



**AVALIAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE
FUNGOS ANAERÓBIOS CELULOLÍTICOS A PARTIR DE
AMOSTRAS PROVENIENTES DE DOIS ECOSISTEMAS
DISTINTOS: RÚMEN E ATERRO SANITÁRIO.**

NEIDE PESSIN

Orientador: JURANDYR POVINELLI

DEDALUS - Acervo - EESC



31100013597

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em Engenharia
Civil, área de Hidráulica e Saneamento.

**São Carlos
Estado de São Paulo
Março, 1997**



Class. TESE - EESC

Área: Hidráulica e Saneamento

Cutt. 4429

31100013597

Tombo T091/97

st 0747767

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC-USP

P475a Pessin, Neide
Avaliação de uma metodologia para obtenção de fungos
anaeróbios celulolíticos, a partir de amostras
provenientes de dois ecossistemas distintos : rúmen e
aterro sanitário / Neide Pessin. -- São Carlos, 1997.

Dissertação (Mestrado). -- Escola de Engenharia
de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1997.

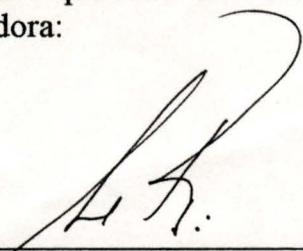
Área: Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Dr. Jurandyr Povinelli.

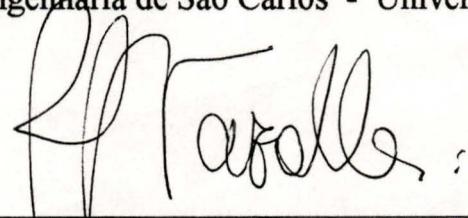
1. Fungos anaeróbios. 2. Microbiota anaeróbia.
3. Aterro sanitário. 4. Degradação de resíduos.
5. Resíduos celulósicos. I. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

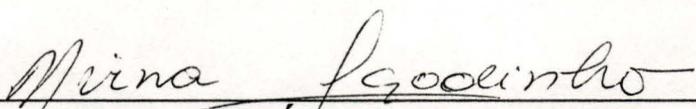
Dissertação defendida e aprovada em 12-3-1997
pela Comissão Julgadora:



Prof. Titular **JURANDYR POVINELLI (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



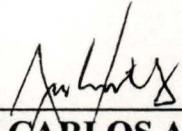
Profª. Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



Profª. Doutora **MIRNA JANUÁRIA LEAL GODINHO**
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)



Prof. Assoc. **EDUARDO CLETO PIRES**
Coordenador da Área de Hidráulica e Saneamento



JOSE CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA:

Em especial, ao meu amigo e esposo Ivandro pelo apoio e incentivo em todos os momentos desta caminhada....

Ao querido amigo Robinson: tua luz permanecerá entre nós, juntamente com teu exemplo de ser humano maravilhoso que és....fostes...

...e a todos aqueles que de alguma maneira acreditaram em mim...

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Jurandiy Povinelli pela orientação e apoio.
- À Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller pelo estímulo, amizade e valiosas contribuições dispensadas durante a realização deste trabalho.
- Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - USP pelo apoio científico.
- À Universidade de Caxias do Sul, em especial ao Grupo de Resíduos Sólidos e ao Departamento de Engenharia Química, por tornarem possível a execução de parte deste trabalho.
- Às colegas, Cláudia Echevengúá Teixeira, Isalmar Brustolin, Suzana Maria De Conto Mandelli e Vânia Schneider pela permanente colaboração.
- Às queridas bolsitas Marcia Telh e Carine Picolo de Souza pelo apoio laboratorial.
- À “super amiga” Suely por todos os momentos divididos: sempre estás comigo...
- Aos amigos e colegas de São Carlos: Jane, Cláudia, Flávia, Luiz Daniel, Bernardete, Deisa, Luciana, entre outros que, proporcionaram momentos de companherismo.
- Ao Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul pelo auxílio nas análises microscópicas.
- A CAPES, pelas concessão de bolsa de estudos, nível de mestrado.
- A todos que tiveram participação direta ou indireta neste trabalho, e àqueles que pude contar nos diferentes momentos dos últimos anos, ou seja, aos verdadeiros amigos.....

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1. Material Lignocelulósicos e Degradação Microbiana.....	8
3.2. Degradação da Celulose: ação do complexo celulase.....	12
3.3. Os Fungos.....	18
3.3.1. Características gerais e crescimento.....	18
3.3.2. Morfologia geral e reprodução.....	19
3.3.3. Classificação geral.....	26
3.4. Fungos Anaeróbios Celulolíticos.....	35
3.4.1. Digestão anaeróbia no rúmen.....	35
3.4.2. Ciclo de vida dos fungos anaeróbios.....	41
3.4.3. Métodos e meios de cultura para isolamento de fungos anaeróbios de rúmen.....	46
3.4.4. Metabolismo e produção de enzimas por fungos anaeróbios.....	49
3.5. Fundamentos da Degradação de Resíduos Orgânicos em Aterros Sanitários.....	51
4. METODOLOGIA.....	67
4.1. Equipamentos.....	67
4.2. Vidrarias e Outros Materias.....	68
4.3. Técnicas para Manipulação de Anaeróbios Estritos.....	69
4.4. Preparo dos Meios de Cultivo de Microrganismos.....	72
4.4.1. Meio básico de enriquecimento para cultivo de fungos anaeróbios Celulolíticos.....	72
4.4.2. Meio semi-sólido para isolamento de culturas de fungos anaeróbios celulolíticos.....	76

4.5. Soluções Estoques dos Meios de Cultura.....	78
4.5.1. Solução redutora de cisteína-sulfeto.....	78
4.5.2. Solução de carbonato de sódio 8%.....	79
4.5.3. Solução de resazurina 0,1%.....	79
4.5.4. Solução mineral I e II.....	80
4.5.5. Solução de solubilização.....	81
4.5.6. Solução de antibióticos.....	81
4.5.7. Extrato de fluido de rúmen.....	82
4.5.8. Extrato preparado a partir de amostras de resíduos sólidos aterrados...	83
4.6. Origem e Preparo dos Inóculos.....	84
4.6.1. Inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino.....	84
4.6.2. Inóculo proveniente da solubilização de amostras de resíduos sólidos aterrados.....	84
4.7. Caracterização dos Inóculos.....	87
4.7.1. Amostra proveniente do conteúdo ruminal.....	87
4.7.2. Amostra de resíduo aterrado.....	87
4.7.2.1. Composição gravimétrica dos resíduos.....	88
4.7.2.2. Determinação do teor de umidade.....	98
4.7.2.3. Determinação do teor de sólidos voláteis e não-voláteis.....	89
4.7.2.4. Determinação da concentração de metais.....	90
4.8. Procedimentos de Execução dos Ensaios de Enriquecimento.....	90
4.8.1. Enriquecimentos de culturas a partir do inóculo obtido do conteúdo ruminal de bovino.....	90
4.8.2. Enriquecimento das culturas a partir do inóculo proveniente da solubilização de amostras de resíduos sólidos aterrados.....	94
4.9. Ensaios de Isolamento de Fungos Anaeróbios.....	97
4.9.1. Isolamento de culturas a partir do inóculo obtido do conteúdo ruminal de bovino.....	97
4.10. Procedimentos para análise microscópica de amostras.....	98
5. RESULTADOS.....	97
5.1. Ensaios realizados a partir do inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino.....	99
5.1.1. Caracterização microscópica do inóculo.....	100
5.1.2. Ensaios de enriquecimento com inóculo proveniente de rúmen bovino.....	101
5.1.3. Ensaios de isolamento com inóculo proveniente de rúmen de bovino.....	105
5.2. Ensaios realizados a partir do inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado.....	112
5.2.1. Caracterização físico-química das amostras coletadas.....	112
5.2.2. Ensaios de enriquecimento com inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado.....	116
5.2.3. Ensaios de isolamento com inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado.....	124
	125

6. DISCUSSÃO.....	
6.1. Ensaio realizado a partir do inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino.....	127
6.1.1. Caracterização do inóculo por análises microscópicas.....	128
6.1.2. Ensaio de enriquecimento.....	130
6.1.3. Ensaio de isolamento.....	133
6.2. Ensaio realizado a partir do inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado.....	138
6.2.1. Caracterização físico-química de amostras coletadas.....	140
6.2.2. Ensaio de enriquecimento.....	146
6.3. Importância do presente trabalho para a microbiologia e saneamento ambiental.....	150
7. CONCLUSÕES.....	153
8. RECOMENDAÇÕES.....	155
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes da madeira, incluindo a estrutura química da lignina, celulose e produtos da hidrólise, celobiose e glicose.....	10
Figura 2	Esquema simplificado do processo de hidrólise ácida da celulose.....	14
Figura 3	Mecanismos de ação do complexo celulose.....	14
Figura 4	Estruturas somáticas e reprodutivas de diferentes grupos de fungos.....	24
Figura 5	Esquema sistemático da Divisão Eumycota e suas respectivas subdivisões.....	27
Figura 6	Ciclo de vida de <i>Chytrium hyalinus</i>	30
Figura 7	Ciclo de vida de <i>Allomyces macrogynus</i>	31
Figura 8	Chave taxonômica para a Classe Chytridiomycetes.....	33
Figura 9	Esquema do sistema digestivo de animais ruminantes.....	37
Figura 10	Principais reações que ocorrem durante a digestão do alimento no rúmen.....	38
Figura 11	Esquema da digestão anaeróbia e fluxo de substrato nos sistemas anaeróbio de degradação.....	40
Figura 12	Ciclo de vida dos fungos anaeróbios de rúmen.....	44
Figura 13	Etapas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.....	54
Figura 14	Esquema representativo do processo de degradação de compostos orgânicos em aterros sanitários.....	58
Figura 15	Degradação das frações orgânicas e inorgânicas dos resíduos domésticos em aterro sanitário.....	59

Figura 16	Caracterização geral da degradação dos resíduos em aterro sanitário, com recirculação de chorume.....	65
Figura 17	Bancada para manipulação de microrganismos anaeróbios - Laboratório de Saneamento/DENQ-Universidade de Caxias do Sul.....	71
Figura 18	Sistema de distribuição simultânea de gases - coluna redutora e bomba vácuo - Laboratório de Saneamento/DENQ-Universidade de Caxias do Sul.....	71
Figura 19	Introdução de fluxo de gás no meio de cultura, através da utilização de difusores de vidro.....	74
Figura 20	Introdução do gás nos frascos tipo "antibiótico" contendo meio de cultura.....	75
Figura 21	Lacreador de frascos tipo "antibiótico" - fixação do lacre de alumínio nos frascos.....	76
Figura 22	Frascos tipo "soro" utilizados na fase de enriquecimento I das amostras estudadas- Frasco 01: inóculo ruminal solubilizado. Frasco 02: meio de cultura inoculado.....	92
Figura 23	Frascos tipo "ensaio" com lacre de alumínio, utilizados na fase de enriquecimento II para as amostras provenientes do rúmen....	92
Figura 24	Representação esquemática dos ensaios desenvolvidos a partir da coleta de amostras do conteúdo ruminal de bovino.....	93
Figura 25	Representação esquemática dos ensaios desenvolvidos a partir de amostras de resíduo aterrado.....	96
Figura 26	Estruturas celulares encontradas no inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino.....	101
Figura 27	Frasco correspondente ao ensaio de enriquecimento I - Crescimento fúngico sobre a superfície do meio líquido.....	104
Figura 28	Crescimento fúngico ocorrido sob a camada de celulose nos frascos correspondentes a fase de enriquecimento II.....	104
Figura 29	Crescimento fúngico ocorrido sobre meio semi-sólido, nos ensaios de isolamento com inóculo proveniente dos ensaios da fase de enriquecimento II.....	106

Figura 30	Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - nove dias de incubação(a). / (objetiva 40 e ocular 10).....	107
Figura 31	Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - nove dias de incubação(b)./(objetiva 40 e ocular 10).....	108
Figura 32	Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - nove dias de incubação(c). / (objetiva 40 e ocular 10).....	108
Figura 33	Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - treze dias de incubação(a). / (objetiva 40 e ocular 10).....	109
Figura 34	Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - treze dias de incubação(b) / (objetiva 40 e ocular 10).....	109
Figura 35	Estrutura detectada após dois dias de incubação nos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - culturas líquidas (objetiva 40 e ocular 10).....	110
Figura 36	Estrutura detectada após cinco dias de incubação nos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - culturas líquidas (objetiva 40 e ocular 10).....	111
Figura 37	Estrutura detectada após nove dias de incubação nos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal. (objetiva 40 e ocular 10).....	111
Figura 38	Frasco correspondente a fase de enriquecimento I com inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado.....	120
Figura 39	Cultivos correspondentes a fase de enriquecimento II com inóculo proveniente dos frascos da fase de enriquecimento I a partir de inóculo de resíduo aterrado - meio de cultura adquiriu coloração amarelada após vinte dias de incubação (amostras C2, H4 e D2).....	123

Figura 40	Frascos correspondentes a fase de enriquecimento II inoculados com amostras dos frascos da fase de enriquecimento I a partir do inóculo de resíduo aterrado - meio de cultura não sofreu mudança de coloração após vinte dias de incubação (amostras A1, B1 e F3).....	123
Figura 41	Estruturas de crescimento e reprodução típicas da Classe Chytridiomycetes.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Especificidade do substrato relacionado aos componentes enzimáticos do complexo de celulase.....	17
Tabela 2	Classificação e algumas características dos principais grupos de fungos.....	25
Tabela 3	Características gerais das espécies de fungos anaeróbios de rúmen.....	45
Tabela 4	Considerações de cultivos e composição dos meios de cultura utilizados em ensaios de isolamento de fungos anaeróbios de rúmen.....	47
Tabela 5	Amostragem de resíduo aterrado (inóculo).....	85
Tabela 6	Ensaio realizado a partir dos inóculos utilizados neste estudo.....	100
Tabela 7	Alterações das culturas nos ensaios de enriquecimento I e II, realizados com inóculo proveniente do conteúdo ruminal, observadas ao longo do período de incubação.....	103
Tabela 8	Ensaio de isolamento realizado após os subcultivos correspondentes ao enriquecimento I e II, com inóculo proveniente do conteúdo ruminal.....	105
Tabela 9	Análises físico-química das amostras coletadas (inóculos).....	113
Tabela 10	Concentrações de metais obtidas a partir do teste de lixiviação nas amostras de resíduo sólido aterrado.....	114
Tabela 11	Concentrações de metais obtidas a partir do teste de solubilização nas amostras de resíduo sólido aterrado	115
Tabela 12	Alterações macroscópicas das culturas após o subcultivo correspondente ao enriquecimento I com amostras de resíduo sólido aterrado, ao longo do período de incubação.....	117
Tabela 13	Características das culturas após o subcultivo correspondente ao enriquecimento II com amostras de resíduo sólido aterrado, ao longo do período de incubação.....	121

RESUMO

PESSIN, N. Avaliação de uma metodologia para obtenção de fungos anaeróbios celulolíticos a partir de amostras provenientes de dois ecossistemas distintos: rúmen e aterro. São Carlos, 1997. 168 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

O presente trabalho visou avaliar uma metodologia para obtenção de fungos anaeróbios celulolíticos a partir de amostras provenientes de ecossistemas anaeróbios. Neste sentido, foram estudados inóculos de dois sistemas, um de procedência do conteúdo ruminal de bovino, e outro procedente de amostras de resíduo sólido aterrado. As atividades relacionadas com o estudo do inóculo ruminal foram desenvolvidas no Laboratório de Processos Anaeróbios-SHS-EESC-USP, a partir da coleta de amostras do rúmen de um animal bovino abatido em Araraquara-SP. As amostras de resíduo sólido aterrado foram obtidas no aterro sanitário de São Giácomo no município de Caxias do Sul, sendo que as atividades envolvendo este inóculo foram desenvolvidas no Laboratório de Saneamento-DENQ da Universidade de Caxias do Sul. Através dos ensaios de enriquecimento e isolamento realizados com amostras provenientes do conteúdo ruminal de bovino verificou-se o desenvolvimento de fungos anaeróbios, nas condições empregadas neste estudo. Nestes ensaios, foram detectadas estruturas de crescimento de fungos anaeróbios semelhantes ao gênero *Neocallimastix sp.* Nos cultivos realizados a partir do enriquecimento de amostras de resíduo sólido aterrado, após sua solubilização, não foi detectado o desenvolvimento de fungos anaeróbios. Este fato pode estar relacionado a inúmeras interferências, entre as quais, a presença de substâncias tóxicas no aterro sanitário, grau de umidade, tempo de aterramento e número de amostras estudadas.

Palavras-chaves: fungos anaeróbios, rúmen, aterro sanitário, degradação de resíduos celulósicos.

ABSTRACT

PESSIN, N. Evaluation of a methodology for obtaining cellulolytic anaerobic fungi from samples derived from anaerobic microbial ecosystems: the rumen and landfill São Carlos, 1997. 168 p. Dissertation (Master Degree) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The aim of this dissertation was to evaluate a methodology for obtaining cellulolytic anaerobic fungi from samples derived from anaerobic microbial ecosystems. For that, inocula from two systems were obtained: one from rumen of bovine, and the other from solid waste filling. Activities related to the study of the inoculum of rumen were developed at the Laboratory of Anaerobic Processes - SHS-EESC-USP, from sampling of rumen of a bovine slaughtered in Araraquara - SP. Samples of solid waste were obtained from São Giacomino landfill in Caxias do Sul, and activities involving this inoculum were performed at the Sanitation Laboratory-DENQ at Universidade de Caxias do Sul. By means of enrichment and isolation experiments performed in rumen samples, it was possible to detect the development of anaerobic fungi in the conditions employed in this study. In these experiments, growth structures of anaerobic fungi similar to *Neocallimastix sp* were detected, described in literature (ORPIN, 1975; BARR et al., 1989). On the other hand, in cultures of enrichment of solid waste filling samples after solubilization, the development of anaerobic fungi was not detected. This fact may be related to different types of interference, among which it was possible to indicate the presence of toxic substances in the landfill, humidity rate, filling time and number of samples analyzed.

Key-words: anaerobic fungi, rumen, sanitary landfill, cellulosic waste degradation.

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos sólidos produzidos no âmbito urbano e rural caracterizam-se como o resultado diário da atividade humana. O processo de produção de resíduos nos centros urbanos é considerado um fenômeno irreversível, pois os mecanismos intrínsecos ao processo de geração estão intimamente associados aos fatores propulsores do desenvolvimento urbano, como o aumento populacional e o intenso processo de industrialização da sociedade em geral. Deve-se considerar que o aumento populacional se reflete diretamente na ativação da produção industrial, e a geração de resíduos é inevitavelmente incrementada. Com isto, o percentual de produção *per capita* de resíduos sofre um considerável acréscimo, além de ser contínuo e crescente, devido à constante produção de bens de consumo exigidos pelos padrões de vida atuais.

Assim, a geração e a disposição inadequada de resíduos sólidos têm conduzido a sérios problemas de degradação ambiental, e os impactos decorrentes da falta de manejo, tratamento e destino final levam a refletir e a buscar tecnologias e alternativas para a minimização destes efeitos.

Dentro deste contexto, tem surgido inúmeras alternativas para tratar e dispor os resíduos sólidos urbanos, sendo que o conjunto de tais alternativas constituirão os sistemas integrados de tratamento de resíduos, normalmente concebidos para a realidade econômico-social do local. Como formas ou sistemas de tratamento e de disposição final de resíduos pode-se citar: o tratamento térmico que inclui a pirólise e a incineração; a compostagem; os aterros sanitários, e os reatores de biodigestão anaeróbia.

Cabe ressaltar, que as alternativas tecnológicas de tratamento e disposição final de resíduos sólidos urbanos acima citadas, não se constituem, isoladamente, em sistemas eficientes para a solução da problemática acerca dos resíduos gerados no meio urbano e rural. Sabe-se que os resíduos urbanos se caracterizam pela heterogeneidade e, portanto, é viável optar por um sistema integrado de tratamento e disposição final dos mesmos, precedido de um programa educacional com vistas a sistematizar a fonte geradora desses resíduos. Este programa pode ser caracterizado como um amplo plano de ação que visa incentivar e esclarecer a população a respeito da importância da segregação na fonte, coleta diferenciada dos resíduos, reciclagem dos materiais e reincorporação dos materiais ao processo produtivo. Assim, deve-se observar que além do investimento tecnológico, as soluções relacionadas à problemática dos resíduos sólidos, não deverão prescindir de programas educacionais à comunidade, que visem, de um modo geral, contribuir para a implantação e viabilização da tecnologia utilizada, tendo como ideal a minimização dos resíduos, a maximização das oportunidades para a reciclagem dos mesmos e a reutilização de matéria-prima.

No Brasil, os aterros sanitários caracterizam-se como o método de disposição e tratamento de resíduos mais utilizado, devido aos inúmeros fatores intrínsecos ao próprio sistema. O aterro sanitário pode ser definido como uma forma de disposição de resíduos sólidos, onde os mesmos são intercalados com camada de terra e compactados. Em decorrência da degradação biológica e química, bem como da lixiviação dos materiais dispostos, o aterro sanitário deve ser constituído de sistemas de drenagem e de tratamento dos líquidos percolados e dos gases gerados no processo.

Nos aterros sanitários o processo biológico de digestão anaeróbia prevalece como forma de degradação dos resíduos dispostos. Segundo GIJZEN (1986), a digestão anaeróbia de resíduos orgânicos pode ser considerada o método mais viável como solução para o tratamento dos resíduos sólidos gerados pela sociedade, e como possível fonte alternativa de energia, devido ao biogás formado pelo processo.

