



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA CIVIL - UAEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL-
PPGECA**

MÁRBARA VILAR DE ARAUJO ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EM
UM BIORREATOR DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS**

**CAMPINA GRANDE-PB
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EM UM
BIORREATOR DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS**

MÁRBARA VILAR DE ARAUJO ALMEIDA

Dissertação apresentada ao programa de Pós -
Graduação em Engenharia Civil e Ambiental
da Universidade Federal de Campina Grande,
em cumprimento as exigências para obtenção
do título de mestre em Engenharia Civil e
Ambiental.

Área de concentração: Engenharia de Recursos
Hídricos e Sanitária

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Veruschka Escarião
Dessoles Monteiro
Coorientadores: Prof. Dr. Márcio Camargo de
Melo
Prof. Dr. William de Paiva

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

- A447i Almeida, Márbara Vilar de Araújo.
Identificação de fungos filamentosos presentes em um biorreator de resíduos sólidos urbanos / Márbara Vilar de Araújo Almeida. – Campina Grande, 2015.
65 f. : il. Color.
- Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, 2015.
- "Orientação: Prof.^a Dr.^a Veruschka Escarião Dessoles Monteiro, Prof. Dr. Márcio Camargo de Melo, Prof. Dr. William de Paiva".
Referências.
1. Resíduos Sólidos Urbanos. 2. Biorretador. 3. Fungos. 4. Identificação. 5. Preservação. I. Monteiro, Veruschka Escarião Dessoles. II. Melo, Márcio Camargo de. III. Paiva, William de. IV. Título.

CDU 624.4(043)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Márbara Vilar de Araújo Almeida

Título: Identificação de fungos filamentosos presentes em um biorreator de Resíduos Sólidos Urbanos

Dissertação defendida e aprovada em: 25/02/2015

Pela Banca Examinadora

(Assinatura):



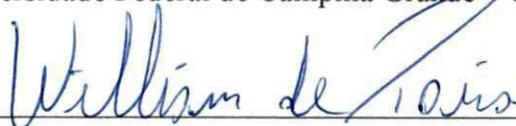
Prof.^a Dra. (Orientadora) Veruschka Escarião Dessoles Monteiro
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

(Assinatura):



Prof. Dr. (Coorientador) Márcio Camargo de Melo
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

(Assinatura):



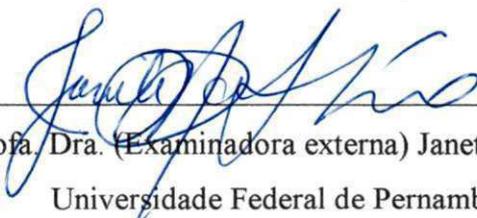
Prof. Dr. (Coorientador) William de Paiva
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

(Assinatura):



Prof.^a Dr.^a (Examinadora interna) Mônica de Amorim Coura
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

(Assinatura):



Prof.^a Dra. (Examinadora externa) Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos dois grandes homens da minha vida. Ao meu pai Anchieta e ao meu esposo Gláucio pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim e por todo carinho a mim dedicado. Dedico também a minha querida filha Lavínnia, minha razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ele ter permitido que eu chegasse até aqui e concluísse mais esta etapa da minha vida. Obrigada Senhor por ter me dado forças, pois só tu sabes o quanto foi difícil esta caminhada e que de todas as vezes que eu pensei em desistir, tu me encorajaste e me fizeste vencer cada dificuldade encontrada pelo caminho.

Ao Gláucio Almeida Silva, o marido amigo, por contribuir imensamente pela transformação da mulher que sou hoje. Com certeza por aguentar todo o meu sofrimento nas horas em que eu achava que não conseguiria dar conta de tudo que eu fazia ao mesmo tempo e pelo amor e carinho dedicados. Obrigada por toda sua ajuda e companheirismo, seja nas tarefas domésticas, na educação de nossa filha ou em tudo que me proponho a fazer, você sempre está ali disposto a me ajudar.

A minha querida filha Lavínnia que mesmo sem imaginar, me faz tão feliz com sua inocência e esperteza. Obrigada por todos os momentos ímpares que você me proporciona, pelo seu carinho que tanto me acalma e me encoraja a prosseguir e tentar ser uma pessoa melhor e por me fazer conhecer esse sentimento tão nobre e grandioso, o amor incondicional. Você consegue com simples gestos transformar o meu dia. Amo-te minha princesa.

Ao meu pai que sempre me apoia em minhas decisões, mesmo que ele não esteja totalmente de acordo. A minha eterna gratidão por seu esforço em sempre tornar os meus sonhos realidade, por seus conselhos e palavras de carinho.

A minha mãe por toda ajuda em cuidar de Lavínnia, enquanto eu estudo.

Aos meus amigos e a minha irmã que sempre ficam tão felizes quanto eu a cada conquista.

A família do meu esposo que desde o início me acolheu muito bem e nunca mediram esforços em nos ajudar com Lavínnia, especialmente ao meu sogro e minha sogra, pessoas generosas e de grande coração. Obrigada por todo carinho e dedicação à minha princesa.

Aos meus orientadores por todo este tempo de pesquisa, ensinamentos e por aceitar a me orientar mais uma vez, e que apesar de toda correria estão sempre dispostos a compartilhar informações e conhecimentos. Só tenho que agradecer por todo aprendizado.

Ao Grupo de Geotecnia Ambiental (GGA) da UFCG por toda ajuda durante as análises e interpretação dos dados. Sem o auxílio de vocês seria impossível realizar esta pesquisa.

A Embrapa Algodão, principalmente ao pesquisador Wirton Coutinho que aceitou fazer a identificação dos fungos estudados. Wirton você foi fundamental na realização de um sonho antigo que tínhamos em identificar os fungos, se você não tivesse aceitado, este sonho seria adiado mais uma vez. Muito obrigada!

Agradecer ao pesquisador da Embrapa Dartanhã Soares que também nos auxiliou na identificação dos fungos.

A técnica do laboratório de Fitopatologia Jacilane Fernandes que desde o começo foi muito solícita e por compartilhar um pouco dos seus conhecimentos em microbiologia comigo. Por sua amizade, confiança e auxílio durante as atividades laboratoriais. Tenha certeza que aprendi muito com você e lhe sou muito grata.

Ao laboratorista do laboratório de Fitopatologia Juarez. Pessoa engraçada e muito gentil.

A professora Mabel Calina de França Paz que mesmo sem me conhecer foi muito educada e gentil em fornecer a maioria dos reagentes necessários para o preparo dos meios de cultura para identificação dos fungos. Muito obrigada, pois sem a sua ajuda seria mais difícil a realização desta pesquisa.

A professora Líbia Conrado do Departamento de Engenharia Química, que também forneceu reagentes para preparo dos meios de cultura.

Aos meus colegas de turma que foram muito pacientes em ensinar um pouco dos cálculos a esta bióloga que nem sabia ligar a calculadora científica. Muito obrigada.

Aos colegas Natalí, Elaine, Elisa e Juciélio pelo auxílio nas análises e por diversos momentos descontraídos que nos ajudavam a enfrentar longos períodos dentro do laboratório para a realização das atividades.

Aos professores do PPGECA que contribuíram para ampliação dos meus conhecimentos na área de Engenharia Ambiental.

Aos funcionários do laboratório de Saneamento (Bloco CV), especialmente Valmaria e Tiquinho pela ajuda nas análises e esterilização de materiais enquanto não tínhamos a autoclave em nosso laboratório.

A funcionária da secretaria de Pós-Graduação Josete pela eficiência no andamento dos processos solicitados.

Ao Professor William de Paiva por todos os estudos estatísticos.

A todos os membros da banca pela contribuição para este trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida e a Capes pelo apoio financeiro dispensado.

Enfim, gostaria de agradecer de forma sincera, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização de mais um sonho. Muito obrigada.

“Tudo o que acontece tem um significado. Compreenda: sempre que um ciclo se fecha, outro se abre; ou seja, os obstáculos são portais para fazer de cada dificuldade a entrada de uma nova possibilidade.” (Coen Sensei).

RESUMO

Os fungos são os principais microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica presente nos resíduos sólidos. Nesse contexto faz-se necessário o estudo da ação dos fungos em meio à massa de resíduos e a identificação destes microrganismos quanto ao gênero e a espécie que pode gerar informações importantes no que refere a melhorar sistemas degradativos em aterros de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU). É uma das maneiras para se estudar estes microrganismos, sem que ocorra grande interferência no processo biológico, é a partir de biorreatores. O objetivo geral deste estudo foi identificar os fungos filamentosos presentes em um biorreator de RSU situado na cidade de Campina Grande/PB. Para isto os fungos foram isolados e preservados, para depois fazer a identificação. O método de preservação escolhido para esta pesquisa foi o Castellani (1967). O processo de identificação aconteceu entre os meses de abril a agosto de 2014. A identificação microscópica foi feita conforme KLICH (2002) e PITT (2000). A partir dos resultados obtidos, observou-se que, a preservação de fungos em tubos de vidro com água destilada foi considerada de fácil manejo, armazenamento e transporte, além de representar ser uma técnica eficiente para fungos filamentosos, e aplicável a uma grande diversidade de gêneros de fungos. A prática de isolamento e preservação de fungos filamentosos encontrados em RSU é importante, uma vez que futuramente estes fungos podem ser utilizados para acelerar processos de biodegradação. Durante o processo de identificação, o gênero *Aspergillus* foi o que se mostrou predominante. Isto já era esperado visto que estes fungos são comumente encontrados em solos e o biorreator estudado apresenta uma camada de cobertura de solo compactado, favorecendo assim o aparecimento destes fungos na massa de resíduos. Identificar fungos pode gerar informações importantes no que se refere a melhorar sistemas degradativos em aterros de RSU.

Palavras chave: Biorreator. Fungos. Identificação. Preservação. Resíduos Sólidos Urbanos

ABSTRACT

Fungi are the main microorganisms responsible for the decomposition of organic matter present in the solid waste. In this context it is necessary the study the action of the fungi in the middle of the mass of waste and the identification of these microorganisms in terms of gender and the species can generate important information in regards to upgrade degradative systems in MSW landfills. And one of the ways for study these microorganisms, though without encountering a great interference in the biological process, it's from bioreactors. The general aim of this study was to identify the filamentous fungi present in a bioreactor of municipal solid waste in the city of Campina Grande / PB. For this, the fungi had to be isolated and preserved for later proceed the identification. The preservation method chosen for this research was the Castellani. The identification process happened between April and August 2014. The microscopic identification was made according to KLICH (2002) and Pitt (2000). From the results obtained, it was observed that the conservation of fungi in glass tubes with distilled water was considered easy handling, storage and transportation, in addition to represent to be an effective technique for filamentous fungi, and applicable to a wide variety of fungal genera. The practice of isolation and preservation of filamentous fungi found in MSW is of short importance, since these fungi in the future can be used to accelerate biodegradation processes. During the identification process, the *Aspergillus* genus was what if proved predominant. This was expected since these fungi are commonly found in soils and the bioreactor studied presents a compacted soil cover layer, thereby fostering the emergence of these fungi in the mass of waste. Identify fungi can generate important information concerning to improve degradative systems in MSW landfills.

Keywords: Bioreactor. Fungi. Identification. Preservation. Municipal Solid Waste.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2	18
Figura 1 - Célula experimental localizada na UFCG	20
Figura 2 - Estrutura celular de um <i>Aspergillus</i>	23
ARTIGO N° 1	23
Figura 1 - Biorreator localizado em um terreno cedido pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).....	31
Figura 2 - Localização da cidade onde o biorreator foi construído	32
Figura 3 – Croqui do biorreator estudado	32
Figura 4 - Isolamento dos fungos filamentosos.....	34
Figura 5 - Etapas da preservação.....	35
Figura 6 - Fungos isolados em placas de Petri.	35
Figura 7 - Preservação em CASTELLANI (1967) dos fungos encontrados	38
ARTIGO N° 2	43
Figura 1 - Biorreator localizado em um terreno cedido pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).....	47
Figura 2 - Gêneros encontrados nos RSU	51
Figura 3 - Espécies de <i>Aspergillus</i> cultivadas em CYA 25°C (A), CYA 37°C (B) e MEA 25°C (C).....	53
Figura 4 - Figura (a), espécie <i>Aspergillus flavus</i> identificada com base nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas. <i>Aspergillus flavus</i> em CYA a 25° C, (b) estruturas microscópicas em microscopia de luz.....	54

LISTA DE QUADROS

ARTIGO N°1	27
Quadro 1 - Quantidade de fungos que foram isolados em cada nível do biorreator	36
Quadro 2 - Quantidade de fungos que foram preservados	37
ARTIGO N° 2	43
Quadro 1: Identificação dos fungos encontrados	50

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO 2	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS	18
2.2 ATERROS SANITÁRIOS.....	18
2.3 CÉLULAS EXPERIMENTAIS (BIORREACTORES)	19
2.4. DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS RESÍDUOS (BIODEGRADAÇÃO).....	21
2.4.1 FATORES QUE INTERFEREM NOS PROCESSOS BIODEGRADATIVOS	22
2.5 FUNGOS.....	22
2.5.1 IDENTIFICAÇÃO.....	24
CAPÍTULO 3	26
ARTIGO Nº1	27
RESUMO	28
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
FONTE DE MICRORGANISMOS	31
ISOLAMENTO	33
PRESERVAÇÃO	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
ISOLAMENTO	35
PRESERVAÇÃO	37

CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
ARTIGO Nº 2.....	43
RESUMO	44
ABSTRACT	44
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
FONTE DE MICRORGANISMOS	46
IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA.....	47
IDENTIFICAÇÃO MICROSCÓPICA	48
IDENTIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DE <i>ASPERGILLUS</i> E <i>PENICILLIUM</i>	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	49
GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i>	52
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
CONCLUSÃO GERAL	58
REFERÊNCIAS	59

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e crescimento populacional desencadearam uma produção quantitativa de resíduos muito superior a sua degradação, especialmente a biológica. Os Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) por apresentarem uma composição bastante heterogênea, fazem muitas vezes com que o processo de degradação ocorra de forma mais lenta.

