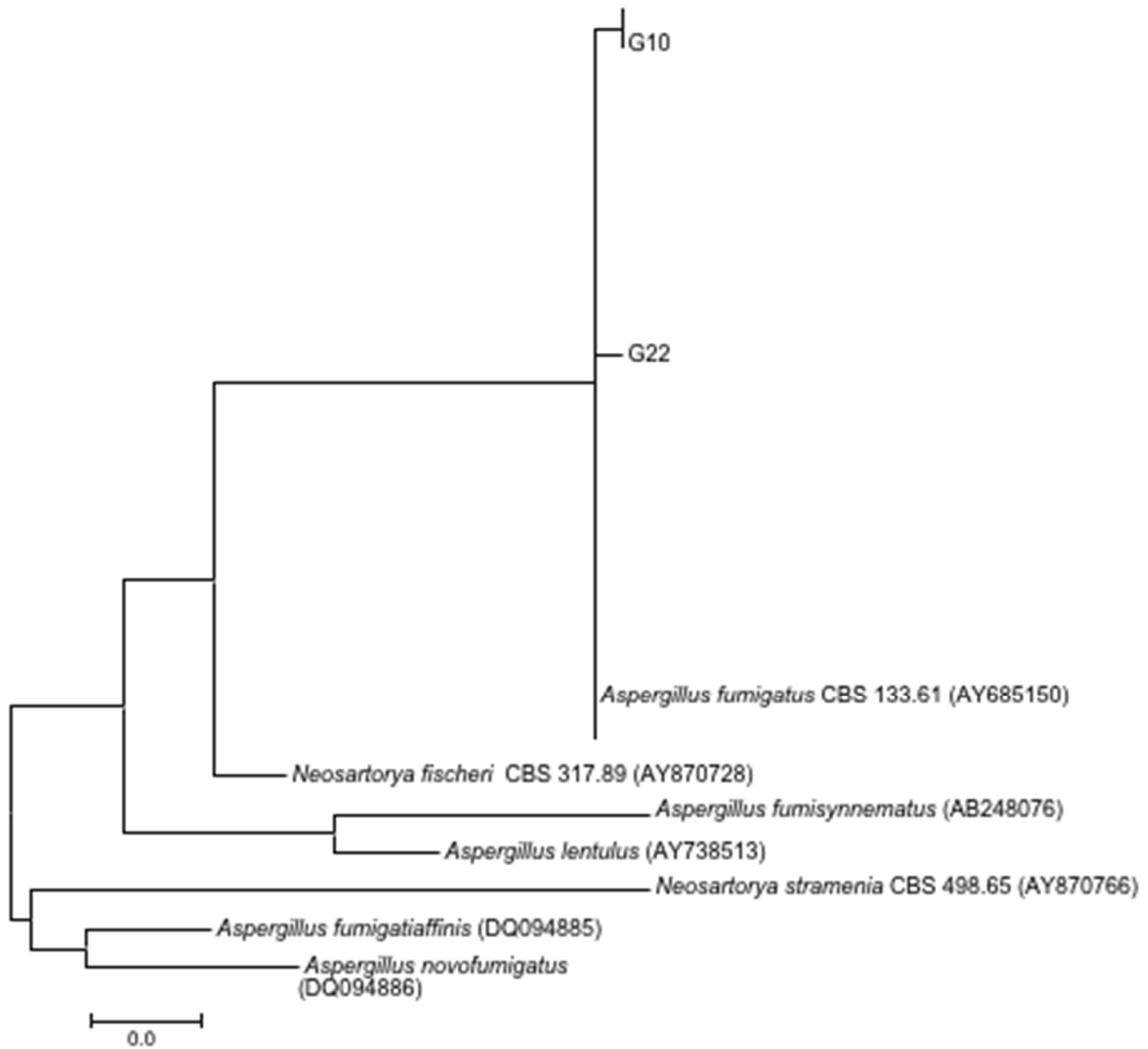


Figura 8. Filogenia para espécies de *Aspergillus fumigatus*.

A. *Nidulans* (= *Emericella nidulans*)

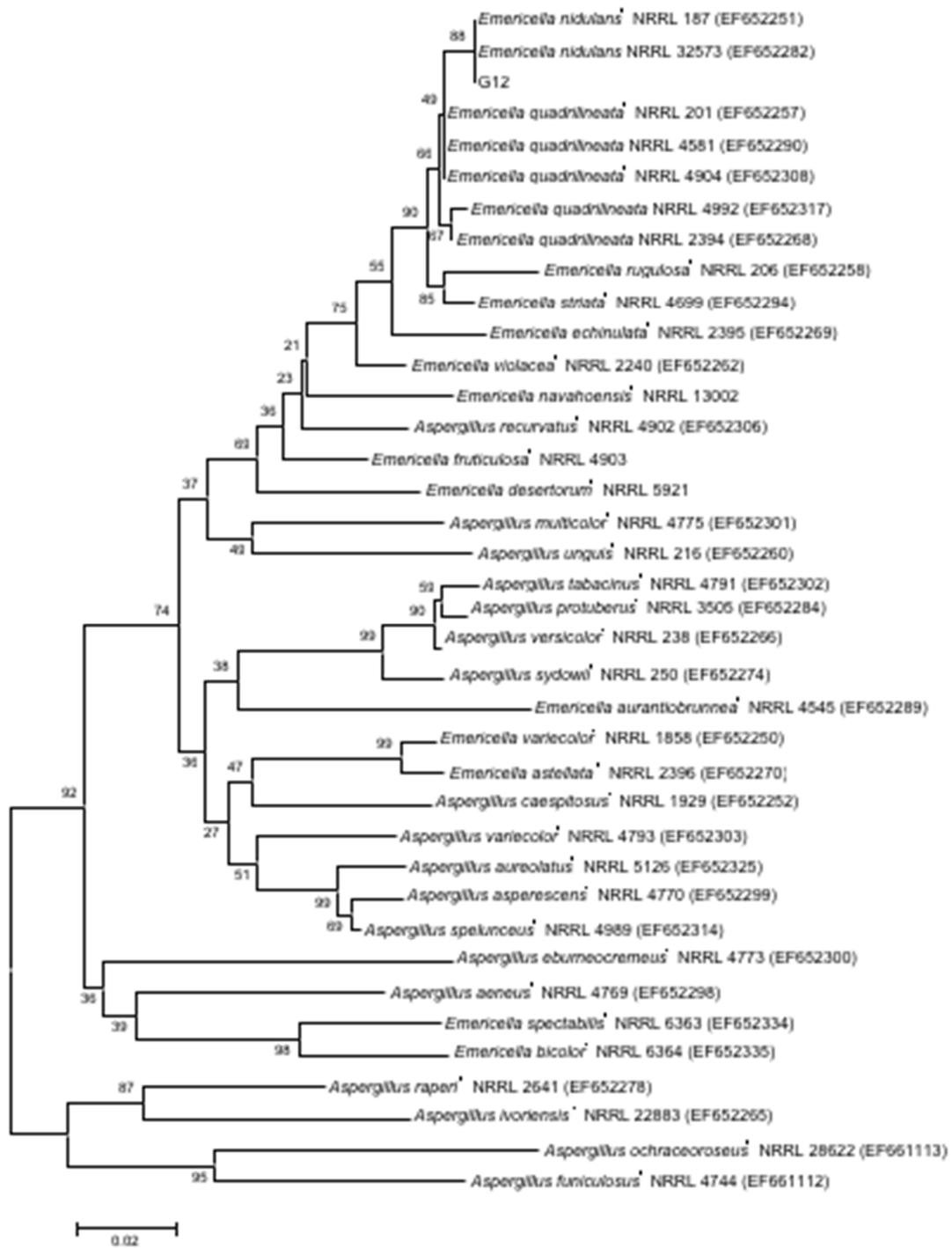


Figura 9. Filogenia para espécies de *Aspergillus nidulans* (= *Emericella nidulans*).

Rhizomucor

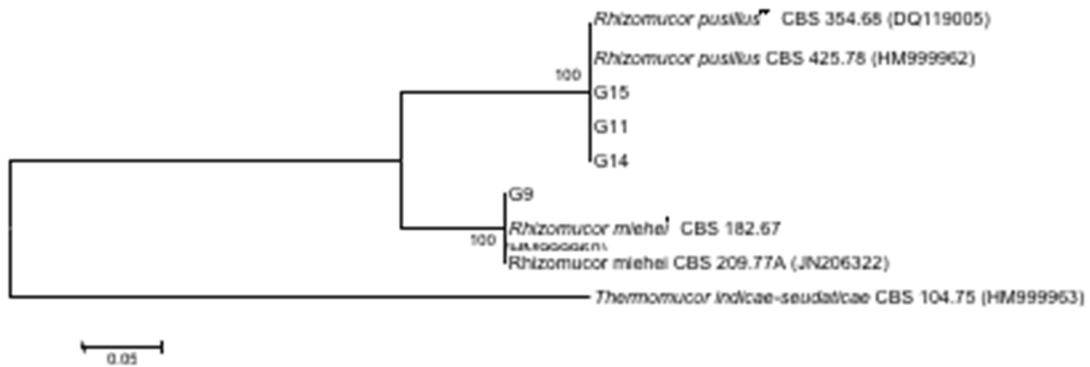


Figura 10. Filogenia para espécies de *Rhizomucor*.

Lichtheimia ramosa

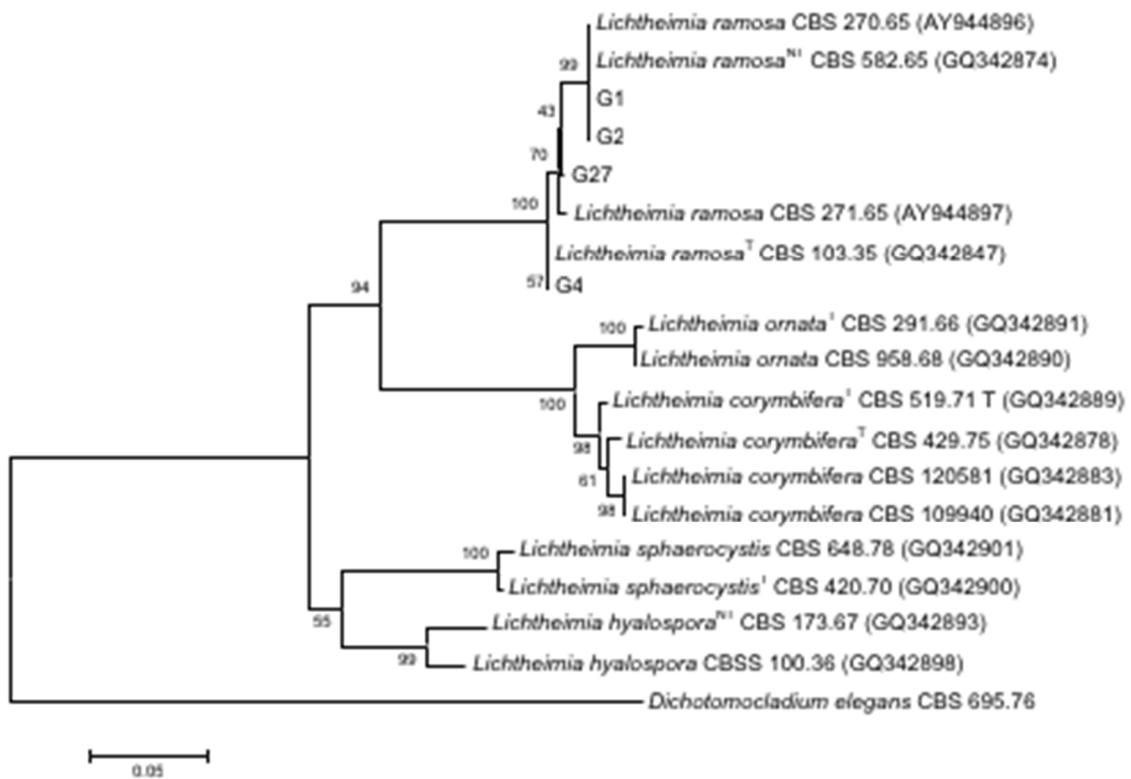


Figura 11. Filogenia para espécies de *Lichtheimia ramosa*.