Em suma, o aterro sanitário nada mais é que um ecossistema anaeróbio, no qual ocorrem interações complexas entre microrganismos de diferentes espécies. Nos estudos sobre microbiologia da digestão anaeróbia, estas interações têm sido amplamente observadas através do acompanhamento de biodigestores, sedimentos provenientes de regiões bentônicas, lacustres e marinhas, e, sobretudo, no trato

gastro-intestinal de animais ruminantes (KIRSCH, 1969; TOERIEN, 1970; ZEIKUS E WINFREY, 1976; HUNGATE, 1982; ZINDER, 1984; LIN et al. 1985; AKIN, 1986). Nestes habitats, o resultado de todas as interações complexas de ordem bioquímica consiste na conversão total de sólidos orgânicos biodegradáveis a metano e a dióxido de carbono.

Nos sistemas tecnológicos de tratamento em que a digestão anaeróbia prevalece como processo de degradação e estabilização da matéria orgânica, a etapa limitante do processo está relacionada à presença de moléculas biodegradáveis insolúveis, pois a degradação destas moléculas, comumente denominadas de biopolímeros, depende basicamente da presença e da atividade de espécies microbianas no meio. Muitos organismos produzem enzimas extracelulares hidrolíticas, no caso as hidrolases denominadas de lipases, proteolases e celulases, cuja função está relacionada à degradação das moléculas complexas, como lipídeos, proteínas e carboidratos, em unidades que possam ser assimiladas pelas células microbianas. Nos processos de digestão anaeróbia, onde polímeros constituem uma parte substancial dos resíduos a serem tratados, as bactérias hidrolíticas e suas enzimas têm papel de destaque, pois sua atividade é responsável pela produção daqueles substratos imprescindíveis para os demais grupos microbianos envolvidos no processo (REES, 1980; WISE, 1987).

Os resíduos sólidos urbanos se caracterizam por apresentar aproximadamente 60% de matéria orgânica de fácil degradação (GOMES, 1989), substrato-base para a ocorrência da fermentação em aterros sanitários. Além do material facilmente biodegradável, os resíduos contêm cerca de 20% de material celulósico e lignocelulósico, cuja degradação é lenta devido à estrutura físico-química destes compostos. A estrutura da celulose dificulta a atuação dos microrganismos celulolíticos, os quais possuem atividade enzimática muito baixa ou inexistente sobre a porção cristalina da molécula de celulose. Como consequência dessa atividade lenta, a fase hidrolítica caracteriza-se como a etapa limitante dos processos fermentativos (DEMEYER, 1981; GASI et al. 1986). A estrutura macromolecular da lignina constitui-se em uma rede rígida, cuja complexidade é variável e derivada de três precursores primários aromáticos: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool paracumárico. Nesse sentido, também, a degradação microbiana da lignina está diretamente relacionada à produção de enzimas específicas para promover o rompimento dos anéis aromáticos, os quais dificultam sobremaneira a atuação microbiana.

O conhecimento sobre a população microbiana dos ecossistemas como o aterro sanitário é ainda pequeno. A microbiologia tem sido pouco estudada e, portanto, não é considerada como parâmetro de controle, avaliação e otimização de tais sistemas (VILLAS BÔAS, 1990). Alguns dados revelam claramente a atuação das bactérias anaeróbias celulolíticas na degradação de resíduos lignocelulósicos, porém poucas são as informações de literatura a respeito da atividade celulolítica dos fungos anaeróbios. (ORPIN & LETCHER, 1979; BAUCHOP & MOUNTFORT, 1981; LOWE, et al.,1987; LI & CALZA, 1991; CHENG et al.,1994).

Na última década, mais intensivamente, estudos têm elucidado aspectos relacionados à degradação da celulose em alguns habitats anaeróbios, entre os quais podemos citar o rúmen e o trato intestinal de animais herbívoros, digestores de lodo de esgoto sanitário, e sedimentos lacustres e marinhos. Dentre estes, o rúmen foi o sistema anaeróbio mais estudado, em virtude de possuir uma microbiota diversificada. Estes estudos levaram a procedimentos que permitiram a avaliação do processo de digestão anaeróbia em sistemas tecnológicos empregados no tratamento de esgoto e resíduos.

Na década de 70, os organismos denominados de protozoários flagelados, constituintes da população microbiana do sistema gastro-intestinal de ruminantes, foram descritos como espécies de fungos anaeróbios pertencentes ao antigo grupo dos ficomicetos (ORPIN, 1975, 1976 e 1977; BAUCHOP, 1979). Estudos posteriores demonstraram que estes organismos possuem capacidade de degradação dos carboidratos da fibra vegetal no rúmen (ORPIN & LETCHER, 1979, BAUCHOP e MOUNTFORT, 1981) e desenvolvem-se preferencialmente aderidos a materiais lignocelulósicos. Tais evidências indicaram que estes fungos anaeróbios celulolíticos possuem um papel de destaque na degradação da fibra vegetal do rúmen, e certamente o questionamento sobre a presença desses microrganismos em outros habitats anaeróbios, como por exemplo, solo, pântanos ou sistemas tecnológicos como os aterros sanitários é válido, e respostas à essas questões tornam-se de extrema relevância.

O presente trabalho visa estabelecer uma metodologia para avaliar a presença de fungos anaeróbios estritos e celulolíticos em amostras oriundas de aterros sanitários. Para a determinação dos procedimentos experimentais foi utilizado um inóculo cuja a presença de fungos anaeróbios foi amplamente divulgada na literatura

especializada (ORPIN,1975,1976,1977; BAUCHOP,1979,1981; JOBLIN, 1981; LOWE et al., 1987; MOUNTFORT & ASHER, 1989). Assim foi possível estabelecer previamente as condições de crescimento da população fúngica anaeróbia, para posterior estudo com amostras provenientes de um aterro sanitário, e assim indicar a existência de fungos anaeróbios em amostras de resíduos sólidos provenientes do mesmo.

Este trabalho contemplou uma revisão bibliográfica fundamental sobre fungos, que consistiu especialmente em facilitar o entendimento sobre o assunto. Além disso, deve-se ressaltar que a descrição de aspectos fundamentais de ecologia, morfologia e reprodução de alguns grupos fúngicos podem constituir-se relevantes para o saneamento ambiental, já que tais organismos são pouco considerados como agentes biológicos alternativos para a estabilização da matéria orgânica.

As amostras de resíduo sólido aterrado foram obtidas no Aterro Sanitário de São Giacomino da cidade de Caxias do Sul-RS, no qual são dispostos diariamente 200 toneladas de resíduos sólidos domésticos. A área de São Giacomino caracteriza-se pela implantação de um processo de remediação, e posterior implantação de um sistema de aterro sanitário. Em 1990 foi assinado um Convênio de Cooperação Técnica entre a Prefeitura Municipal de Caxias do Sul e a Universidade de Caxias do Sul visando conjugar esforços para implantação de um projeto de remediação da área de São Giacomino, a qual foi impactada pela disposição inadequada de resíduos sólidos no período de 1988 a 1990.

Em função da situação encontrada, o projeto de Remediação foi desenvolvido embasado em duas fases: Fase I - emergencial e Fase II - definitiva. Na fase emergencial, foram iniciadas as obras de remediação mediante a realização de diagnóstico e elaboração do ante-projeto, dando origem a primeira fase de aterramento constituindo a célula C1. Na fase definitiva, deu-se a continuidade da disposição de resíduos em células de aterramento implantadas segundo os critérios técnicos estabelecidos nas normas brasileiras para aterro sanitário, sendo estas células denominadas de C3 e C4. Concomitantemente à execução da fase emergencial do projeto, foi elaborado um plano de monitoramento ambiental com o objetivo de avaliar a eficiência sanitária individual e integrada dos processos de tratamento dos resíduos sólidos, líquidos e gasosos. Através do plano de monitoramento ambiental e tecnológico foi possível avaliar a eficiência sanitária do sistema de remediação e constatar que o projeto de aterro sanitário implantado

garantiu condições ambientais condizentes aos padrões vigentes na legislação, apesar das dificuldades operacionais encontradas no desenvolvimento do processo de remediação, principalmente em relação às condições hidrogeológicas da área.

2. OBJETIVOS

- Enriquecer amostras provenientes de ecossistemas anaeróbios como o rúmen para verificar o desenvolvimento de espécies de fungos anaeróbios celulolíticos, e recomendar uma metodologia para o isolamento desses microrganismos;
- Enriquecer amostras de resíduo sólido aterrado para verificar o desenvolvimento de espécies fúngicas anaeróbias;
- Definir métodos e técnicas para a amostragem, conservação e manipulação de fungos anaeróbios celulolíticos provenientes de amostras de resíduo aterrado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Materiais Lignocelulósicos e Degradação Microbiana

A biosfera se constitui por uma mistura de compostos orgânicos em estado contínuo de formação, transformação e decomposição, decorrente da atividade biológica que nela está presente há milhões de anos (ODUM,1985). Segundo SCHINK (1988), os organismos autótrofos, representados pelos vegetais, algas e cianobactérias, são considerados os grandes produtores primários do planeta, pois através da fotossíntese transformam anualmente cerca de $1,3 \times 10^{17}$ gramas de carbono, sob a forma de dióxido de carbono atmosférico, a um complexo celular carbonáceo. Com a morte dos organismos fotossintéticos e de outros membros da cadeia trófica, a atuação microbiana promove o resgate das moléculas de carbono orgânico, mineralizando-as, isto é, incorporando-as a outros constituintes, e dando origem ao dióxido de carbono e água.

Os ecossistemas, bem como os organismos possuem a característica termodinâmica essencial, ou seja, conseguem manter um alto grau de ordem interna, criando um estado de baixa entropia. Embora a entropia, no sentido técnico, refira-se à energia, a palavra é usada num sentido mais amplo para referir-se à degradação de materiais. Os ecossistemas e os organismos são sistemas abertos que trocam continuamente energia e matéria com o ambiente, para diminuir o estado entrópico do meio, à medida que a entropia externa aumenta. Nos ecossistemas, a ordem de uma estrutura complexa de biomassa é mantida pela respiração total da comunidade (ODUM, 1985). Seres autótrofos e heterótrofos participam de um ciclo global e interdependente, no qual os organismos autótrofos utilizam dióxido de carbono atmosférico, para construir suas biomoléculas, dando origem ao oxigênio gasoso

como subproduto de seu metabolismo. Por sua vez, os heterótrofos utilizam os produtos orgânicos dos autótrofos como nutrientes e liberam dióxido de carbono à atmosfera (LEHNINGER, 1989). Assim, a equivalência de taxas de produção e o consumo dióxido de carbono se caracterizam como um fator relevante para o equilíbrio dinâmico da Terra (ODUM, 1985).

A grande parcela de carbono orgânico presente nos ecossistemas em geral, está sob a forma de lignocelulose e seus derivados. Para VEAL & LYNCH (1984), a degradação de resíduos celulósicos é de extrema importância aos ciclos do carbono e ao fluxo de energia dos ecossistemas, reciclando os substratos minerais e gases necessários à fotossíntese. Do total de biomassa formada a partir da fotossíntese, aproximadamente 28 a 50% é de constituição celulósica THOMPSON apud GIAJ-LEVRA (1991).

O termo lignocelulose refere-se ao conjunto dos três maiores componentes do tecido vascular dos vegetais: celulose, hemicelulose e lignina, conforme pode ser observado na Figura 1 (COLBERG, 1988). Segundo COLBERG (1988), a lignocelulose constitui de 89 a 98% do peso da madeira, sendo dividida em lignina e holocelulose. A holocelulose inclui a celulose e a hemicelulose, perfazendo um total de 63 a 78%, enquanto a lignina não ultrapassa 15 a 38% do total para a grande maioria das árvores.

Estudos sobre a degradação aeróbia de compostos lignocelulósicos, têm fornecido subsídios para a compreensão de alguns aspectos relacionados com o processo, porém pouco destaque tem se dado às condições anaeróbias de degradação microbiana desse compostos. Os trabalhos de HACKETT et al. e ZEIKUS apud BENNER et al. (1984), utilizando lignina sintética marcada ($[^{14}\text{C}]\text{-lignina}$ lignocelulose), obtida a partir de madeira de álamo, após um período de incubação de sessenta dias sob condições anaeróbias, demonstraram que não ocorria a biodegradação da lignina marcada com ^{14}C . O composto foi incubado em condições aeróbias e anaeróbias junto a diferentes tipos de inóculos, como solos, sedimentos de lagos e conteúdo de rúmen. A degradação do polímero foi observada apenas sob condições de aerobiose, em função da determinação de alguns produtos resultantes do processo. Tais estudos, provavelmente, poderiam ser responsáveis pela opinião generalizada sobre a lignina ser inerte à biodegradação em ambientes anaeróbios.

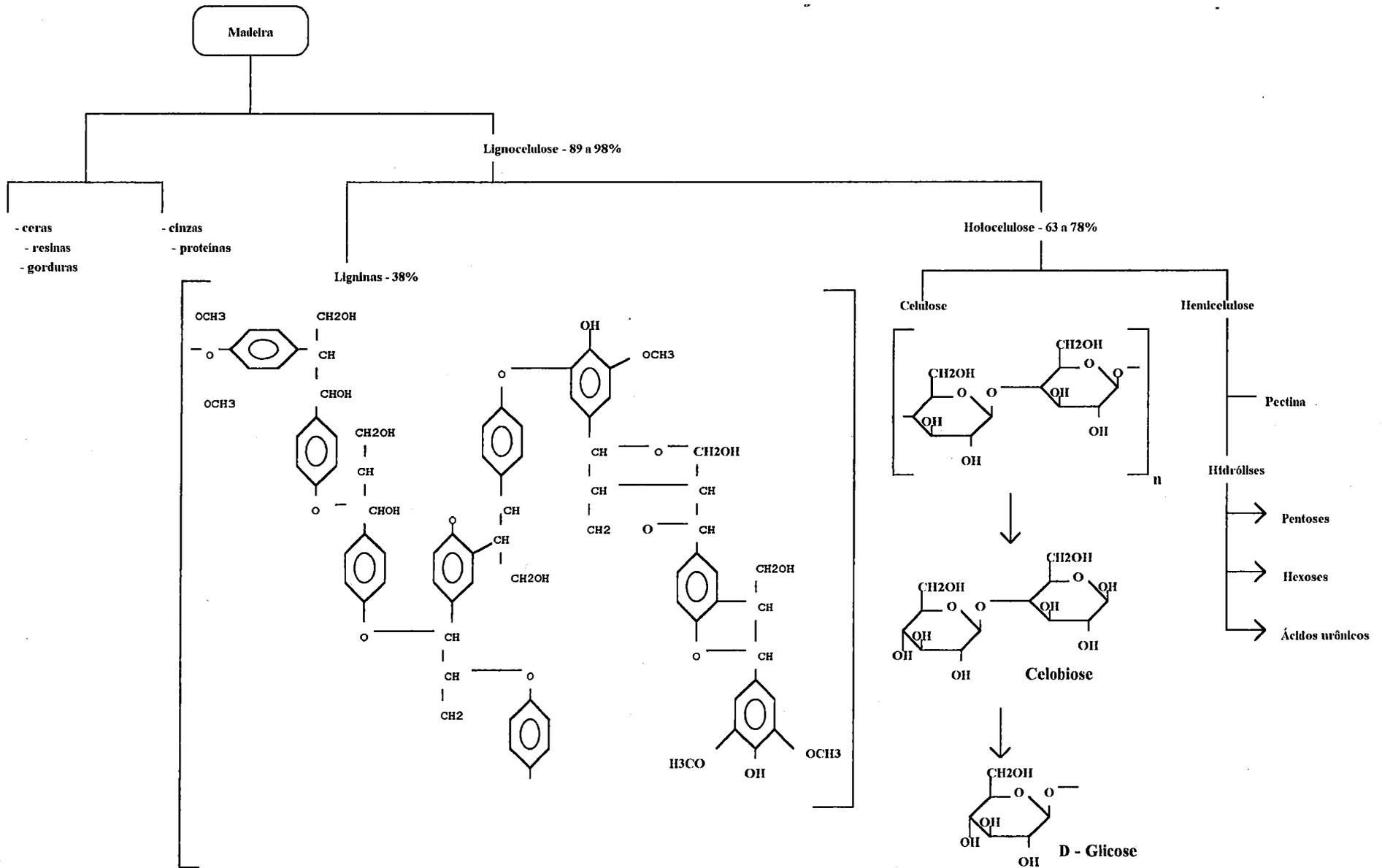


Figura 1 - Componentes da madeira, incluindo a estrutura química da lignina (modelo), celulose e produtos da hidrólise, celobiose e glicose. (COLBERG, 1988)

As avaliações de BENNER et al. (1984) sugeriram que em alguns ecossistemas aquáticos, lignina sintética foi degradada muito lentamente sob condições de anaerobiose, porém a taxas expressivas para tais ambientes. Nos experimentos realizados, a ^{14}C -lignina sintética foi submetida a uma hidrólise ácida e em seguida incubada com inóculo proveniente de sedimento do mar, em condições anaeróbias. Após um período de vinte e quatro dias de incubação, em torno de 30 a 38% da fração de polissacarídeo, e de 6 a 18% da fração de lignina marcada haviam sido mineralizados a $^{14}\text{CO}_2$.

De acordo com COLBERG (1988), os compostos lignocelulósicos podem sofrer biodegradação em ambientes anaeróbios, embora tais compostos representem apenas uma pequena parcela dos materiais recalcitrantes nesses habitats. Este fato é de suma importância no que diz respeito ao ciclo do carbono na biosfera, bem como ao acúmulo desses polímeros em vários ecossistemas, predominantemente anaeróbios.

Vários estudos apontaram claramente o papel de bactérias no processo de degradação da celulose em habitats anaeróbios. Assim, algumas espécies de bactérias anaeróbias celulolíticas foram isoladas do sistema gastro-intestinal de herbívoros, dentre estas: *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrosolvens* e *Eubacterium cellulosolvens*, sendo tais espécies responsáveis pela fermentação da celulose a succinato, propionato, acetato, butirato, formiato, lactato, H_2 e CO_2 (COLVIN et al. e SADDLER & KHAN apud COLBERG, 1988). Representantes do gênero *Clostridium sp* já foram isolados de solos, sedimentos lacustres e marinhos, trato intestinal de animais e seres humanos. A espécie *Clostridium thermocellum* pode degradar a celulose em celbiose e celodextrinas, pois produz um conjunto de enzimas que agem sobre a fibra de celulose. A bactéria *Acetivibrio cellulolyticus*, uma espécie anaeróbia estrita isolada de lodo de esgoto, pode converter celulose em hidrogênio, dióxido de carbono, acetato e, em quantidades menores, a etanol, propanol e butanol (CARREIRA & LJUNGDAHL; DUONG et al. e JOHNSON et al. apud LJUNGDAHL & ERIKSSON, 1985).

3.2. Degradação da Celulose: ação do complexo celulase

Os principais agentes biológicos, abundantes na natureza e responsáveis pela degradação da celulose, incluem bactérias e fungos celulolíticos aeróbios e anaeróbios que podem crescer sob diferentes condições de pH e temperatura, e em diversos ecossistemas (LJUNGDAHL & ERIKSSON, 1985).

As fibras vegetais são constituídas de uma grande quantidade e variedade de polissacarídeos, entre eles a celulose, a hemicelulose e as pectinas. Tais polissacarídeos são formados por uma série de açúcares diferentes. Por exemplo, a celulose é um polímero de glicose; a hemicelulose, por sua vez possui uma série de unidades de xilose, arabinose, galactose, glicose, entre outros açúcares residuais que constituem a pectina. A pectina caracteriza-se por ser uma combinação de vários açúcares, como frutose, galactose e arabinose, porém com a função de ligar ou unir os demais polissacarídeos da parede celular dos tecidos vegetais. Além dos polissacarídeos citados, os tecidos vegetais contêm proteínas, ácidos graxos e orgânicos, sais e compostos complexos aromáticos como a lignina (HOBSON & WALLACE, 1982). As hemiceluloses podem ser constituídas com mais de 20% de unidades de xilose, sendo este o carboidrato encontrado em maior quantidade na interface entre a lignina e outros carboidratos da parede celular de vegetal de plantas superiores, podendo estabelecer ligações covalentes ou não com a pectina, o glicano e tantos outros constituintes da parede celular (BATT, 1991).

A celulose é uma substância fibrosa, resistente e insolúvel em água, encontrada na parede celular dos tecidos vegetais (LEHNINGER, 1989). Está sempre associada a outros polímeros, como o amido, a pectina, a lignina, e a uma variedade de hemiceluloses. Segundo BISARIA & GHOSE (1981), a celulose é um homopolímero linear, constituído por unidades anidroglicosídicas, unidas por ligações β 1-4, sendo o principal componente estrutural que confere rigidez e forma aos vegetais. Em geral a celulose é representada pela fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, a qual pode ser visualizada na Figura 1 (COLBERG, 1988).

D'ALMEIDA apud GASI et al. (1986) afirmou que a configuração β permite a formação de moléculas de cadeias lineares com estruturas amorfas e cristalinas de alta resistência. Segundo o autor, as fibras de celulose apresentam regiões cristalinas, onde as moléculas estão altamente ordenadas e mantidas em posição por ligações do

tipo ponte de hidrogênio entre os numerosos grupos hidroxila (OH) adjacentes, e regiões paracristalinas ou amorfas, com as moléculas de celulose dispostas desordenadamente. As regiões amorfas são as mais susceptíveis ao ataque microbiano. O exterior da fibra de celulose, formado por uma camada cristalina, é resistente e não-biodegradável, sendo que a atividade hidrolítica acontece com maior intensidade nas extremidades, em regiões danificadas da estrutura da fibra.