As características dos resíduos podem variar em função de aspectos sociais, econômicos e culturais, dependendo dos hábitos de cada comunidade. A análise dos resíduos pode ser efetuada segundo as suas características físico-químicas e biológicas.

Em relação aos aspectos biológicos, os resíduos orgânicos podem ser metabolizados por vários microrganismos decompositores, como fungos e bactérias, aeróbios e/ou anaeróbios, cujo desenvolvimento dependerá das condições ambientais existentes (IPT, 2000).

Os fungos são os principais microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, interferindo no ciclo do carbono, do azoto e de outros nutrientes (ALEXOPOULOS et al., 1996). Degradam todo tipo de material degradável, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas. Os fungos são organismos economicamente importantes, amplamente distribuídos na natureza. São empregados na produção de alimentos, fármacos, enzimas e ácidos orgânicos (PATERSON, 2008).

Estes microrganismos apresentam um papel importante no ciclo da degradação da matéria orgânica presente nos resíduos sólidos. Nesse contexto faz-se necessário o estudo da ação dos fungos na massa de resíduos, visto que estes microrganismos são os primeiros degradadores a surgirem no processo de biodegradação. São eles que vão preparar o terreno para que os outros microrganismos possam atuar, já que graças ao seu poderoso arsenal enzimático, os fungos são capazes de degradar macromoléculas, ou seja, de transformar produtos complexos em produtos menos complexos ou mais fáceis de serem assimilados.

Em aterros de RSU os microrganismos bacterianos sempre ganharam mais destaque, o que gera pouca literatura disponível, sobretudo, na identificação de fungos. A identificação de organismos fúngicos pode gerar dados dos mais diversos, inclusive auxiliando no melhoramento de processos metabólicos.

Nos últimos anos tem surgido um grande interesse pelos fungos em decorrência do potencial de utilização destes organismos no controle biológico, produção de metabólitos com

diferentes atividades biológicas, excreção de enzimas e até como fonte direta de alimentos. Apesar da crescente descoberta tanto no que se refere à identificação de fungos quanto ao seu papel ou nicho ecológico, existe uma grande lacuna no conhecimento, sobretudo na eficiência destes organismos em RSU.

Um aspecto importante na identificação de fungos tanto a nível morfológico como a nível molecular é que rotas metabólicas podem ser sugeridas, reduzindo trabalho e custos na obtenção de respostas, e ainda melhorar os processos biodegradativos que apresentam um grande potencial biotecnológico.

Nesse contexto, identificar fungos quanto ao gênero e a espécie pode gerar informações importantes no que refere a melhorar sistemas degradativos em aterros de RSU. Uma das maneiras para se estudar estes microrganismos, sem que ocorra grande interferência no processo biológico, é a partir de células experimentais.

Células experimentais ou biorreatores de bancada têm sido uma das justificativas para o melhor entendimento do comportamento de aterros sanitários devido à facilidade de conhecimento e controle das condições internas e externas (ARAÚJO, 2011). Vale salientar que entender um aterro em condições experimentais pode ser menos complexo devido às condições conhecidas e/ou controladas.

Desta forma, o presente estudo foi realizado em uma célula experimental construída em alvenaria com volume total de 11m³, situada na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e preenchida com resíduos sólidos urbanos da cidade de Campina Grande, PB.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar os fungos filamentosos presentes em um biorreator de Resíduos Sólidos Urbanos situado na cidade de Campina Grande/PB.

2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os fungos a partir de amostras de resíduos sólidos urbanos (RSU) a diversas profundidades do biorreator;
- Aplicar um método de preservação para os isolados fúngicos;
- Identificar os fungos que ocorrem em cada camada do biorreator;
- Verificar o gênero mais representativo dentre os fungos isolados e a partir destes encontrar as espécies presentes.

CAPÍTULO 2

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS

A questão dos resíduos sempre foi uma problemática que acompanha o crescimento da população humana mundial. A produção de resíduos sólidos faz parte do cotidiano do ser humano; não sendo possível imaginar um modo de vida que não gere resíduos sólidos. Este problema é percebido em decorrência do aumento da população humana, a densidade dessa população nos centros urbanos, à forma e o ritmo da ocupação desses espaços e o modo de vida da população com base na produção e consumo de bens materiais de maneira desenfreada, vem tornando os resíduos cada vez mais visíveis (PHILIPPI e AGUIAR, 2005).

Resíduos sólidos são materiais heterogêneos (inertes, minerais e orgânicos) resultantes das atividades humanas e da natureza, os quais podem ser parcialmente utilizados, gerando entre outros aspectos, proteção à saúde pública e a economia de recursos naturais (FUNASA, 2006).

Os resíduos sólidos podem ser classificados de acordo com a composição química: matéria orgânica e matéria inorgânica; por sua natureza física: seco e molhado e quanto aos riscos potenciais à saúde pública e ao meio ambiente: perigosos, não inertes e inertes. Outro tipo de classificação está relacionado à origem dos resíduos: domiciliar, comercial, de varrição e feiras livres, de serviços de saúde e hospitalar, de aeroportos e terminais rodoviários e ferroviários, industriais, agrícolas e entulhos.

O processo de decomposição da matéria orgânica ocorre naturalmente, sendo regido, principalmente, por microrganismos. (CHANG& MILLES, 2004). Por serem constituídos por cerca de 50% de material biodegradável, os resíduos sólidos urbanos (RSU), passam por um processo de biodegradação que é realizado por diversos tipos de microrganismos, como fungos, bactérias e actinobactérias.

2.2 ATERROS SANITÁRIOS

A incorreta disposição final do lixo urbano, além de provocar poluição do solo, colabora para a poluição da água e do ar. A poluição das águas acontece por fenômenos

naturais como a lixiviação; e no ar constata-se efluentes gasosos e particulados emitidos para a atmosfera provenientes de diversas atividades humanas que podem ser considerados como lixo (SIQUEIRA e MORAES, 2009).

Em geral, a sociedade não se preocupa como os resíduos produzidos são dispostos e tratados, desejando sempre que sejam feitos longe do seu alcance de vista, uma vez que produzem maus odores e têm um aspecto desagradável. A disposição adequada dos resíduos sólidos deve ser realizada em um aterro sanitário, que deve ser implantado em locais específicos, caracterizados por grandes áreas e a certa distância de zonas urbanas (RODRIGUES, 2007).

O estudo dos resíduos presentes nos aterros sanitários é de extrema importância, uma vez que permite avaliar o seu comportamento e estabelecer as relações físicas, químicas e biológicas que ocorrem durante o seu processo de degradação, além de possibilitar a avaliação dos processos de decomposição desses resíduos, bem como a geração de gases e chorume. Contudo, o estudo do comportamento de aterros em grandes escalas ainda apresenta alguns empecilhos, principalmente devido à escassez desse tipo de aterro em nosso país, visto que a maioria dos resíduos são dispostos de forma inadequada em lixões (SILVA, 2012).

No sentido de conhecer melhor o comportamento dos resíduos nos aterros, surge como alternativa o estudo desses resíduos em células experimentais (biorreatores). Através dessa técnica, os dados obtidos podem ser utilizados para construção e monitoramento de um aterro em escala real.

2.3 CÉLULAS EXPERIMENTAIS (BIORREACTORES)

Os biorreatores funcionam como células experimentais que simulam o comportamento dos resíduos em escala real.

As células experimentais constam de uma estrutura cilíndrica rígida, com seção transversal circular que visa facilitar a distribuição e a compactação dos resíduos no seu interior, uniformizando a distribuição das pressões laterais na parede interna da célula, evitando caminhos preferenciais de percolação do lixiviado e reduzindo a área de superfície lateral interna diminuindo desta forma o contato entre os resíduos e a parede interna da estrutura. Além do sistema de drenagem de líquidos e gases e da instrumentação prevista, a célula possui orifícios com acesso à massa de resíduos para coletas de amostras sólidas (ALCÂNTARA, 2007).

Segundo Alcântara (2007), o estudo de células experimentais é importante para simular situações particulares para análise de causa e efeito, o que seria inviável em escala real, como, por exemplo, estudar o comportamento de resíduos com composições específicas, sua codisposição com resíduos de outra natureza, a simulação de condições ambientais que podem envolver precipitação, umidade e temperatura, concepção técnica alternativa de tratamento ou pré-tratamento dos resíduos, dentre outros aspectos (Figura 1).

Figura 1- Célula experimental localizada na UFCG



Fonte: Grupo de Geotecnia Ambiental (GGA)

A escolha do tipo do biorreator depende basicamente das condições locais, tipo de substrato, e principalmente relação custo x benefício (DUARTE, 2014). Biorreatores de bancada são simples, usados principalmente para investigações em laboratório. Os reatores são preenchidos em sua totalidade, e de uma só vez, com os resíduos frescos. Ao término do processo, os resíduos, já estabilizados, são removidos e inicia-se um novo ciclo, com a introdução de nova batelada de resíduos (CASSINI, 2003).

Estudos realizados em células experimentais buscando entender o comportamento dos resíduos foram realizados por diversos autores: Medeiros (2002), Youcai et al. (2002); John (2004); Levine et al. (2005); Alcântara (2007); Santos (2010); entre outros. Todos estes visando compreender as dinâmicas ocorridas no processo de degradação dos resíduos sólidos, a fim de contribuir para construção e compreensão de um aterro em escala real (em funcionamento). Na cidade de Campina Grande, local de estudo desta pesquisa, estudos também foram desenvolvidos neste intuito: Leite (2008); Garcez (2009); Meira (2009); Pereira, (2010); Farias, (2011); Araújo (2011); Melo (2011); Silva (2012); Ribeiro (2012);

Aires (2013); Duarte (2014), entre outros que ainda se encontram em andamento, todos buscando dados que podem ser aplicados em aterros de escala real e para locais que têm condições meteorológicas e que a composição dos resíduos seja semelhante às de Campina Grande. Estudos em células experimentais vêm se tornando bastante comum, visto que há um número sempre crescente de resíduos sendo gerados.

2.4. DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS RESÍDUOS (BIODEGRADAÇÃO)

A biodegradação da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos é caracterizada por uma sucessão de processos complexos através dos quais microrganismos, transformam a matéria orgânica em compostos minerais e gasosos. A natureza desses microrganismos e características das diferentes reações químicas e seus produtos permite distinguir várias etapas da degradação (RUSSO, 2005).

Após a disposição de resíduos num aterro há predominância de um ambiente rico em oxigênio, o que favorece inicialmente a ação dos microrganismos aeróbios. No entanto, este é um período muito breve, pois o oxigênio é rapidamente consumido pelos microrganismos e também vai se esgotando devido ao recobrimento diário com novas camadas de resíduos.

A decomposição dos resíduos sólidos urbanos em aterros sanitários é um processo complexo e para que ocorra um crescimento microbiano de forma satisfatória, todos os microrganismos necessitam de condições mínimas para sobrevivência e posterior reprodução. A microbiologia em aterros sanitários é de fundamental importância, uma vez que a presença de microrganismos nos processos degradativos do lixo são um bom instrumento da biotecnologia (MELO, 2003).

Os fungos são os primeiros organismos degradadores a se estabelecerem na massa de resíduos, até porque os esporos (estruturas de reprodução) dos fungos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, germinam rapidamente no solo, em plantas e em alimentos.

Estes microrganismos são de fundamental importância no processo de biodegradação, visto que conseguem transformar compostos complexos em subprodutos menos complexos, mais simples e de mais fácil digestão. No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliam a ocorrência de fungos em resíduos sólidos urbanos. Sendo assim, faz-se necessário sua detecção e identificação em meio à massa de resíduos, onde a partir destes estudos pode-se otimizar o processo de biodegradação dos RSU.

2.4.1 FATORES QUE INTERFEREM NOS PROCESSOS BIODEGRADATIVOS

Em qualquer ser vivo, o crescimento é um processo dinâmico que requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e manutenção celular. Os fungos, em particular, são organismos heterotróficos alimentando-se por absorção de nutrientes solúveis simples através da parede e membrana celulares.

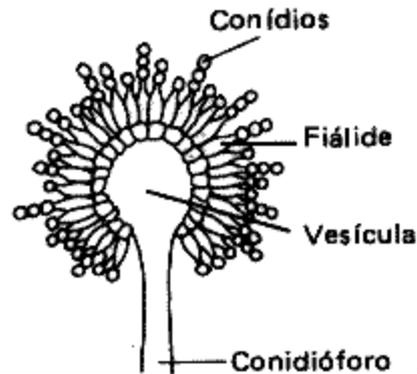
Se as exigências desses microrganismos são conhecidas, é possível estabelecer um conjunto de condições (valores de pH, temperaturas e umidade, etc.) que favoreçam o seu crescimento. Quando estão fora de seu habitat natural, é necessário criar um ambiente similar ao natural, para que o microrganismo possa se desenvolver de forma satisfatória.