5.2. PRODUÇÃO DE ENZIMAS PELOS ISOLADOS

Os 38 isolados foram cultivados por fermentação em estado sólido para avaliação do seus potenciais de produção de enzimas degradadoras de material vegetal. Os fungos que apresentaram as maiores atividades de CMCase foram as cepas *Lichtheimia ramosa* GF1.5, *Aspergillus* GF2.13, *Aspergillus fumigatus* GF2.6 e *Aspergillus fumigatus* GF1.4. (Tabela 5).

Com exceção da cepa GF1.5, que não pôde ser identificada, todas as cepas que apresentaram melhores produções de CMCase são de fungos representantes do gênero *Aspergillus* da seção fumigatti. Os fungos deste gênero foram testados por Grigorevski-Lima *et al.* (2009) que observaram a produção de aproximadamente 21,5 U/g de CMCase o que corresponde a uma menor produção daquela encontrada neste trabalho, o que pode ser justificada por uma incubação das cepas a uma temperatura menor (30°C) em contraste com a utilizada no presente trabalho (45°C). Porém resultados semelhantes aos obtidos foram descritos por Liu (2011) ao analisar enzimas termoestáveis de *Aspergillus fumigatus*, onde os valores encontrados para a produção de CMCase, quando otimizados os meios de cultivo, foram de 507,6±13,7 U/g, com a utilização de palha de milho como fonte de carbono e cultivo dos fungos por 4 dias a 50°C.

Os valores observados para a produção da enzima CMCase são condizentes com a literatura, porém os testes foram realizados sem a padronização das condições ideais de temperatura, pH e fonte de carbono, o que poderá acarretar o aumento da produção enzimática. Porém a utilização de fungos do gênero *Aspergillus* da seção fumigatti deverá ser realizada com cautela, pois os fungos identificados como *Aspergillus fumigatus* se apresentam na literatura como patógenos oportunistas podendo levar ao desenvolvimento de micoses e doenças relacionadas (SAMSON *et al.*, 2007).

Tabela 5. Produção de CMCase pelos isolados.

| Código | CMCase U/mL | CMCase U/g |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------|
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF1.1 | 0,30 | 6,00 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF1.2 | 0,54 | 10,80 |
| <i>Aspergillus</i> GF1.3 | 2,34 | 46,80 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF1.4 | 7,54 | 150,80 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF1.5 | 24,62 | 492,40 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF2.1 | 0,19 | 3,80 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF2.2 | 4,17 | 83,40 |
| <i>Paecilomyces</i> sp. GF2.3 | 3,25 | 65,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF2.4 | 2,73 | 54,60 |
| <i>Aspergillus</i> GF2.5 | 2,61 | 52,20 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF2.6 | 9,98 | 199,60 |
| <i>Aspergillus</i> GF2.7 | 1,72 | 34,40 |
| <i>Aspergillus</i> GF2.8 | 2,65 | 53,00 |
| <i>Aspergillus</i> GF2.9 | 3,53 | 70,60 |
| <i>Rizhomucor miehei</i> GF2.10 | 0,70 | 14,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF2.11 | 1,92 | 38,40 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> GF2.12 | 2,52 | 50,40 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> GF2.13 | 11,52 | 230,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF3.1 | 1,99 | 39,80 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> GF3.2 | 0,52 | 10,40 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> GF3.3 | 0,64 | 12,80 |
| <i>Aspergillus</i> GF3.4 | 2,43 | 48,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.1 | 3,91 | 78,20 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.2 | 2,60 | 52,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.3 | 1,69 | 33,80 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.4 | 3,45 | 69,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.5 | 3,07 | 61,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.6 | 3,54 | 70,80 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.7 | 2,73 | 54,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.1 | 4,15 | 83,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.2 | 3,77 | 75,40 |
| <i>Aspergillus</i> GF5.3 | 4,11 | 82,20 |
| <i>Aspergillus</i> GF5.4 | 3,33 | 66,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.5 | 3,62 | 72,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.6 | 3,27 | 65,40 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF5.7 | 0,73 | 14,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.8 | 4,03 | 80,60 |
| <i>Paecilomyces</i> sp. GF5.9 | 1,63 | 32,60 |

As melhores cepas produtoras para a enzima Xilanase foram os isolados *Lichtheimia ramosa* GF1.5, *Aspergillus fumigatus* GF2.6, *Aspergillus* GF2.13 e *Aspergillus fumigatus* GF1.4 que apresentaram, respectivamente, 20,50 U/mL (410,00 U/g), 7,71 U/mL (154,20 U/g), 6,00 U/mL (120,0U/g) e 5,87 U/mL (117,40 U/g) (Tabela 6). Excetuando-se a cepa GF1.5 que não pôde ser identificada, todos os melhores produtores para a enzima Xilanase foram fungos do gênero *Aspergillus*, citados na literatura como bons produtores enzimáticos.

Egea (2010) testou fungos do gênero *Aspergillus* para a produção enzimática de Xilanase e obteve valores de produção máximos de 64 U/mL, que pode ser considerado elevado se comparado à máxima produção encontrada para os isolados deste trabalho. Ainda nos trabalhos de Kanget *al.* (2004) e Shah (2004), com a otimização dos parâmetros de fermentação, foram obtidos valores para as atividades enzimáticas de xilanase de 5070 U/g e 210,0 U/ml, respectivamente. Estes valores elevados em relação aos obtidos no presente trabalho podem ser justificados parcialmente pela otimização dos parâmetros fermentativos dos referidos trabalhos, principalmente devido a utilização de temperatura ótima para o crescimento fúngico e alteração de substrato para produção das enzimas.

Os resultados obtidos para os ensaios enzimáticos para a enzima lacase não apresentaram resultados significantes para as cepas isoladas, indicando que as cepas isoladas podem não se apresentar como bons produtores da enzima, entretanto, o tempo utilizado para o screening enzimático durante este estudo pode ser caracterizado como reduzido quando se comparado à outros estudos envolvendo a produção desta enzima, podendo ser produzida com um tempo de até 40 dias de fermentação.

Tabela 6. Produção de Xilanase pelos isolados.

| Código | Xilanase U/mL | Xilanase U/g |
|-------------------------------------|----------------------|---------------------|
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF1.1 | 0,31 | 6,20 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF1.2 | 0,23 | 4,60 |
| <i>Aspergillus</i> GF1.3 | 2,80 | 56,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF1.4 | 5,87 | 117,40 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF1.5 | 20,50 | 410,00 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF2.1 | 0,33 | 6,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF2.2 | 5,66 | 113,20 |
| <i>Paecilomyces</i> sp. GF2.3 | 4,83 | 96,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF2.4 | 2,17 | 43,40 |
| <i>Aspergillus</i> GF2.5 | 2,71 | 54,20 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF2.6 | 7,71 | 154,20 |
| <i>Aspergillus</i> GF2.7 | 2,28 | 45,60 |
| <i>Aspergillus</i> GF2.8 | 4,38 | 87,60 |
| <i>Aspergillus</i> GF2.9 | 3,06 | 61,20 |
| <i>Rizhomucor miehei</i> GF2.10 | 0,23 | 4,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF2.11 | 2,59 | 51,80 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> GF2.12 | 2,62 | 52,40 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> GF2.13 | 6,00 | 120,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF3.1 | 2,16 | 43,20 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> GF3.2 | 0,28 | 5,60 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> GF3.3 | 0,24 | 4,80 |
| <i>Aspergillus</i> GF3.4 | 2,13 | 42,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.1 | 3,38 | 67,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.2 | 2,95 | 59,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.3 | 1,49 | 29,80 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.4 | 2,50 | 50,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.5 | 2,13 | 42,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.6 | 2,87 | 57,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF4.7 | 3,21 | 64,20 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.1 | 3,34 | 66,80 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.2 | 2,41 | 48,20 |
| <i>Aspergillus</i> GF5.3 | 3,94 | 78,80 |
| <i>Aspergillus</i> GF5.4 | 2,71 | 54,20 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.5 | 2,89 | 57,80 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.6 | 2,43 | 48,60 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF5.7 | 0,12 | 2,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF5.8 | 3,99 | 79,80 |
| <i>Paecilomyces</i> sp. GF5.9 | 5,25 | 105,00 |

5.3. SELEÇÃO DAS CEPAS PARA OS ESTUDOS DE COMPOSTAGEM

Com base nas produções de enzimas CMCase e Xilanase, consideradas enzimas chaves para o processo de biodegradação de matéria orgânica vegetal, foram selecionadas dez linhagens (Tabela 7) para os estudos de compostagem. O inóculo fúngico utilizado posteriormente neste trabalho foi realizado a partir da suspensão de esporos homogeneizada dos dez fungos selecionados.