De acordo com GOLDMAM & AZEVEDO (1989), a conversão de resíduos celulósicos para formação de produtos como açúcares solúveis torna-se possível através da hidrólise por via ácida ou enzimática. O processo de hidrólise da celulose corresponde à cisão da ligação β 1-4, ou seja, à ruptura da ligação entre dois monômeros de glicose.

A hidrólise ácida ou a catálise ácida foi um dos primeiros métodos empregados para a hidrólise química da fibra de celulose, utilizando-se ácido sulfúrico. O processo "Scholler", implantado nos Estados Unidos no início do século, incluía a adição de ácido sulfúrico a 0,6% a uma temperatura de 184°C, resultando em 50% da quantidade de celulose inicial, e uma concentração de glicose de aproximadamente 3%. No entanto, à medida que aumentavam-se as concentrações de ácido, a hidrólise do polímero se aproximava a 100%. O processo desenvolvido por Tennessee Valley Authority para hidrólise ácida de lignocelulose, constituía-se de duas etapas, precedidas de uma trituração que pode ser considerada um pré-tratamento. A primeira hidrólise era realizada utilizando-se compostos ácidos, os quais podiam ser recuperados no final do processo, seguida da remoção de hexoses e pentoses na cadeia do polímero, conforme apresentado na Figura 2 (BATT, 1991). No final do processo, a lignina era recuperada e utilizada para outros fins.

A hidrólise enzimática da celulose envolve a ação de proteínas altamente especializadas, denominadas celulasas. A quebra da celulose é executada pela atividade de um conjunto de enzimas com ação endocelulolítica e exocelulolítica, conforme esquema apresentado na Figura 3 (BATT, 1991). A especificidade dessas enzimas tem sido investigada através da utilização de vários substratos, incluindo algodão, avicel, carboximetilcelulose, papel filtro e celobiose. Cada substrato difere no que diz respeito ao grau de polimerização, e conseqüente eficiência nas taxas de hidrólise.

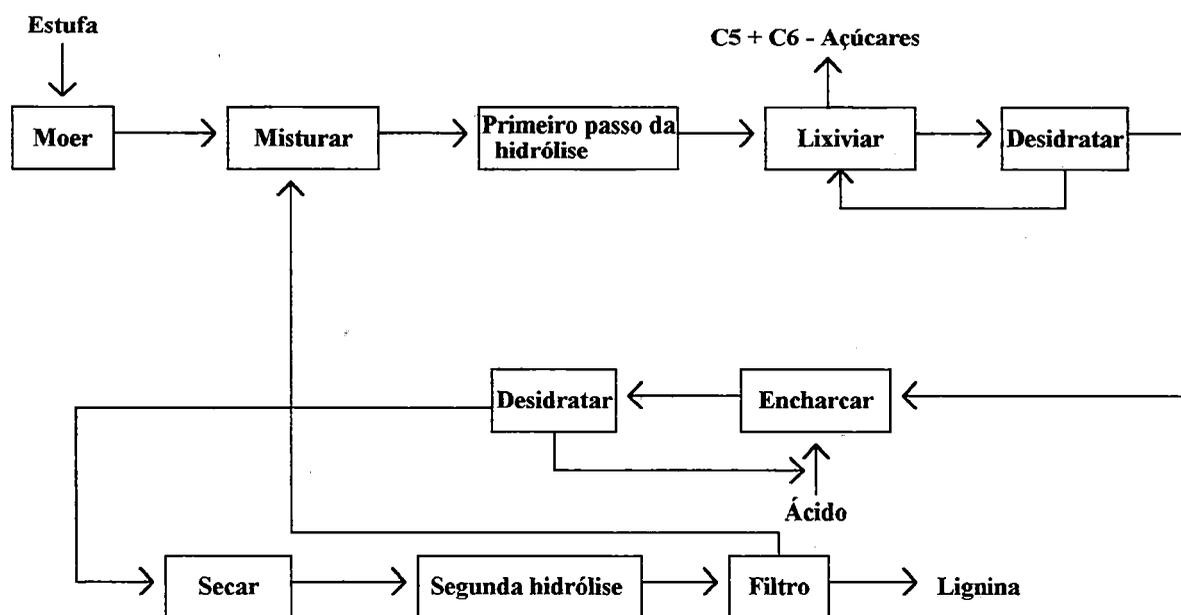


Figura 2 - Esquema simplificado do processo de hidrólise ácida da celulose (BATT, 1991).

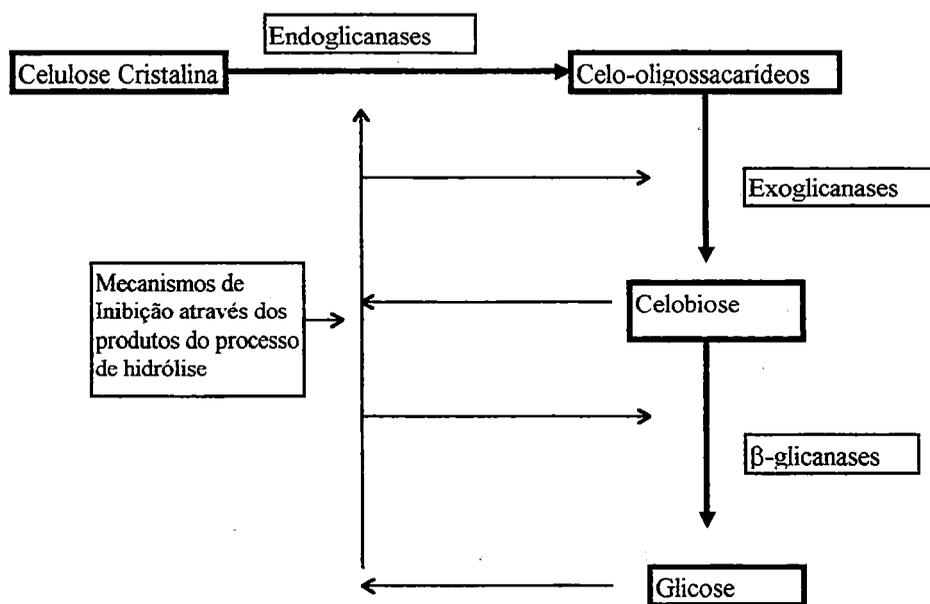


Figura 3: Mecanismos de ação do complexo celulase (BATT, 1991).

Os estudos desenvolvidos sobre o sistema enzimático celulolíticos de alguns microrganismos não foram suficientes para o esclarecimento total da atuação dos principais componentes do complexo enzimático celulolítico RYU & MANDELS; STREAMER et.al. e T.M. WOOD et. al. apud LJUNGDAHL & ERIKSSON (1985).

Segundo BISARIA & GHOSE (1981), o sistema enzimático responsável pela hidrólise da celulose nos fungos é formado por três grupos de enzimas:

1. endoglicanases que atua sobre as regiões amorfas da fibra de celulose, resultando na abertura de novas extremidades na cadeia molecular;
2. exoglicanases que se apresentam sob duas formas:
 - a- celobiohidrolase que remove unidades de celobiose da extremidade não-redutora da cadeia de celulose;
 - b- glicohidrolase que remove unidades de glicose da extremidade não-redutora da cadeia de celobiose;
3. celobiase, ou também denominada β -glicosidase, que converte celobiose e outras dextrinas em glicose.

A degradação da molécula de celulose depende de uma ação sinérgica entre três enzimas hidrolíticas. Este sinergismo entre as enzimas endo e exoglicanases torna-se mais acentuado, principalmente, sobre substratos ordenados (celulose cristalina). A endoglicanase atua sobre as regiões amorfas da fibra de celulose, dando origem a novas extremidades na cadeia, possibilitando desta forma, a ação das exoglicanases sobre a fibra T.M. WOOD e ERIKSSON & WOOD apud LJUNGDAHL & ERIKSSON (1985).

O sistema enzimático celulolítico das bactérias pode ser relacionado ao sistema celulolítico dos fungos. Porém algumas diferenças foram mencionadas por LJUNGDAHL & ERIKSSON (1985). O sistema celulolítico bacteriano pode ser caracterizado pela produção de endo- β -1,4-glicanases e exo- β -1,4-glicosidases, e ao contrário da maioria dos fungos, muitas bactérias não secretam β -glicanases. Cabe ressaltar, que o processo de hidrólise enzimática de muitos polissacarídeos como a celulose, está relacionado a uma ação conjunta de muitos organismos num mesmo hábitat, no qual pode-se detectar uma variedade de enzimas específicas e atuantes sobre o substrato.

BISARIA & MISHRA (1989), estudando por cromatografia o fracionamento das celulasas presentes em filtrados de culturas de fungos como *Trichoderma reesei*,

Trichoderma koningii, *Trichoderma viride*, *Penicillium pinophilum*, *Fusarium solani*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Talaromyces emersonii* e *Neocallimastix frontalis*, verificaram que o complexo celulase envolvido na hidrólise da celulose cristalina apresentava três tipos de enzimas, cuja ação era similar ao complexo encontrado em culturas bacterianas.

Segundo RYU & MANDELS (1980), cepas de *Trichoderma reesei* e de seus mutantes têm sido utilizadas com sucesso no processo de sacarificação, devido à atividade da celulase extracelular. Estes organismos podem excretar o complexo celulase, o qual é constituído de endo e exoglicanases, além de β -glicosidase (celobiases), as quais agem sinergisticamente para degradar a celulose cristalina a açúcares solúveis. Para os autores, as cepas de *Trichoderma sp* podem ser induzidas pela celulose, ou pela lactose, e reprimidas pela glicose. A indução, a síntese e a excreção de enzimas exo e endo β -glicanases parecem estar intimamente relacionadas nesses organismos.

O trabalho de WOOD & McCRAE apud BISARIA & MISHRA (1989) demonstrou que a enzima exoglicanase, mais especificamente a exoglicohidrolase, produzida por organismos como *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma emersonii*, foi capaz de catalisar a remoção de moléculas de glicose pela não-redução das extremidades da cadeia de celodextrinas, sendo esta não dependente da ação sinérgica com as endoglicanases no processo de hidrólise da celulose.

BISARIA & GHOSE (1981) observaram que a percentagem de produtos resultantes da degradação do algodão aumentou significativamente após o pré-tratamento das fibras com endoglicanases. Assim, a enzima endoglicanase poderia iniciar o ataque das fibras através da criação de uma ruptura no final da cadeia celulósica, local em que a exoglicanase agiria posteriormente. Estes autores sugeriram o seguinte mecanismo de degradação enzimática da celulose por fungos:

- as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose sofrem ação das endoglicanases, e o final das cadeias do polissacarídeo ficam abertas;
- as exoglicanases iniciam a degradação pelas cadeias finais através da remoção da celobiose;
- a celobiose é hidrolisada à glicose através da ação da β -glicosidase.

Os componentes das celulasas dos fungos não parecem constituir complexos físicos com interdependência da excreção e ação, porém a sua ação cooperativa é

mais intensa que a individual. Além disso, a complexidade da estrutura celulósica pode ser uma das razões pelas quais os organismos celulolíticos produzem uma família de diferentes componentes nas celulasas (LJUNGDAHL & ERIKSSON, 1985; BISARIA & MISHRA, 1989). Na Tabela 1 pode-se encontrar a relação entre a especificidade do substrato celulósico a ser degradado e a ação das diferentes enzimas celulasas.

Tabela 1 - Especificidade do substrato relacionado aos componentes enzimáticos do complexo de celulasas.

Substrato Utilizado	Celulasas		
	Celobiohidrolase	Endoglicanase	β -Glicosidase
Celulose cristalina	pouco ativa	-	-
Celulose amorfa	muito ativa	muito ativa	-
CMC / HEC*	ação limitada	muito ativa	-
Celo-oligosacarídeos	ativa	ativa	ativa
Celobiose	-	-	ativa

*Obs: CMC/HEC - Carboximetilcelulose/ Hemicelulose

FONTE: BISARIA & MISHRA (1989)

Para BISARIA & MISHRA (1989), as enzimas fúngicas endoglicanases, mais especificamente as carboximetilcelulasas, hidrolisam a carboximetilcelulose em frações aleatórias, resultando num rápido consumo da cadeia e poucos grupos redutores. As endoglicanases também agem sobre as celodextrinas, produto intermediário da hidrólise da celulose, convertendo-as em glicose e celobiose. Além disso, os autores descreveram que as enzimas β -glicosidases atuam na degradação da celulose formando produtos como a glicose. A ação destas enzimas diminui sobre moléculas de cadeia celulósica maior, como as celodextrinas, e a atividade máxima pode ser constatada sobre a celobiose. O produto final da ação das enzimas β -glicosidases e glicohidrolases é a glicose, porém as β -glicosidases se distinguem das glicohidrolases pela sua atividade posterior de transferase, retenção da configuração- β da glicose após a hidrólise, inibição pela baixa concentração de gliconolactona, forte ação sobre a celotriose e ação pouco eficiente sobre celodextrinas complexas.

Para LJUNGDAHL & ERIKSSON (1985), a ação enzimática da endoglicanase de um fungo é similar a atividade da mesma enzima produzida por

outras espécies. Desta forma, uma endoglicanase de um fungo atua sinergisticamente com uma exoglicanase de outro fungo. Esse sinergismo é maior entre enzimas (endo e exoglicanases) de espécies de fungos diferentes, quando ambos os microrganismos produzem um complexo completo de celulases, capaz de hidrolisar a celulose cristalina. A produção de celulases por fungos é regulada por mecanismos de indução e repressão catabólica. Entretanto, tais autores afirmam que a atividade enzimática celulolítica observada em culturas fúngicas tem demonstrado a existência de outros mecanismos de regulação específicos, além daqueles envolvidos na regulação da biossíntese dessas enzimas.

3.3. Os Fungos

3.3.1. Características Gerais e Crescimento

Os fungos são microrganismos eucarióticos, quimiorganotróficos, e reproduzem-se naturalmente por esporos, com raras exceções. Não possuem clorofila, são filamentosos e comumente ramificados. Centenas de espécies diferentes de fungos habitam o solo, sendo mais abundantes nas proximidades da superfície, onde prevalecem as condições de aerobiose. Os fungos são ativos na decomposição dos principais constituintes dos vegetais, especialmente da celulose, hemicelulose e lignina. A classificação de tais organismos se baseia, primeiramente, nas características dos esporos e dos corpos de frutificação presentes durante a fase sexuada de seus ciclos vitais (ALEXOPOULOS & MIMS, 1979).

A grande maioria dos fungos vive como saprófitas, desempenhando papel indispensável nas transformações cíclicas da matéria orgânica, não somente na decomposição de substâncias, mas também na síntese de compostos orgânicos complexos. Os fungos podem sintetizar suas proteínas, utilizando-se de fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico e de vários elementos minerais essenciais ao seu crescimento, os quais são provenientes do meio em que os organismos se desenvolvem (BROCK & MADIGAN, 1991).

Conforme citado por SEIFERT (1990), os fungos ocupam uma ampla variedade de habitats e nichos, podendo ser encontrados em ambientes aquáticos, no ar, no solo, na madeira em decomposição, bem como nos produtos alimentícios e industrializados. Os fungos saprófitas são encontrados em ambientes temperados, tropicais, desérticos, aquáticos e marinhos. Além destes, destacam-se os fungos

simbióticos, como as micorrizas e os parasitas que absorvem nutrientes das plantas, dos insetos, dos peixes e dos mamíferos, incluindo o homem.

Para ALEXOPOULOS & MIMS (1979), de um modo geral, os fungos de espécies diferentes possuem exigências nutricionais diversas, porém estudos em laboratório têm confirmado que potássio, magnésio, manganês, enxofre, cobre, ferro, zinco, boro e molibdênio são elementos nutricionais importantes para o crescimento da grande maioria dos fungos, além dos elementos básicos como carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e fósforo. Em geral, a glicose é a maior fonte de carbono, assim como os compostos de nitrogênio orgânico são as fontes mais utilizadas de nitrogênio. Muitos fungos são capazes de sintetizar as vitaminas necessárias para seu crescimento e reprodução, outros, entretanto, necessitam de fatores de crescimento específicos ao seu metabolismo, que podem ser obtidos apenas através do substrato.

A grande maioria das espécies de fungos cresce em faixas de temperaturas entre 0° e 35°C, sendo a faixa ótima entre 20-30°C. Em contraste com as bactérias, os fungos desenvolvem-se perfeitamente em meio ácido, sendo que um grande número de espécies cresce em pH 6,0. Adaptam-se a sobrecargas orgânicas mais elevadas que a maioria dos microrganismos, por exemplo, crescem em meios com concentrações de açúcar intoleráveis para certas bactérias, uma vez que são menos sensíveis às altas pressões osmóticas (ALEXOPOULOS & MIMS, 1979).

3.3.2. Morfologia Geral e Reprodução

Os fungos são reconhecidos por talos constituídos de pequenos filamentos com ramificações espalhadas, preferencialmente, em direção ao substrato que lhe serve como fonte de alimento. Cada filamento é conhecido como hifa, que caracteriza-se por ser transparente, com células de formato tubular, em cujo interior encontra-se o protoplasma. O conjunto de hifas constitui o talo, comumente denominado micélio, e que poderá apresentar, em certos grupos, formas rizóides importantes para a fixação sobre o meio suporte (ALEXOPOULOS & MIMS, 1979; WEBSTER, 1980).

HERRERA & ULLOA (1990) apresentaram algumas características do "Reino Fungi", que estão destacadas a seguir:

- nível de organização unicelular, pluricelular ou dimórfico;
- um corpo vegetativo chamado de talo, na maioria dos casos filamentosos, constituído por filamentos denominados hifas, onde o conjunto recebe o nome de micélio;
- talos com paredes celulares bem definidas, constituídas principalmente por quitina, em combinação com diversos polissacarídeos;
- as substâncias de reserva são geralmente glicogénio e lípidos;
- em geral a estrutura das células dos fungos é semelhante à de plantas vasculares, por apresentarem parede celular estratificada, núcleo eucariótico, mitocôndrias, retículo endoplasmático, dictiossomas, vacúolos e ribossomas, diferindo destas pela ausência de cloroplastos, na constituição da parede celular e nas substâncias de reserva;
- não possuem cloroplastos, mas pigmentos que lhes proporcionam colorações variadas;
- talo micelial pode ser septado e/ou asseptado;
- nutrição heterotrófica através de osmose;
- divisão do núcleo por mitose e meiose, com reprodução sexuada e assexuada.

Um aspecto importante para a distinção entre grupos de fungos é, certamente, a presença ou não de septos ou divisões nas hifas. O protoplasma consiste em uma massa única, o qual pode apresentar inúmeros núcleos. Quando as hifas não são septadas e observam-se inúmeros núcleos no interior do protoplasma celular, as hifas são denominadas de cenocíticas. Esta característica é comum entre os fungos inferiores, muitos deles aquáticos, classificados como ficomicetos (Phycomycetes), segundo a terminologia antiga. Nos demais grupos o protoplasma apresenta septos como forma de individualização dos núcleos. Nos grupos de formas septadas, os segmentos de hifas podem conter um, dois ou até três núcleos, o que caracteriza as formas mais evoluídas na classificação dos fungos. Nessas hifas com septos, o protoplasma comunica-se por um poro central do mesmo segmento (WEBSTER, 1980).

Em muitos fungos, o talo é diferenciado em uma parte denominada vegetativa, que é responsável por absorver os nutrientes do meio (rizóides), e outra denominada reprodutiva, que dará origem às células sexuadas de reprodução como os esporos. Organismos com tal diferenciação dos talos são denominados eucárpicos e os demais, que não demonstram a diferenciação a nível de talos, são denominados holocárpicos (WEBSTER, 1980).

Uma mesma espécie de fungo pode ser eucárpica e holocárpica, o que pode estar relacionado às condições ambientais, como por exemplo, à mudança na composição do meio. Desta forma, o organismo, que se apresentar em forma filamentosa com diferenciação de funções em seu talo, poderá constituir-se em um outro, por propágulos dispersos flutuantes no meio, desde que este possua nutrientes básicos ao seu crescimento.

A grande maioria dos fungos reproduz-se sob a forma sexuada e assexuada, ou por ambas as formas. Em geral, a reprodução assexuada é a mais importante para a propagação das espécies, pois resulta em inúmeros indivíduos, em um tempo muito menor, já que o ciclo de reprodução sexuada, em muitos destes organismos, não ocorre com muita frequência (ALEXOPOULOS, & MIMS, 1979; WEBSTER, 1980).

ALEXOPOULOS & MIMS (1979) definiram a reprodução assexuada como sendo a formação de células reprodutivas que não envolve a união de núcleos, células ou estruturas sexualmente distintas. De acordo com o autor, a reprodução assexuada pode acontecer das seguintes formas:

1. fragmentos de hifas podem se desenvolver em novos indivíduos;
2. divisão de células somáticas em células filhas;
3. germinação ou brotamento por células somáticas ou esporos;
4. produção de esporos que, individualmente, poderão germinar e dar origem a um novo micélio.

WEBSTER (1980) afirmou que a reprodução assexuada nos fungos pode acontecer com maior frequência devido à grande produção de esporos assexuados. Esta observação se justifica pelo desconhecimento dos ciclos sexuados de um grande número de espécies de fungos.

Os esporos variam quanto à cor, ao tamanho e à forma, e são indiscutivelmente estruturas importantes para a classificação desses organismos. Alguns fungos produzem um único tipo de esporos, outros, porém, dão origem até quatro tipos diferentes. Os esporos assexuados são produzidos no interior de uma estrutura com porção terminal em forma de saco, denominado esporângio. Os esporos originados dos esporângios são chamados de esporangiósporos, os quais poderão apresentar motilidade ou não. Nos fungos inferiores, como os ficomicetos, os esporangiósporos são livres, flagelados e móveis, por isto recebem a denominação

de zoósporos. Por outro lado, quando não apresentam motilidade recebem o nome de aplanósporos (ALEXOPOULOS & MIMS, 1979). Segundo BROCK & MADIGAN (1991), os esporos assexuados são denominados conídios, sendo que, muitas vezes, apresentam-se coloridos em função da presença de pigmentos e resistentes a períodos de desidratação longos. Para muitas espécies, os conídios têm como função vital promover a dispersão dos fungos em novos habitats.