Os fungos conseguem sobreviver em ambientes que tem suas condições ambientais oscilando a todo momento. Os fungos, assim como os outros microrganismos, têm sua faixa ótima de crescimento, no entanto não são tão sensíveis à mudanças ambientais, quanto às bactérias anaeróbias.

2.5 FUNGOS

Os fungos são microrganismos eucarióticos largamente distribuídos no ambiente, incluindo ar, solo e água. A estrutura básica dos fungos filamentosos é formada por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio. O micélio pode ter duas funções distintas: promover a fixação do fungo no substrato (micélio vegetativo) e promover a reprodução, através da produção de esporos (micélio reprodutivo). O micélio dos fungos filamentosos é responsável pelo aspecto característico das colônias que formam, podendo ser cotonosos, úmidos e gelatinosos (FRANCO et al., 1996; GOCK et al., 2003) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura celular de um *Aspergillus*



Estes microrganismos apresentam uma grande versatilidade em crescer em substratos, que outros microrganismos não são capazes de colonizar, como: (i) crescimento com atividade de água reduzida ($a_w > 0,65$ até $a_w < 0,99$), (ii) crescimento em valores de pH reduzido: 3,0 e abaixo; (iii) crescimento em uma grande variedade de temperatura: maior que 0°C e menor que 40°C ; (iv) utilização de uma grande variedade de substrato, (v) capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições (Taniwaki, 1996; Filtenborg et al., 1996; Medina et al., 2006).

Os fungos, juntamente com outros microrganismos, desempenham papel importante na formação do solo, evolução da fertilidade, nutrição de plantas, formação e melhoria de sua estrutura, degradação e depuração de substâncias tóxicas (BUÉE et al., 2007; DONNISON et al., 2000; ZHONG; CAI, 2004)

Apesar de seu papel bem documentado no funcionamento do ecossistema, estima-se que apenas 5% das espécies de fungos tenham sido descritas (HAWKSWORTH, 1991) e pouco é o conhecimento sobre sua dinâmica, estrutura da comunidade e diversidade (BELLIS; KERNAGHAN; WIDDEN, 2007).

O número hipotético para fungos é cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos no planeta, porém apenas cerca de 70.000 espécies foram descritas, permanecendo 1.430.000 espécies ainda não descritas, os habitats inexplorados podem ser uma fonte de muitas espécies desconhecidas, inclusive o solo (HAWKSWORTH, 1991).

Os gêneros de fungos filamentosos mais comumente encontrados na natureza são representantes de *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* (GAMS, 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Fungos possuem a capacidade de secretar enzimas no meio ambiente e essas enzimas auxiliam na degradação de vários produtos e compostos; fungos pertencentes ao gênero

Aspergillus são amplamente empregados em processos biotecnológicos, devido à produção de enzimas importantes (SCHUSTER et al., 2002).

Em compostos de RSU, têm sido encontrados fungos do gênero *Aspergillus*, inclusive da espécie *Aspergillus fumigatus*, que é responsável por infecções graves em seres humanos e animais. Como os fungos são microrganismos esporógenos, a sua presença ao longo do processo de degradação de RSU em aterros, sugere que eles possam permanecer por muito tempo, no ambiente do aterro, mesmo após a estabilização do material orgânico (ALCÂNTARA, 2007).

2.5.1 IDENTIFICAÇÃO

Os fungos constituem um grupo de organismos muito amplo. Esses microrganismos representam um grupo distinto, apresentam uma grande variedade de estruturas e organização celular. Podem ser unicelulares ou filamentosos. Os ciclos de reprodução dos fungos são muito variados e podem ser inteiramente sexuados, ou ter fases sexuadas e fases assexuadas.

Sendo na maioria microscópicos e vivendo nos mais diversos substratos, muitos fungos ainda são praticamente desconhecidos. Calcula-se que menos de 5% das 1.500.000 espécies de fungos que se supõe existir tenham sido descritas (KIRK et al. 2001). E esse número inclui em sua maioria, fungos macroscópicos, tendo em vista que a identificação de fungos microscópicos é mais difícil.

Esta grande diversidade torna a sua identificação difícil e restrita a um grupo específico de estudiosos que se dedicam às questões da micologia. Toda a classificação dos fungos se prende essencialmente às características morfológicas e reprodutoras (MACHADO, 2006). Nesse contexto, a identificação contribui para um melhor entendimento da estrutura da comunidade de fungos e também de suas funções.

Apesar de haver milhares de espécies microbiológicas identificadas, estima-se que elas correspondam a menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta; o restante das espécies permanece desconhecido para a comunidade científica (GARCIA, 1995).

Através dessa pesquisa pode-se conhecer quais fungos encontram-se presentes na massa de resíduos. Pois a grande dificuldade na realização dessa pesquisa é a escassez de estudos de fungos em resíduos sólidos aqui no Brasil, principalmente resíduos sólidos aterrados.

Sendo assim, os estudos envolvendo a identificação dos fungos filamentosos que atuam no processo de biodegradação dos RSU, são de grande importância, tanto

academicamente quanto em relação à sua aplicabilidade. O entendimento de suas atividades em ambiente natural é extremamente relevante para a simulação em laboratório, e posteriormente utilização dos resultados em escala real.

CAPÍTULO 3

Neste capítulo serão apresentados dois artigos científicos. O primeiro artigo aborda o processo de isolamento e preservação dos fungos filamentosos encontrados em Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) presentes em um biorreator. O segundo artigo, aborda o processo de identificação destes fungos isolados de RSU. Desta maneira assuntos de maior relevância destes trabalhos foram abordados em formas de artigos.

ARTIGO Nº1

Artigo submetido a Revista Journal of the Air & Waste Management Association/Qualis A2

Isolamento e Preservação de Fungos Filamentosos provenientes de Resíduos Sólidos**Urbanos****Márbara Vilar de Araujo Almeida**

Mestranda em Engenharia Civil e Ambiental pela Universidade Federal de Campina Grande-PB. Integrante do grupo de pesquisa em Geotecnia Ambiental na Universidade Federal de Campina Grande-PB.

Jacilane Fernandes do Nascimento

Mestranda em Biologia de Fungos pela Universidade Federal de Pernambuco. Técnico B – no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão - Campina Grande-PB

Kellianny Oliveira Aires

Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba. Integrante do grupo de pesquisa em Geotecnia Ambiental na Universidade Federal de Campina Grande-PB.

Veruschka Escarião Dessoles Monteiro

Professora do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Professora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Doutora em Engenharia Civil pela Universidade Federal de Pernambuco.

Márcio Camargo de Melo

Professor Adjunto da Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Doutor em Ciências e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande-PB.

RESUMO

O isolamento fúngico tem por finalidade preservar a viabilidade das colônias, permitindo observar o seu comportamento em sua forma pura. Os métodos de preservação visam manter as culturas em um estado viável sem mudança morfológica, fisiológica ou genética. O objetivo deste trabalho é demonstrar a técnica de isolamento e o método de preservação de fungos filamentosos de ocorrência em Resíduos Sólidos Urbanos (RSU). Este estudo contribuirá na otimização de processos biodegradativos de RSU e tomadas de decisões. Os fungos estudados foram provenientes da massa de RSU de um biorreator com altura de 3,5 m e 2,0 m de diâmetro e volume aproximado de 11 m³, dotado de doze pontos de coleta de resíduos. No isolamento fúngico foi utilizado o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose, rico em nutrientes que, devido às altas concentrações de carboidratos, favorece o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos. Após o período de crescimento dos fungos totais, foram isolados apenas os filamentosos. Para a preservação destes fungos foi escolhido o método de água destilada esterilizada. Como resultado observou-se que, ao longo dos seis meses de coleta de resíduos, houve variação no número de fungos isolados por amostra. Dos 81 fungos isolados, 76 foram preservados, visto que alguns não cresceram o suficiente para que os discos fossem cortados e outros foram contaminados ao longo dos repiques. O método de preservação escolhido apresentou como resultado um baixo índice de contaminação, mostrando que após a preservação, os fungos estavam viáveis e apresentavam as mesmas características morfológicas.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Isolamento. Preservação. Resíduos Sólidos Urbanos

Isolation and Preservation of filamentous fungi from Municipal Solid Waste

ABSTRACT

The fungal isolation aims to preserve the vitality of colonies, allowing observe their behavior in its pure form. The preservation methods aim to maintain cultures in a viable state without morphological, physiological or genetic change. The objective of this work is to demonstrate the isolation technique and the method of preservation of filamentous fungi found in Municipal Solid Waste (MSW). This study will contribute in the optimization of biodegradation processes of MSW and decision making. The fungi were studied from MSW

65 mass of a bioreactor with a height of 3.5 m and 2.0 m of diameter and approximate volume of
66 11 m³, equipped with twelve points of waste collection. In fungal isolation, Sabouraud
67 Dextrose Agar culture media was used, rich in nutrients due to high concentrations of
68 carbohydrates, it promotes the growth of several yeasts and filamentous fungi. After the
69 growth period of total fungi, only the filamentous ones were isolated. To preserve these fungi,
70 the sterile distilled water method was selected. As a result, it was observed that, over the six
71 months of waste collection, there was a variation in the number of fungi isolated per sample.
72 Of the 81 isolated fungi, 76 were preserved because some have not grown enough so that the
73 discs were cut and others were contaminated during the samplings. The chosen method of
74 preservation had a low infection rate, showing that after preservation, the fungi were viable
75 and had the same morphological characteristics.

76

77 **Keywords:** Filamentous fungi. Isolation. Preservation. Municipal Solid Waste

78 INTRODUÇÃO

79

80 Os fungos apresentam um papel importante no ciclo da degradação da matéria
81 orgânica presente nos Resíduos Sólidos Urbanos (RSU), pois são os primeiros organismos a
82 surgirem no processo de biodegradação. Os fungos, por exemplo, podem tornar disponível o
83 carbono de estruturas orgânicas e acelerar processos bioquímicos por diminuir as perdas de
84 nitrogênio e, assim, otimizar os processos fermentativos, levando-se em consideração a
85 relação C:N, pois se ocorrerem desequilíbrio destes constituintes, podem surgir problemas
86 operacionais e biológicos (MISRA et al., 2003; KIEHL, 2002).

87 Assim, conhecer a fisiologia de fungos é oportuno, uma vez que, as informações
88 fisiológicas servem para prever taxas de degradação metabólica em ambientes específicos.
89 Uma das maneiras de coletar informações destes microrganismos é isolá-los e preservá-los
90 para o desenvolvimento de trabalhos posteriores e sucessivos.

91 Denomina-se isolamento, a operação de transferência do microrganismo da fonte de
92 origem, a outro meio natural ou artificial que permita estudá-lo na sua forma pura. Tem por
93 finalidade preservar a vitalidade das colônias, permitindo desta forma, observar o
94 comportamento dos microrganismos em diferentes meios de cultura.

95 A atividade de isolamento de fungos pode ser feita diretamente a partir de algum
96 substrato ou de um compartimento ambiental como ar, água ou solo, utilizando vidraria e

97 instrumentos esterilizados, com a manipulação em uma zona de segurança próximo a uma
98 chama.

99 Para que ocorra o isolamento dos fungos, é necessário oferecer condições propícias
100 para o seu desenvolvimento. O isolamento pode ser realizado utilizando câmaras úmidas e um
101 meio de cultura sólido ou líquido, semi-sintético ou sintético.

102 As culturas de microrganismos são extremamente vulneráveis e podem se contaminar
103 facilmente, sendo muitas vezes difíceis obtê-las puras. Os métodos de preservação têm como
104 objetivo manter as culturas num estado viável, sem mudança morfológica, fisiológica ou
105 genética. Para se obter um bom resultado na aplicação de um método de preservação, a
106 cultura deve estar em condições adequadas para o seu desenvolvimento e respeitar as
107 condições ótimas de crescimento, temperatura, umidade, aeração, iluminação e meio de
108 cultivo. Além disso, a escolha de uma técnica para preservação depende das particularidades
109 do agente, das características do método, dos custos de manutenção, da importância do acervo
110 e principalmente da disponibilidade de equipamentos (ABREU & TUTUNJI, 2003; GIRÃO
111 et al., 2004).

112 Os métodos mais comuns de preservação de culturas de fungos filamentosos são a
113 preparação de suspensões de esporos conservadas a baixas temperaturas ou a preservação em
114 meio sólido no caso de fungos não produtores de esporos. É ainda possível a preservação do
115 micélio de fungos filamentosos em água estéril. Esta é uma técnica simples, econômica e
116 segura, que previne o pleomorfismo (capacidade de assumir diversas formas) e a
117 contaminação com ácaros, além de garantir a sobrevivência de cultivos fúngicos por períodos
118 prolongados de cerca de 12 anos, com uma taxa de sobrevivência da ordem dos 90 %
119 (BUENO & QIANGQIANG, 1998).

120 Nos laboratórios de engenharia sanitária e ambiental, geralmente, os fungos são
121 estudados no momento de sua ação e depois descartados. Este estudo pode oferecer uma nova
122 visão e perspectiva no que se refere ao isolamento e preservação de fungos em RSU. O
123 isolamento e a preservação de fungos pode proporcionar o seu uso posterior em processos
124 biológicos sem a necessidade de sempre buscá-los no próprio aterro de disposição. Este
125 trabalho tem como objetivo demonstrar a técnica de isolamento e o método de preservação de
126 fungos filamentosos encontrados em Resíduos Sólidos Urbanos.