Tabela 7. Cepas selecionadas para produção do inóculo nos estudos de compostagem

| Cepas | Xilanase U/g substrato | CMCase U/g substrato |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>Lichtheimia ramosa</i> GF 1.5 | 410,00 | 492,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF 1.4 | 117,40 | 150,80 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF 2.2 | 113,20 | 83,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF 2.6 | 154,20 | 199,60 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF 4.1 | 67,60 | 78,20 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF 5.1 | 66,80 | 83,00 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF 5.2 | 48,20 | 75,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF 5.5 | 57,80 | 72,40 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> GF 5.8 | 79,80 | 80,60 |
| <i>Paecilomyces sp</i> GF 5.9 | 105,00 | 32,60 |

5.3.4. ESTUDO PILOTO LABORATORIAL- COMPOSTAGEM EM FRASCOS

5.3.4.1. Variações do pH

No início do processo de compostagem, o pH da suspensão feita com o composto foi 8,0 para tratamento e controle. Após uma semana, verificou-se uma maior alcalinização do material inoculado, porém, a variação em ambos não chegou a uma unidade de pH. A maior diferença observada entre o tratamento e o controle foi a diminuição do pH ocorrida neste último na quarta semana (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de pH do substrato ao longo da compostagem em escala laboratorial em frascos.

| Tempo (semanas) | Compostagem com inóculo do fungo | Controle |
|-----------------|----------------------------------|-------------|
| 0 | 8,00 ± 0,21 | 8,00 ± 0,21 |
| 1 | 8,77 ± 0,37 | 8,11 ± 0,45 |
| 2 | 8,20 ± 0,21 | 8,36 ± 0,17 |
| 3 | 8,01 ± 0,21 | 8,23 ± 0,11 |
| 4 | 8,68 ± 0,33 | 7,94 ± 0,21 |

controle: compostagem usando o mesmo material, sem o inóculo do fungo.

Segundo Kiehl (2002) e Misra *et al.* (2003) a variação do pH durante a compostagem deve-se a liberação de ácidos orgânicos ao meio, derivados da degradação dos polímeros que compõe a biomassa vegetal, como as pectinas, ou produzidos pelos microrganismos. No final do processo, o pH tende a torna-se novamente levemente básico pelo consumo desses ácidos orgânicos pelos microrganismos. Desse modo, segundo Kiehl (2002), o pH fornece informação sobre o estado de decomposição da matéria orgânica que foi submetida a um processo de compostagem. Diferentemente do que é apresentado na literatura, o material a ser compostado durante o trabalho teve em seu início uma característica básica que se manteve ao longo do processo, o que pode sugerir que a matéria orgânica utilizada possuía poucas substâncias com característica básica, ou que esta já chega ao pátio de compostagem da usina de tratamento em um estágio mais avançado de decomposição.

Para efeito de interpretação no processo de compostagem, considera-se que matéria-prima crua tem característica ácida enquanto que composto humificado apresentará, obrigatoriamente, pH alcalino. Porém, considerando as diferenças inerentes a composição biomassa usada em cada processo, a informação fornecida pelo pH deve ser complementada por outras, como a relação C:N (COSTA, 2005).

5.3.4.2. Influência do inóculo nos teores de matéria orgânica e carbono total

Os perfis de redução de carbono e material orgânica foram muito similares entre controle e tratamento, porém, para ambos os parâmetros, logo na primeira semana a redução foi mais acentuada no material que recebeu o inóculo dos fungos indicando uma aceleração no processo de degradação (figura 12). Um aumento no teor de carbono observado na

terceira semana pode estar relacionado com a perda de água do material e materiais voláteis levando a uma concentração de fibras nas amostras.

A síntese dos resultados apresentada na Tabela 9, mostra que o inóculo adicional promoveu uma redução de aproximadamente 32% na quantidade total de matéria orgânica enquanto o controle, de apenas 22%, evidenciando que o inóculo fúngico auxiliou na degradação mais rápida da matéria orgânica, como já descrito por outros autores como Kiehl (2002) e Xi *et al.* (2005). Trabalhos de Kiehl (2002), Xi *et al.* (2005), Ming *et al.* (2007) e Gomes (2011) mostram que o inóculo atua de forma a reduzir o período de adaptação da microbiota no início do processo permitindo uma aceleração do processo.

A redução da matéria orgânica é corroborada pelos valores de carbono total que sofreu uma maior redução mostrando a mesma perda de 32% para as amostras que tiveram a adição do inóculo fúngico, e de 22% para aquelas do controle, sendo os valores apresentados na figura 12.

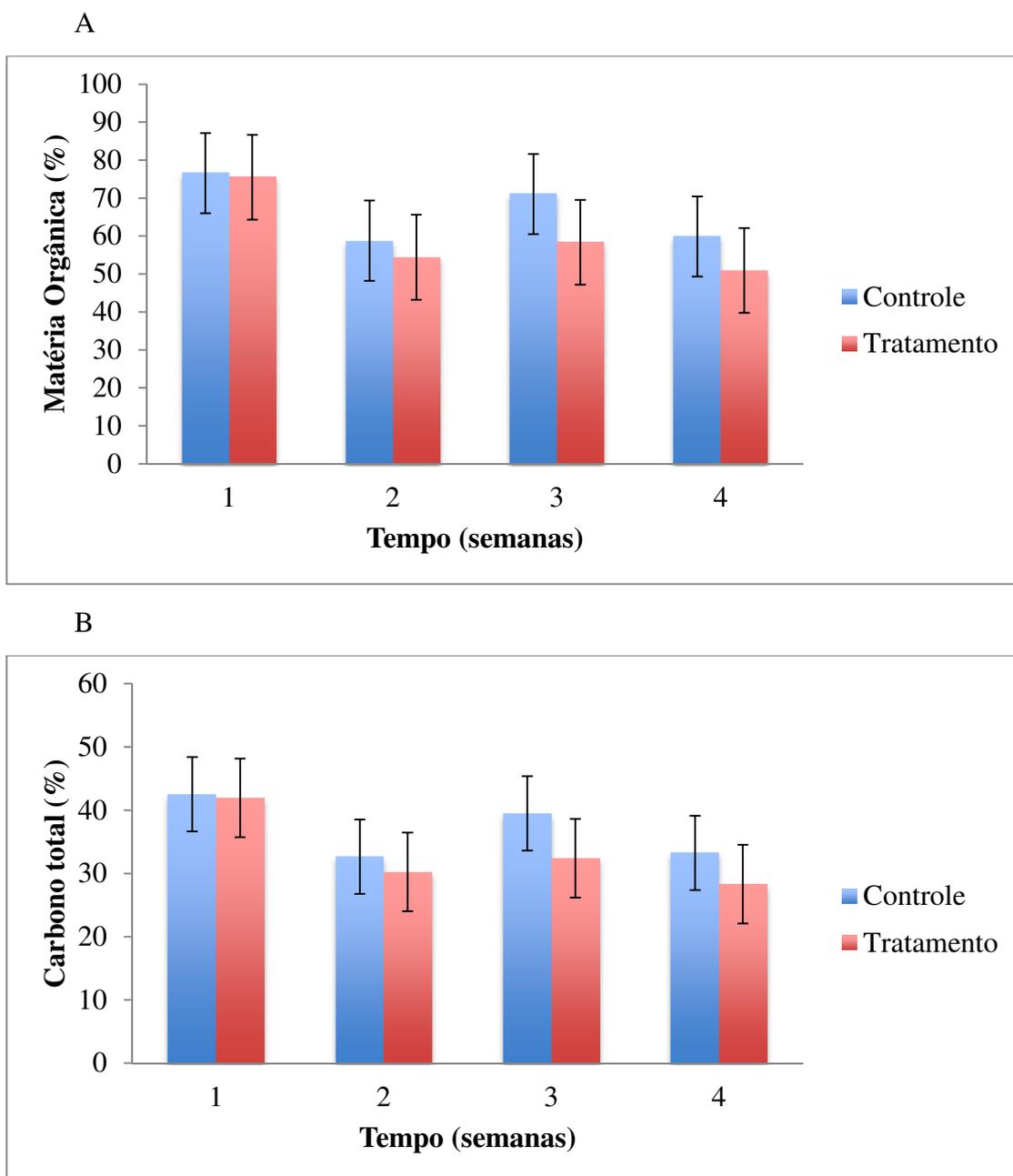


Figura 12. Perfis dos teores de matéria orgânica (A) e carbono total (B) ao longo do período de compostagem em frascos.

Tabela 9. Matéria orgânica remanescente no substrato ao longo da compostagem em frascos.

| Tempo (semanas) | C | T |
|-----------------|-------|-------|
| 1 | 76,5% | 75,5% |
| 2 | 58,7% | 54,4% |
| 3 | 71,0% | 58,3% |
| 4 | 59,8% | 50,9% |

* C:controle; T: tratamento.

5.3.4.3. Influência do inóculo nos teores de Nitrogênio total

Ao longo dos 30 dias de compostagem laboratorial, observou-se um aumento da quantidade de N total tanto para as amostras do tratamento, quanto para as amostras controle. No controle houve um aumento um pouco maior àquele observado para as amostras tratamento, com valor inicial de 0,71% de nitrogênio e final de 1,57% (após 30 dias), um aumento de 220%. As amostras de tratamento, mostraram um aumento de aproximadamente 200%, de um valor inicial de 0,67% de nitrogênio para 1,32% ao final do processo (Figura 13).

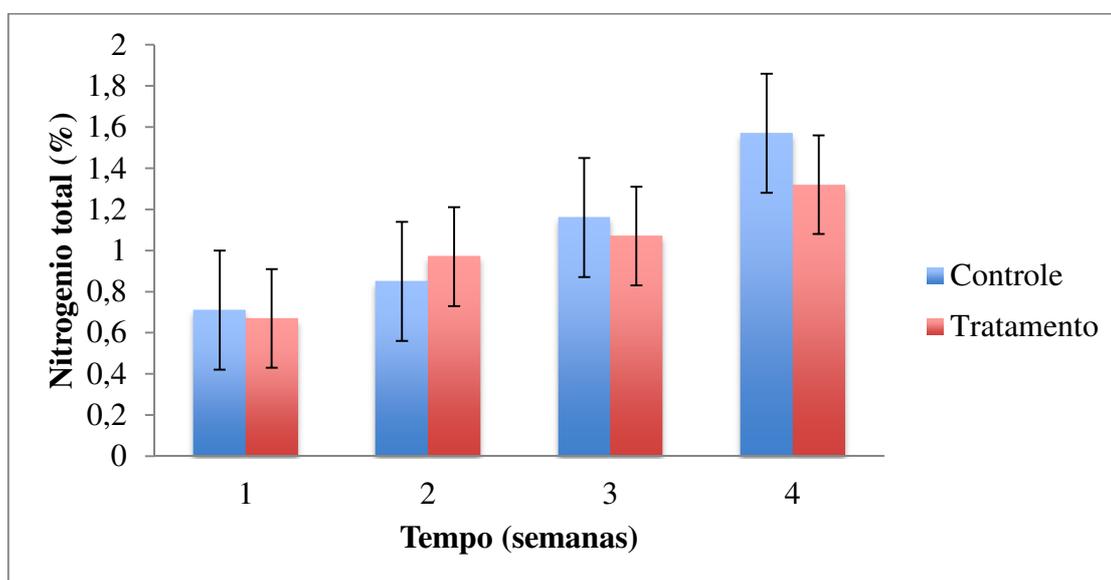


Figura 13. Teores de Nitrogênio ao longo do período de compostagem em frascos.