Alguns fungos também reproduzem-se por esporos sexuados, através da fusão de gametas unicelulares, ou da fusão de hifas especializadas, comumente denominadas de gametângios. Esporadicamente, a fusão de duas células haplóides, como esporos sexuados, pode originar esporos individuais, caracterizando uma célula diplóide (BROCK & MADIGAN, 1991). A reprodução sexuada em fungos envolve a fusão de núcleos compatíveis que, segundo ALEXOPOULOS & MIMS (1979) consiste de três fases distintas:

- a plasmogamia que reúne dois núcleos haplóides num único protoplasto;
- a cariogamia, ou seja, a fusão real dos dois núcleos da qual será originado um núcleo diplóide, ou zigótico;
- a meiose, ou divisão redutora que devolverá a condição haplóide aos quatro núcleos originados.

A Figura 4 (HERRERA & ULLOA, 1990) apresenta algumas estruturas somáticas e reprodutivas de alguns grupos de fungos, representativas de várias classes desses organismos. Nesta figura, estão representadas as estruturas morfológicas citadas ao longo deste capítulo, com destaque especial para algumas estruturas morfológicas típicas das espécies de fungos pertencentes a divisão e subdivisão, Eumicota e Ficomycota, respectivamente. Muitas destas estruturas, por exemplo zoósporos e esporângios, constituem-se em elementos-chaves para a melhor compreensão da temática que o presente trabalho encerra.

Na Figura 4 (HERRERA & ULLOA, 1990) estão apresentadas algumas estruturas morfológicas citadas anteriormente, e outras que receberam destaque neste momento, como por exemplo estruturas de fixação e resistência, os apresórios e os haustórios. O apresório constitui num tubo de fixação originado da germinação de um esporo ou de uma hifa vegetativa, o qual se adere na superfície da célula hospedeira (característica de fungos fitopatogênicos). Já os haustórios são estruturas de absorção formadas também a partir de hifas vegetativas, porém com a função de invadir os tecidos das células hospedeiras. Os esclerócios, também apresentados na

figura citada, constituem-se em estruturas capazes de resistir as condições desfavoráveis do meio, sendo os mesmos constituídos de pseudoparênquima, frequentemente quitinado. Os estromas apresentam-se como uma massa compacta de hifas, as quais em sua maioria são constituídas de tecidos vegetativos denominados de prosênquima e pseudoparênquima. O prosênquima apresenta as hifas entrelaçadas, ou seja muito próximas uma das outras, porém cada uma das hifas mantém sua individualidade; já o pseudoparênquima caracteriza-se por ser um tecido, no qual as hifas estão unidas por um líquido intersticial.

No sentido de esclarecer alguns aspectos referentes a formação de esporos, também na Figura 4 (HERRERA & ULLOA, 1990), observa-se a estrutura denominada esporóforo, a qual tem origem a partir de um conjunto de hifas especializadas, caracterizando-se como uma espécie de “bolsa”, na qual em seu interior ocorrerá a formação de esporângios. Os esporângios apresentam-se sob várias formas e tamanhos, e são responsáveis pela formação de esporos de origem assexuada móveis, esporos típicos dos fungos inferiores comumente denominados de ficomicetos. Os conidióforos são responsáveis pela formação de outro tipo de esporos, os conídios, denominação dada aos esporos assexuados imóveis. Os conídios se caracterizam como os esporos assexuados dos fungos deuteromicetes, ascomicetes e basidiomicetes.

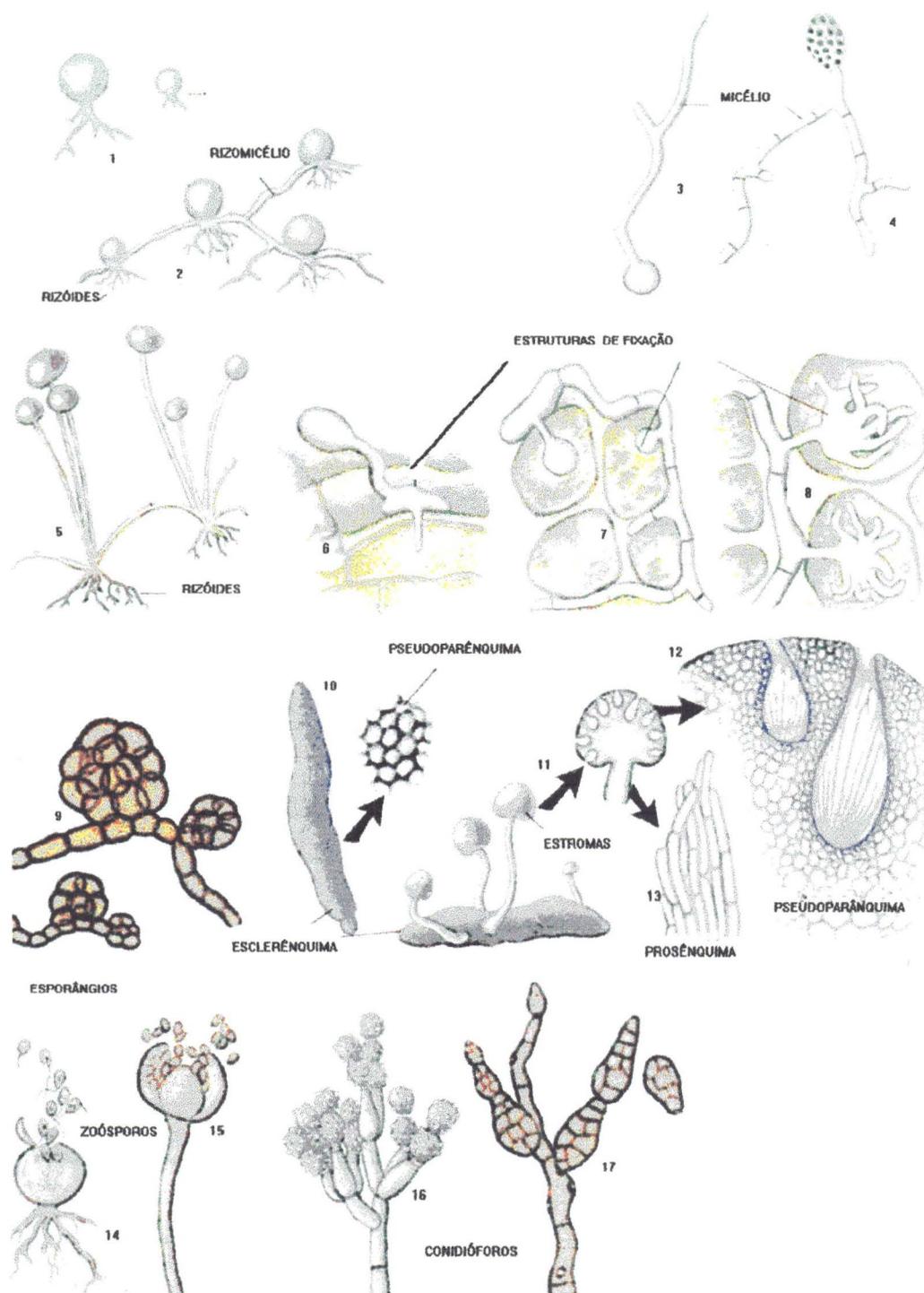


Figura 4- Estruturas somáticas e reprodutivas de diferentes grupos de fungos.

1-4 Tipos de talos. 1-talo unicelular de fungo aquático. 2-talo de fungo aquático (Chytridiomycetes). 3- micélio cenocítico. 4- Micélio septado. 05-08 Estruturas de fixação e absorção. 5-rizóides. 6-apresório. 7-8 haustórios. 09-13 Estruturas de propagação vegetativa, estruturas de resistência e tecidos derivados de hifas. 14-17 Esporóforos de reprodução sexual. 14- Esporângio (Chytridiomycetes). 15- Esporângio (Zygomycetes). 16 e 17- Conidióforos (Hyphomycetes) (HERRERA & ULLOA, 1990).

Na tabela 2 está apresentada a classificação e algumas características dos fungos, segundo BROCK & MADIGAN (1991). Observa-se que, dependendo de um grupo particular de fungos, ocorrem diferentes tipos de esporos sexuais, os quais são produzidos no interior de estruturas típicas de cada grupo estudado.

Tabela 2 - Classificação e algumas características dos principais grupos de fungos

Grupo	Gêneros Representativos	Tipo de esporos sexuais	Hifa	Habitats
Ascomycetes	<i>Neurospora sp.</i> <i>Saccharomyces sp.</i>	Ascósporo	Septada	Solo, plantas em decomposição
Basidiomycetes	<i>Amanita sp.</i> , <i>Agaricus sp.</i>	Basidiósporo	Septada	Solo, plantas em decomposição
Zigomicetes	<i>Mucor sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i>	Zigósporo	Cenocítica	Solo, plantas em decomposição
Oomicetes	<i>Alomyces sp.</i>	Oósporo	Cenocítica	Aquáticos
Deuteromicetes (fungos imperfeitos)	<i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i>	Não possui	Septada	Solo, animais e plantas em decomposição

FONTE: BROCK & MADIGAN (1991)

Segundo BROCK & MADIGAN (1991), o papel ecológico (atividade sobre o meio) de muitos fungos, especialmente os membros do grupo dos basidiomicetos, é a ação sobre a decomposição de madeira, papel, tecidos, e de outros materiais derivados de recursos naturais. Tais organismos são hábeis em utilizar celulose ou lignina como fonte de carbono e energia. A decomposição da lignina em habitats naturais ocorre exclusivamente através da ação de certos fungos do grupo dos basidiomicetos, também denominados fungos da decomposição da madeira. Dois grupos de fungos decompositores de madeira podem ser citados: os "brown-rot", ou também denominados fungos da decomposição marrom, que degradam a celulose preferencialmente em relação à lignina, e os "white-rot", também denominados fungos da decomposição branca, que são responsáveis pela degradação tanto da celulose como da lignina.

Muitas outras considerações poderiam ser descritas acerca da morfologia, reprodução e ecologia dos fungos, porém, devido à amplitude e à diversidade que o tema encerra, procurou-se, no entanto, apenas evidenciar aspectos básicos sobre o ciclo vital de tais organismos, e de relevância para os objetivos deste estudo. Além

disto, os fungos constituem um grupo de seres vivos bastante heterogêneo em peculiaridades, o que dificulta a análise individual de cada grupo no âmbito do presente trabalho.

3.3.3. Classificação Geral

Em linhas gerais, a classificação taxonômica dos fungos apresentada nesse texto foi citada por AINSWORTH (1973) e adaptada por WEBSTER (1980). A classificação proposta baseiou-se nas características dos esporos e dos corpos de frutificação presentes durante as etapas do ciclo sexuado dos fungos. WEBSTER (1980), no entanto, considerou que muitas espécies dão origem a esporos sexuais e corpos de frutificação somente em condições específicas e apropriadas, fazendo com que muitos ciclos vitais perfeitos ou completos de alguns fungos ainda não sejam conhecidos. Nestes casos, a morfologia dos esporos assexuais e dos micélios torna-se importante, ao menos até que parte de seus ciclos sexuais sejam observados, o que resultaria em uma reavaliação do posicionamento de determinado organismo nas chaves taxonômicas.

WEBSTER (1980) adaptou o esquema proposto por AINSWORTH (1973), em que o grande mundo dos fungos está agrupado em duas divisões baseadas na presença ou não de plasmódios e pseudoplasmodios. Segundo o autor, o plasmódio caracteriza-se por ser uma massa viscosa, disforme, multinucleada e sem parede celular, a qual possui movimentos amebóides e alimentam-se através da ingestão de material particulado. Por outro lado, um pseudoplasmodio é um agregado de células amebóides separadas, as quais perderam a individualidade mas não se fundem. Os fungos que apresentam-se sob a forma de plasmódio ou pseudoplasmodio estão dispostos na DIVISÃO MYXOMYCOTA (fungos limosos); a grande maioria dos fungos, usualmente filamentosos, está classificada na DIVISÃO EUMYCOTA (fungos verdadeiros).

Em suma, o esquema da sistemática da grande DIVISÃO EUMYCOTA inclui a grande maioria dos fungos já estudados, bem como os fungos em destaque neste trabalho. A Figura 5 (WEBSTER, 1980) contém as cinco subdivisões do grupo Eumycota e suas respectivas classes.

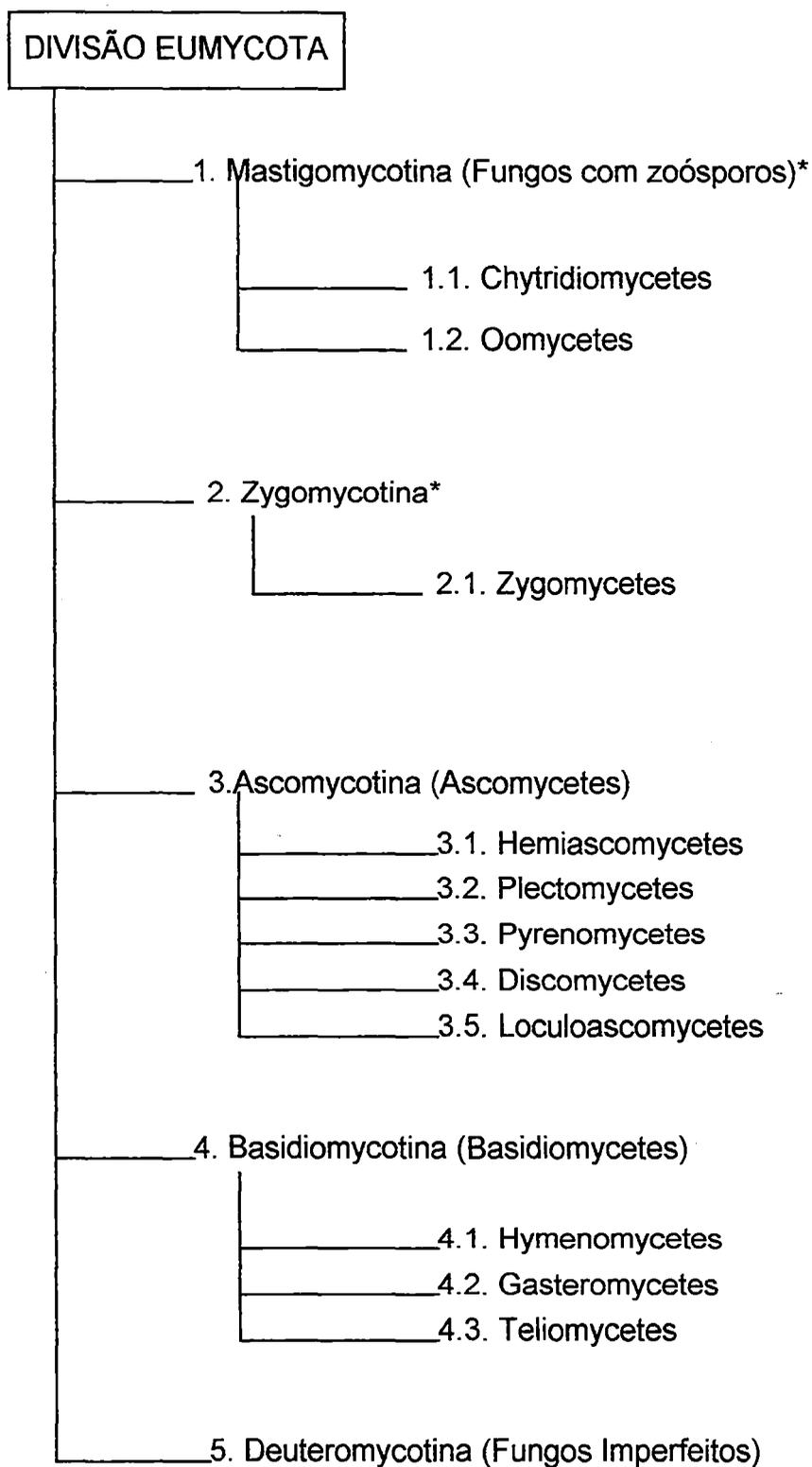


Figura 5 - Sistemática da Divisão Eumycota e suas respectivas subdivisões e classes (WEBSTER, 1980)

(*) - Grupos pertencentes aos Ficomycetos nas chaves taxonômicas anteriores.

Há poucos anos, alguns pesquisadores classificavam os ficomicetos tomando como ponto de referência a presença ou não de flagelos, número e posição destes nos zoósporos. Segundo HERRERA & ULLOA (1990), atualmente há uma tendência de vários micologistas de suprimir o grupo dos ficomicetos como categoria taxonômica, considerando que este grupo constitui-se muito heterogêneo, pois seus representantes se caracterizam de forma diversificada.

Os fungos anaeróbios, habitantes do aparelho gastro-intestinal de animais ruminantes, freqüentemente foram descritos como organismos pertencentes ao antigo grupo dos ficomicetos. Mais recentemente, tais organismos foram incluídos na Classe Chytridiomycetes, em virtude do grupo dos ficomicetos não ser mais considerado um grupo taxonômico.

De acordo com WEBSTER (1980) e HERRERA & ULLOA (1990), a Classe Chytridiomycetes é composta por grupos de fungos que apresentam zoósporos com um único flagelo liso, em forma de "chicote"; localizado na parte posterior do esporo. Os microrganismos estão subdivididos em três ordens:

- Chytridiales - possuem um talo desprovido de um sistema vegetativo com apenas estruturas reprodutivas (holocárpico), ou com um sistema vegetativo rizoidal especializado (eucárpico), e uma (monocêntrico) ou mais (policêntrico) estruturas reprodutivas; presença de zoósporos orientando-se usualmente por um simples glóbulo oleoso visível; germinação monopolar.
- Blastocladales - os talos quase sempre são bem diferenciados nos sistemas vegetativos, e apresentam um conjunto de hifas nas quais nascem numerosos órgãos reprodutivos; possuem o zoósporo sem um glóbulo visível e germinação bipolar; muitas espécies dessa classe apresentam reprodução sexuada por meio de planogametos, isogametos ou anisogametos, com alternância de gerações; apresentam formação de esporângios de resistência.
- Monoblepharidales - o talo não apresenta uma célula basal bem definida; são fungos compostos por delicadas hifas muito ramificadas, e a reprodução sexuada ocorre por meio de oogametos, onde o gameta masculino sempre encontra-se livre no meio, enquanto o gameta feminino é desprovido de flagelo.

Na Figura 6 está representado, de forma esquemática, o ciclo de vida da espécie *Chytriumyces hyalinus*, pertencente à Classe Chytridiomycetes, de acordo com HERRERA & ULLOA (1990). Segundo a figura, na fase assexuada de reprodução do organismo, cada um dos zoósporos liberados pela vesícula

esporangial nada livremente por algum tempo, encista-se, e após um determinado período germina dando origem a um talo que se transformará, posteriormente, em zoosporângio. Na fase sexuada de reprodução, a germinação dos zoósporos encistados dá origem a talos diferenciados que se unirão para formar o zigoto. Na seqüência, o zigoto se transformará em zoosporângio de resistência através de divisões meióticas. O zoosporângio de resistência germinará dando origem a zoósporos, da mesma maneira que o zoosporângio formado na fase assexuada.

Na Figura 7 (HERRERA & ULLOA, 1990), está representado de forma esquemática o ciclo de vida de *Allomyces macrogynus*, espécie pertencente à Classe Chytridiomycetes. O ciclo de vida dessa espécie caracteriza-se pela alternância de gerações bem definidas, com a formação de gametotalos hapóides alternados com esporotalos diplóides. Em muitas espécies, a união (fecundação) dos planogametas livres (isogametas), formados em diferentes gametângios, acontece na presença de baixos teores de água no meio, sendo que cada par de planogametas dá origem a um zigoto biflagelado que se movimenta até invadir a célula hospedeira. Após penetrar nos tecidos da célula hospedeira, o zigoto perde os flagelos, adquirindo uma forma esférica dotada de parede espessa e de caráter resistente, denominado esporângio de resistência, forma de vida latente característica dos períodos de temperatura mais baixa. Em condições favoráveis, o núcleo do esporângio divide-se em dois (por meiose), e assim sucessivamente até formar muitos núcleos, os quais originarão numerosos zoósporos, e o esporângio de resistência tornam-se um zoosporângio.

As Figuras 6 e 7 foram apresentadas para evidenciar o ciclo de reprodução de fungos pertencentes a Classe Chytridiomycetes, uma vez que os organismos em destaque neste estudo pertencem a esta classe, e por não constar em literatura um ciclo típico dos organismos de interesse.