127 MATERIAL E MÉTODOS

128 FONTE DE MICRORGANISMOS

129

130 Os fungos estudados foram isolados da massa de RSU do biorreator ilustrado na
 131 Figura 1. Este biorreator apresenta doze pontos de coleta de resíduos, porém os três primeiros
 132 pontos na horizontal, referente ao nível superficial, foram desativados logo na primeira coleta
 133 de amostras de RSU devido ao recalque imediato elevado que acontece naturalmente, ou seja,
 134 deformações verticais imediatas na massa de resíduos, ocasionado pelo peso da camada de
 135 cobertura de solo compactado. Sendo assim, ficaram apenas três níveis em profundidade para
 136 coleta de resíduos, denominados de nível superior, intermediário e inferior onde cada nível
 137 apresenta tres pontos de coleta, totalizando nove pontos para coleta dos resíduos (Figura 1).
 138 Vale salientar que os pontos de coletas do nível superficial, foram desativados apenas para as
 139 coletas, sendo que estes não foram removidos, permanecendo no biorreator estudado.

140

141 **Figura 1 - Biorreator localizado em um terreno cedido pela Universidade Federal de Campina**
 142 **Grande (UFCG)**



143

144

Fonte: Grupo de Geotecnia Ambiental (GGA)

145

146 Esse biorreator foi construído nas dependências da UFCG, localizada na cidade de
 147 Campina Grande, no Estado da Paraíba-Brasil (Figura 2), sendo construído em alvenaria de
 148 tijolos manuais, com altura de 3,5 m, diâmetro de 2,0 m e com um volume aproximado de 11
 149 m³, dotado de doze pontos de coleta de resíduos, sendo três a cada 0,6 m de altura,

150 distribuídos em quatro pontos de alturas diametralmente opostas. Cada abertura lateral tem
 151 diâmetro de 0,10 m, conforme ilustrado na Figura 3.

152

153

Figura 2 - Localização da cidade onde o biorreator foi construído



154

155

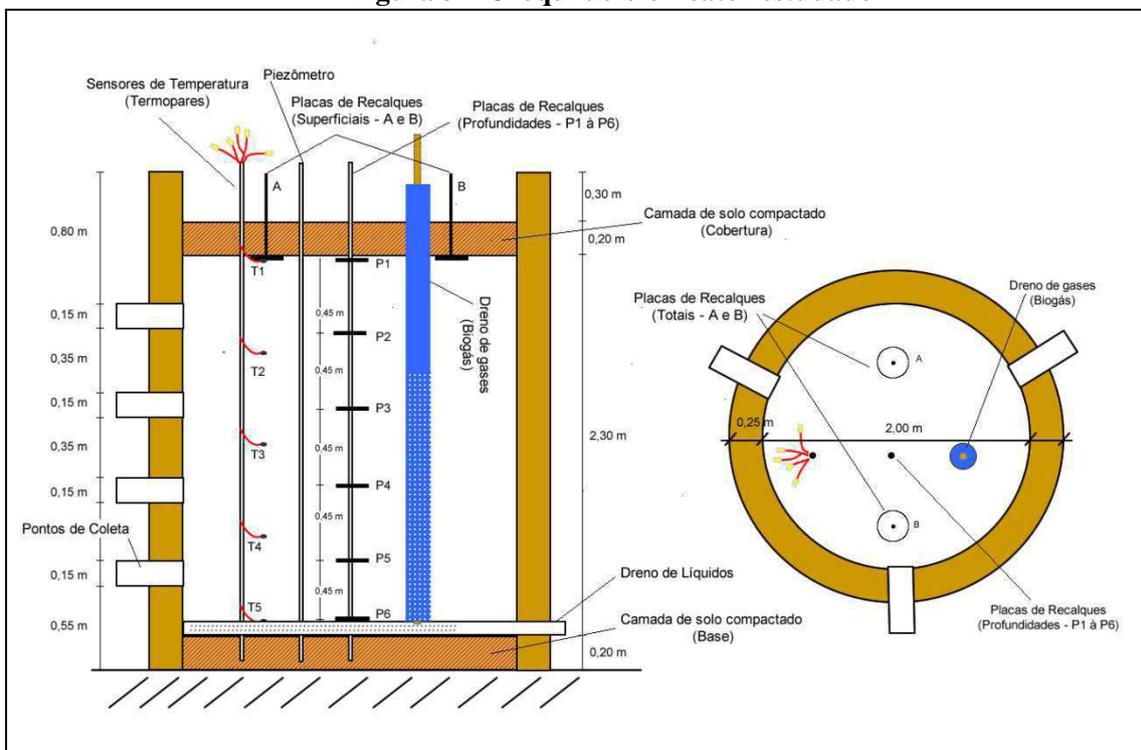
156

157

158

Fonte: Grupo de Geotecnia Ambiental (GGA)

Figura 3 – Croqui do biorreator estudado



159

160

161

Fonte: Grupo de Geotecnia Ambiental (GGA)

162 Visando obter amostras representativas dos RSU da Cidade de Campina Grande
163 verificou-se a necessidade de se estabelecer um plano de amostragem, através de um
164 planejamento estatístico. Este plano foi baseado nas informações obtidas junto a Diretoria de
165 Limpeza Urbana (DLU) da cidade e do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Para isso,
166 foram utilizados dados do censo populacional do IBGE 2010, juntamente com dados da
167 geração de resíduos na cidade e desenvolvida uma metodologia inédita de amostragem, com o
168 objetivo de representar fielmente a composição dos resíduos sólidos gerados na cidade de
169 Campina Grande.

170 No planejamento estatístico a cidade de Campina Grande está dividida em quatro
171 zonas (Norte, Sul, Leste e Oeste), e através do sorteio foram selecionados os bairros para
172 coleta dos resíduos. Para os nove bairros sorteados foram previamente estabelecidos, por meio
173 de cálculos estatísticos, a quantidade de resíduos que deveria ser coletada (MONTEIRO,
174 2012).

175

176 **ISOLAMENTO**

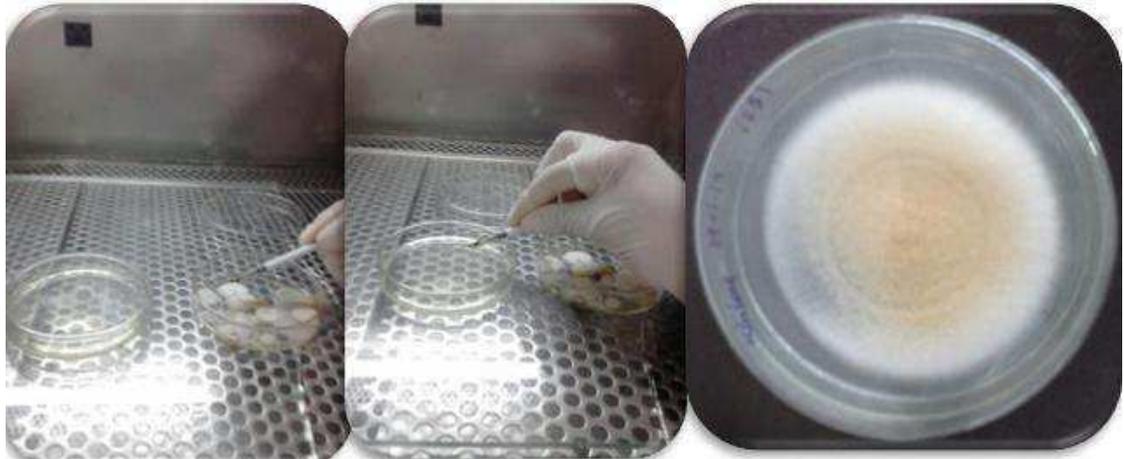
177

178 Para a realização do isolamento, os meios de cultura são na maioria das vezes
179 solidificados com ágar, na proporção de 1,5 a 2,0%. De forma geral, os fungos desenvolvem-
180 se melhor em meios abundantemente supridos com hidratos de carbono e em pH neutro ou
181 ligeiramente ácido. O meio de cultura utilizado nesta pesquisa para o isolamento foi o Ágar
182 Sabouraud Dextrose com adição do antibiótico cloranfenicol, onde foi colocado 10 mL de
183 meio de cultura em cada placa de *Petri*, incubadas a uma temperatura de 25°C.

184 Após o período de crescimento que é em torno de cinco a sete dias, foi realizada a
185 contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) dos fungos totais, que permaneceu
186 durante quase todo o período de monitoramento numa ordem de grandeza de 10^{-7} . Para o
187 isolamento, foram separadas as placas de *Petri* que continham apenas os fungos filamentosos.
188 Em seguida, foram preparadas novas placas contendo Agar Sabouraud Dextrose, e estes
189 fungos que haviam sido separados, foram repicados até se conseguir o isolamento das
190 colônias puras, livres de contaminação. As colônias fúngicas foram isoladas com base em
191 aspectos macroscópicos como textura e cor. Estes procedimentos foram realizados em uma
192 câmara de fluxo laminar e próximos a uma lamparina (Figura 4).

193

194

Figura 4 - Isolamento dos fungos filamentosos

195

196

197

198

199

Os fungos foram isolados durante os meses de outubro e novembro do ano de 2013, de janeiro a abril de 2014, totalizando seis meses de coleta.

200

PRESERVAÇÃO

201

202

203

204

Os métodos usualmente empregados para a manutenção de microrganismos são o óleo mineral, água destilada esterilizada, baixas temperaturas (congelamento à -80°C e nitrogênio líquido) e liofilização (FIGUEIREDO, 2001; CANHOS, 2003; NAKASONE et al., 2004).

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

O método escolhido para esta pesquisa foi o CASTELLANI (1967), onde tubos de vidro com capacidade para 10 mL, foram preenchidos com cerca de 3 mL de água destilada esteril. Para a preservação dos fungos filamentosos isolados, após crescimento das colônias no meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), foram cortados discos de micélio, com o auxílio de furadores, e transferidos para os tubos de vidro. Os tubos foram posteriormente tampados com tampas de borracha, que foram vedadas com papel filme, sendo também identificados com etiquetas que forneciam uma numeração aleatória e a data da preservação, sendo mantidos à temperatura ambiente (Figura 5).

215

Figura 5 - Etapas da preservação

216

217

218

219

220 RESULTADOS E DISCUSSÃO

221

222 ISOLAMENTO

223

224

225

226

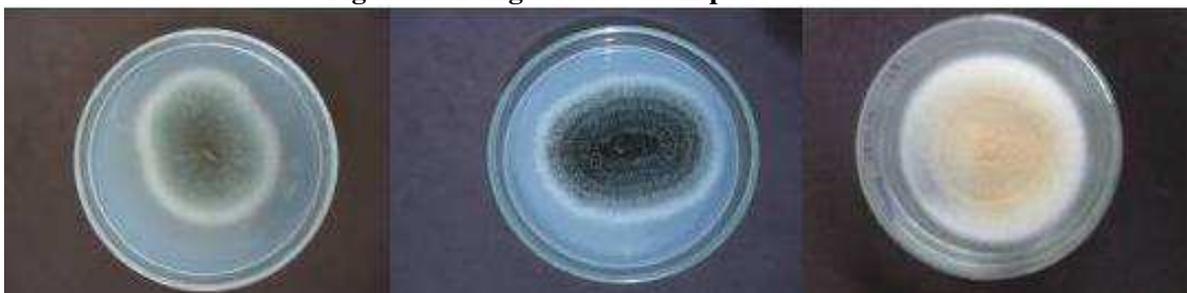
227

228

229

230

231

Figura 6 - Fungos isolados em placas de Petri.

232

233

234

Fonte: Arquivo pessoal

235

236

237

238

239

O Quadro 1 apresenta a quantidade de fungos por nível de profundidade no biorreator durante o período de coleta de amostras.

240

Quadro 1 - Quantidade de fungos que foram isolados em cada nível do biorreator

Mês de coleta	Quantidade de isolados por nível			Quantidade de isolados por mês
	Superior	Intermediário	Inferior	
Outubro (2013)	2	2	1	5
Novembro (2013)	3	4	4	11
Janeiro (2014)	2	8	5	15
Fevereiro (2014)	3	4	5	12
Março (2014)	4	4	5	13
Abril (2014)	5	13	7	25
Total de isolados:	19	35	27	81

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

Ao longo dos seis meses de coleta dos resíduos, houve variação no número de fungos isolados, onde pode-se perceber que no nível intermediário, houve um maior número de fungos isolados. Isso pode ter acontecido em decorrência das condições de alguns parâmetros tais como: pH e umidade estarem mais propícias para o crescimento de fungos na massa de RSU na camada intermediária do biorreator. Durante o período de monitoramento, foram encontrados no nível intermediário do biorreator, valores de pH (entre 8 e 9 unidades), e uma umidade (em torno de 40 a 60%) e isto pode ter favorecido o maior crescimento de fungos neste nível, visto que fungos filamentosos toleram pH entre 1,5 e 11 e a taxa de umidade considerada ótima para a biodegradação, fica em torno dos 40 a 60%.

Outro fator que pode ter influenciado o maior número de fungos filamentosos na camada intermediária, é que este biorreator é dotado de uma camada de cobertura de solo compactado, e através de outros estudos, foi verificado que o solo dessa camada foi carregado por todo o extrato de resíduos. Sendo assim, além dos fungos estarem presentes na massa de resíduos, eles foram acrescidos do solo que foi carregado, esse solo pode ter funcionado como uma espécie de inóculo.