O aumento da quantidade de nitrogênio amoniacal é descrito como parte integrante do processo de compostagem por alguns autores (KIEHL, 2002; MING *et al.*, 2007) e resulta da transformação do N total (orgânico e inorgânico) em nitrogênio orgânico incorporado a biomassa microbiana. Esse fenômeno é um dos mecanismos importantes da compostagem pois gera material rico em compostos nitrogenados que pode ser usado como adubo orgânico.

5.3.4.4. Influência do inóculo na relação carbono:nitrogênio (C:N)

A relação carbono:nitrogênio (C:N) observada tanto para amostras controle para as amostras do tratamento com inóculo fúngico sofreu redução de aproximadamente 50% ao longo do período de compostagem laboratorial. Inicialmente as amostras apresentaram uma relação de 61:1 (Controle) e 62:1 (Tratamento) chegando ao final do processo com uma relação de aproximadamente 20:1 para ambas (Figura 14).

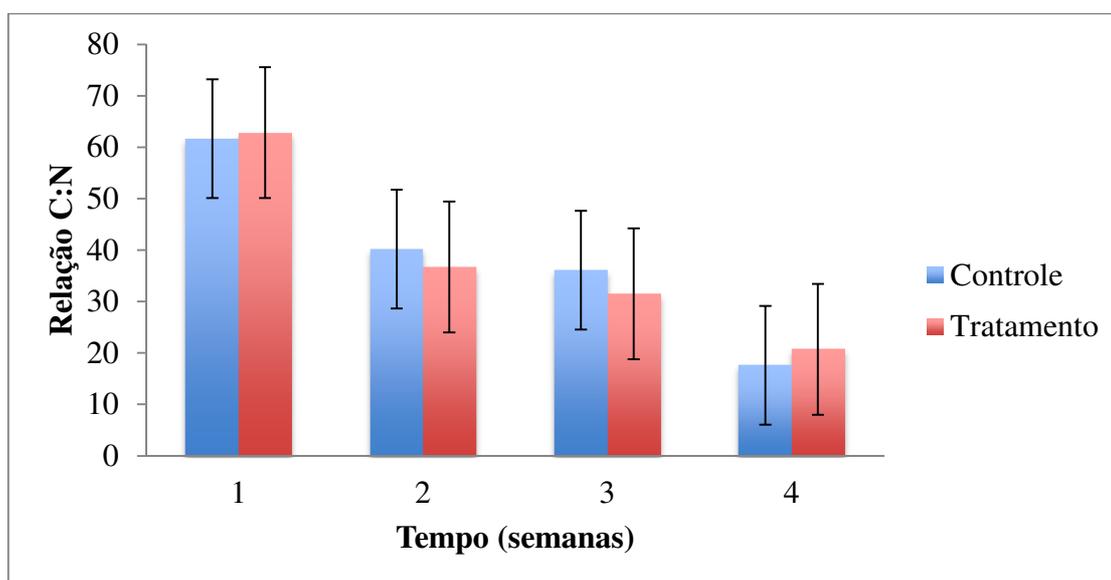


Figura 14. Relação Carbono:Nitrogênio ao longo do processo de compostagem em frascos.

Os valores iniciais para C:N são considerados elevados para o processo de compostagem de acordo com KIEHL (2002) e REIS (2005) que sugerem valores em torno de 30:1.

O declínio da relação C:N é esperado para o processo de compostagem, considerando que, além do C acumulado na biomassa microbiana, parte é perdida como compostos voláteis e CO₂ da respiração (REIS, 2005; KIEHL, 2002).

A relação C:N final dos compostos encontra-se ainda em uma faixa considerada elevada para um composto estabilizado. Kiehl (2002) comenta que a matéria orgânica bioestabilizada é caracterizada, dentre outros parâmetros, exatamente pelo fato de apresentar relação C:N que indica o início do processo de mineralização do nitrogênio e, para o húmus, esse valor está em torno de 10:1 (COSTA, 2005). Ao final do processo espera-se uma relação C:N por volta de 10:1, os valores encontrados para esse trabalho se

encontram superiores àqueles descritos na literatura, porém, devido a alta heterogeneidade do composto e a possível presença de carbono na forma de lignina poderiam explicar a alta concentração do mesmo, porém com disponibilidade reduzida para a sua utilização pelo metabolismo de microrganismos.

5.3.4.5. Avaliação da fitotoxicidade do composto resultante

Em muitas situações, o crescimento microbiano e a degradação da matéria orgânica podem gerar compostos fenólicos, ácidos graxos de cadeia curta pelos fungos e ácido oxálico, acético e patulina pelas bactérias que podem levar a inibição do crescimento das raízes e germinação de sementes (TOKUHISA et al., 2007).

A germinação das sementes apresentaram, na primeira etapa de compostagem, um índice de germinação maior quando receberam o eluído do controle da compostagem do que quando em relação ao tratamento (1,83 : 1,24 – Controle : Tratamento), porém com o decorrer do processo, pode-se observar que o índice de germinação das sementes para o tratamento tornou-se maior quando comparado com o controle (0,94 : 1,79 – Controle : Tratamento), (0,42 : 2,43 – Controle:Tratamento), sendo essa diferença diminuída ao final de 4 semanas, quando as amostras apresentaram índices de germinação relativamente próximos (2,32 : 2,12 – Controle:Tratamento) (Figura 15).

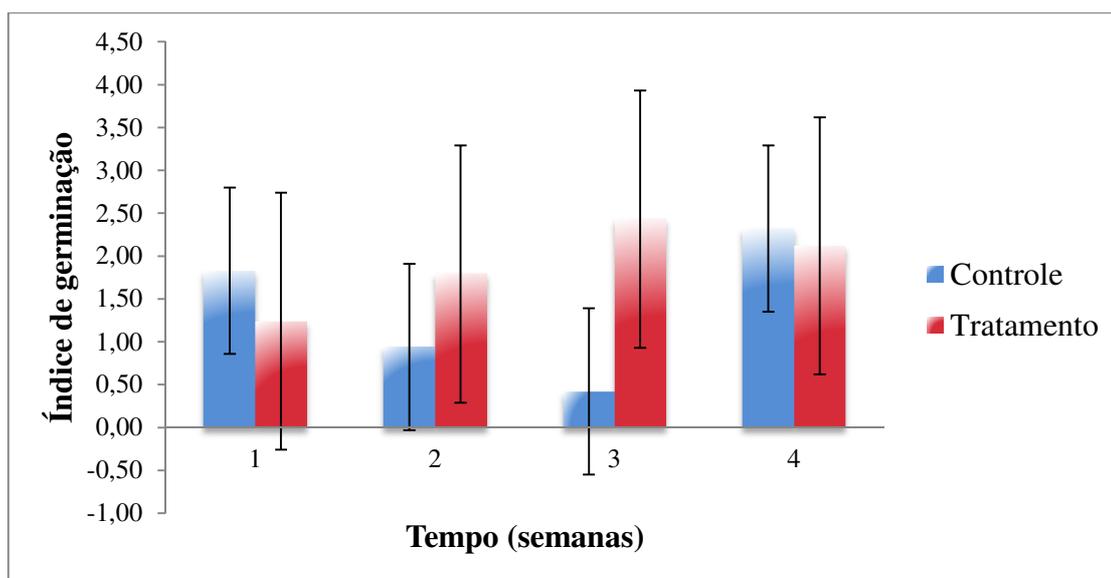


Figura 15. Índice de germinação ao longo do período de compostagem em frascos.

Em trabalho estudando a diferença do tipo de material compostado, Nasreen *et al.* (2005) relataram uma diminuição, ao longo do processo de compostagem, no índice de germinação de material ácido como bagaço de laranja, encontrado em grande quantidade nas pilhas de compostagem da Constroeste Ambiental, havendo um aumento no índice somente ao fim do processo, como observado para as amostras do controle ao longo do período de compostagem laboratorial.

Segundo Nasreen *et al.* (2005) e Zuconni *et al.* (1981) um índice de germinação acima dos 50% indica um composto livre de fitotoxinas e, portanto, apto à utilização em culturas.

O aumento mais rápido no índice germinação para as amostras do tratamento indica que a presença do inóculo fúngico pode favorecer a maturação do composto e a diminuição da toxicidade do mesmo mais rapidamente, especialmente com a adição de mais microrganismos. Uma baixa fitotoxicidade implica no potencial emprego do composto gerado mais rapidamente na agricultura, já que o principal ponto a ser analisado antes de sua utilização é a interação não prejudicial do composto com as culturas onde este será utilizado (MISRA *et al.*, 2003), sendo assim, a diminuição mais acelerada da fitotoxicidade possibilita a distribuição mais rápida do composto e, a diminuição dos gastos com a manutenção dos mesmos nas empresas de gerenciamento de resíduos e emprego de maquinário na manutenção da compostagem.

5.4. ESTUDOS DE COMPOSTAGEM ESCALA LABORATORIAL E EM PILHAS NA PLANTA INDUSTRIAL

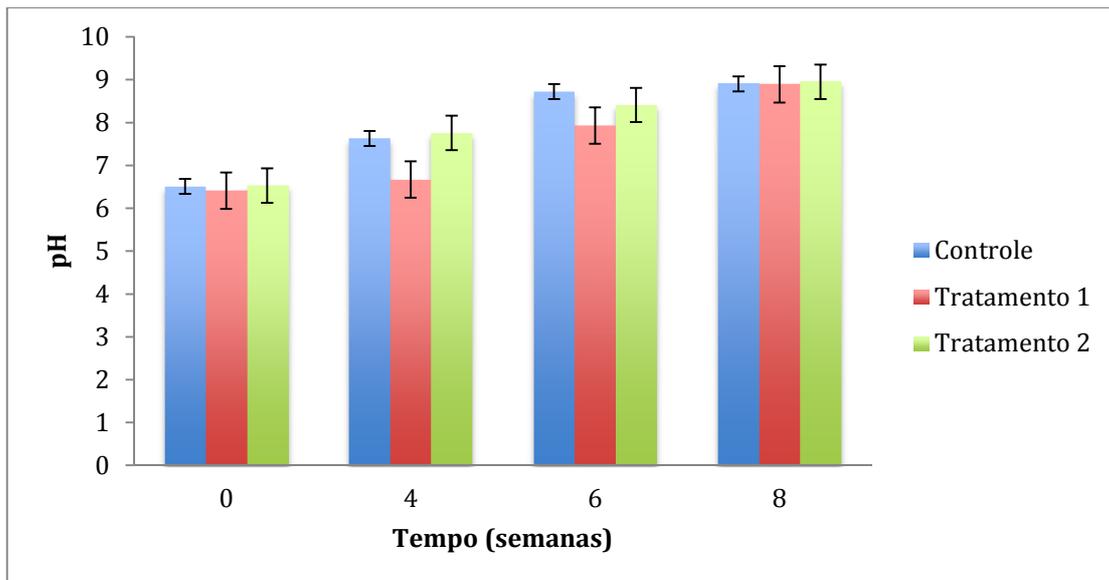
Nesses ensaios foi utilizado lixo orgânico de outra coleta e, portanto, a composição não foi a mesma daquela dos ensaios em pequena escala cujos resultados foram descritos e discutidos até aqui. Nesses próximos ensaios que serão descritos foram feitos dois tipos de tratamento: T1- misturas de esporos inoculadas após a primeira semana de compostagem; T2- esporos de fungos mesofílico/ termotolerantes inoculados após a primeira semana e os termofílicos, após a segunda semana.