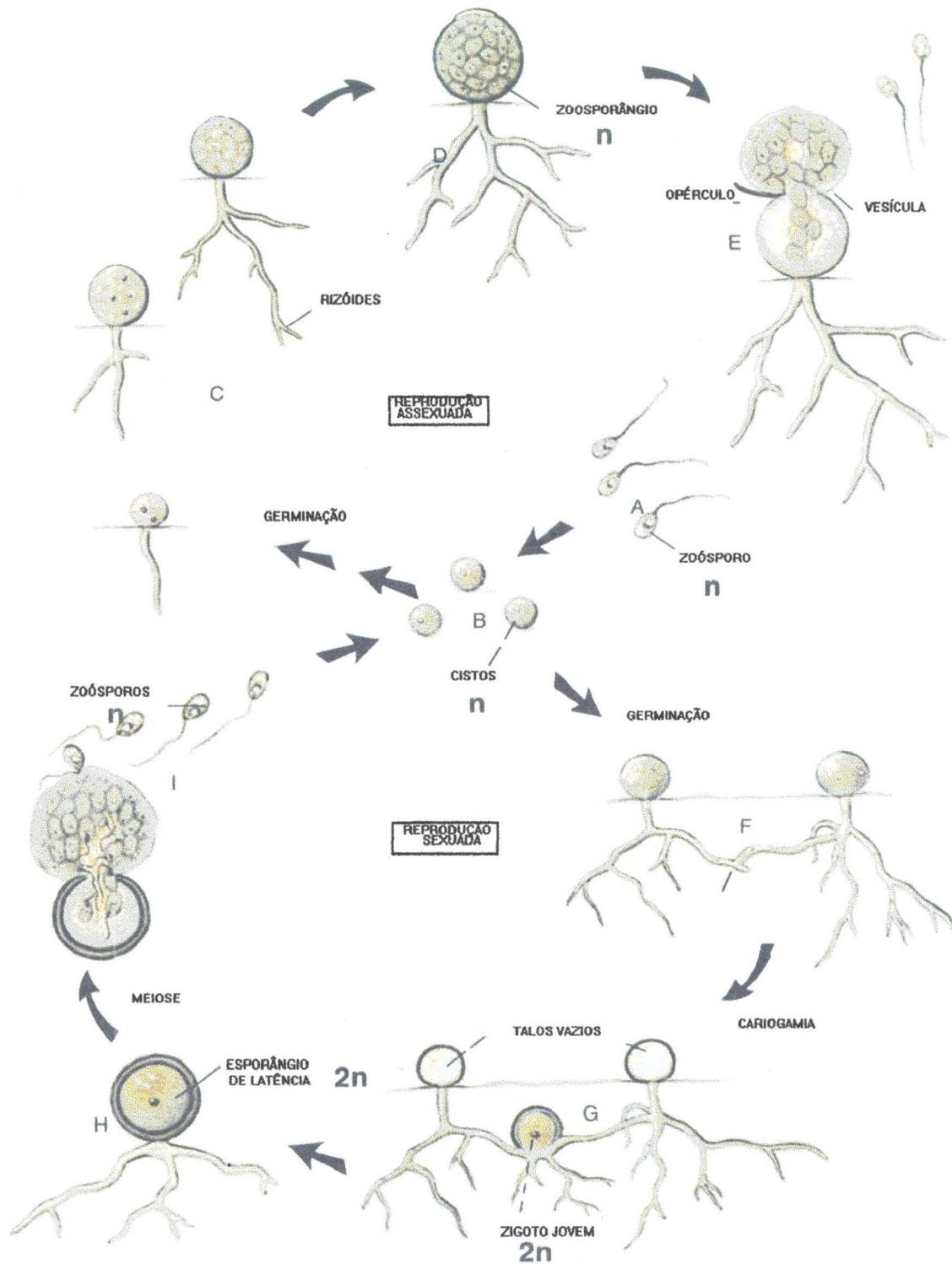


Figura 6 - Ciclo de vida de *Chytriumyces hyalinus*.

A-E. Estágios constituintes da reprodução assexuada. F-I. Estágios constituintes da reprodução sexuada (HERRERA & ULLOA, 1990)

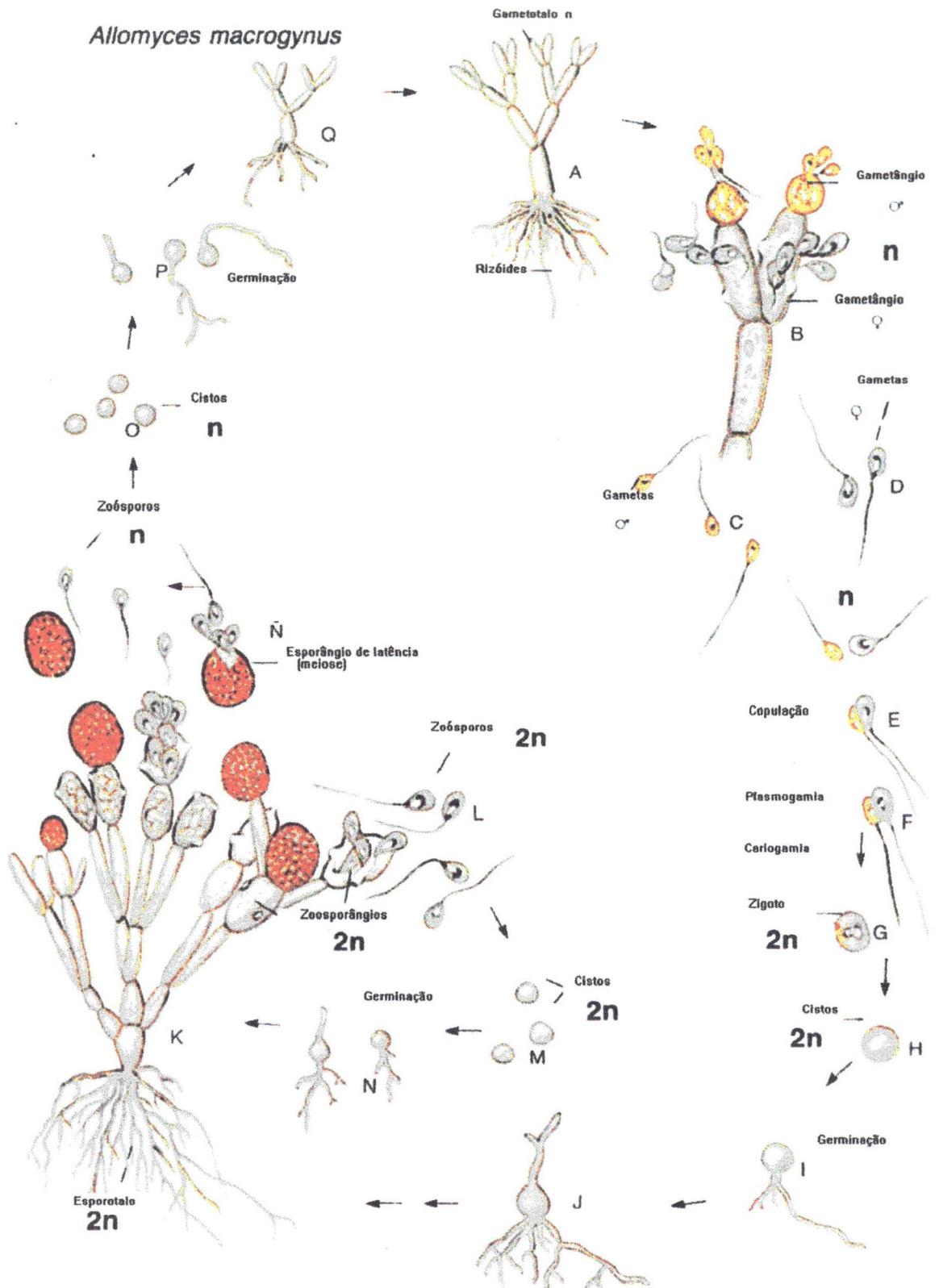


Figura 7- Ciclo de vida de *Allomyces macrogynus* (continuação na página posterior).

Figura 7- Ciclo de vida de *Allomyces macrogynus*

A. Gametotalo jovem aderido ao substrato através de rizóides. B. Gametotalo com gametângios masculinos, de coloração laranja, desenvolvidos sobre gametângios femininos, incolores. C-D. Gametas femininos e masculinos móveis (planogametas) liberados pelos gametângios. E-H Copulação dos gametas sexuais e formação do zigoto biflagelado, que, posteriormente, perde os flagelos e encista. I-K Germinação do cisto diplóide para transformar-se em esporotalo, no qual desenvolvem-se zoosporângios de dois tipos, de parede delgada e incolor (mitosporângios) e outros de parede mais espessa e coloridos (meiosporângios). L-N. Os zoósporos diplóides liberados dos zoosporângios incolores nadam por um tempo, encistam-se e germinam dando origem a novos esporotalos, repetindo a formação da geração diplóide. N-Q. Os zoosporângios de resistência (latência) através do processo de meiose, germinam e liberam zoósporos haplóides, os quais se encistam e posteriormente germinam para formar gametalos que iniciam uma nova geração haplóide (HERRERA & ULLOA, 1990)

Os fungos que apresentam zoósporos em seu ciclo de vida constituem um grupo polifilético de quatro classes, segundo BARR (1988). Em comparação a outras classificações, o autor apresenta a Classe Chytridiomycetes subdividida em quatro ordens, conforme pode-se observar na Figura 8. A apresentação da nova classificação proposta está baseada na ultra-estrutura dos zoósporos. Entre as famílias que constituem a ordem Spizellomycetales, a família Neocallimasticaceae recentemente criada, foi definida para abranger os fungos encontrados no rúmen, com base no desenvolvimento e na morfologia do talo e das organelas citológicas dos zoósporos, como por exemplo o arranjo e a inserção dos flagelos no esporo.

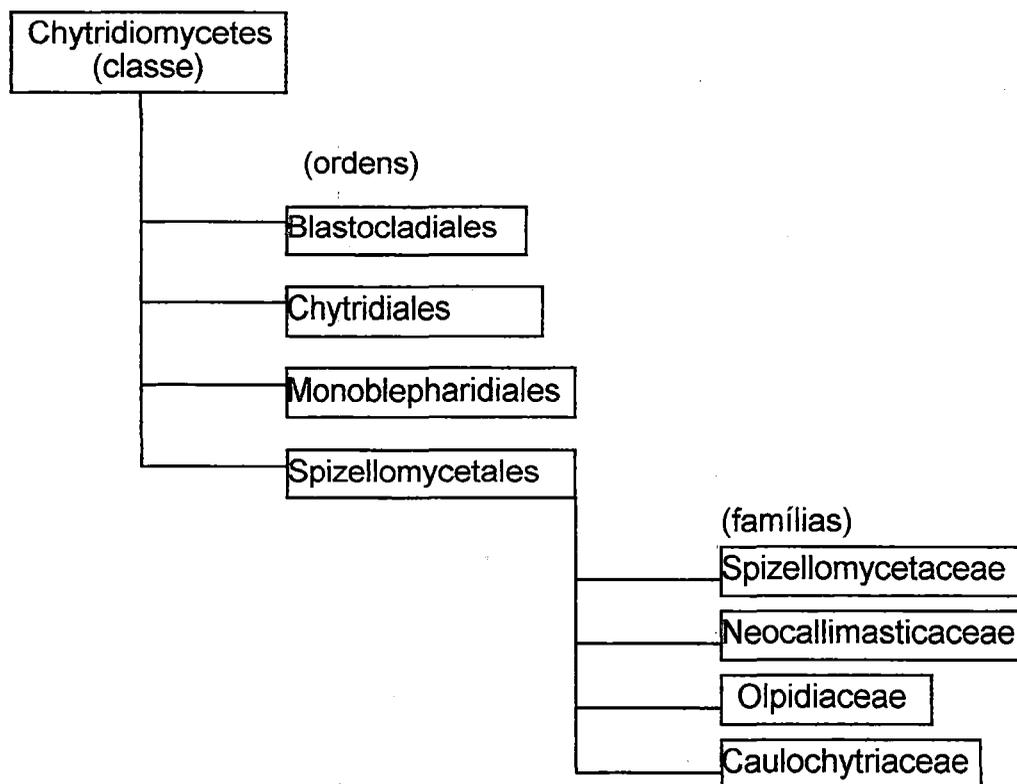


Figura 8 - Chave taxonômica para a Classe Chytridiomycetes (BARR, 1988)

BARR apud BARR (1988) observou que os detalhes estruturais dos zoósporos somente foram conhecidos pelo uso da microscopia eletrônica. Anteriormente ao uso da microscopia eletrônica, as diferenças entre os zoósporos foram descobertas por longas investigações sob microscopia de luz, que auxiliaram na organização dos níveis dos fungos até então denominados fiicomycetes.

BARR (1988), após algumas observações acerca de estudos realizados com fungos anaeróbios de rúmen, sugeriu alguns critérios taxonômicos para redefinir e classificar tais organismos. Para o autor, um grande número de espécies de fungos pertencentes à Classe Chytridiomycetes necessitava ser inoculado em meio de cultura, e seus zoósporos estudados em microscopia eletrônica. As famílias foram tradicionalmente agrupadas segundo as características morfológicas dos talos. Esse critério foi proposto afim de facilitar a classificação, porém, não é o mais usual para subdivisão de ordens e famílias. Como exemplo, na Ordem Chytridiales estão agrupadas espécies monocêntricas e policêntricas com o mesmo subtipo de zoósporo. Alguns trabalhos realizados na década de 80 (MUNN et al, 1981; HEATH et.al.,1983; MUNN et al.,1888) utilizaram a avaliação da ultra-estrutura dos

zoósporos através de microscopia eletrônica para a definição dos gêneros relativos aos fungos anaeróbios de rúmen.

As fases de crescimento vegetativo e dos zoósporos de três chitridiomycetos celulolíticos de rúmen, *Piromonas sp*, *Sphaeromonas sp* e *Neocallismatix sp* cepa NF1, foram objeto de estudos de MUNN et al. (1988). Através de microscopia eletrônica, algumas características comuns foram suficientes para distinguir estes anaeróbios obrigatórios dos demais chitridiomycetos aeróbios e facultativos. Estas características podem ser resumidas da seguinte forma: ausência de mitocôndrias e presença de hidrogenossomo em todos os estágios do ciclo de vida; presença de rizóides e esporângios recobertos com cristais dispostos em ordem hexagonal; nos zoósporos a presença de uma superfície de apoio das organelas de motilidade distinta do corpo celular, e os ribossomos organizados sob a forma de membranas associadas a hélices e glóbulos.

Para BARR (1988), a maioria dos critérios usuais ainda empregados na classificação de espécies foi criada fortuitamente, especialmente em relação àquelas espécies incluídas nas ordens Chytridiales e Spizellomycetales. Isto significa que muitos fungos isolados a partir do rúmen poderiam estar erroneamente identificados como uma espécie diferente da real, uma vez que se desenvolveram em cultura pura, e que as condições fisiológicas *in vivo* e *in vitro* poderiam promover alterações na morfologia de crescimento e correlações incorretas das características desses organismos. Segundo o autor, a provável solução para a sistemática dos Chytridiomycetes é viabilizar o crescimento de tais organismos em laboratório, sob condições padronizadas. Estudos a nível molecular poderiam ser utilizados no auxílio da sistemática, afim de serem explorados com o objetivo de fixar padrões para todos os grupos de Chytridiomycetes, traçando relações filogenéticas entre os diversos gêneros. Segundo MILLER apud BARR (1988), muitas espécies foram identificadas com base na morfologia dos talos e habitats de origem, mas tais critérios vêm sofrendo alterações. Muitos métodos foram criados para o desenvolvimento de fungos em cultura pura, e um grande número de variações morfológicas foi diagnosticado.

3.4. Fungos Anaeróbios Celulolíticos

Neste capítulo está apresentado algumas considerações a respeito do processo de digestão anaeróbia no sistema gastro-intestinal de ruminantes e o papel desempenhado pelos microrganismos na degradação da fibra vegetal. Nesta linha, procurou-se ressaltar a importância dos fungos anaeróbios no processo de digestão da fibra vegetal e o ciclo de vida de tais organismos no rúmen, bem como os métodos de isolamento para fungos anaeróbios descritos em literatura.

3.4.1. Digestão Anaeróbia no Rúmen

Um dos ecossistemas anaeróbios em que a digestão da celulose sempre foi bastante investigado e descrito é o rúmen, parte do sistema gastrodigestivo de animais ruminantes como bovinos e caprinos. (AKIN et al., 1983; WILLIAMS and DINUSSON, 1973; DEMEYER, 1981; ORPIN, 1984; FONTY et al. 1989; MAAS and GLASS, 1991).

No rúmen dos animais herbívoros ocorre naturalmente o processo de digestão anaeróbia, pela presença de microrganismos que se desenvolvem e promovem a degradação das fibras vegetais para o animal. Pela definição de HUNGATE apud GIAJ-LEVRA (1991), o rúmen é um ambiente que apresenta condições constantes de mistura da alimentação, temperatura e pH, sob baixo potencial de oxi-redução.

A Figura 9 (BROCK & MADIGAN, 1991) apresenta um esquema no qual pode ser visualizado o aparelho digestivo dos herbívoros ruminantes. O conteúdo alimentar entra no rúmen misturado com a saliva através dos movimentos de mastigação e ação peristáltica, e as fibras de celulose são transformadas em uma fina suspensão, propícia ao ataque microbiano. A massa alimentar sob ação peristáltica é empurrada para o interior do retículo, onde ocorre a divisão do bolo alimentar em pequenas porções as quais poderão voltar a boca, sendo novamente mastigadas, misturadas com a saliva, engolidas e conduzidas ao abomasso, um órgão semelhante a um estômago com pH acidificado. No abomasso inicia o processo digestivo que terá continuidade no intestino delgado e grosso.

Conforme HOBSON & WALLACE (1982), o conteúdo alimentar em geral permanece no rúmen por um período mínimo de nove horas, e as partículas alimentares maiores podem ficar retidas até três dias. O processo de digestão tem seu

início com liberação da saliva sobre o alimento, a qual contém bicarbonatos e fosfatos que funcionam como agentes-tampões da fermentação, mantendo o pH em torno de 6,5 e favorecendo o crescimento dos microrganismos. Para BROCK & MADIGAN (1991), no rúmen a ação enzimática de bactérias, fungos e protozoários permite a hidrólise da celulose em celobiose e glicose. A glicose sofre fermentação bacteriana, ocorrendo a formação de ácidos voláteis, como butírico, propiônico e acético e os gases dióxido de carbono e metano. Os ácidos graxos passam pelo rúmen através de sua parede, são conduzidos pelas vias sanguíneas e oxidados. Assim, os ácidos graxos consistem na maior fonte de energia para o animal. Em adição a sua função digestiva, os microrganismos configuram-se como a principal fonte de nutrientes essenciais para o animal, através da síntese de aminoácidos e vitaminas. Após a fermentação encontram-se no conteúdo ruminal um grande número de células microbianas (10^{10} a 10^{11} bactérias por mililitro de fluido ruminal), e material parcialmente digerido. O restante do processo fermentativo tem continuidade através do trato gastro-intestinal do animal, onde ocorrerá um processo digestivo similar aos animais que não são ruminantes.

As reações ocorridas no rúmen, durante a digestão das fibras vegetais, como mostrado na Figura 10 (HOBSON, 1976), são essencialmente aquelas da fermentação anaeróbia, incluindo a produção de ácido acético, propiônico e butírico. A fermentação produz um excesso de hidrogênio, o qual é removido por bactérias produtoras do metano. HOBSON (1976) verificou que sob condições de alimentação intermitente, o rúmen se assemelhava a um processo de fermentação descontínuo, com a formação dos seguintes gases: 60 a 70% de dióxido de carbono, 30 a 40% de metano, 7% de nitrogênio, 0,2% de hidrogênio, 0,01% de gás sulfídrico e 0,6% de oxigênio. O dióxido de carbono se constitui no principal gás formado no processo, originado a partir do bicarbonato da saliva do animal ruminante e dos produtos de fermentação microbiana. LIN apud GIAJ-LEVRA (1991) ressaltou que os carboidratos complexos após sua hidrólise e fermentação, geram o ácido pirúvico, que por sua vez, a partir das diferentes espécies de microrganismos e condições de crescimento, levam à formação dos produtos finais de fermentação nas seguintes concentrações: ácido acético (56 a 70%), propiônico (17 a 29%) e butírico (9 a 19%). Estes ácidos são transportados do rúmen por via sanguínea para os tecidos do animal, e utilizados como fonte de energia e carbono. Segundo BRYANT (1970), quase todas as bactérias do rúmen utilizam amônia como a principal fonte de nitrogênio para a síntese de aminoácidos. No entanto, a maior parte da amônia é convertida a uréia e excretada pelo animal ruminante.

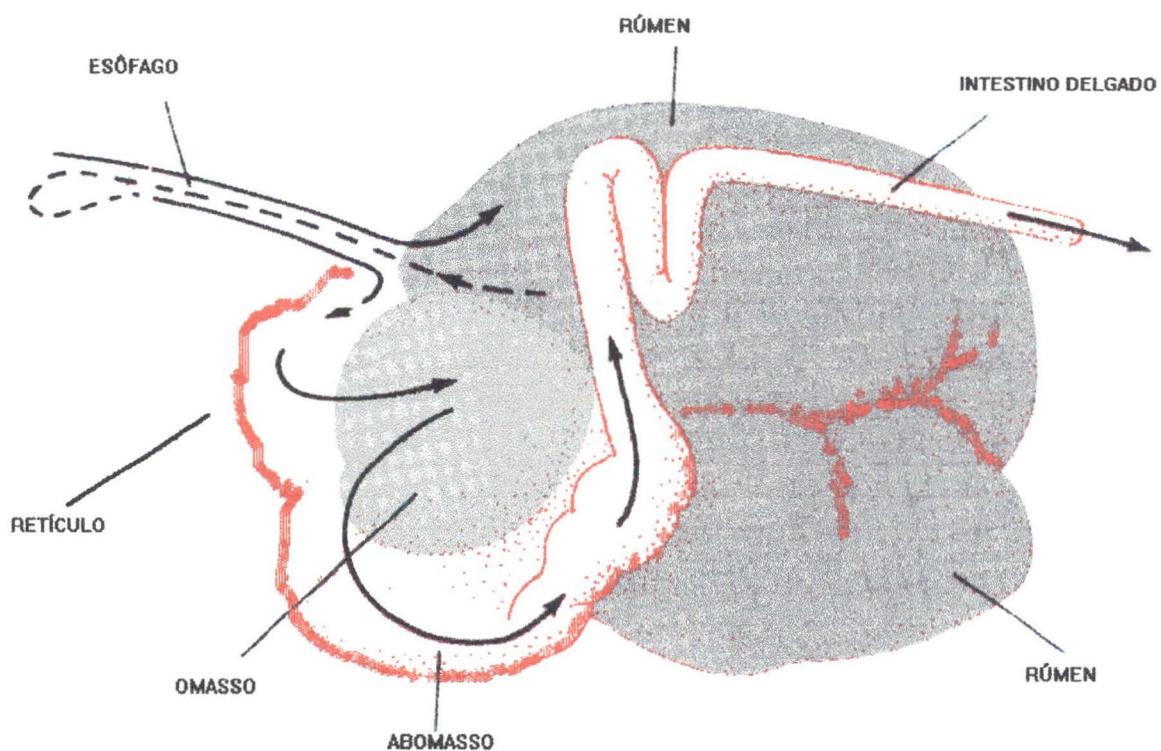


Figura 9 - Esquema do sistema digestivo de animais ruminantes - Rúmen. 1- reticulo, 2.-omaso, 3- abomaso, 4- intestino delgado, 5- ceco, 6- intestino grosso, 7- esôfago (BROCK & MADIGAN, 1991).