Estes resultados corroboram com estudos realizados por MELO et al (2014) em um biorreator com características e dimensões semelhantes ao que foi estudado, onde pode-se perceber que a camada que melhor representa o processo de biodegradação dentro do biorreator, é a camada intermediária; pois esta camada sofre pouco ou nenhuma interferência do ambiente e das camadas adjacentes.

Alguns fungos foram repicados várias vezes em virtude de se contaminarem facilmente. Essas contaminações devem-se ao fato dos fungos estudados apresentarem esporos muito secos, o que faz com que estes se dispersem rapidamente dentro do ambiente de trabalho, podendo contaminar outras culturas. Outro fator que pode ter contribuído para

266 estas contaminações ocorrerem, pode ter sido a presença de fungos parasitas, os quais podem
 267 ter crescido sobre outros fungos, ocasionando as contaminações e perda total da cultura.

268

269 **PRESERVAÇÃO**

270

271 Dos 81 fungos isolados, 77 foram preservados, visto que alguns fungos não cresceram
 272 o suficiente para que os discos fossem cortados, podendo se tratar de fungos de crescimento
 273 lento e outros foram contaminados ao longo dos repiques (Quadro 2).

274

275

Quadro 2 - Quantidade de fungos que foram preservados

Mês de coleta	Quantidade de isolados por nível			Total de isolados por mês	Quantidade de fungos preservados
	Superior	Intermediário	Inferior		
Outubro (2013)	2	2	1	5	5
Novembro (2013)	3	4	4	11	11
Janeiro (2014)	2	8	5	15	15
Fevereiro (2014)	3	4	5	12	12
Março (2014)	4	4	5	13	9
Abril (2014)	5	13	7	25	25
					Total: 77

276

277 Dos fungos isolados, a maioria foram preservados, e apenas 4 do total de 81 isolados
 278 não puderam ser preservados, pois se contaminaram durante o processo.

279 O método CASTELLANI (1967) é bastante utilizado para preservar fungos
 280 filamentosos. Há relatos de preservação de muitos fungos neste método, inclusive dos que
 281 habitam o solo tais como *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* e *Phytium sp.*
 282 (DHINGRA, 1995; SINGLETON, 1992).

283

284 Após o processo de preservação, os fungos podem ser reativados para utilização em
 285 processos de identificação. Sendo assim, os resultados observados para este método de
 286 preservação, foram considerados positivos e mostraram que após a preservação, os fungos
 287 estavam viáveis e apresentavam as mesmas características morfológicas. BUENO e
 288 GALLARDO (1998) em um estudo utilizando 26 cepas preservadas pelo método de
 289 CASTELLANI (1967), durante dois anos observaram a viabilidade de 100% das cepas e sem
 290 alterações nas características macroscópicas e morfológicas, demonstrando a eficiência desse
 método na preservação da viabilidade de culturas fúngicas.

291 APARECIDO et al (2007) comparando viabilidade de culturas fúngicas preservadas
292 pelos métodos CASTELLANI (1967) e liofilização, sugerem que o método de CASTELLANI
293 seja mais vantajoso para manter em laboratório diferentes gêneros e espécies de fungos.

294 APARECIDO et al. (2001) afirmaram que o método de água destilada esterilizada,
295 além de garantir a preservação das características originais da cultura por longos períodos,
296 pode promover a ausência de contaminação por ácaros, apresentar baixo custo por utilizar
297 somente água destilada e revelar a necessidade de pequeno espaço físico para acondicionar os
298 frascos, além de poder ser empregado para grande número de gêneros e espécies de fungos.

299 Resultados positivos, com relação ao método de CASTELLANI (1967), vêm sendo
300 obtidos desde 1967 por diversos autores (FIGUEIREDO, 1967; FIGUEIREDO; PIMENTEL,
301 1975; FIGUEIREDO et al., 1980; RUSSOMANNO et al., 1995; PICCININ; PASCHOLATI,
302 1996; APARECIDO; FIGUEREDO, 1997; EGYDIO; FIGUEIREDO, 1999; PASSADOR et
303 al., 2000; APARECIDO et al., 2001), demonstrando a eficiência desta técnica para a
304 manutenção da viabilidade de culturas fúngicas.

305 Para a recuperação dos fungos, foi utilizado somente o meio de cultura BDA. Este
306 meio de cultura é muito utilizado para cultivar fungos filamentosos, visto que estes
307 microrganismos apresentam grande aderência ao ágar, e por tratar-se também de um meio de
308 cultivo de fácil preparo e de baixo custo. MCGINNIS (1974), também utilizou BDA no
309 processo de reativação de fungos filamentosos, e encontrou elevados índices de viabilidade
310 para os fungos mantidos em água.

311

312

313

Figura 7 - Preservação em CASTELLANI (1967) dos fungos encontrados



314

315

Fonte: Arquivo pessoal

316 CONCLUSÕES

317

318 • O isolamento de fungos filamentosos provenientes de RSU demonstrou ser uma
319 técnica trabalhosa, pois neste tipo de substrato é comum a presença de fungos contaminantes e
320 estes são extremamente vulneráveis, podendo contaminar facilmente o ambiente de trabalho;

321

322 • O BDA caracterizou-se como um meio de cultura eficaz, quando comparado ao
323 Agar Sabouraud Dextrose, para o cultivo dos fungos filamentosos estudados em RSU, onde
324 todos os fungos mostraram um crescimento positivo;

325

326 • O método de preservação escolhido, além de econômico, demonstrou ter um baixo
327 índice de contaminação, quando comparado a técnica de repiques sucessivos;

328

329 • A preservação de fungos em tubos de vidro com água destilada (método Castellani)
330 foi considerada de fácil manejo, armazenamento e transporte, além de representar ser uma
331 técnica eficiente para fungos filamentosos, e aplicável a uma grande diversidade de fungos;

332

333 • Os índices de viabilidade observados para os fungos filamentosos foram elevados,
334 visto que todos os fungos mantiveram suas características morfológicas após a preservação,
335 demonstrando que a manutenção em água destilada parece ser adequada para a preservação
336 desses fungos;

337

338 • A prática de isolamento e preservação de fungos filamentosos encontrados em RSU
339 é de suma importância, uma vez que futuramente estes fungos podem ser utilizados para
340 acelerar processos de biodegradação;

341

342 • A partir desse estudo, pode-se perceber a dificuldade em se isolar fungos
343 filamentosos presentes em RSU e os resultados encontrados, irão subsidiar outras pesquisas
344 na área de Resíduos Sólidos; uma vez que existe uma escassez de estudos de fungos em
345 resíduos sólidos no Brasil, principalmente resíduos sólidos aterrados.

346

347

348

REFERÊNCIAS

349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380

1. Abreu MMV, Tutunjii VL (2006) **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB**. Universitas Ciências da Saúde - v. 02, n. 02, p. 236-251, Brasília.
2. Aparecido CC, Figueiredo MB (1997) **Estudos sobre a manutenção da viabilidade e patogenicidade de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, agente causal da gomose em fruto de abacaxi, preservado por três diferentes métodos**. Revista do Núcleo de Pesquisas da Faculdade de Ciências Exatas e Experimentais da Universidade Mackenzie, v.1, 148-151.
3. Aparecido CC, Egydio APM, Figueiredo MB (2001) **Avaliação de três diferentes métodos utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo para preservação de fungos fitopatogênicos**. Summa Phytopathologica, v.27, p.421-424.
4. Aparecido CC et al (2007) **Divulgação técnica: avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani (água destilada) e liofilização**. Biológico, São Paulo, v. 69, n. 1, 5-8.
5. Bueno L, Gallardo R (1998) **Preservación de hongos filamentosos en água destilada estéril**. Revista Iberoamericana de Micología, Barcelona, n.15, 166-168.
6. Canhos VP (2003) **Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica**. *Ciênc. Cult.* v.55, n.3. São Paulo, SP.
7. Castellani A (1967) **Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile water**. Further researches. *J Trop Med Hyg.* 70: 181-184.
8. Dhingra OD, Sinclair JB (1995) **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 434 p.

- 381 9. Egydio APM, Figueiredo MB (1999) **Eficiência do método de Castellani (água**
382 **destilada) para preservação de três diferentes espécies fúngicas.** *Summa*
383 *Phytopathologica.* v.25, 37 p.
384
- 385 10. Figueiredo MB (1967) **Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para**
386 **conservação de fungos patogênicos em plantas.** *Biológico,* v.33, 9-13.
387
- 388 11. Figueiredo MB, Pimentel PVC (1975) **Métodos utilizados para conservação de**
389 **fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico.**
390 *Summa Phytopathologica.* v.1, 299-302.
391
- 392 12. Figueiredo MB, Pimentel PVC, Pitta GBP (1980) **Preservação da patogenicidade de**
393 **alguns fungos conservados em água destilada.** *Biológico,* v.46, 279-308.
394
- 395 13. Figueiredo MB (2001) **Métodos de Preservação de Fungos Patogênicos.** *Biológico,*
396 n. 1/2 p. 73-82, jan., São Paulo.
397
- 398 14. Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha
399 MFG (2004) **Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em**
400 **diferentes métodos de conservação.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*
401 *Tropical,* Rio de Janeiro, RJ, v.37, n.3, 229-233.
402
- 403 15. Kiehl EJ (2002) **Manual de compostagem: Maturação e qualidade do composto.** 3
404 ed. Piracicaba, SP, 146p.
- 405 16. Bueno L, Gallardo R. (1998). **Filamentous fungi preservation in distilled water.**
406 *Iberoamericana de Micologia,* 15, 166-168.
407
- 408 17. Mcginnis MR, Padhye A A, Ajello L (1974) **Storage of stock cultures of**
409 **filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled**
410 **water.** *Appl. Microbiol.* 28:218-222.
411
- 412 18. Melo MC et al (2014) **Microbiologia de resíduos sólidos urbanos e sua relação**
413 **com a deformação vertical da massa aterrada.** *Revista de Engenharia Sanitária e*
414 *Ambiental.* v.19, n.3, 225-234

415

416

19. Misra RV, Roy RN, Hiraoka K (2003) **On-farm composting methods**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 51p.

418

419

20. Monteiro VED (2012) **Estudos para Estimativa da Geração de Biogás em uma Célula Experimental de Resíduos Sólidos Urbanos**. Relatório Técnico Projeto de Pesquisa MCT/CNPq. Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande.

422

423

21. Nakasone KK, Peterson SW, Jong S (2004) **Preservation and distribution of fungal cultures**. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS. *Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods*. 1st ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 37-47.

426

427

22. Passador MM, Coutinho LN, Figueiredo MB (2000) **Avaliação da viabilidade, esporulação e patogenicidade de culturas de *Verticillium fungicola* conservadas pelo método de Castellani**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, SP, v.67, 134 p. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIÓLOGICO. Resumo 216.

432

433

23. Piccinin E, Pascholati SF (1996) **Crescimento, esporulação e patogenicidade de isolados de *Colletotrichum graminicola* após 14 anos de preservação pelo método de Castellani**. Fitopatologia Brasileira, v.21, 499-502.

436

437

24. Qiangqiang ZJ, Li L (1998) **Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years**. *Mycoses*, 41, 255-257.

439

440

25. Russomanno OMR, Coutinho LN, Figueiredo MB, Pimentel CPV (1995) **Preservação da patogenicidade de culturas de *Verticillium dahliae* conservadas em água destilada**. *Summa Phytopathologica*. v.21,178-181.

443

444

26. Singleton LL, Mihail JD, Rush CM (1992) **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 265p.

446

ARTIGO Nº 2

Artigo submetido a Revista Brazilian Journal of Microbiology/Qualis B1

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EM UM
BIORREATOR DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS****Márbara Vilar de Araujo Almeida**

Mestranda em Engenharia Civil e Ambiental pela Universidade Federal de Campina Grande-PB. Integrante do grupo de pesquisa em Geotecnia Ambiental na Universidade Federal de Campina Grande-PB.

Wirton Macedo Coutinho

Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Brasil. Mestrado em Agronomia (Fitopatologia) pela Universidade Federal de Lavras, UFLA, Brasil.

Jacilane Fernandes do Nascimento

Mestranda em Biologia de Fungos pela Universidade Federal de Pernambuco. Técnico B – no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão - Campina Grande-PB

Márcio Camargo de Melo

Professor Adjunto da Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Doutor em Ciências e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande-PB.