5.4.1. VARIAÇÕES DO PH

Nesse experimento, o material apresentou maior acidez que aquele usado nos primeiros ensaios, iniciando em 6,3. Durante a compostagem em escala laboratorial, foi possível visualizar uma curva ascendente do pH, para todas as amostras, elevando-se até valores próximos a 8,5-9,0 seguindo o padrão descrito para o processo de compostagem, com elevação do pH e estabilização em valores neutros ou levemente alcalinos, como citado por Kiehl (2002) (Figura 16A). A curva do tratamento 2 se manteve muito próxima a curva controle, enquanto que a do tratamento 1, mostrou uma elevação mais lenta do pH, indicando também um consumo mais lento dos ácidos orgânicos presentes na matéria orgânica (Figura 16).

Durante a compostagem em escala industrial, o mesmo padrão foi observado. As leiras controle e tratamento 2 demonstraram um perfil de variação do pH muito próximos, enquanto a leira tratamento 1 apresentou uma variação mais lenta dos valores de pH (Figura 16B).

A



B

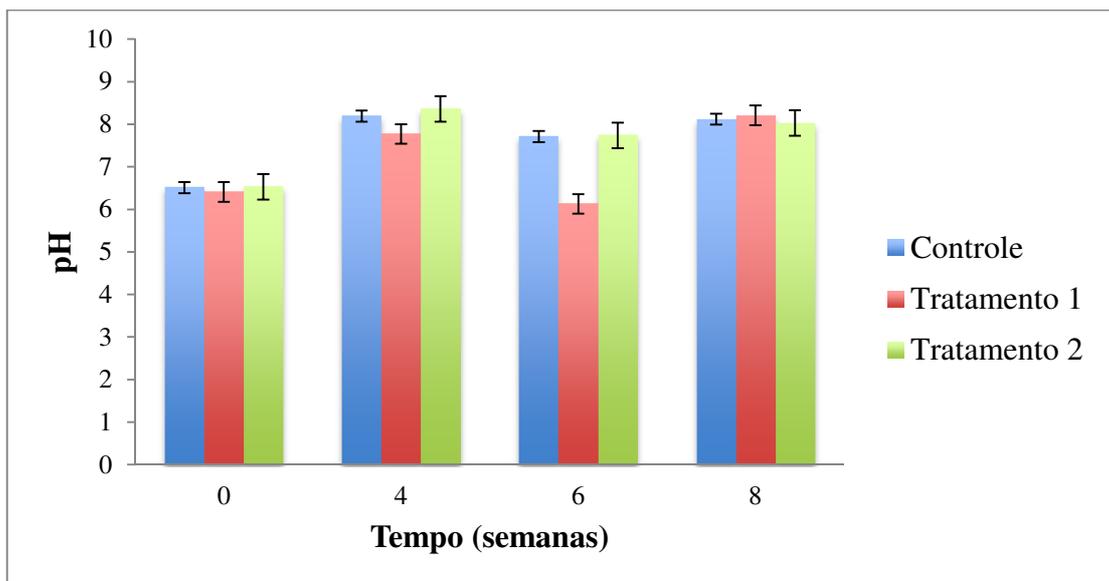


Figura 16. Valores de pH da suspensão do material de compostagem ao longo do processo em escala laboratorial (A) e em pilhas (B).

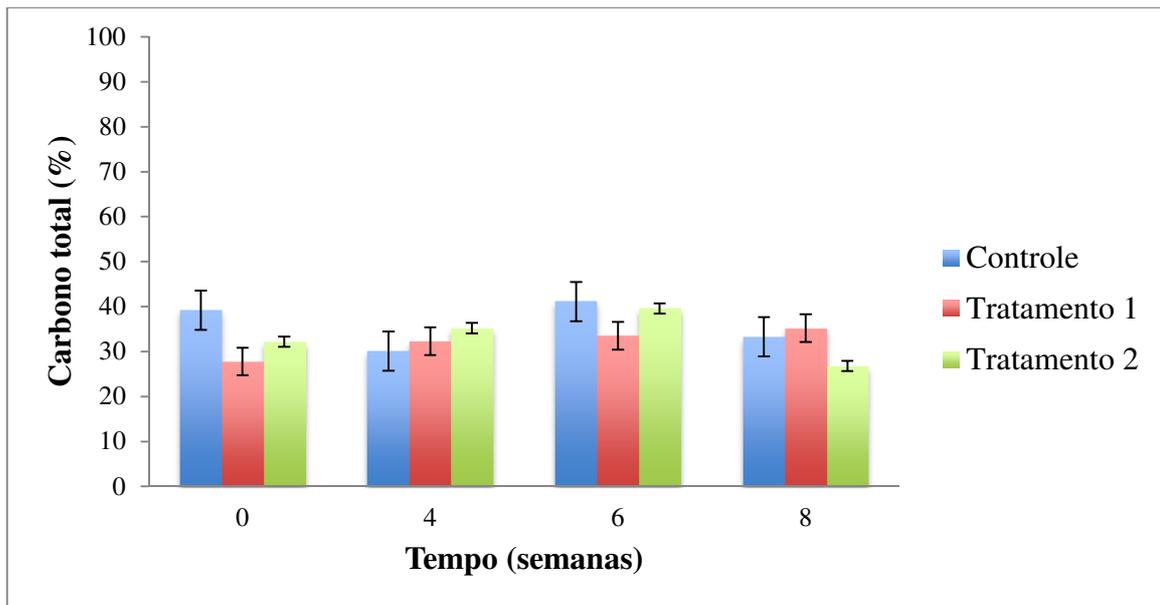
5.4.2. MATÉRIA ORGÂNICA E CARBONO TOTAL

Ao longo da compostagem laboratorial, pôde-se ver uma variação pequena e irregular do teor de carbono. Com aparente redução da quantidade de Carbono para as amostras controle e tratamento 2, enquanto que para a amostra de tratamento 1 houve aumento na quantidade de carbono (Figura 17).

O aparente aumento na quantidade de matéria orgânica pode ser devido a dificuldade em amostragem da matéria orgânica aplicada ao processo, que apresentava grande heterogeneidade.

Diferentemente do observado anteriormente na compostagem em pequenos frasco, o inóculo fúngico aparentou não influenciar na decomposição da matéria orgânica em escala laboratorial e industrial, porém pela alta heterogeneidade das amostras, a não alteração das quantidades de carbono pode ser interpretada como variação devida principalmente a amostragem.

A



B

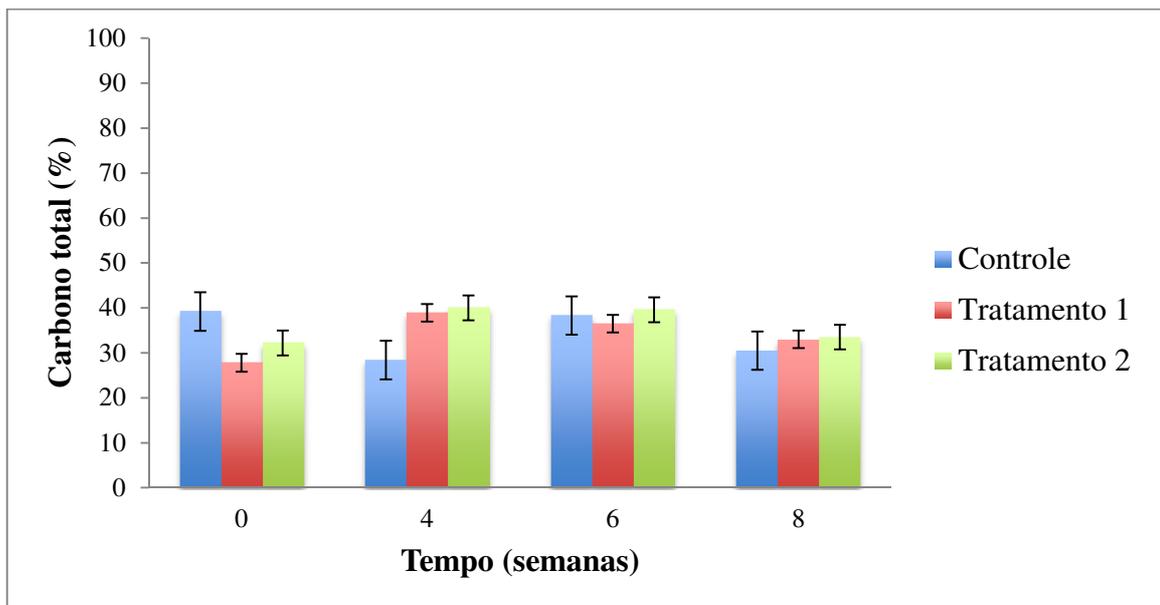


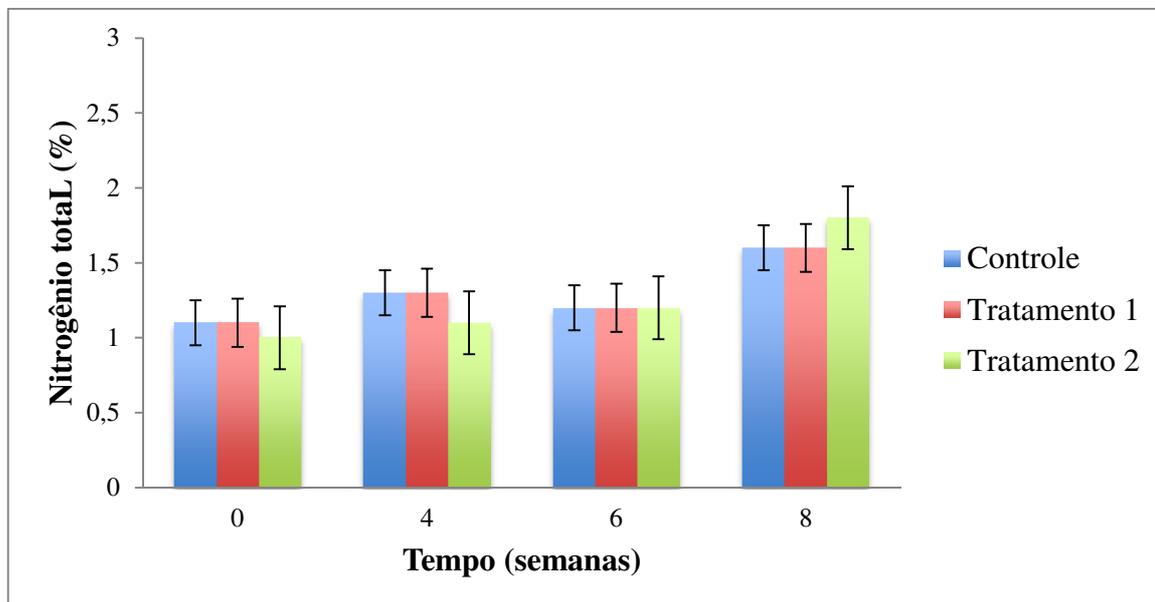
Figura 17. Teores de carbono total ao longo da compostagem laboratorial (A) e em pilhas (B).