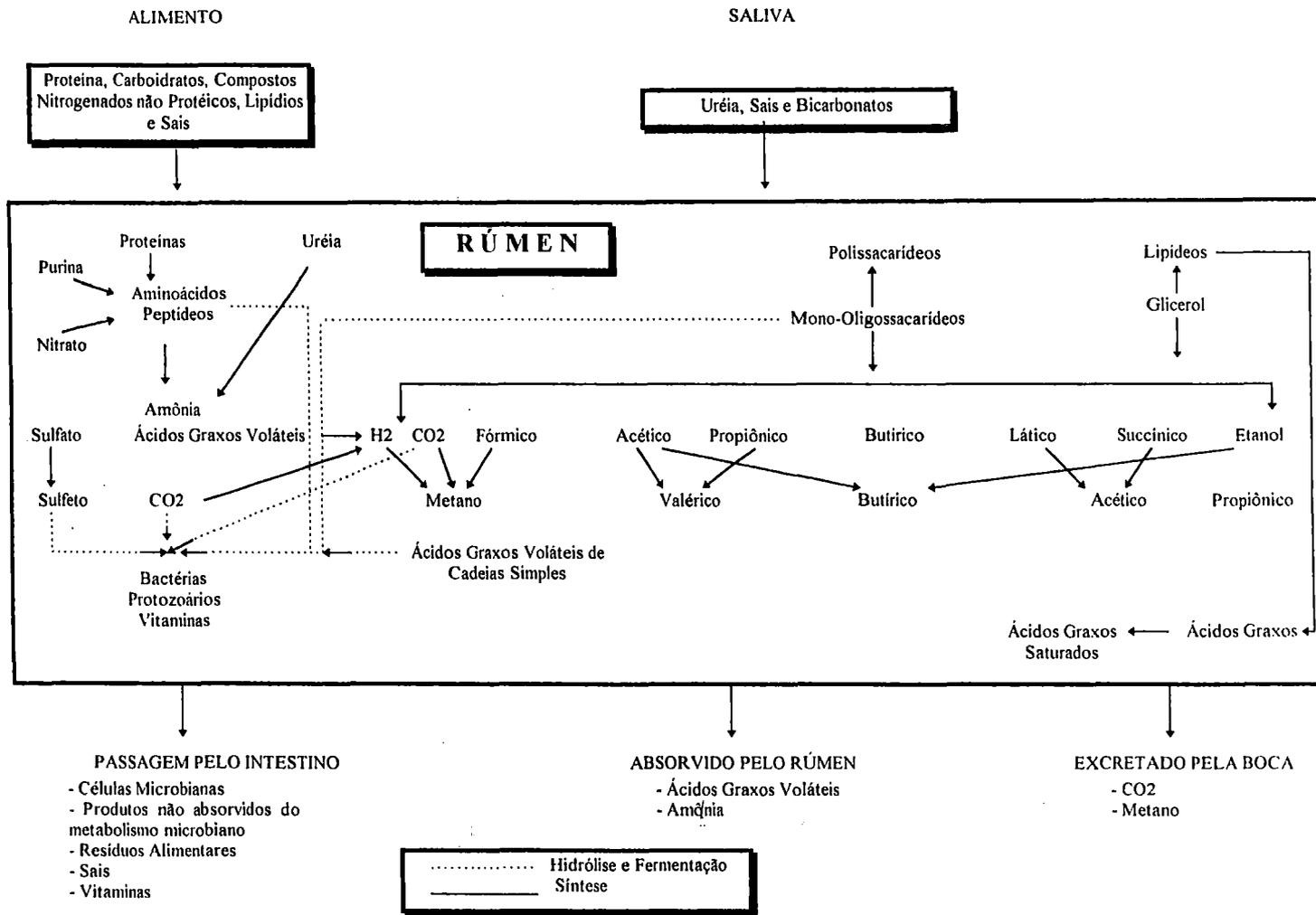


Figura 10 - Principais reações que ocorrem durante a digestão do alimento no rúmen (HOBSON apud GIAJ-LEVRA, 1991).

Para TEMMES & METALA apud GIAJ-LEVRA (1991), a diferença existente entre o processo de digestão no rúmen e o processo da digestão anaeróbia aplicados ao tratamento de resíduos, é a forma de geração do gás metano nesses ambientes. No rúmen, a produção do metano é quase exclusivamente devida à redução do dióxido de carbono pelo hidrogênio, através da atividade das bactérias metanogênicas hidrogenotróficas. Em contrapartida, nos processos anaeróbios de tratamento de resíduos, geralmente 70% do metano formado é proveniente da ação das bactérias metanogênicas acetoclásticas que atuam através de um mecanismo de descarboxilação do ácido acético. O restante do gás formado nesses ambientes é devido a ação das metanogênicas utilizadoras de hidrogênio e dióxido de carbono. Tais diferenças estão apresentadas na Figura 11, onde constam as etapas metabólicas da digestão anaeróbia e o fluxo de substratos em diferentes ecossistemas anaeróbios, TEMMES & METTALA apud GIAJ- LEVRA (1991). Observa-se nesta figura que os ácidos voláteis formados a partir da fermentação da celulose no rúmen são utilizados pelo animal. Portanto a celulose, no rúmen, não é convertida completamente a produtos gasosos, ao contrário do ocorrido em digestores de lodo de esgoto e na maioria dos ambientes anaeróbios naturais, em que o metano e o dióxido de carbono são os principais produtos formados no processo.

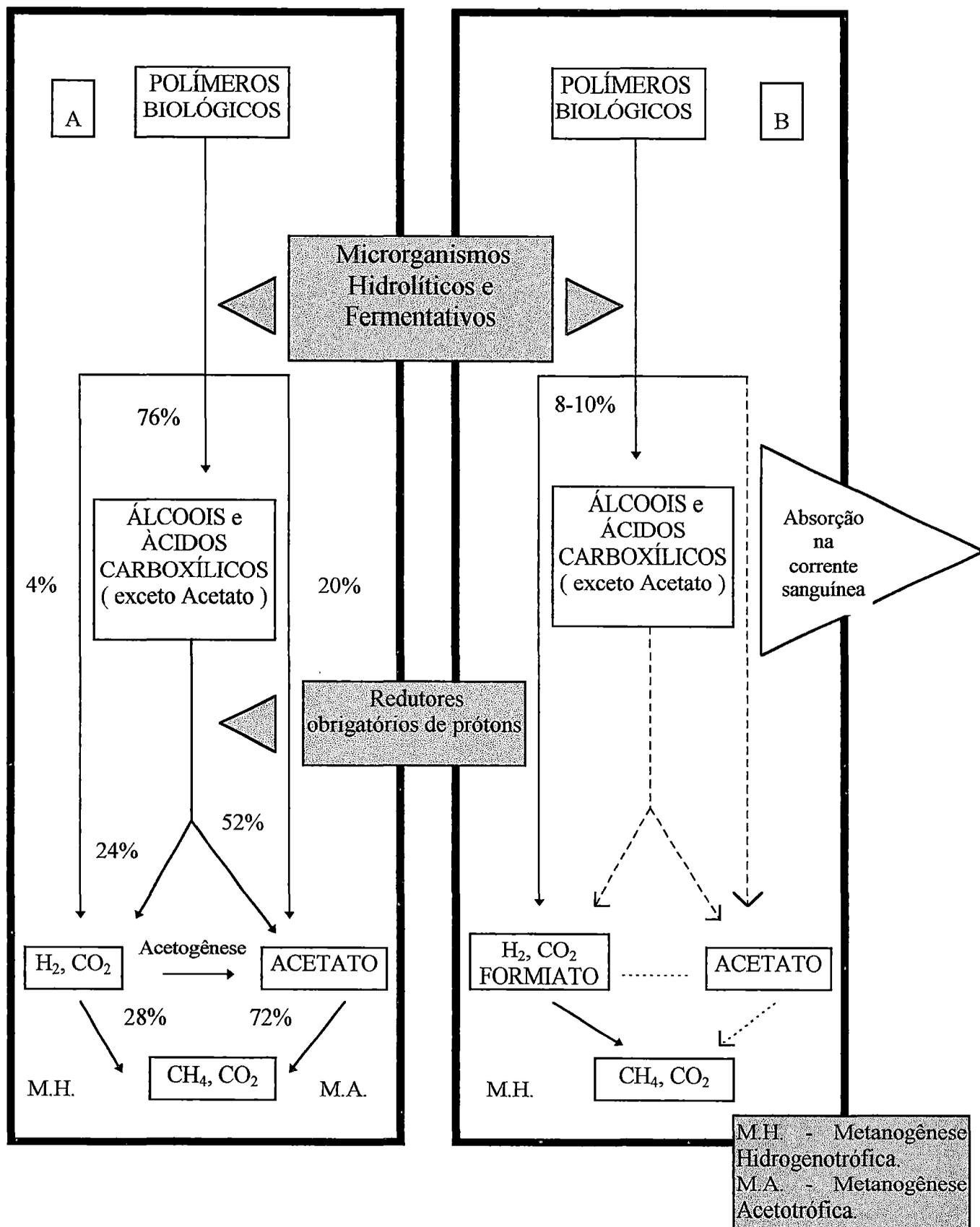


Figura 11 - Esquema da digestão anaeróbia e fluxo de substratos nos sistemas anaeróbios de degradação: (A) completa degradação da matéria orgânica em sedimentos aquáticos, pântanos e lodo em digestão. (B) degradação parcial da matéria orgânica em sistemas gastro-intestinal de animais ruminantes (TEMME & METTALA apud GIAJ-LEVRA, 1991).

3.4.2. Ciclo de vida dos fungos anaeróbios

Na verdade, até pouco tempo, sabia-se que a microbiota do rúmen se constituía por bactérias celulolíticas e protozoários. BRYANT (1970) constatou que os grupos de microrganismos encontrados no rúmen, eram protozoários ciliados, alguns flagelados e uma variedade de bactérias, principalmente anaeróbias não formadoras de esporos. LIN et al. (1985) mostraram que a maioria dos carboidratos presentes na alimentação dos animais ruminantes como celulose, pectina, amido, hemicelulose e outros carboidratos, era hidrolisada e fermentada pela complexa interação entre as espécies de bactérias celulolíticas e protozoários.

WOLIN apud LJUNGDAHL & ERIKSSON (1985) descreveu espécies de flagelados anaeróbios isolados do rúmen de bovinos, ovinos e caprinos, referindo-se aos protozoários como: *Neocallismastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* e *Piromonas communis*. ORPIN (1975), BAUCHOP (1979) e HEATH et al. (1983) verificaram que tais protozoários flagelados eram na verdade fungos com características comuns aos ficomicetos aquáticos.

O ciclo de vida destes ficomicetos presentes no aparelho digestivo de ruminantes, constitui-se de uma alternância de gerações entre um estágio livre em forma de zoósporos móveis no fluido ruminal, e um estágio de vida que não apresenta movimentos, ou fase reprodutiva vegetativa, a qual está intimamente associada às partículas em digestão no rúmen. (ORPIN, 1975, 1976, 1977; BAUCHOP, 1979; ORPIN & LETCHER, 1979).

Como anteriormente referido, AKIN (1986) também acreditou que os zoósporos (esporos flagelados dos fungos) eram protozoários, mas verificou que ao inoculá-los em meio de cultura para crescimento, ocorria a desesporulação e a formação de hifas (parte vegetativa) e esporângios (órgãos onde são formados os esporos). Através de microscopia eletrônica, o autor constatou que esses fungos se desenvolviam aderidos a materiais lignocelulósicos.

Baseado na ultra-estrutura de zoósporos poliflagelados, HEATH et. al. (1983) incluíram a espécie *Neocallimastix frontalis* em uma nova família Neocallimasticeae, da Classe dos Chytridiomycetes, com redefinição dos atributos ao incorporar este novo microrganismo. Como afirmado por AKIN (1986), esta

redefinição é absolutamente possível, já que outras espécies ao serem descobertas, promovem modificações na taxonomia geral de fungos.

A Classe dos Chytridiomycetes foi enumerada em três ordens distintas de fungos, como anteriormente referido. No entanto, com o recente aparecimento dos fungos anaeróbios do rúmen, essa classe recebeu uma nova ordem para acomodar taxonomicamente tais organismos, a Ordem Spizellomycetales.

ORPIN & JOBLIN apud CHENG (1990) afirmaram que fungos anaeróbios de rúmen podem desempenhar um importante papel na digestão de materiais celulósicos. Para BAUCHOP (1981), os esporos flagelados de tais fungos demonstraram atração quimiostática por materiais celulósicos e ataque seletivo a tecidos vegetais específicos, sobre os quais os zoósporos se desenvolvem dando origem as hifas que penetram profundamente nos tecidos vegetais.

Os fungos anaeróbios de rúmen foram encontrados inicialmente no fluido ruminal, caracterizando-se por apresentar estágios de vida livre (ORPIN, 1975,1976). Porém, alguns estudos posteriores avaliaram a digestão das partículas vegetais, através de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, e revelaram que o estágio vegetativo destes fungos ocorria em íntima associação com as partículas vegetais em digestão no rúmen (ORPIN, 1977; ORPIN & LETCHER, 1979). Segundo ORPIN & BOUNTIFF apud ORPIN (1984), a invasão nos tecidos vegetais pelos zoósporos destes fungos é rápida, devido ao fato de fixarem-se em regiões fragmentadas das partículas, incisões finais e estômatos, onde os esporos incistam, germinam e dão origem ao estágio vegetativo. A análise microscópica dos fragmentos vegetais removidos após um período de vinte duas horas da alimentação do animal, demonstraram que em torno de 30% das partículas maiores de 2 mm e em processo de digestão, apresentavam-se infectadas por fungos anaeróbios.

BAUCHOP (1981) ao estudar os fungos de rúmen, verificou que o ponto-chave para o entendimento do ciclo de vida de tais organismos concentrava-se na colonização dos zoósporos nos tecidos e fragmentos vegetais. Os zoósporos fixam-se rapidamente aos fragmentos vegetais no rúmen, encistando-se, e após 2 a 3 horas, hifas podem ser detectadas em tecidos mais internos, através de coloração com “Azul-do-Congo” ou “Azul-Niágara”. O desenvolvimento dos fungos anaeróbios do rúmen resultou na produção de muitos rizóides, talos e esporângios. Os esporângios aumentavam em tamanho entre 12 e 24 horas, atingindo assim o tamanho que indica

maturidade, rompiam-se e liberavam novos esporos flagelados. O ciclo total destes fungos anaeróbios pode ocorrer num período de 24 a 30 horas.

Na Figura 12 (MUNN et. al. 1988) está apresentado um esquema do ciclo de vida dos fungos anaeróbios de rúmen, dando ênfase a formação dos zoósporos. Segundo MUNN et al. (1988), os zoósporos de todos os gêneros dos fungos anaeróbios de rúmen possuem motilidade, pois apresentam um flagelo na parte posterior do zoósporo, e movimentos amebóides. Uma vez que os zoósporos são colocados em contato com material vegetal em digestão, germinam e desenvolvem-se dando origem ao estágio de vida vegetativo celulolítico. Nesta etapa do ciclo ocorre a formação dos esporângios, no interior dos quais as organelas citológicas sofrem diferenciação, dando origem a novos zoósporos.

Nos gêneros *Piromonas sp* e *Neocallimastix sp*, os indivíduos fixam-se ao substrato e após perder as organelas de motilidade, desenvolvem-se a partir de um único rizóide, tornando-se organismos com micélio bastante ramificado. Os organismos pertencentes ao gênero *Sphaeromonas sp* fixam-se através da germinação dos zoósporos e produzem um talo bastante amplo, sobre o qual desenvolvem-se sete estruturas esféricas (ORPIN 1976,1977). Nos três gêneros, os rizóides não são septados e sobre estes desenvolvem-se os esporângios, no interior dos quais, formam-se os zoósporos que se distinguirão em cada uma das espécies.

A Tabela 3 apresenta algumas características fundamentais para a distinção das principais espécies de fungos anaeróbios do rúmen. Os dados da tabela foram obtidos a partir das investigações de MUNN et al. (1988), e os organismos utilizados no estudo foram isolados de animais ovinos e cultivados sob atmosfera gasosa de dióxido de carbono, conforme descrito por ORPIN (1975, 1976, 1977).

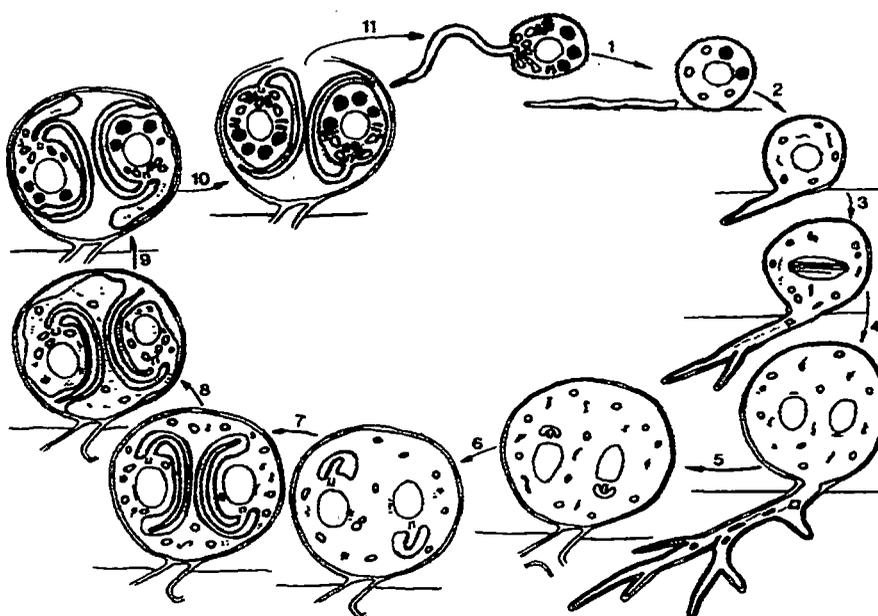


Figura 12 - Ciclo de vida dos fungos anaeróbios de rúmen - Etapas de desenvolvimento dos zoósporos. 1. Os zoósporos aderem-se ao material vegetal através de pequenos rizóides, encistando-se. 2-3. Os rizóides sofrem prolongamento formando ramificações. 4-5 Divisões mitóticas produzem dois ou mais núcleos e os precursores das organelas de motilidade dividem-se dando origem a vesículas. 6-7. As vesículas sofrem prolongamento. (8) A massa celular do interior do esporângio destaca-se da parede. 9. Os ribossomos agregam-se sob duas formas distintas, helicoidais e globulares. 10. A diferenciação dos zoósporos é completa; a parede do esporângio é digerida dando origem a um orifício. 11. Os zoósporos formados são liberados para o meio (MUNN et. al, 1988).

Tabela 3 - Características gerais das espécies de fungos anaeróbios do rúmen

	Zoósporo ^a			Crescimento Vegetativo			
	Corpo	Organela de motilidade		Rizóide	Esporângio		
	Forma	Tamanho	Número	Comprimento (µm)	Número/ forma	Tamanho máximo (comp. x diam. µm)	Tamanho máximo (µm)
<i>Neocallimastix sp</i>	Ovóide	20,6 x 8,7	6 - 18	37	Único/ ramificado	2500 x 15	128 x 64
<i>Piromonas sp</i>	Ovóide	14,2 x 7,0 ^b 9,4 x 7,8 ^c	1	28,8	Único/ ramificado	365 x 11	95 x 49
<i>Sphaeromonas sp</i>	Esférico	9,1 x 7,9	1	24,9	Único/ pouco ramificado	92 x 14	64 x 42
NF1	Ovóide	12,1 x 8,1	1	24,2	Único/ ramificado	1750 x 12	115 x 73

^aMédias de 50 verificações

^bTamanho em isolamentos

^cTamanho depois de cinco dias de incubação

FONTE: MUNN et al. (1988)

3.4.3. Métodos e meios de cultura para isolamento de fungos anaeróbios do rúmen, sob anaerobiose estrita

Das três espécies conhecidas de fungos anaeróbios de rúmen, todas fermentam polissacarídeos constituintes das fibras vegetais, presentes na dieta dos animais ruminantes, resultando em açúcares solúveis, os quais serão utilizados pelo animal como fonte de carbono e energia. A associação destes fungos com as partículas em digestão no rúmen ainda não foi totalmente esclarecida, nem mesmo em que proporção tais organismos estão no conteúdo ruminal. Porém, estima-se que em condições favoráveis, acima de 8% da biomassa microbiana nesse hábitat, pode consistir de fungos celulolíticos anaeróbios (ORPIN apud ORPIN, 1984). Na Tabela 4 estão representadas resumidamente as condições de laboratório pelas quais obtiveram-se os primeiros isolamentos de fungos anaeróbios, a partir do conteúdo ruminal. Os meios de cultura estão descritos, observando-se a proporção de grama por 100 mL de volume final de meio utilizado.