Veruschka Escarião Dessoles Monteiro

Professora do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Professora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Doutora em Engenharia Civil pela Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

O processo de identificação é extremamente importante, pois quando se conhece o microrganismo, é possível, a partir de suas características, estimar o seu papel funcional. Este trabalho teve como objetivo identificar os fungos que ocorrem em cada camada de um biorreator de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) durante um período de seis meses de monitoramento, verificar o gênero mais representativo dentre os fungos totais e a partir deste identificar as espécies presentes. O biorreator apresenta uma altura de 3,5 m e 2,0 m de diâmetro e volume aproximado de 11m³, dotado de doze pontos de coleta de resíduos. Para identificação foram utilizados os meios de cultura padrão, Czapeck Yeast Agar (CYA) a 25 °C e 37 °C por 7 dias e Malt Extract Agar (MEA) a 25 °C por 7 dias. Como resultado observou-se que, dentro dos 77 isolados fúngicos, foram encontrados 12 gêneros, onde o gênero *Aspergillus* foi o que apareceu em maior frequência e também com o maior número de espécies encontradas. Dentre as espécies presentes do gênero *Aspergillus*, 15 foram encontradas no nível superior do biorreator, 19 no nível intermediário e 14 no nível inferior. Este gênero foi o mais predominante, pois *Aspergillus* são amplamente distribuídos na natureza e ocorrem em diversos substratos, principalmente em solos e o biorreator estudado apresenta uma camada de cobertura de solo compactado. A maioria dos fungos encontrados neste estudo foi identificada, mostrando que os métodos escolhidos são eficazes para a identificação de fungos filamentosos encontrados em RSU.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Fungos filamentosos. Identificação. Resíduos Sólidos Urbanos

IDENTIFICATION OF FILAMENTOUS FUNGI PRESENT IN A BIOREACTOR OF MUNICIPAL SOLID WASTE

ABSTRACT

The identification process is extremely important, because when you know the microorganism, it is possible, from its characteristics, estimate its functional role. This work aimed to identify the fungi present in each layer of a bioreactor of Municipal Solid Waste (MSW) for a period of six months of monitoring and verify the most representative genus in the total fungi and from this find the species present. The bioreactor has a height of 3.5 m to 2.0 m in diameter and approximate volume of 11 m³, with twelve points of waste collection. For identification

70 were used the standard culture media , Czapeck Yeast agar (CYA) at 25 ° C and 37 ° C for 7
71 days and Malt Extract Agar (MEA) at 25 ° C for 7 days. As a result it was observed that,
72 within the 77 fungal isolates, were found 12 genera, where the *Aspergillus* genus was what
73 appeared in larger frequency and also with the highest number of species found. Among the
74 species present in the *Aspergillus* genus, 15 were found in the upper level of the bioreactor,
75 19 in the intermediate level and 14 in the less level. This genus was the most predominant,
76 because the *Aspergillus* are widely distributed in nature and occur in various substrates,
77 mainly in soils and the studied bioreactor present a compacted soil cover layer. Most fungi
78 found in this study was identified, showing that the chosen methods are effective for the
79 identification of filamentous fungi found in MSW.

80

81 **Keywords:** *Aspergillus*. Filamentous fungi. Identification. Municipal Solid Waste

82

83 INTRODUÇÃO

84

85 Os fungos são organismos extremamente importantes para o funcionamento dos
86 ecossistemas; embora estejam entre os organismos mais importantes do mundo, existem
87 informações limitadas ou incompletas para a maioria das espécies (MUELLER et al., 2004;
88 MUELLER; SCHMIT, 2007).

89 Sendo na maioria microscópicos e vivendo nos mais diversos substratos, os fungos
90 ainda são praticamente desconhecidos. Calcula-se que menos de 5% dentre 1.500.000
91 espécies de fungos que se supõe existir tenham sido descritas (KIRK et al. 2002). Esse
92 número inclui em sua maioria, fungos macroscópicos, tendo em vista que a grande
93 diversidade dos fungos microscópicos torna a sua identificação difícil devido à ampla
94 variação das características morfológicas resultantes da constituição genética de cada
95 microrganismo.

96 Os gêneros de fungos filamentosos mais comumente encontrados na natureza são
97 representantes de *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*,
98 *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* (GAMS, 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

99 Os fungos possuem a capacidade de secretar enzimas no meio ambiente e esses
100 catalisadores biológicos, auxiliam na degradação de produtos e compostos. Fungos
101 pertencentes ao gênero *Aspergillus*, por exemplo, são amplamente empregados em processos
102 biotecnológicos, devido à produção de enzimas importantes (SCHUSTER et al., 2002).

103 Os estudos envolvendo a identificação dos fungos filamentosos que atuam no processo
104 de biodegradação dos Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) são de grande importância, tanto
105 academicamente quanto em relação à sua aplicabilidade. Conhecendo a microbiota presente
106 nos RSU, é possível analisar a velocidade da biodegradação ou até mesmo acelerar este
107 processo aumentando a sua eficiência, através do conhecimento das espécies presentes. Isto
108 pode ajudar o monitoramento dos aterros e também aumentar o seu tempo de vida útil, através
109 de consórcios de diversos tipos de fungos, que podem ser introduzidos dentro da massa de
110 resíduos.

111 Nesse contexto, a identificação contribui para um melhor entendimento da estrutura da
112 comunidade de fungos e também de suas funções. Identificar é uma tarefa extremamente
113 relevante, pois quando se conhece o microrganismo, é possível, a partir de suas
114 características, estimar o seu papel funcional e com base nessas informações, poder simular
115 seu ambiente natural em laboratório. Através dessa pesquisa pretende-se conhecer quais
116 fungos encontram-se presentes na massa de resíduos dentro do biorreator.

117 Este trabalho teve como objetivo identificar os fungos presentes em cada camada de
118 um biorreator de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) durante um período de seis meses de
119 monitoramento e verificar o gênero mais representativo dentre os fungos totais e a partir deste
120 encontrar as espécies presentes.

121

122 **MATERIAL E MÉTODOS**

123

124 **FONTE DE MICRORGANISMOS**

125

126 Os fungos estudados foram isolados da massa de RSU do biorreator ilustrado na
127 Figura 1. Este biorreator apresenta doze pontos de coleta de resíduos, porém os três primeiros
128 pontos na horizontal, referente ao nível superficial, foram desativados logo na primeira coleta
129 de amostras de RSU devido ao recalque imediato elevado que acontece naturalmente, ou seja,
130 deformações verticais imediatas na massa de resíduos, ocasionado pelo peso da camada de
131 cobertura de solo compactado. Sendo assim, ficaram apenas três níveis em profundidade para
132 coleta de resíduos, denominados de nível superior, intermediário e inferior onde cada nível
133 apresenta tres pontos de coleta, totalizando nove pontos para coleta dos resíduos (Figura 1).
134 Vale salientar que os pontos de coletas do nível superficial, foram desativados apenas para as
135 coletas, sendo que estes não foram removidos, permanecendo no biorreator estudado.

136
137
138

Figura 1 - Biorreator localizado em um terreno cedido pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



Fonte: Grupo de Geotecnia Ambiental (GGA)

139
140
141

142 A identificação dos fungos filamentosos foi feita através de um convênio institucional
143 entre a Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), através do laboratório de
144 Geotecnia Ambiental e com o laboratório de fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa
145 Agropecuária, (EMBRAPA) localizada na cidade de Campina Grande, no Estado da Paraíba-
146 Brasil.

147

148 IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA

149

150 O processo de identificação aconteceu entre os meses de abril a agosto de 2014. As
151 culturas que estavam isoladas e preservadas pelo método CASTELANI (1967) foram
152 reativadas a 25 °C em placas de Petri utilizando o meio de cultura Batata Dextrose Ágar
153 (BDA). Para a inoculação dos fungos nas placas contendo o meio de cultura, foi utilizado um
154 fragmento da colônia (com o auxílio de uma alça de platina) que foi introduzido no centro da
155 placa.

156

157 Após 5 e 7 dias de crescimento foi efetuado um registro fotográfico (Máquina
158 Cybershot 14.1 Megapixels, Sony, Tokyo, Japan) das características macroscópicas
159 observadas. Características como borda e tamanho das colônias, medição do seu diâmetro em
mm, cor e textura das colônias, também foram observadas.

160 Para facilitar, os fungos foram identificados primeiramente a nível de gênero
161 utilizando o meio de cultura BDA, para que depois pudesse se chegar até a espécie.

162

163 **IDENTIFICAÇÃO MICROSCÓPICA**

164

165 A identificação microscópica para *Aspergillus* e *Penicillium* foi feita conforme KLICH
166 (2002) e PITT (2000). Passado o período de crescimento, os isolados fúngicos foram
167 inoculados em novas placas de Petri contendo os meios de cultura padronizados, Czapeck
168 Yeast Agar (CYA), incubados às temperaturas de 25 °C e 37 °C por 7 dias e Malt Extract
169 Agar (MEA) a 25 °C por 7 dias conforme os manuais de identificação.

170

171 **CYA (Composição do meio de cultura)**

172 NaNO₃ - 3 g

173 KCl - 0,5 g

174 MgSO₄.7H₂O - 0,01 g

175 FeSO₄.7H₂O - 0,01 g

176 CuSO₄.5H₂O - 0,005 g

177 ZnSO₄.7H₂O - 0.1g

178 K₂HPO₄ - 1 g

179 Extrato de levedura - 5 g

180 Sacarose - 30 g

181 Ágar - 20 g

182 Água destilada - 1000 ml

183

184 **MEA (Composição do meio de cultura)**

185 Extrato de malte - 25 g

186 Ágar - 20 g

187 Água destilada - 1000 ml

188

189 Para o preparo dos meios de cultura, os reagentes foram dissolvidos em água destilada
190 dentro de um béquer. Em seguida o béquer foi levado para o micro-ondas (cerca de 6
191 minutos) para realizar a fusão do ágar com os demais reagentes. Em seguida, o meio de
192 cultura foi distribuído em Erlenmeyeres e levados para a autoclave a 121°C por 15 minutos.

193 Para os demais gêneros encontrados, a identificação foi realizada utilizando-se apenas
194 o meio de cultura BDA; não foi necessário fazer suspensões e o fragmento da colônia foi
195 colocado apenas no centro da placa.

196 Existem diversos métodos para realização de preparações microscópicas para
197 visualização ao microscópio, no entanto, o mais comum e utilizado nesta pesquisa, consiste
198 em retirar do rebordo da colônia uma amostra e colocá-la numa gota de azul de algodão (1g/L
199 em ácido láctico 88%), entre lâmina e lamínula.

200

201 **IDENTIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DE *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM***

202

203 Para os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, foi preparada uma
204 suspensão de conídios a partir de cada cepa em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de Agar-
205 agar e 0,05% de Tween 80TM, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos, distribuída
206 em tubos Eppendorf (PITT; HOCKING, 1999). Em seguida, foi introduzida a agulha de
207 platina na suspensão de conídios e transferiu-se para três pontos equidistantes nas placas
208 contendo o meio de cultura CYA (incubadas a 25 °C e 37 °C) e MEA (incubadas a 25 °C).

209

210 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

211

212 **IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA**

213 Analisando as características morfológicas dos fungos foram identificados 77 isolados,
214 conforme o Quadro 1.

215

Quadro 1: Identificação dos fungos encontrados

1. <i>A. niger</i>	34. <i>Dactylaria</i> sp.	67. <i>A. flavus</i>
2. <i>Cladosporium</i> sp.	35. <i>Scedosporium</i> sp.	68. Descartado
3. <i>Graphium</i> sp.	36. <i>Curvularia</i> sp.	69. <i>A. candidus</i>
4. Descartado	37. <i>A. sydowii</i>	70. <i>Scedosporium</i> sp.
5. <i>A. clavatus</i>	38. <i>Paecilomyces</i> sp.	71. <i>A. sydowii</i>
6. <i>A. parasiticus</i>	39. <i>A. flavus</i>	72. <i>A. terreus</i>
7. Descartado	40. Descartado	73. <i>A. sydowii</i>
8. <i>Scedosporium</i> sp.	41. <i>A. fumigatus</i>	74. <i>Scytalidium</i> sp.
9. <i>Paecilomyces</i> sp.	42. <i>Basipetospora</i> sp.	75. <i>A. sydowii</i>
10. Descartado	43. Descartado	76. <i>A. terreus</i>
11. <i>Paecilomyces</i> sp.	44. Descartado	77. <i>mycelia sterilia</i>
12. <i>Paecilomyces</i> sp.	45. <i>A. fumigatus</i>	78. <i>P. commune</i>
13. <i>A. fumigatus</i>	46. <i>A. ochraceus</i>	79. <i>A. fumigatus</i>
14. <i>Paecilomyces</i> sp.	47. <i>Paecilomyces</i> sp.	80. <i>A. fumigatus</i>
15. <i>A. flavus</i>	48. <i>Paecilomyces</i> sp.	81. <i>A. fumigatus</i>
16. <i>Basipetospora</i> sp.	49. <i>Scedosporium</i> sp.	82. Descartado
17. <i>Sarophorum</i> sp.	50. <i>Scedosporium</i> sp.	83. <i>Scedosporium</i> sp.
18. <i>A. niger</i>	51. <i>P. purpurogenum</i>	84. Descartado
19. <i>A. niger</i>	52. Descartado	85. <i>A. sydowii</i>
20. <i>A. fumigatus</i>	53. Descartado	86. <i>Scedosporium</i> sp.
21. Descartado	54. <i>A. fumigatus</i>	87. <i>A. candidus</i>
22. <i>A. fumigatus</i>	55. <i>A. fumigatus</i>	88. <i>A. fumigatus</i>
23. <i>A. flavus</i>	56. <i>mycelia sterilia</i>	89. <i>mycelia sterilia</i>
24. <i>A. ochraceus</i>	57. <i>A. terreus</i>	90. Descartado
25. Descartado	58. <i>A. fumigatus</i>	91. <i>Scedosporium</i> sp.
26. <i>Scedosporium</i> sp.	59. <i>A. fumigatus</i>	92. <i>A. ochraceus</i>
27. <i>P. spinulosum</i>	60. <i>A. terreus</i>	93. <i>A. niger</i>
28. <i>A. flavus</i>	61. <i>A. flavus</i>	94. <i>A. fumigatus</i>
29. <i>A. fumigatus</i>	62. <i>A. flavus</i>	95. <i>P. purpurogenum</i>
30. <i>Paecilomyces</i> sp.	63. <i>A. flavus</i>	96. <i>A. flavus</i>
31. Descartado	64. <i>A. flavus</i>	97. Descartado
32. <i>P. citrinum</i>	65. <i>A. flavus</i>	98. Descartado
33. <i>A. sydowii</i>	66. <i>A. flavus</i>	