5.4.3. NITROGÊNIO TOTAL

Os níveis de nitrogênio apresentados ao longo da compostagem em escala laboratorial não diferiram com as do controle e demonstraram um perfil de queda durante as primeiras 3 coletas, com um posterior aumento (Figura 18).

A quantidade de nitrogênio nas amostras da escala industrial mostrou perfil diferente, com decaimento constante após a quarta semana, evidenciando o consumo do nitrogênio disponível nas leiras.

A



B

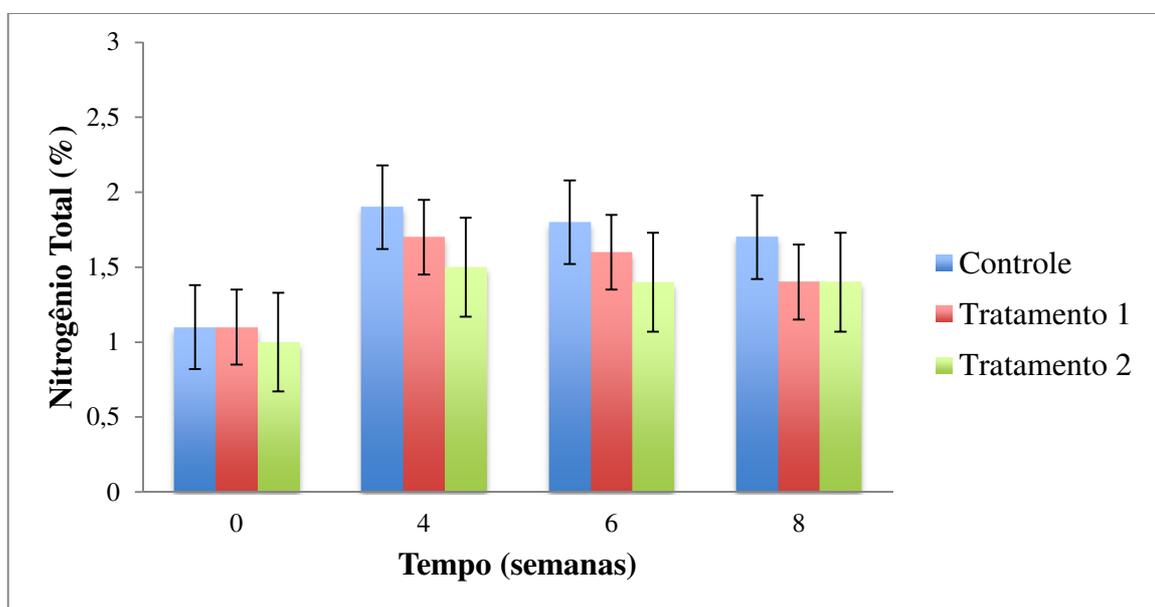


Figura 18. Teores de Nitrogênio para as amostras de compostagem em escala laboratorial (A) e industrial (B).

O consumo de nitrogênio aparece como fator recorrente do processo de compostagem. Segundo Kiehl (2002), a quantidade total de nitrogênio ao longo do processo

de compostagem tende a diminuir devido ao consumo deste composto por grupos de microrganismos durante seu desenvolvimento e metabolismo.

5.4.4. RELAÇÃO CARBONO:NITROGÊNIO (C:N)

Segundo Kiehl (2002) a relação Carbono/Nitrogênio inicial considerada ótima para o processo de compostagem está em torno de 25 a 30 partes de carbono para 1 de nitrogênio devido a utilização diferencial destes compostos pelos micro-organismos, é aceitável para alguns pesquisadores ainda valores próximos à 20:1 (RUSSO, 2003). No início do processo de compostagem em escala laboratorial, foi verificada uma relação próxima aos 35:1 para as amostras controle e de 25:1 e 32:1 para as amostras do tratamento 1 e 2 respectivamente. Sendo assim, os valores encontrados inicialmente no processo podem ser considerados inadequados para a condução do processo, o que pode ter prejudicado o desenvolvimento de uma compostagem plena para o material de estudo.

Ao fim do processo em escala laboratorial, a relação C:N atingiu valores de 20:1 para a amostra controle, 22 para o tratamento 1 e 15 para o tratamento 2. A relação tida como ótima para o fim do processo está próxima aos 10:1, próxima àquela vista para o tratamento 2, porém como não houve redução na quantidade de carbono ao longo da compostagem, esta relação está associada ao aumento da quantidade de nitrogênio, o que ressalta a necessidade de que o processo de compostagem seja monitorado mais eficientemente devido a alta heterogeneidade da matéria orgânica utilizada.

Para o início do processo de compostagem em escala industrial foram observadas relações de Carbono:Nitrogênio próximas a 35:1 para as amostras controle, 25:1 para a pilha tratamento 1 e 32:1 para a leira tratamento 2. Com excessão da pilha tratamento 1, as outras pilhas se apresentaram próximas à faixa tida como ótima para o início do processo.

Ao longo do processo observou-se uma redução acentuada na relação C:N, devida a pequena redução da quantidade de carbono e nitrogênio das leiras. A relação apresentada pela leira controle foi de 18:1, enquanto que para as leiras de tratamento foram de 23:1 e 24:1 respectivamente. A diminuição da relação C:N observada para as pilhas controle está associado a alteração da quantidade nitrogênio, sem que houvesse uma redução na quantidade de carbono, que pode ter sido ocasionada por dificuldade de amostragem do material que se apresenta de forma heterogênia. A baixa variação na quantidade de carbono apresentada, mesmo com a alta presença do composto no início do processo pode estar

associada a disponibilidade do mesmo, já que quando presente na forma de compostos mais resistentes como a lignina, este se torna indisponível à utilização para o metabolismo de microrganismos.

5.4.5. TESTE DE FITOTOXICIDADE

Os testes de fitotoxicidade para o processo de compostagem em escala laboratorial indicaram não haver diferenças entre as amostras que sofreram a ação do inóculo fúngico da amostra controle (Figura 19).

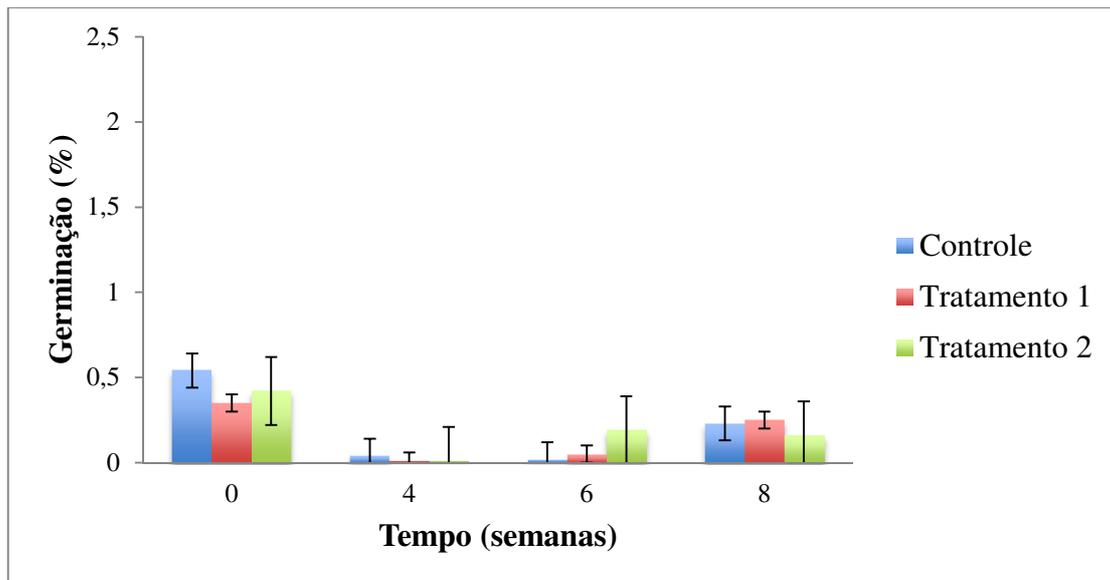
A toxicidade do composto se manteve praticamente constante ao longo do processo, o que, segundo a literatura pode ser devido a liberação de ácidos orgânicos durante a decomposição da matéria orgânica, porém esta justificativa não se apresenta como justificativa satisfatória, já que o perfil traçado para o pH dos tratamentos e controle, sugere um aumento gradativo do mesmo, se estabilizando próximo a 9.

A característica altamente heterogênea da matéria orgânica utilizada para os testes sugere que, devido à difícil triagem de materiais, resíduos com características tóxicas aos organismos teste deste ensaio possam ter sido trazidos para o laboratório juntamente às amostras.

Diferentemente do observado para o teste de fitotoxicidade conduzido em laboratório, o teste realizado no pátio da usina de compostagem em pilhas de compostagem se mostrou promissor.

Ao longo do processo, a pilha de tratamento 1 mostrou um aumento acentuado em relação às pilhas de tratamento 2 e controle, apresentando, ao final da compostagem, um índice de germinação aproximadamente 3 vezes maior do que àquele da pilha controle (Figura 19), o que pode sugerir, que o inóculo de microrganismos ao início do processo atuou de forma positiva na diminuição da fitotoxicidade, disponibilizando a utilização do composto orgânico mais rapidamente, já que um dos grandes problemas enfrentados na utilização do adubo não maturado é o seu efeito fitotóxico.