Nos estudos de ORPIN (1975, 1976, 1977) foram coletadas amostras de material obtidas a partir do rúmen de ovinos submetidos a um crescimento confinado, com inserção de cânula permanente no aparelho gastro-intestinal. Para o cultivo das espécies fúngicas citadas, foram utilizados os meios de cultura descritos na Tabela 4, onde pode-se observar a adição de fluido de rúmen clarificado, preparado da seguinte forma:

- o fluido ruminal coletado do animal foi submetido a uma pré-filtragem;
- o material retido, na pré-filtragem foi lavado por duas vezes, e denominado partículas grosseiras (PG);
- o líquido resultante da pré-filtragem foi centrifugado por 15 minutos, em temperatura ambiente, e o sobrenadante resultante denominado FRF. O sedimento resultante foi lavado por duas vezes sendo denominado partículas de tamanho intermediário (PI);
- a porção FRF, resultante da primeira centrifugação, foi submetida a uma nova centrifugação, e o sobrenadante denominado fluido de rúmen clarificado.

Tabela 4 - Condições de cultivos e composição dos meios de cultura utilizados em ensaios de isolamento de fungos anaeróbios de rúmen.

Condições de Isolamento	Espécies		
	<i>Neocallismastix frontalis</i> (*)	<i>Sphaeromonas communis</i> (**)	<i>Piromonas communis</i> (***)
Hábitat	Rúmen de ovino	Rúmen de ovino	
Temperatura	39°C	39°C	39°C
pH	6,5	6,5	6,5
Composição do meio de cultura	- 1,0g extrato de levedura - 3,0g triptona - 0,02g ácido ascórbico - 10mL fluido de rúmen clarificado	- 0,65g na HCO ₃ - 0,64g K ₂ HPO ₄ - 0,50g KH ₂ PO ₄ - 0,64 NaCl - 0,005 CaCl ₂ - 0,005g Mg ₂ SO ₄ - 0,02g glicose - 10mL fluido clarificado	- 0,65g na HCO ₃ - 0,64g K ₂ HPO ₄ - 0,50g KH ₂ PO ₄ - 0,64 NaCl - 0,05 CaCl ₂ - 0,005g Mg ₂ SO ₄ - 0,02g glicose - 10mL fluido clarificado

FONTE: ORPIN (1975)* ; ORPIN (1976)**; ORPIN (1977)***

Para o desenvolvimento de culturas *in vitro*, ORPIN (1975) utilizou o meio de cultura baseado em DIAMOND (1957), descrito na Tabela 4 para o isolamento da espécie *Neocallismastix frontalis*. Os compostos listados foram dissolvidos em 70 mL de água destilada. À esta solução, foram adicionados 10 mL de fluido de rúmen centrifugado, e o meio foi então autoclavado a 121°C e 1 atm. Após o resfriamento do meio a 50°C, além dos compostos já listados na Tabela 4, foi adicionado 1 mL de solução, contendo 100.000 unidades de benzopenicilina de sódio e 0,1g de sulfato de estreptomicina. O meio de cultura foi distribuído assepticamente sob o fluxo gasoso de dióxido de carbono em frascos de dimensões 12,7 x 13,0 cm, sendo mantido 2,5 cm de espaço entre a camada superficial do líquido e a tampa. O primeiro isolamento foi realizado sob fluxo gasoso de dióxido de carbono, a partir da inoculação do meio líquido com 0,2 mL da fração denominada de partículas de tamanho intermediário (PI), obtida no preparo do fluido de rúmen clarificado descrito acima, e incubada a 30°C. Após um período de dois dias de incubação, quando os organismos flagelados foram observados, a camada superficial do meio foi aspirada e descartada. A camada inferior restante, contendo os zoósporos, foi recoberta com meio de cultura semi-sólido fresco. Os frascos foram agitados para

proporcionar a distribuição dos zoósporos sobre a superfície do meio cultura, e incubados nas mesmas condições descritas para o primeiro isolamento. A biomassa fúngica formada sobre o meio, foi transferida para frascos contendo meio líquido, iniciando-se novamente os procedimentos descritos.

O método do “roll-tube” descrito por HUNGATE (1969) para o cultivo de bactérias anaeróbias foi utilizado para o isolamento de fungos anaeróbios de rúmen, no trabalho realizado por JOBLIN (1981). O autor afirmou que o emprego destas técnicas permitiu o isolamento de tais organismos a partir do fluido de rúmen enriquecido, bem como a enumeração de seus zoósporos. Baseado nos métodos descritos para a preparação e pré-redução do meio por HUNGATE (1969), o meio utilizado sob atmosfera de dióxido de carbono consistiu de 17 mL de solução mineral A (composta basicamente por NaCl, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , CaCl_2), 17 mL de solução mineral B (composta de K_2HPO_4), 15 mL de fluido de rúmen clarificado, 500 mg de NaHCO_3 , 200 mg de celobiose, 50 mg de extrato de levedura, 100 mg de triptona, 0,05 de solução de hemina, a 56 mL de água destilada, 0,1 % (p/v) de resazurina (0,3 mL), e 30 mg de cisteína hidrocloreídrica. O fluido de rúmen foi obtido de um ovino com rúmen fistulado, sendo então clarificado por centrifugação a 10.000g por 30 minutos e estocado a -20°C .

Nos estudos de CHENG & LJUNGDAHL (1994), a cepa do fungo anaeróbio de rúmen *Orpinomyces sp* cepa PC-2 foi cultivada conforme as técnicas descritas por BORNEMAN et al. (1991) para a produção de enzimas. Os organismos foram incubados por 8 dias a 39°C em frascos contendo 14 litros de meio basal com 0,3% de Avicel (celulose microcristalina). O meio foi autoclavado por 1 hora, resfriado sob atmosfera de dióxido de carbono, e após, acrescido por 0,03% de cisteína-HCl. Foi utilizada solução de antibiótico consistindo de uma mistura de penicilina (334 U mL^{-1}), estreptomina-sulfato ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cloranfenicol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), filtrada sob condições de assepsia através do sistema Millipore, utilizando membranas de $0,22\mu\text{m}$, e em seguida adicionada para inoculação. Cada frasco foi inoculado com 400 mL de uma cultura previamente sub-cultivada duas vezes, em meio basal, contendo 0,2% de celobiose e solução de antibióticos.

Nos trabalhos desenvolvidos por McSWEENEY et al. (1994), o ficomiceto anaeróbio de rúmen *Neocallimastix patriarcum* foi cedido por C.G. ORPIN. Os procedimentos utilizados para o preparo do meio, armazenamento e os sub-cultivos, foram baseados nas técnicas desenvolvidas por HUNGATE (1969), que serão

descritas neste trabalho posteriormente. O meio basal foi constituído de 20 % (vol/vol) de fluido de rúmen clarificado; 3,75% (vol/vol) de solução mineral A e B (composição baseada nos estudos de Caldwell & Bryant (1966); 0,4% (p/vol) de carbonato de sódio; 0,05 (p/vol) de cisteína hidrocloreídica, e 0,001% (p/vol) de resazurina. O meio foi preparado com e sem a adição de fonte de carbono e fatores de crescimento, mas quando presentes consistiram de 0,5% (p/vol) de celobiose e 0,25% (p/vol) de extrato de levedura. O meio foi preparado sob fluxo gasoso de dióxido de carbono, e distribuído em frascos com capacidade de 25 mL (18 por 250 mm), tampados e autoclavados. No momento da inoculação, em cada frasco foi adicionada vitamina B, e 0,5 mL de uma suspensão de *Neocallimastix patriarcum*. Os frascos foram incubados a 39°C, sob ausência de luz.

3.4.4. Metabolismo e produção de enzimas por fungos anaeróbios

Através dos vários trabalhos realizados com os fungos do rúmen, concluiu-se que tais microrganismos são de fato anaeróbios obrigatórios (ORPIN, 1975, 1976, 1977; BAUCHOP, 1979; MUNN et al., 1981; GOLD, et al., 1988; BARR, et al., 1989). Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos regulatórios do catabolismo destes fungos. No entanto, alguns estudos foram realizados com o intuito de verificar a atividade enzimática e seu papel na degradação das fibras vegetais no rúmen (MOUNTFORT & ASHER, 1983, 1989; WILLIAMS & ORPIN, 1987; WILSON & WOOD, 1992; MCSWEENEY, et al., 1994).

Observações sob microscopia eletrônica de fragmentos vegetais do conteúdo ruminal, vinte e duas horas após a alimentação do animal, revelaram que mais de 30% das partículas maiores de 20 mm estavam infestadas pela micota anaeróbia (ORPIN, 1984). Nos estudos de BAUCHOP (1979), foram empregadas técnicas de colorações de material similar, revelando a penetração dos rizóides na parede celular de células vegetais, e indicando a capacidade de degradação dos polímeros constituintes da mesma.

MOUNTFORT & ASHER (1983) cultivaram a espécie *Neocallimastix frontalis* PN-1 em meios em que a composição do substrato variava. Os açúcares solúveis, como glicose, celobiose, frutose, maltose, sacarose e xilose, foram usados concomitantemente e individualmente para verificar a preferência metabólica do organismo. No caso dos monossacarídeos, a glicose foi preferencialmente utilizada pelos microrganismos, se comparada com a frutose e a xilose. Entre os dissacarídeos

utilizados, a celobiose e a sacarose foram também substratos preferenciais metabolizados pelos organismos.

Os estudos de PEARCE & BAUCHOP (1985) evidenciaram a presença de glicosidases frente aos substratos celulósicos, em culturas de *Neocallimastix frontalis*. A atividade enzimática foi fracionada em extracelular e intracelular a nível de membrana. A atividade máxima da fração de enzima extracelular, produzida pelo fungo inoculado em meio contendo Avicel (celulose cristalina), foi quase o dobro da atividade quando utilizou-se papel de filtro Whatmann nº 1 como substrato. A redução da quantidade de enzimas produzidas no meio contendo papel de filtro como substrato pode ter sido causada pela repressão da síntese de enzimas, como um resultado do aumento da concentração da glicose formada, após seis dias de cultivo. Os autores concluíram também, que utilizando Avicel como substrato, o produto obtido da digestão da celulose em maior proporção foi a glicose e não a celobiose, sugerindo uma maior produção de enzima β -glicosidade em relação as demais celulasas.

A produção de xilanase foi investigada no fungo anaeróbio *Neocallimastix frontalis*, por MOUNTFORT & ASHER (1989). As enzimas foram obtidas através da filtração do sobrenadante das culturas com correção de pH a 5,5. Através de solução tampão de acetato, e incubação à temperatura de 55° C, por cinco minutos. Como substratos de crescimento foram utilizados xilana, xilose, glicose e celobiose. Nas culturas que foram submetidas a elevadas concentrações de xilana, a produção de xilanase sofreu um decréscimo em relação as demais, acompanhada pelo acúmulo no meio de cultura de xilose e, em menor quantidade, de arabinose. Na adição concomitante de substratos como xilana e xilose, a produção da enzima ocorreu durante o crescimento das culturas utilizando apenas xilana, e, num segundo momento, através da utilização de xilose.

WOOD et al. apud WILLIAMS & ORPIN (1987) verificaram que a ação das enzimas produzidas pela população de fungos, protozoários ciliados e bactérias do rúmen é muito similar entre si. Entretanto, a celulase do fungo *Neocallimastix frontalis* RK21 foi particularmente ativa sobre as fibras de celulose cristalina. A pectina, componente da parede celular vegetal, apresentou-se pouco suscetível ao ataque das celulasas dos fungos anaeróbios.

No estudo realizado por LI & CALZA (1991), o conjunto de celulases extracelulares produzido pelo fungo *Neocallimastix frontalis* cepa EB188 foi separado através de cromatografia gasosa em coluna empacotada com hidroxilapatita. As enzimas obtidas no sobrenadante dos meios de culturas dessa cepa foram representativas do sistema celulase. No período de incubação das culturas, mantiveram-se na massa rizoidal valores de 7,0 , 8,0 e 32,0% de carboximetilcelulase, avicelase e β -glicosidade, respectivamente. Com exceção da β -glicosidase, as atividades de origem intracelular apresentaram atividades semelhantes àquelas determinadas para o conteúdo do sobrenadante.

CHEN et al. (1994) desenvolveram um estudo para isolar e definir as propriedades da enzima β -glicosidase extracelular do fungo *Orpinomyces* sp. cepa PC-2. O fungo foi inoculado em meio de cultura contendo Avicel - celulose microcristalina (0,3% p/v), e as enzimas obtidas no sobrenadante foram isoladas por técnicas de cromatografia gasosa. Uma variedade de tipos ou formas múltiplas de β -glicosidase estava presente no sobrenadante das culturas. As β -glicosidases do *Orpinomyces* sp. cepa PC-2 caracterizaram-se como uma glicoproteína que contém 8,5% de carboidratos.

3.5. Fundamentos da degradação de resíduos orgânicos em aterros sanitários

Segundo a CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (1980), o aterro sanitário é tecnologicamente um sistema utilizado para a disposição de resíduos sólidos no solo, particularmente o lixo domiciliar, que, fundamentado em critérios de engenharia e normas operacionais específicas, permite uma confinção segura, em termos de controle de poluição e proteção ambiental.

De acordo com WISE (1987), um ambiente criado a partir de um aterro sanitário, pode ser denominado de ecossistema, uma vez que estão presentes condições ambientais propícias para o estabelecimento de populações microbianas. Estas populações evoluem e multiplicam-se, proporcionando, através de sua ação metabólica a degradação da matéria orgânica complexa até compostos orgânicos mais simples, constituindo desta maneira um verdadeiro ecossistema.

Sob o ponto de vista científico, o aterro sanitário tem importância pelo fato de que nele ocorre a decomposição de matéria orgânica, atuando ali uma comunidade microbiana pouco estudada (WISE, 1987). Os aterros sanitários configuram-se como sistemas biológicos predominantemente anaeróbios, nos quais o tratamento dos resíduos domésticos dispostos ocorre através de interações bioquímicas de diferentes espécies microbianas. Tais interações permitem a conversão da matéria orgânica aterrada em gases e líquidos percolados (REES, 1980; POHLAND & HARPER, 1985; AUGENSTEIN & PACEY, 1991). Esse sistema de tratamento requer um controle efetivo, devido, principalmente, à geração de tais gases e líquidos, os quais, por suas características peculiares podem causar impactos ambientais, caso não sejam manejados e tratados adequadamente

Segundo POHLAND & HARPER (1985), um aterro sanitário não apresenta uma "idade única", mas sim uma família de idades diferentes associadas a esse ecossistema complexo, convergindo para a estabilização final da matéria orgânica. LIMA (1988) ressaltou que em consequência da solubilização dos resíduos sólidos pela atividade microbiana, forma-se um líquido percolado comumente denominado chorume, que, juntamente com a água da chuva, confere o teor de umidade ao aterro sanitário. O líquido percolado ou chorume, é o resultado da ação enzimática dos microrganismos do sistema e dos produtos resultantes da biodegradação.

O processo de conversão dos resíduos orgânicos em aterro sanitário é predominantemente a digestão anaeróbia, que é similar nas vias de degradação nos ambientes naturais, bem como aos diversos sistemas de tratamento desenvolvidos pelo homem, apresentando algumas diferenças quanto ao tipo de substância orgânica a ser degradada e aos tipos de microrganismos atuantes (VILLAS BÔAS, 1990). Na Figura 11 (TEMME & METTALA apud GIAJ-LEVRA, 1991), apresentada anteriormente, observou-se a comparação do fluxo de substratos nos ecossistemas anaeróbios. A Figura 13 (NOVAES, 1986) mostra um esquema das etapas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia de resíduos orgânicos.

Para NOVAES (1986), o grupo de bactérias fermentativas hidrolíticas tem ação na primeira etapa do processo, ou seja, a transformação da matéria orgânica complexa em compostos orgânicos e solúveis de menor cadeia. Este grupo microbiano também é responsável pela transformação dos compostos orgânicos solúveis formados em ácidos graxos orgânicos. Na segunda etapa do processo,

grupos de bactérias acetogênicas são responsáveis pela formação de acetato, dióxido de carbono e hidrogênio, a partir dos compostos formados na etapa anterior. A quarta e quinta etapas do processo se caracterizam pela redução do dióxido de carbono através do hidrogênio, e utilização de acetato para formação do gás metano, dióxido de carbono e água, através da ação metabólica das bactérias metanogênicas.

Deve-se ressaltar que a fase metanogênica é considerada uma das etapas limitantes do processo de digestão anaeróbia em reatores para o tratamento de esgotos, porém para o processo de degradação de resíduos sólidos a fase hidrolítica-fermentativa parece limitante tendo em vista as altas concentrações de celulose.

As bactérias metanogênicas são mais sensíveis em relação as condições desfavoráveis do meio (pH, temperatura, concentração de nutrientes, compostos tóxicos, entre outros). As bactérias metanogênicas são organismos dependentes da atividade de outros anaeróbios, principalmente em função de suas necessidades de fontes orgânicas de cadeia simples. Estes organismos ocupam a posição terminal na cadeia alimentar complexa anaeróbia, embora possam ser substituídas por bactérias que utilizam como aceptores de elétrons compostos como o nitrato e o sulfato. A natureza das interações durante a metanogênese varia com os tipos de organismos envolvidos, com as substâncias químicas no meio e com os compostos orgânicos disponíveis. O pH ótimo para o crescimento das bactérias metanogênicas situa-se na faixa de 6,8 a 7,2 ; abaixo de valores como 6,2, as condições ácidas podem se tornar tóxicas às bactérias metanogênicas. Quanto à temperatura, as populações metanogênicas apresentam duas faixas ótimas de temperatura, nas quais essas populações se multiplicam e produzem CH_4 à velocidade máxima, ou seja em torno de 35°C , e em torno de 60°C (NOVAES, 1986; VAZOLLER & CARVALHO, 1993).

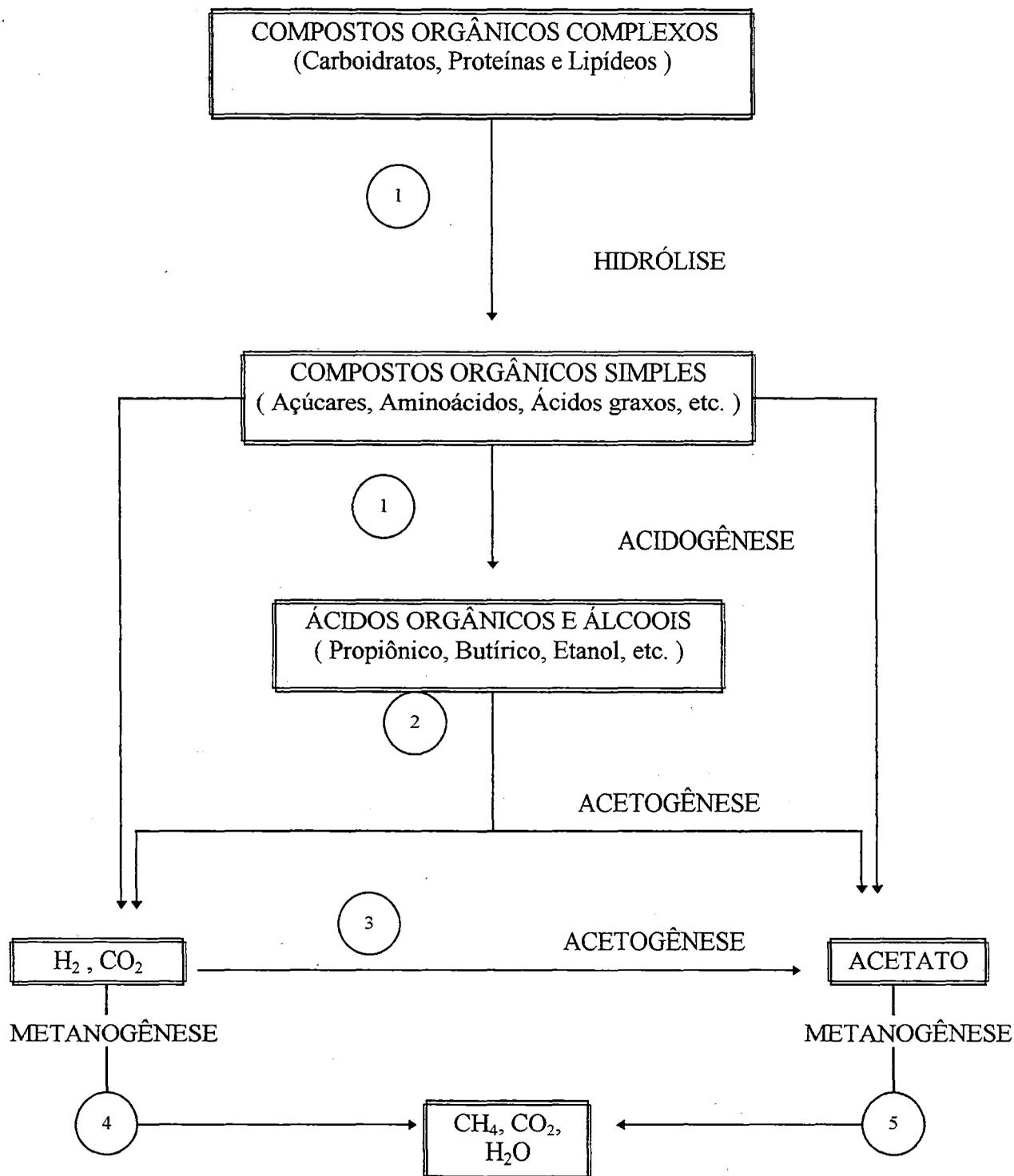


Figura 13 - Etapas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia (NOVAES, 1986):

1. Bactérias fermentativas hidrolíticas;
2. Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio;
3. Bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio;
4. Bactérias metanogênicas redutoras de dióxido de carbono;
5. Bactérias metanogênicas que descarboxilam o acetato.