216

217

218

219

220

221

222

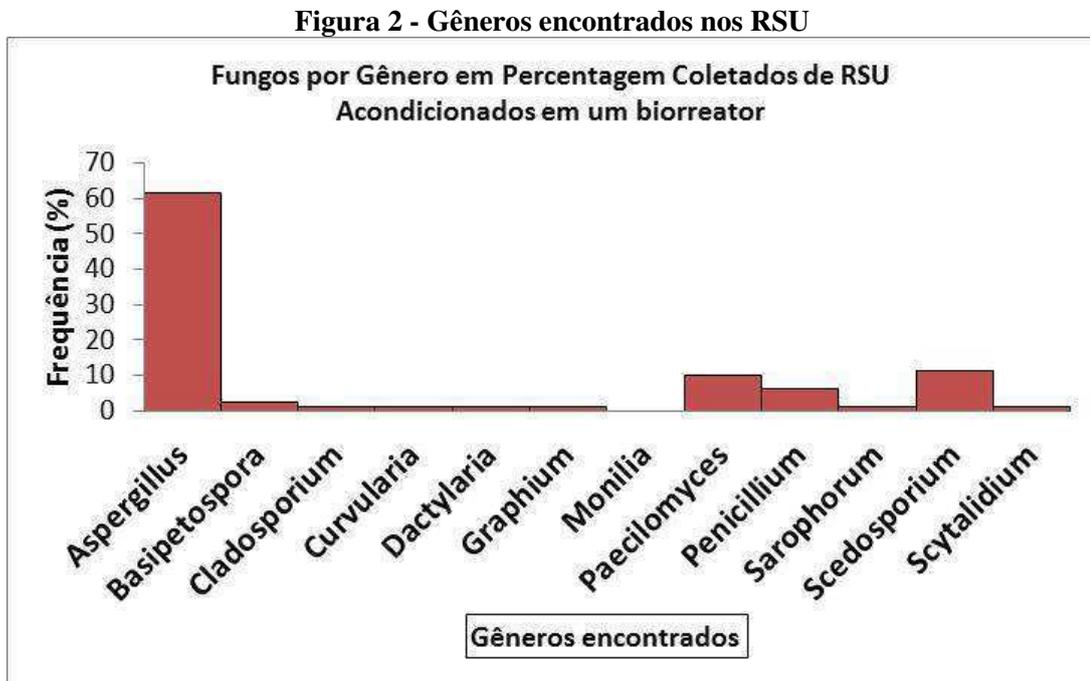
223

No Quadro 1 pode-se observar que dentro dos 77 isolados fúngicos, foram encontrados 11 gêneros (Figura 2), onde o gênero *Aspergillus* foi o que apareceu em maior frequência e também com o maior número de espécies encontradas. Isto já era esperado, pois fungos do gênero *Aspergillus* são cosmopolitas e podem ser encontrados em diversos tipos de substratos, principalmente aqueles que são ricos em matéria orgânica, como é o caso do biorreator estudado que apresenta um percentual de 47% de material orgânico. Vale salientar

224 também que alguns fungos foram descartados, pois se contaminaram durante o processo,
 225 impedindo assim que fosse feita a identificação.

226 A Figura 2 mostra os gêneros fúngicos encontrados na massa de RSU do biorreator
 227 estudado.

228
 229



230
 231

232 Dos fungos isolados foram identificados 12 gêneros. Os fungos pertencentes ao gênero
 233 *Monilia*, não puderam ser identificados em nível de espécie por serem fitopatogênicos, sendo
 234 assim estes fungos não foram quantificados. Apesar de sua frequência não ter sido
 235 relativamente alta (11,5%), foi encontrado no interior da massa de resíduos o gênero
 236 *Scedosporium*. Este fato faz um alerta aos cuidados que se deve tomar com este tipo de
 237 material, pois *Scedosporium* é patogênico para humanos podendo até causar micoses
 238 profundas e também aponta um índice de contaminação presente neste resíduo, visto que
 239 fungos pertencentes a este gênero são encontrados em solos, águas e ambientes contaminados.
 240 Portanto os fungos fitopatogênicos e os associados a patologias humanas que foram
 241 encontrados neste estudo deverão ser alvos de estudos mais detalhados e precisos para evitar
 242 possíveis contaminações com riscos para saúde humana e ambiental.

243 O gênero dominante de acordo com o número de espécies encontradas foi *Aspergillus*
 244 (61,5%), com 48 isolados; este gênero foi encontrado em todas as amostras analisadas.
 245 Isolados de *Paecilomyces* (8 isolados) e *Penicillium* (5 isolados) que são mais frequentes em
 246 regiões onde predominam temperaturas baixas, também foram constatados, porém em menor
 247 frequência 10,25% e 6,41% respectivamente.

248 Este trabalho irá focar no gênero *Aspergillus*, visto que este foi o gênero mais
249 encontrado nesta pesquisa, quando analisado a sua frequência nos meses de monitoramento;
250 fungos pertencentes a este gênero são considerados cosmopolitas e amplamente distribuídos
251 na natureza. Algumas espécies de *Aspergillus* são economicamente importantes, pois,
252 algumas produzem micotoxinas.

253 Dentre os 48 isolados encontrados do gênero *Aspergillus*, 15 foram encontradas no
254 nível superior do biorreator, 19 no nível intermediário e 14 no nível inferior. O fato de ter
255 aparecido mais *Aspergillus* no nível intermediário pode ser explicado devido à camada
256 intermediária ser a que melhor representa o processo de biodegradação dentro do biorreator;
257 pois esta camada sofre pouca interferência do ambiente e das camadas adjacentes.

258

259 **GÊNERO ASPERGILLUS**

260

261 *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos economicamente mais importantes. Muitos
262 isolados são utilizados na produção de diversos produtos, porém algumas espécies são
263 consideradas patógenos oportunistas, entre as mais comuns encontram-se *Aspergillus flavus* e
264 *Aspergillus niger* (VARGA et al., 2004).

265 Para a identificação morfológica de isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* a
266 coloração das colônias pode representar um fator importante, pois permite a diferenciação das
267 diversas seções pertencentes ao gênero, facilitando posteriormente a identificação dos
268 isolados até espécies como podem ser observadas na Figura 3. Pois no meio ambiente ocorre
269 uma interação entre diversas espécies e nutrientes, podendo, por exemplo, modificar o
270 formato, a textura e a coloração de colônias (OGUNSEITAN, 2005).

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

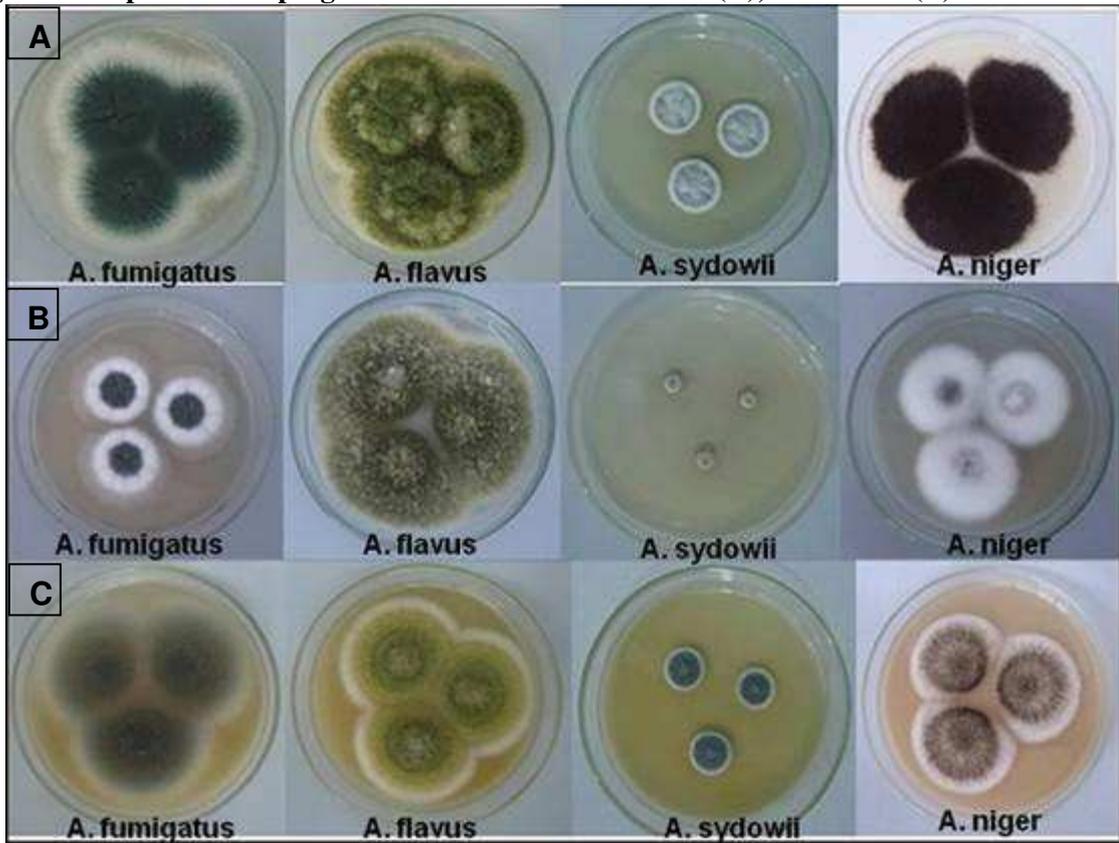
283

284

285

286

287 **Figura 3 - Espécies de *Aspergillus* cultivadas em CYA 25°C (A), CYA 37°C (B) e MEA 25°C (C)**



Fonte: Arquivo pessoal

288
289

290

291 Verificou-se na Figura 3 que a temperatura e o meio de cultura utilizado, não só
292 alterou a coloração da colônia, mas a sua morfologia e o tamanho.

293 Nesta pesquisa foram encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo,
294 cinza, preto e branco; onde estas tonalidades estão de acordo com a padronização de cores
295 referenciadas nos manuais utilizados, o que foi comprovado posteriormente pela análise
296 microscópica o que facilitou o processo de identificação.

297 Utilizando a identificação morfológica como ferramenta para este estudo, foram
298 encontradas 9 espécies para o gênero *Aspergillus* (*A. fumigatus*; *A. flavus*; *A. sydowii*; *A.*
299 *niger*; *A. terreus*; *A. ochraceus*; *A. candidus*; *A. parasiticus*; *A. clavatus*), onde a maioria das
300 espécies encontradas, é referida como isolados de solo.

301 Espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* são amplamente distribuídas e ocorre
302 em diversos substratos (DOMSCH et al. 1993; ELLIS 1971; RAPER & FENELL 1977). As
303 espécies *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* se destacaram neste estudo em relação à
304 sua ocorrência, sendo consideradas mais abundantes em relação ao número de isolados.

305 *Aspergillus flavus* (Figura 4) é relatado como patógeno oportunista, sapróbio e
306 amplamente distribuído na natureza (KLICH, 2002). O solo é a principal fonte de *Aspergillus*

307 *flavus* e de *Aspergillus fumigatus*. Um fator que pode justificar a ampla distribuição dessas
 308 espécies, é que elas podem estar relacionadas com a produção de numerosos conídios que são
 309 facilmente dispersos pelo ar (BARROS et al., 2005; HEDAYATI et al., 2007).

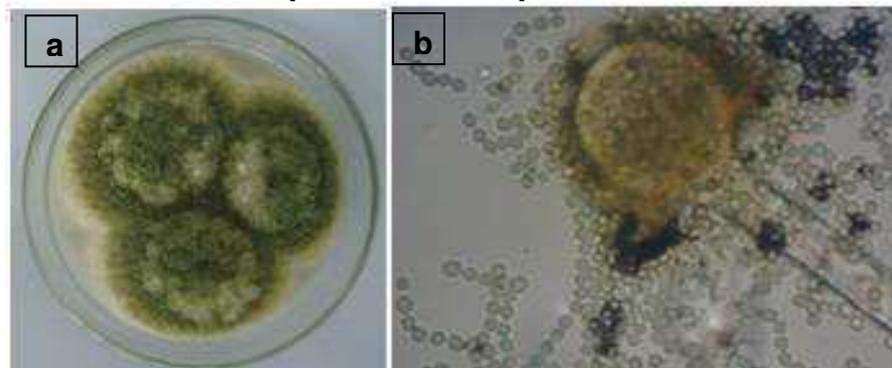
310 Espécies do gênero *Aspergillus* foram encontradas em todas as amostras de resíduos.
 311 Visto que este gênero tem como habitat natural o solo, isso justifica a presença desses fungos
 312 em aterros ou em biorreatores, já que em ambos são utilizados solos para a composição da
 313 camada de cobertura.

314 O biorreator estudado apresenta uma camada de cobertura de solo compactado e
 315 através de outros estudos, foi verificado que o solo dessa camada é carregado por todo o extrato
 316 de resíduos. Sendo assim este solo funciona como uma espécie de inóculo no interior da
 317 massa de resíduos.

318

319

320 **Figura 4 - Figura (a), espécie *Aspergillus flavus* identificada com base nas características**
 321 **morfológicas macroscópicas e microscópicas. *Aspergillus flavus* em CYA a 25° C, (b) estruturas**
 322 **microscópicas em microscopia de luz**



323

324

Fonte: Arquivo pessoal

325

326 Vale salientar também que, tanto *Aspergillus flavus* como *Aspergillus fumigatus*, são
 327 patógenos oportunistas, onde *Aspergillus fumigatus* é considerado um dos principais
 328 causadores de aspergiloses. FETTI (2014) em um trabalho utilizando fungos no processo de
 329 compostagem de resíduos observou que as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*
 330 foram comumente isoladas. Desta forma, os cuidados ao se manusear resíduos contendo estes
 331 microrganismos devem ser redobrados, evitando assim o desenvolvimento de doenças.