A



B

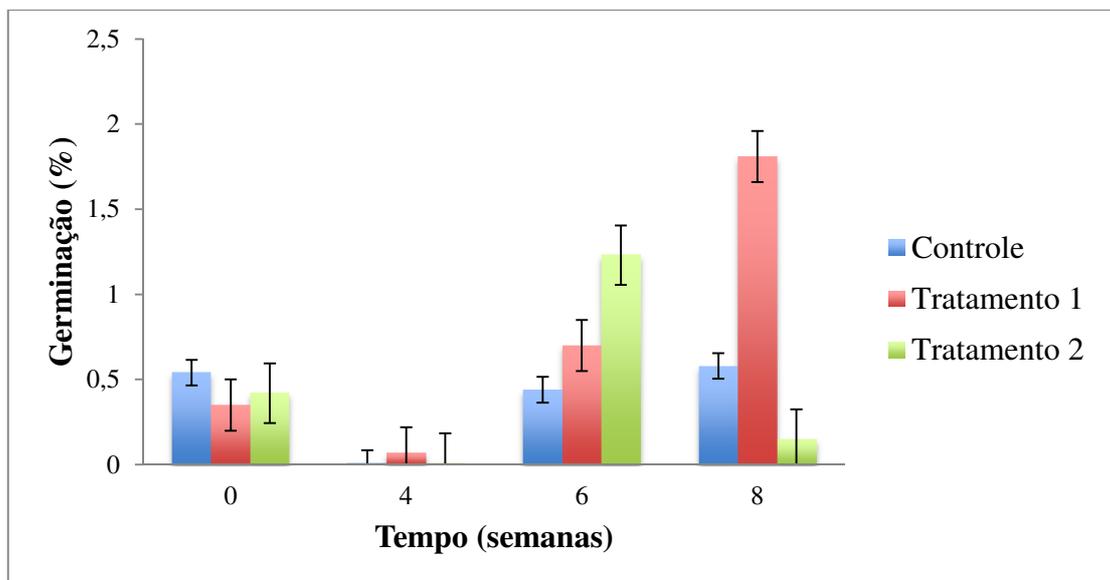


Figura 19. Índice de germinação (%) das sementes após a aplicação do eluído da compostagem proveniente da escala laboratorial (A) e em pilhas (B).

Os dados obtidos no processo de compostagem, tanto em escala laboratorial quanto na planta industrial, não foram conclusivos com relação a importância da inoculação dos fungos. Em ambos os sistemas, o uso de inóculo único manteve a acidez do material por período maior, mas não diferiu do tratamento com inóculo em duas etapas com relação a decomposição da matéria orgânica e acúmulo de N no material.

5.4.6. Análise CG/EM

Em tentativa a fim de se identificar os possíveis compostos responsáveis pela inibição da germinação durante os testes fitotóxicos, foram realizados experimentos utilizando-se um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de massas (CG/EM), porém, em todas as tentativas com os extratos que se comportaram de forma mais inibitória durante os ensaios, nenhum composto foi detectado. A ausência de detecção por parte do CG/EM pode estar relacionada ao tipo de metodologia escolhida para tratamento das amostras, ou pela própria identidade química dos compostos, sendo que moléculas de alto peso molecular ou pertencentes à certas funções orgânicas podem acabar não sendo volatilizadas ou, quando volatilizadas, não conseguem atingir o detector e, dessa forma não são reconhecidas pelo equipamento. Portanto a utilização da técnica de cromatografia gasosa não se mostrou eficiente na determinação dos compostos presentes nas amostras analisadas.

6. CONCLUSÕES

O inóculo fúngico parece ter pouca influência na degradação mais rápida da matéria orgânica, já que os tratamentos apresentaram um perfil muito próximo àquele do controle, porém a diminuição mais eficiente da toxicidade para as amostras do tratamento 1 em pilhas de compostagem e durante o teste piloto na compostagem laboratorial sugere que o inóculo fúngico, quando realizado de forma única ao início do processo, pode favorecer uma disponibilidade do composto orgânico para sua aplicação na lavoura mais rapidamente, diminuindo os gastos com sua produção e facilitando a aceitação da técnica.

Apesar dos testes demonstrarem uma não alteração dos perfis de degradação da matéria orgânica, a heterogeneidade da mesma e a falta de controle total sobre o processo, dificultaram um melhor entendimento da ação dos microrganismos durante os testes, portanto novos estudos devem ser realizados a fim de se entender melhor a atuação dos fungos filamentosos sobre a matéria orgânica no processo de compostagem.

Não somente os fungos filamentosos termofílicos são responsáveis pela degradação da matéria orgânica ao longo do processo de compostagem, mas também os actinomicetos

e bactérias, sendo assim, estudos utilizando os diferentes microrganismos devem ser realizados a fim de se entender melhor a contribuição de cada um dos grupos envolvidos no processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUELWafa, R. et al. Aerobic biodegradation of sludge from the effluent of a vegetable oil processing plant mixed with household waste: Physical–chemical, microbiological, and spectroscopic analysis. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 18, p. 8571-8577, 2008. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408003179>
http://ac.els-cdn.com/S0960852408003179/1-s2.0-S0960852408003179-main.pdf?_tid=273b816b0a4fc4b38881eb50346c1859&acdnat=1344276669_e93f793cde78300354586b3da65831d4 >.
- ABRELPE. Panorama dos resíduos sólidos no Brasil. p. 186, 2011.
- ANDREOLI, C. V. Resíduos sólidos do Saneamento: Processamento, Reciclagem e Disposição final. p. 273, 2001.
- BAHERI, H.; MEYSAMI, P. Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 89, n. 2–3, p. 279-286, 2002. ISSN 0304-3894. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389401003181>
http://ac.els-cdn.com/S0304389401003181/1-s2.0-S0304389401003181-main.pdf?_tid=cb69c6d167a750c9a32a9b0fed640f12&acdnat=1344520848_f9a4999f01cc04824e0841a52e07cb06 >.
- BARREIRA, L. P.; JUNIOR, A. P.; RODRIGUES, M. S. Usinas de compostagem do Estado de São Paulo: Qualidade dos compostos e processos de produção. *Eng. Sanit. Ambient.*, v. 11, n. 4, p. 9, 2006.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*. v. 128, p. 81-88, 1995.
- CASTALDI, P. et al. Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Management*, v. 25, n. 2, p. 209-213, 2005. ISSN 0956-053X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X05000152>
http://ac.els-cdn.com/S0956053X05000152/1-s2.0-S0956053X05000152-main.pdf?_tid=1158a9103abe6cd5a30d999018947929&acdnat=1344516680_457ac963049e5adb0e271a7390132a50 >.
- COLÓN, J. et al. Environmental assessment of home composting. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 54, n. 11, p. 893-904, 2010. ISSN 0921-3449. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344910000261>
http://ac.els-cdn.com/S0921344910000261/1-s2.0-S0921344910000261-main.pdf?_tid=76598ad37307f63a40d281025f3036b4&acdnat=1344528716_6d86ca6ac335b8d4372086147d1d052d >.

COSTA, M. S. S. M.; COSTA, L. A. M.; SESTAK, M.; OLIBONE, D.; SESTAK, D.; KAUFMANN, A. V.; ROTTA, S. R. Compostagem de resíduos sólidos da indústria de desfibrilação de algodão. Eng. Agric., v.25, n. 2, p. 540-548, 2005.

DIAS, S. M. F.; CARVALHO, M. C. Fungos em pilhas de compostagem aeróbica. 20º Congresso Brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, p. 9, 1999.

DOMINGO, J. L.; NADAL, M. Domestic waste composting facilities: A review of human health risks. Environment International, v. 35, n. 2, p. 382-389, 2009. ISSN 0160-4120. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412008001189>
http://ac.els-cdn.com/S0160412008001189/1-s2.0-S0160412008001189-main.pdf?_tid=86d6ba015c94acd156be9a2b3a7d8db&acdnat=1344972561_9342dca740d59ddec05e6205c9cf300b>.

FAURE, D.; DESCHAMPS, A. M. The effect of bacterial inoculation on the initiation of composting of grape pulps. Bioresource Technology, v. 37, n. 3, p. 235-238, 1991. ISSN 0960-8524. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096085249190189Q>
http://ac.els-cdn.com/096085249190189Q/1-s2.0-096085249190189Q-main.pdf?_tid=79dcf3ae52d130f717422faf084cd59b&acdnat=1344520832_bfedb4bc36b36e93b552ce91167b5fd2>.

GAUR, A. C. et al. Rôle of mesophilic fungi in composting. Agricultural Wastes, v. 4, n. 6, p. 453-460, 1982. ISSN 0141-4607. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141460782900403>
http://ac.els-cdn.com/0141460782900403/1-s2.0-0141460782900403-main.pdf?_tid=fb6812950b4f636d573c7078d97c636a&acdnat=1344520839_d2ee0513d56b672e61eda5efebc67f8c>.

GOMES, A. P. D. Fundamentos da compostagem de resíduos sólidos. 333 p., 2001.

HASSEN, A. et al. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. Bioresource Technology, v. 80, n. 3, p. 217-225, 2001. ISSN 0960-8524. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401000657>
http://ac.els-cdn.com/S0960852401000657/1-s2.0-S0960852401000657-main.pdf?_tid=5f0c92cd30efc2007a039d8ba14250b1&acdnat=1344515330_483725e254da8f30431dca05b9e114fb>.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews, v. 13, n. 2-3, p. 125-135, 1994. ISSN 0168-6445. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168644594900760>>.

ICHIDA, J. M. et al. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. Journal of Microbiological Methods, v. 47, n. 2, p. 199-208, 2001. ISSN 0167-7012. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701201003025>>.

http://ac.els-cdn.com/S0167701201003025/1-s2.0-S0167701201003025-main.pdf?_tid=e36d5209b28e52805ab091c6ca4f1933&acdnat=1344520783_29cec423a88f0627702883cd63d3d396 >.

ISHII, K.; FUKUI, M.; TAKII, S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, p. 10, 2000.

KIEHL, E. J. Manual de compostagem: Maturação e qualidade do composto. 3. Piracicaba: 2002. 146

LEI, F.; VANDERGHEYNST, J. S. The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 9, p. 923-929, 2000. ISSN 1359-5113. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959299001557>
http://ac.els-cdn.com/S0032959299001557/1-s2.0-S0032959299001557-main.pdf?_tid=fa6ffefb54bda0e50322d8ab49483fda&acdnat=1344520778_e9601df3f2f70a6524b3b75e91f3c1da >.

MAKALY BIEY, E.; MORTIER, H.; VERSTRAETE, W. Nitrogen transfer from grey municipal solid waste to high quality compost. *Bioresource Technology*, v. 73, n. 1, p. 47-52, 2000. ISSN 0960-8524. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001364>
http://ac.els-cdn.com/S0960852499001364/1-s2.0-S0960852499001364-main.pdf?_tid=9488a8e46403417366dd5ac8ed549e2f&acdnat=1344520797_2eb0895bc52b9b7acc5fe8c946d88151 >.

MANDELS, M. & STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. *J Ferment. Technol.* vol. 54, p. 267-386, 1976.