332

A espécie menos abundante encontrada para o gênero *Aspergillus* foi *Aspergillus*
 333 *clavatus* e *Aspergillus parasiticus*. Segundo FRAGA et al., 2008; GERBALDO et al., 2011
 334 estas espécies são encontradas frequentemente na agricultura e preferem substratos tais
 335 como: milho, amendoim e alguns tipos de sementes. Isto provavelmente ocorreu, pois talvez

336 estes substratos não estivessem presentes em quantidades significativas dentro da massa de
337 resíduos, dificultando assim o desenvolvimento destas espécies.

338 CONCLUSÕES

339

340 • A maioria dos fungos encontrados neste estudo foi identificada, mostrando que os
341 métodos escolhidos são eficazes para a identificação de fungos filamentosos encontrados em
342 RSU;

343

344 • Os fungos mostraram-se importantes degradadores da matéria orgânica, pois
345 sempre estiveram presentes em todo o tempo de monitoramento. E isso pode ser comprovado
346 pelo fato do gênero *Aspergillus* ter sido comumente encontrado em todas as camadas do
347 biorreator, tendo em vista que fungos pertencentes a este gênero são biodegradadores natos;

348

349 • Durante o processo de identificação, o gênero *Aspergillus* foi o que se mostrou
350 predominante. Isto já era esperado visto que estes fungos são comumente encontrados em
351 solos e o biorreator estudado apresenta uma camada de cobertura de solo compactado,
352 favorecendo assim o aparecimento destes fungos na massa de resíduos;

353

354 • Dentre os fungos identificados, encontrou-se *Scedosporium*, *A. flavus* e *A.*
355 *fumigatus* (patogênicos para humanos) e *Monilia* (fitopatogênico). Isso mostrou que os
356 resíduos podem oferecer riscos e que as pessoas que os manuseiam podem contrair doenças,
357 portanto devem ser redobrados os cuidados ao se manipular este tipo de material;

358

359 • Identificar fungos pode gerar informações importantes no que se refere a melhorar
360 sistemas degradativos em aterros de RSU.

361

REFERÊNCIAS

362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394

1. Barros G et al (2005) ***Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region.** Sclerotia production and toxigenic profile. Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford, v. 85, 2349–2353.
2. Domsch, KH, Gams W & Anderson, TH (1971) **Compendium of soil fungi.** v.I. San Francisco, Academic Press.1993. ELLIS, M.B. Dematiaceus Hyphomycetes. Kew, Commonwealth Mycologi Institute.
3. Fetti, GLR (2014) **Avaliação do efeito da inoculação de fungos termofílicos em pilhas de compostagem de lixo urbano.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 73p.
4. Gams W (2007) **Biodiversity of soil-inhabiting fungi.** Biodiversity and Conservation, London, v. 16, 69-72.
5. Hedayati MT et al (June 2007) ***Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer.** Microbiology, New York, v. 153, 1677-1692.
6. Raper KB & Fenell DI (1977) **The genus *Aspergillus*.** Malabar, Robert and Krieger Malabar.
7. Kirk O et al (2002) **Industrial enzyme and applications.** Current Opinion in Biotechnology, London, v. 13, 345-351.
8. Klich MA (2002) **Identification of common *Aspergillus* species.** The Netherlands: Centraal bureau voor Schimmelcultures. 116 p.
9. Moreira FMS, Siqueira JO (2002) **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: UFLA. 625 p.

- 395 10. Mueller GM et al (2004) **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods.**
396 Burlington: Elsevier Academic. 777 p.
397
- 398 11. Mueller GM, Schmit JP (2007) **Fungal biodiversity: what do we know? What can**
399 **we predict?** Biodiversity and Conservation, London, v. 16, n. 1/5.
400
- 401 12. Pitt JI (Dec. 2000) **Toxigenic fungi: which are important?** Medical Mycology,
402 Oxford, v. 38, n. 1, 17-22.
403
- 404 13. Pitt J I, Hocking AD (1999) **Fungi and food Spoilage.** London: Blackie Academic
405 and Professional. 593 p.
406
- 407 14. Samson RA, Varga J (2010) **Molecular systematics of *Aspergillus* and its**
408 **teleomorphs.** In: MASHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). *Aspergillus: molecular biology*
409 *and genomics.* London: Caister Academic. 19-40.
410
- 411 15. Schuster S et al (2002) **On the safety of *Aspergillus niger*: a review.** Applied
412 Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 59, 426-435.
413

CONCLUSÃO GERAL

- A presença dos fungos durante a investigação experimental deste trabalho confirma o relato da literatura técnica a respeito da potencialidade dos fungos no processo de biodegradação de RSU;
- Dos fungos encontrados neste estudo foram identificados (78%), mostrando que os métodos escolhidos são eficazes para a identificação de fungos filamentosos encontrados em RSU;
- O gênero *Aspergillus* foi o que se mostrou predominante em relação aos outros gêneros encontrados nos RSU da cidade de Campina Grande. Isso facilitou o processo de degradação dos RSU tendo em vista que estes fungos são biodegradadores natos e são encontrados em diversos tipos de substratos, assim como os resíduos presentes no biorreator estudado que apresenta uma composição bastante heterogênea.

REFERÊNCIAS

1. ALEXOPOULOS, C. J. ; MIMS, C. W. ; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996.
2. AIRES, K. O. **Monitoramento das Concentrações de Gases em uma Célula Experimental de Resíduos Sólidos Urbanos na Cidade de Campina Grande – PB**. 118p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 2013.
3. ALCÂNTARA, P. B. **Avaliação da influência da composição de resíduos sólidos urbanos no comportamento de aterros simulados**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). UFPE. Recife, 2007.
4. ARAÚJO, E. P. **Estudo do Comportamento de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Totais na Biodegradabilidade de Resíduos Sólidos Urbanos da Cidade de Campina Grande-PB**. 116p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Campina Grande, 2011.
5. BELLIS, T.; KERNAGHAN, G.; WIDDEN, P. **Plant community influences on soil microfungus assemblages in boreal mixed-wood forests**. *Mycologia*, New York, v. 99, n. 3, p. 356-367, Mar. 2007.
6. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Orientações técnicas para apresentação de projetos de resíduos sólidos urbanos**. 1ª reimpressão — Brasília: Funasa, 2006. 46 p.
7. BUÉE, M. et al. **Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community**. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v. 39, n. 8, p. 1947-1955, Aug. 2007.
8. CASSINI, S. T.; VOZOLLER, R. F.; PINTO, M. T. **Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do biogás**. Rio de Janeiro: ABES, RIMA. Capítulo 1, 13p. 2003.

9. CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact.** Boca Raton: CRC, 2004. 480p.
10. DONNISON, L. M. et al. **Management influences no soil microbial communities and their function in botanically diverse hay meadows of northern England and Wales.** Soil Biology and Biochemistry, Elmsford, v. 32, n. 2, p. 253-263, Feb. 2000.
11. DUARTE, K. L. S. **Interferências das condições ambientais e operacionais nas concentrações de biogás em biorreatores de bancada com resíduos sólidos.** 135p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 2014.
12. FARIAS, R. M. S; MONTEIRO, V. E. D.; **Estudo para estimativa da geração de biogás com base em parâmetros Físico-Químicos.** VIII Congresso De Iniciação Científica Da Universidade Federal De Campina Grande. Outubro de 2011.
13. FILTENBORG, O. et al. **Moulds and food spoilage.** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.33, p.85-102, 1996.
14. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 182p. 1996.
15. GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation,** London, v. 16, p. 69-72, 2007.
16. GARCEZ, L. R. **Estudo dos componentes tóxicos em um biorreator de resíduos sólidos urbanos da cidade de Campina Grande – PB.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental), Universidade Federal de Campina Grande, 2009.
17. GARCIA, E. S. **Biodiversity, biotechnology and health.** *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, v.11, n.3, p.495-500, jul.-set. 1995.

18. GOCK, M.A. et al. **Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi.** International Journal Food Microbiology, Amsterdam v.248, p. 11-19, 2003.
19. HAWKSWORTH, D. L. **The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited.** Mycological Research, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, Dec. 2001.
20. HAWKSWORTH, D. L. **The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation.** Mycological Research, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 641-655, June 1991.
21. IPT (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS). (2000) *Lixo municipal: Manual de gerenciamento integrado*. 2. ed. São Paulo. Brasil.
22. JOHN, C. E. **Implantação de um biorreator para estudo de resíduos sólidos urbanos: problemas, ajustes e soluções de laboratório.** 103p. Dissertação (Programa de pós-graduação em engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – 2004.
23. KIRK, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C. & Stalpers, J.A. Ainsworth & Bisby's. **Dictionary of the th Fungi.** 9 ed. CABI Bioscience, Egham. 2001.
24. LEITE, H. E. A. S. **Estudo do comportamento de aterros de RSU em um biorreator em escala experimental na cidade de Campina Grande-PB.** 220p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental), Centro de Tecnologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2008.
25. LEVINE, A. D.; et al. **Assessment of biogeochemical deposits in landfill leachate drainage systems.** Florida: University of South Florida, 2005.
26. MACHADO, A. P. S. **Uso de técnicas de detecção rápida de fungos filamentosos na água.** 2006. 64p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Escola de Engenharia da Universidade do Minho.

27. MEDEIROS, P. A.; CASTILHOS JUNIOR, A. B.; OLIVEIRA, J. C. S.; SOARES, S. R. **Geração de líquidos percolados em resíduos urbanos com cobertura permeável.** In: SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 6, 2002, Vitória. Rio de Janeiro: ABES, 2002. v. 6. p. 1-10.
28. MEDINA, A. et al. **Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*.** International Journal Food Microbiology, Amsterdam, v.108, p.196-203, 2006.
29. MEIRA, R. C. **Estudo biodegradativo dos resíduos sólidos urbanos da cidade de Campina Grande – PB em escala experimental.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental), Universidade Federal de Campina Grande, 2009.
30. MELO, M. C. **Uma análise de recalques associada à biodegradação no aterro de resíduos sólidos da Muribeca.** 141p. Dissertação (Mestrado em Ciência em Engenharia Civil), Centro de Tecnologia e Geociências. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
31. MELO, M. C. **Influência da Matéria Orgânica nos Recalques de Resíduos Sólidos Urbanos Aterrados.** 148p. Tese (Tese de doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), Centro de Ciências e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2011.
32. MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: UFLA, 2002. 625 p.
33. PATERSON, R. R. M. **Fungal enzyme inhibitors as pharmaceuticals, toxins, and scourge of PCR.** Current Enzyme Inhibition, Hilversum, v. 4, n. 1, p. 46-59, Mar. 2008.
34. PEREIRA, F. T. G.; LEITE, H. E. A.; GARCEZ, L. R.; ARAUJO, E. P.; MELO, M. C.; MONTEIRO, V. E. D. **Composição Gravimétrica dos Resíduos Sólidos**

- Urbanos da Cidade de Campina Grande-PB.** In: SINRES - 2º Simpósio Nordeste de Resíduos Sólidos. 2010.
35. PHILIPPI JR., Arlindo; AGUIAR, Alexandre O. **Resíduos sólidos: características e gerenciamento.** In: _____. Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável. Barueri (SP): Manole, 2005 (Coleção Ambiental, v. 2).
36. RIBEIRO, L. S. **Estudo da degradação dos resíduos sólidos urbanos através dos parâmetros físicos e físico- químicos em um biorreator de escala experimental.** 2012. 136 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.
37. RODRIGUES, M. C.. *Tratamento Eletrolítico de Lixiviado de Aterro.* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Florianópolis. SC. Brasil. 2007.
38. RUSSO, M. *Avaliação dos processos de transformação de resíduos sólidos urbanos em aterro sanitário.* Doutorado em Engenharia Civil. Universidade do Minho. Escola de Engenharia. Braga. Portugal. 2005.
39. SANTOS, V. C. **Projeto, Construção e Instrumentação de um Lisímetro em Escala de Laboratório para Estudos em Resíduos Sólidos.** 106p. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental). Faculdade de Engenharia e Arquitetura. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2010.
40. SCHUSTER, S. et al. **On the safety of *Aspergillus niger*: a review.** Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 59, p. 426-435, 2002.
41. SILVA, A. S. **Avaliação da Toxicidade dos Resíduos Sólidos Urbanos da Cidade de Campina Grande – PB.** 2012. 139 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2012.
42. SIQUEIRA, M. M; Maria S. Moraes – **Saúde Coletiva, resíduos sólidos urbanos e os catadores de lixo** – Revista Ciência e saúde coletiva, 2009.

43. TANIWAKI, M.H. **Meios de cultura para contagem de fungos em alimentos.** Boletim SBCTA, Campinas, v.30, n.2, p.132-141, 1996.
44. YOUCAI, Z.; LUOCHUN, W.; RENHUA, H.; DIMIN, X.; GUOWEI, G. **A comparison of refuse attenuation in laboratory and field scale lysimeters.** Waste Management, v. 22, n.1, p. 29-35, 2002.
45. ZHONG, W. H.; CAI, Z. C. **Methods for studying soil microbial diversity.** Chinese Journal of Applied Ecology, Beijing, v. 15, n. 5, p. 899-904, 2004.