MARTIN, N. Isolamento de Linhagens Fúngicas Termofílicas Produtoras de Pectinases Termoestáveis: Produção, Caracterização e Purificação Parcial da Poligalacturonase., p. 77, 2006.

MING, L.; XUYA, P.; YOUCAI, Z.; WNCHUAN, D.; HUASHUAI, C.; GUOTAO, L.; ZHENGSONG, W. Microbial inoculum with leachate recirculated cultivation for the enhancement of OFMSW composting. *Journal of Hazardous Materials*, v. 153, p. 885-891, 2008.

MISRA, R. V.; ROY, R. N.; HIRAOKA, K. On-farm composting methods. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 51p., 2003.

NAKASAKI, K.; AKIYAMA, T. Effects of seeding on thermophilic composting of household organic waste. *Journal of Fermentation Technology*, v. 66, n. 1, p. 37-42, 1988. ISSN 0385-6380. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0385638088901276>
http://ac.els-cdn.com/0385638088901276/1-s2.0-0385638088901276-main.pdf?_tid=9b058187c69cc0df652018ed94fe42be&acdnat=1345038169_cf7414075809891b496478fbc5c71601 >.

NARIHIRO, T., ABE, T., YAMANAKA, Y., HIRAISHI A. Microbial population dynamics during fed-batch operation of commercially available garbage composters. *Environmental Biotechnology*, v. 65, p. 8, 2004.

NASCIMENTO FILHO, I.; MÜHLEN, C.; CARAMÃO, E. B. Estudo de compostos orgânicos em lixiviado de aterros sanitários por EFS e CG/EM. *Quim. Nova*, v. 24, p. 554-556, 2001.

NASREEN, Z. & QAZI, J. I. Lab scale composting of fruits and vegetable waste at elevated temperature and forced aeration. *Pakistan J. Zool.*, v. 44, n. 5, p. 1285-1290, 2012.

OLIVEIRA, M. F. D. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. p. 140, 2003.

REBOLLIDO, R., MARTÍNEZ, J., AGUILERA, Y., MELCHOR, K., KOERNER, I., STEGMANN R. . Microbial populations during composting process of organic fraction of municipal solid waste. *Applied Ecology and Environmental Research*, v. 6, n. 3, p. 7, 2008.

REIS, M. F. P. Avaliação do processo de compostagem de resíduos sólidos urbanos. 239 p., 2005.

RUSHTON, L. Health hazards and waste management. *British Medical Bulletin*, v. 68, n. 1, p. 183-197, 2003. Disponível em: <
<http://bmb.oxfordjournals.org/content/68/1/183.abstract>
<http://bmb.oxfordjournals.org/content/68/1/183.full.pdf> >.

RUSSO, M. A. T. Tratamento de resíduos sólidos. 2005. Disponível em:
<http://www.uc.pt/mhidro/Tratamentos_ResíduosSólidos.pdf>

SCHLOSS, P. D. et al. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 46, n. 1, p. 1-9, 2003. ISSN 0168-6496. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168649603001533>
[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1016/S0168-6496\(03\)00153-3/asset/S0168-6496\(03\)00153-3.pdf?v=1&t=h5nwukea&s=b63e0280b60ede344dfd40b946f25c605076f217](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1016/S0168-6496(03)00153-3/asset/S0168-6496(03)00153-3.pdf?v=1&t=h5nwukea&s=b63e0280b60ede344dfd40b946f25c605076f217) >.

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*, v. 40, p. 11, 2009.

SINGH, R. P. et al. Management of urban solid waste: Vermicomposting a sustainable option. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 55, n. 7, p. 719-729, 2011. ISSN 0921-3449. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344911000371>

http://ac.els-cdn.com/S0921344911000371/1-s2.0-S0921344911000371-main.pdf?_tid=cc9bebaac2ac0db7094efb6773787359&acdnat=1344520765_29c312da704483dad284ac77c717ae52 >.

STROM, P. F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 50, n. 4, p. 7, 1985.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of bacterial inoculum and moisture adjustment on composting of pig manure. *Environmental Pollution*, v. 96, n. 2, p. 161-171, 1997. ISSN 0269-7491. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749197000298>
http://ac.els-cdn.com/S0269749197000298/1-s2.0-S0269749197000298-main.pdf?_tid=5184febfe30685c13f71d72a6324a52f&acdnat=1344520770_5d02342d5714458db8b514fb6bc9e2e6 >.

TOKUHISA;D.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M.; HILST P.C.; DEMUNER, A.J. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya*). *Rev. bras. sementes* vol.29 no.3, 2007

TRELLO BEFFA, M. B., LAURENT MARILLEY, JOHANNA LOTT FISCHER, PIERRE-FRANÇOIS LYON, MICHEL ARAGNO. Taxonomic and metabolic microgial diversity during composting. In: (Ed.). *The Science of Composting*. Glasgow, Scotland: Blackies Academic and Professional, v.1, 1995. p.149-161.

WEI, Z. et al. Effect of inoculating microbes in municipal solid waste composting on characteristics of humic acid. *Chemosphere*, v. 68, n. 2, p. 368-374, 2007. ISSN 0045-6535. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565350601784X>
http://ac.els-cdn.com/S004565350601784X/1-s2.0-S004565350601784X-main.pdf?_tid=6af26c6cdcc7cff49407b0597f8abada&acdnat=1344516594_bcc09f7b9457d8a223b7321f368c4968 >.

XI, B.; ZHANG, G.; LIU, H. Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste. *Journal of Hazardous Materials*, v. 124, n. 1-3, p. 165-172, 2005. ISSN 0304-3894. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389405002050>
http://ac.els-cdn.com/S0304389405002050/1-s2.0-S0304389405002050-main.pdf?_tid=fd0f793de3f3ca767a219286cb75434a&acdnat=1344516663_e869ac89b4aa5bd0366d0c022973c3d1 >.

XIAO, Y. et al. Continuous thermophilic composting (CTC) for rapid biodegradation and maturation of organic municipal solid waste. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 20, p. 4807-4813, 2009. ISSN 0960-8524. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409005306>
http://ac.els-cdn.com/S0960852409005306/1-s2.0-S0960852409005306-main.pdf?_tid=30935b7b50d8b8768c918dea274108c8&acdnat=1344516605_a746f0b68b582c1b690ecdd261d76817 >.

ZUCCONI, F.; FORTE, M.; MONAC, A.; BERITODI, M. Biological evaluation of

compost maturity. *Biocycle*, v. 22, p. 27-29, 1981.

8. ANEXOS

Tabela 1. Resultados da identificação molecular e filogenética

| Código do isolado | Identificação estabelecida no estudo | Identificação Morfológica | Resultado do sequenciamento | | | |
|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------|---|-------------|
| | | | Região ¹ | Id (%) ² | Bases de dados ³ | Observações |
| GF 1.1 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia corimbifera</i> | ITS | 99 | <i>Lichtheimia ramosa</i> CBS 582.65 (NR_111438) | |
| GF 1.2 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia corimbifera</i> | ITS | 100 | <i>Lichtheimia ramosa</i> CBS 582.65 (NR_111438) | |
| GF 1.4 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 6113 (KJ527260) | |
| GF 2.1 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia corimbifera</i> | ITS | 100 | <i>Lichtheimia ramosa</i> KACC 46054 (JN315007) | |
| GF 2.2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 5109 (EF669845) | |
| GF 2.3 | <i>Paecilomyces</i> sp. | <i>Paecilomyces</i> sp. | TUB | - | - | Banda dupla |
| GF 2.4 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sp. | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> CBS 315.60 (DQ534077) | |
| GF 2.6 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> CBS 315.60 (DQ534077) | |
| GF 2.10 | <i>Rizhomucor miehei</i> | <i>Rizhomucor miehei</i> | ITS | 99 | <i>Rizhomucor miehei</i> CBS 182.67 (DQ118995) | |
| GF 2.11 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 99 | <i>Aspergillus fumigatus</i> KCCM60331 (HQ285593) | |
| GF 2.12 | <i>Rizhomucor pusillus</i> | <i>Rizhomucor</i> sp. | ITS | 99 | <i>Rizhomucor pusillus</i> KCCM60428 (HQ285622) | |
| GF 2.14 | <i>Aspergillus nidulans</i> | <i>Aspergillus</i> sp. | TUB | 100 | <i>Emericella nidulans</i> CBS 589.65 (AB524358) | |
| | | | | 99 | <i>Emericella quadrilineata</i> NRRL 201 (EF652257) | |
| GF 3.1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> CBS 315.60 (DQ534077) | |
| GF 3.2 | <i>Rizhomucor pusillus</i> | <i>Rizhomucor miehei</i> | ITS | 99 | <i>Rizhomucor pusillus</i> KCCM60428 (HQ285622) | |
| GF 3.3 | <i>Rizhomucor pusillus</i> | <i>Rizhomucor miehei</i> | ITS | 99 | <i>Rizhomucor pusillus</i> KCCM60428 (HQ285622) | |
| GF 4.1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 99 | <i>Aspergillus fumigatus</i> KCCM60331 (HQ285593) | |
| GF 4.2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 99 | <i>Aspergillus fumigatus</i> KCCM60331 (HQ285593) | |
| GF 4.3 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> CBS 315.60 (DQ534077) | |
| GF 4.4 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 99 | <i>Aspergillus fumigatus</i> KCCM60331 (HQ285593) | |
| GF 4.5 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> CBS 315.60 (DQ534077) | |
| GF 4.6 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> CBS 315.60 (DQ534077) | |

| | | | | | | |
|--------|------------------------------|-----------------------------------|-----|-----|--|-------------|
| GF 4.7 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 99 | <i>Aspergillus fumigatus</i> KCCM60331 (HQ285593) | |
| GF 5.1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 99 | <i>Aspergillus fumigatus</i> KCCM60331 (HQ285593) | |
| GF 5.2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> CBS 315.60 (DQ534077) | |
| GF 5.5 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 99 | <i>Aspergillus fumigatus</i> KCCM60331 (HQ285593) | |
| GF 5.6 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> CBS 315.60 (DQ534077) | |
| GF 5.7 | <i>Lichtheimia ramosa</i> | <i>Lichtheimia</i> sp. | ITS | 99 | <i>Lichtheimia ramosa</i> CBS 582.65 (NR_111438) | |
| GF 5.8 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> sect. Fumigati | TUB | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 6113 (KJ527260) | |
| GF 5.9 | <i>Paecilomyces</i> sp. | <i>Paecilomyces</i> sp. | TUB | - | - | Banda dupla |

¹ Região do genoma utilizada no presente trabalho: ITS: *internal transcribed spacer*; TUB: beta tubulina.

² Identidade (em %) da sequência com relação à sequência depositada na base de dados do NCBI – GenBank.

³ Resultado das buscas na base de dados do NCBI – GenBank. Nome do fungo seguido do código do isolado e do número de acesso da sequência na base de dados (em parênteses).