Os digestores anaeróbios caracterizam-se como um hábitat microbiano, no qual a população bacteriana é originada do inóculo, e o sistema está sujeito a novas inoculações à partir do afluente. O processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos domésticos em um aterro sanitário é lento, devido principalmente à composição da matéria orgânica disposta, merecendo destaque os percentuais de material celulósico. A atuação dos microrganismos celulolíticos é limitada, em virtude dos baixos teores de umidade no sistema e da estrutura molecular da própria celulose (GIAJ-LEVRA, 1991).

De forma genérica, os resíduos sólidos domésticos nos aterros sanitários podem ser dispostos em camadas de 1,5 a 4,0 metros, compactados até atingir uma densidade entre 0,6-0,8 toneladas/m³. Após a compactação, os aterros recebem cobertura diária de 0,2-0,5 metros de solo ou argila. Neste método de disposição, a massa de resíduos aterrada sofre ação inicial da atividade metabólica de populações microbianas aeróbias, por serem predominantes neste momento, atividade esta que resultará na depleção de oxigênio no meio. Porém, as etapas subsequentes do processo de biodegradação dos resíduos ocorre sob condições de anaerobiose. Em condições ideais, a maioria dos componente poliméricos são hidrolisados a monômeros, sendo estes fermentados e convertidos a ácidos graxos de cadeia longa, hidrogênio e dióxido de carbono. Os ácidos graxos, cuja cadeia é formada por mais de dois carbonos, serão convertidos a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. O estágio final da biodegradação de resíduos é a produção de metano, através dos precursores metanogênicos, como acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (BEWLEY et.al., 1991).

As interações existentes internamente e as variáveis que interferem externamente no aterro sanitário, são extremamente complexas, tornando difícil seu estudo de uma forma global. SCHALCH (1992) comentou que a composição gravimétrica dos resíduos sólidos urbanos se constitui num fator de influência externa ao aterro sanitário, porém com ação direta sobre a composição dos gases e líquidos gerados no sistema.

Vários estudos foram realizados com o intuito de esclarecer alguns aspectos relacionados ao comportamento do processo de digestão anaeróbia em aterros sanitários, através da determinação de parâmetros físico-químicos e proposição de modelos para a descrição das fases indicadoras do processo de estabilização da matéria orgânica (FARQUAR & ROVERS, 1973; REES, 1980; POHLAND &

HARPER, 1985; AUGENSTEIN & PACEY, 1991). A atividade microbiana em cada fase do processo de estabilização dos resíduos sólidos, confere características típicas aos líquidos percolados, gerados em aterro sanitário (POHLAND & HARPER, 1985).

A produção e a composição dos gases e líquidos percolados, gerados em aterros sanitários são determinadas por vários fatores, podendo-se destacar: as características dos resíduos sólidos, as condições climatológicas e hidrogeológicas do sítio, idade do resíduo, forma operacional do sistema (altura das camadas de aterramento, compactação, cobertura e impermeabilização), umidade (infiltrações de chuva e nascentes), drenagem e captação (ARRUDA et al., 1995).

Em muitos trabalhos, o potencial de geração de metano em sistemas como aterros sanitários têm sido investigado, porém com pouca ênfase nos processos de hidrólise intermediária e nas reações de fermentação a partir dos resíduos dispostos. Sabe-se, no entanto, que as vias de degradação dos compostos orgânicos no aterro podem ser compreendidas através da análise do comportamento dos gases e dos líquidos gerados ao longo do tempo de disposição dos resíduos nesses sistemas. A Figura 14 (BEWLEY et. al., 1991) mostra um esquema geral do processo de degradação de alguns compostos orgânicos e seus produtos, os quais tem sido encontrados através de análises físico-química de amostras líquidas e gasosas de vários aterros monitorados. Os principais produtos finais da fermentação a partir do aterramento de resíduos constituem-se em ácidos graxos voláteis, dióxido de carbono e metano, além da quantidade de traços de outros hidrocarbonetos voláteis de dois e cinco carbonos.

No esquema apresentado na Figura 14 (BEWLEY et al., 1991), considera-se apenas o metano, o dióxido de carbono e o íon amônio como produtos da degradação dos resíduos em aterro. Porém, o autor ressalta que muitos aterros são caracterizados por elevadas Demandas Bioquímicas de Oxigênio (DBO_5), baixo pH nos líquidos percolados, e baixa produção de metano. Geralmente, as elevadas concentrações de ácidos voláteis estão associadas com elevadas DBO_5 , e o aumento na concentração de ácidos pode causar queda nos valores de pH dos líquidos percolados, resultando na solubilização de uma gama variada de íons metálicos, conforme pode-se visualizar na Figura 15, segundo BEWLEY et. al. (1991). A fermentação inicial de carboidratos e proteínas para ácidos voláteis, hidrogênio e dióxido de carbono em aterros é acompanhada por um rápido decréscimo nos valores de pH do sistema, o que pode

afetar a atividade do microrganismos metanogênicos. De acordo com estes autores, nos aterros sanitários, enquanto a produção de metano aumenta, a concentração de ácidos graxos voláteis e íons metálicos decresce proporcionalmente.

A celulose constitui-se no principal carboidrato presente nos resíduos sólidos urbanos, sendo que a taxa de celulose: hemicelulose: lignina, no papel aterrado é próxima a do papel jornal, isto é, 70:15:15. A biodegradabilidade da celulose do resíduo sólido doméstico é maior que a natural e, particularmente, a resultante do papel e dos restos de comida, pode ser comparada com aquela encontrada no lodo de esgoto onde a estrutura primária de celulose havia sido destruída após um processo de pré-cozimento. Entretanto, a biodegradabilidade dos resíduos provenientes da varrição e das podas de jardim dispostos em aterros é bastante similar à encontrada no conteúdo do rúmen, em que a maioria da celulose nativa está sob o estado cristalino e lignificada (REES, 1980)

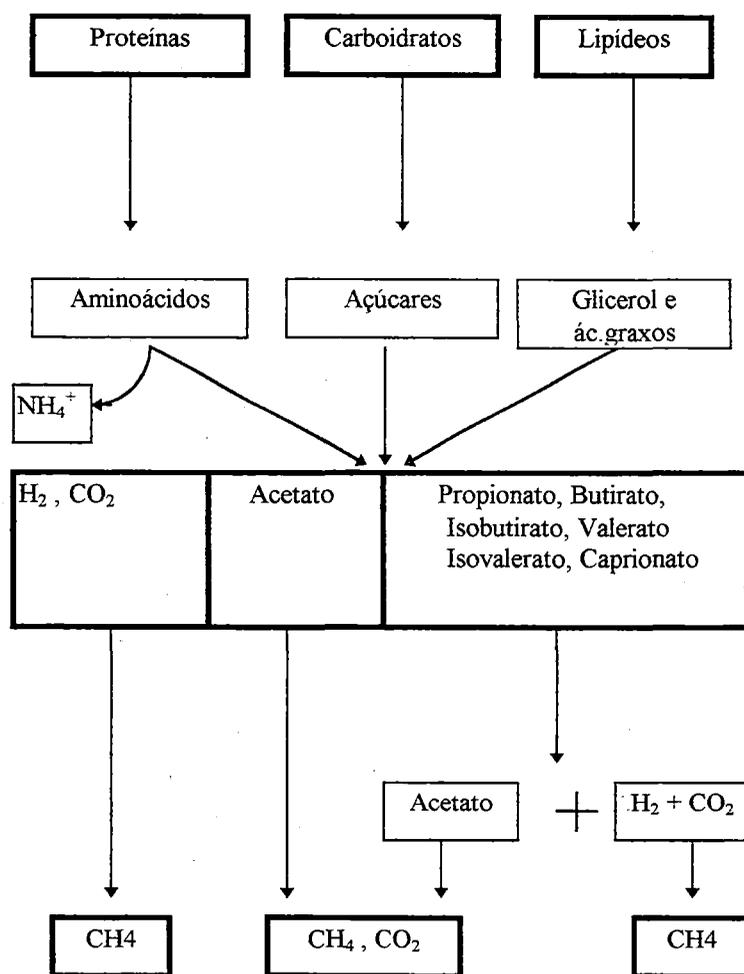


Figura 14 - Esquema representativo do processo de degradação de compostos orgânicos em aterros sanitários (BEWLEY et al., 1991).

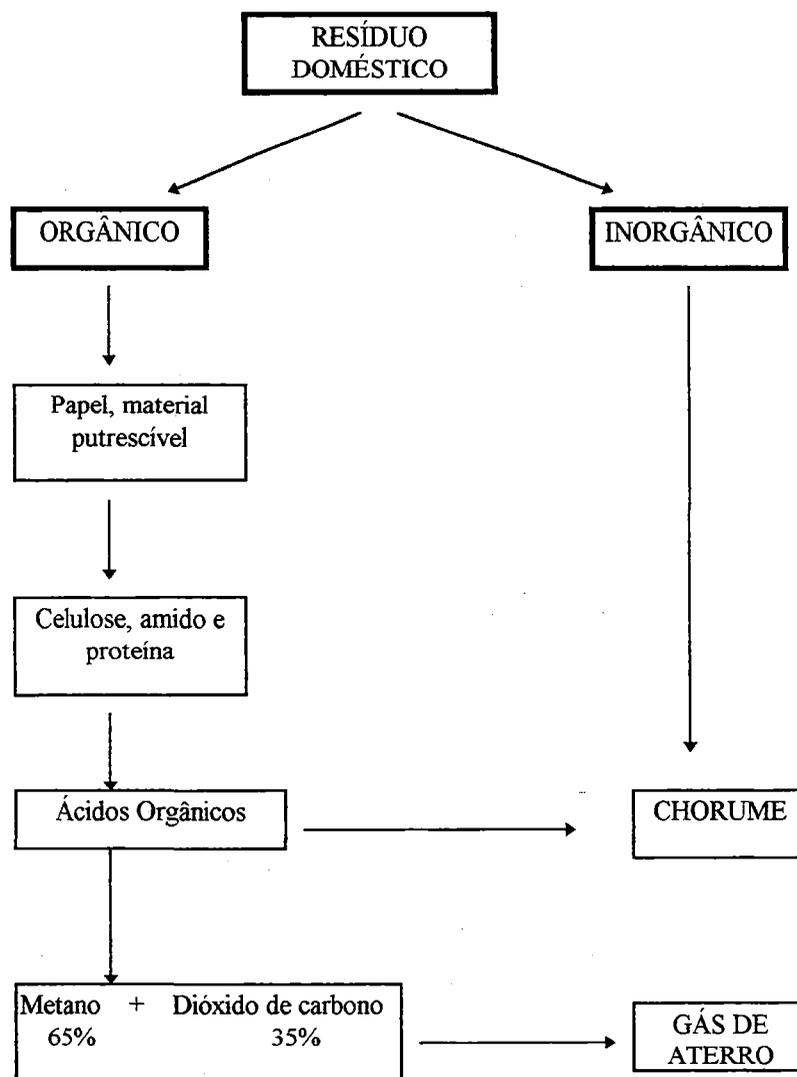


Figura 15- Degradação das frações orgânica e inorgânica dos resíduos domésticos em aterro sanitário (BEWLEY et al., 1991).

Alguns modelos foram propostos para a compreensão das reações complexas que ocorrem nos aterros sanitários. FARQUAR & ROVERS (1973) propuseram um modelo para a formação de gases durante a decomposição da matéria orgânica, composto por quatro fases e baseado no comportamento dos gases presentes na atmosfera interna do aterro em função do tempo de disposição. REES (1980) alterou o modelo de FARQUAR & ROVERS, acrescentando o comportamento dos ácidos orgânicos no percolado e a degradação da celulose, criando um modelo de cinco fases.

Segundo REES (1980), o fenômeno de decomposição de resíduos em aterro sanitário ocorre em cinco fases distintas:

-Fase 1 - Após o aterramento do resíduo orgânico, tem início a fase aeróbia com predominância de microrganismos aeróbios e facultativos, dentre eles fungos e bactérias, dada a presença de oxigênio difundido no meio da massa;

-Fase 2 - A fase anaeróbia-ácida é caracterizada pela brusca queda do pH, em função da pressão parcial do dióxido de carbono e da presença acentuada de ácidos orgânicos e hidrogênio. Nesta fase, ocorre a produção de hidrogênio, com o qual as bactérias acetogênicas metabolizarão acetato, substrato indispensável para a ocorrência da metanogênese.

-Fase 3 - Esta fase é comumente denominada metânica-instável, onde o gás metano começa a ser produzido em pequenas quantidades. Nesta fase nota-se, também, a produção de acetato, formiato, hidrogênio e dióxido de carbono;

-Fase 4 - Denominada metânica-estável, é caracterizada pela intensa produção de metano e de dióxido de carbono, em proporções de 1:1.;

-Fase 5 - Denominada de fase de maturação final, caracteriza-se pela completa bioestabilização da matéria orgânica, decréscimo da produção de metano, e entrada de ar no aterro.

POHLAND & HARPER (1985) propuseram um modelo através de experimentos em escala piloto com um aterro acelerado, ou seja, com recirculação de percolado. O líquido percolado foi introduzido novamente no aterro-piloto a partir da segunda fase do processo de digestão. Para estes autores, a fase de implantação e montagem do aterro constituiu a fase I do processo. A Fase III descrita por POHLAND & HARPER (1985), na qual ocorre a formação de ácidos, assemelhou-se àquela fase anaeróbia ácida descrita por REES (1980). Já a fase IV, apresentada no modelo descrito por POHLAND & HARPER (1985) corresponde às fases metânica instável e metânica estável do modelo apresentado por REES (1980). Para

POHLAND & HARPER (1985), nos sistemas de aterramento de resíduos o período de duração associado a cada fase, a qualidade e a quantidade de gás e chorume, gerados no processo de degradação, são dependentes do processo de aterramento, da natureza, do teor de umidade, do material de cobertura e da compactação dos resíduos.

Para AUGENSTEIN & PACEY (1991), a importância na formulação de modelos matemáticos para representar o processo de estabilização de resíduos em aterro sanitário não reside apenas na intenção de representar a sucessão de etapas de degradação e produtos gerados, e sim de estimar as taxas de produção de metano ao longo do tempo de disposição dos resíduos. Em princípio, o conhecimento de tais taxas de produção de metano em aterro sanitário pode ser esclarecida através da aplicação de modelos matemáticos. As taxas de degradação dos processos microbianos podem ser generalizadas através das correlações com alguns fatores como disponibilidade de nutrientes, temperatura e concentração de substrato, entre outros. As variáveis determinantes dos processos de biodegradação em aterros não foram suficientemente esclarecidas até o presente momento, e as tentativas para aplicar as correlações desenvolvidas sob condições controladas constituem-se insipientes.

No entanto, a dinâmica dos processos de estabilização associadas a fatores operacionais provocam a sobreposição das fases de estabilização, refletindo nas características qualitativas dos líquidos. A sobreposição das fases pode impedir a detecção e a interpretação correta da evolução das mesmas. Assim, a observação da variação dos parâmetros ao longo do tempo, pode ser considerada mais representativa para o estabelecimento da evolução do processo de estabilização, do que o interpretativo de dados isolados (REES, 1980; POHLAND & HARPER, 1985).

Segundo a revisão realizada por LIMA (1988), vários aspectos relacionados aos aterros foram estudados, dando ênfase a produção de percolato e gases, e contribuindo significativamente à compreensão do processo de metanogênese. No entanto, existem poucos estudos sobre microbiologia de aterros sanitários, principalmente no tocante à hidrólise e à fermentação da celulose. ELIASSEN apud LIMA (1988) apresentou o primeiro trabalho no que diz respeito a microbiologia de aterros. Estudando vários aterros em Nova York, relatou que os resíduos orgânicos eram decompostos por processos biológicos, e que estes processos ocorriam de forma natural dada a presença de microrganismos no lixo. ELIASSEN apud LIMA

(1988) comprovou o fato retirando amostras sólidas dos aterros e realizando contagem de bactérias totais, encontrando uma faixa de 3×10^1 a $7,4 \times 10^4$ microrganismos por grama de peso seco de resíduo.

O estudo da atividade celulolítica em aterro foi apresentado por REES & GRAINGER apud VILLAS BÔAS (1990), em que verificaram a inibição da celulase pela presença de íon amônio, ácidos carboxílicos ou, ainda, pela presença de resíduos derivados de enzimas proteolíticas. Nesse estudo, uma celulase comercial derivada do fungo *Trichoderma reesei* foi adicionada no resíduo estéril e não-estéril, demonstrando uma possível relação entre a inativação das celulases e a presença de resíduos derivados de enzimas, como a principal causa da perda da atividade no sistema experimental.

JONES & GRAINGER (1983) e JONES et al. (1983) realizaram, respectivamente, experimentos em escala-piloto e em escala real, com o objetivo de demonstrar a importância de medir a atividade microbiana enzimática extracelular sobre os resíduos sólidos urbanos. Estudaram as proteases, amilases, lipases e celulases, enzimas de grande importância à hidrólise de compostos complexos do lixo doméstico. Concluíram, basicamente, que a primeira fase da degradação microbiana do resíduo doméstico estava associada à hidrólise do material facilmente assimilável (proteína e amido), seguida da fermentação e metanogênese, como o processo de degradação da fibra vegetal ocorrido no rúmen, e lodo de esgoto em digestão. No entanto, as diferenças se concentraram no fato de que os sistemas de fermentação, em escala piloto e real, foram constituídas de um substrato sólido com baixos teores de umidade disponível, fator relevante uma vez já que a atividade microbiana é diretamente proporcional ao grau de umidade do substrato.

JONES & GRAINGER (1983) observaram a nível de escala laboratorial, a ocorrência de baixa atividade celulolítica sobre os resíduos, fato justificado pelos autores em função da baixa quantidade de celulose contida nos resíduos. Vários fatores podem ter contribuído diretamente para a ocorrência de tal fato: efeito inibitório da lignina na decomposição da celulose; inativação das celulases por resíduos derivados de enzimas proteolíticas; separação da fase proteolítica e celulolítica; e celulose presente no sistema na forma refratável.

FILIP & SMED-HILDMANN apud VILLAS BÔAS (1990) compararam amostras de três aterros sanitários, sendo um com material não compactado (aterro

aeróbio) e outro com material compactado (aterro anaeróbio), ambos com seis meses de idade. O terceiro aterro era antigo, com aproximadamente cinco anos de idade, constituído de lixo e lodo de esgoto. A avaliação quantitativa microbiana dos três aterros revelou ordens de grandeza de 10^6 a 10^8 , 10^6 a 10^{10} , 10^6 , 10^5 a 10^6 microrganismos por grama de matéria orgânica seca, para os grupos bacterianos, respectivamente, aeróbios proteolíticos, anaeróbios proteolíticos, os actinomicetos e fungos aeróbios. No aterro compactado, o grupo bacteriano anaeróbios proteolíticos apresentou-se em maior número que os demais. Para os outros grupos de microrganismos tais como, bactérias aeróbias proteolíticas, actinomicetos e fungos, a concentração foi menor no aterro não compactado em relação ao compactado, e menor número de microrganismos foi encontrado no aterro com cinco anos de idade.

BARLAZ et al. (1989a) desenvolveram uma técnica de preparo de amostra de resíduo urbano triturado, para a preparação de um inóculo líquido com o objetivo de desenvolverem um método que promovesse o desprendimento dos microrganismos anaeróbios da matéria sólida para uma posterior quantificação. Para estes testes foram empregadas culturas de bactérias anaeróbias celulolíticas, partindo do princípio que este grupo trófico adere ao material particulado com maior frequência, se comparado com outras culturas. As amostras foram preparadas de seis maneiras diferentes, de forma a diluir, agitar e prensar as mesmas, como princípio básico. Os resultados do estudo demonstraram que entre as técnicas testadas, não havia uma mais efetiva, optando-se assim pela mais simples. Essa consistia em diluir, agitar e prensar a amostra, coletando o líquido num frasco sob anaerobiose, e assim utilizá-lo como inóculo.

BARLAZ et al. (1989b) realizaram uma complexa caracterização da decomposição do resíduo em um aterro simulado, incluindo informações sobre o desenvolvimento de populações microbianas, no caso bactérias anaeróbias, e constituintes químicos da degradação do resíduo. O estudo envolveu vários grupos bacterianos anaeróbios, em frascos contendo resíduo sólido doméstico em partículas de tamanho de 1,9 cm ou menores, e observaram um aumento das populações microbianas ao longo do tempo. Na Figura 16 está apresentado os dados das composições químicas e microbiológicas do resíduo em aterro sanitário simulado por BARLAZ et al. (1989b).

No estudo anterior, o desenvolvimento dos principais grupos de bactérias envolvidos na conversão de resíduos a metano foram quantificados desde o início do

experimento e durante toda a fase da produção de metano, sendo os grupos enumerados pela técnica do número mais provável com meio contendo celulose, xilano, butirato, hidrogênio, acetato, CO₂, e o líquido percolado neutralizado e recirculado para o reator. Na Figura 16 (BARLAZ et. al. ,1989b) pode-se observar que a decomposição da celulose e hemicelulose aumentou com o início da redução da concentração dos ácidos voláteis acumulados, ocorrendo o estabelecimento das populações acetogênicas e metanogênicas. Com os dados das composições químicas e microbiológicas observados nesta figura, os autores descreveram o processo de degradação dos resíduos em quatro fases, sendo estas denominadas de aeróbia, anaeróbia ácida, metânica instável e metânica estável.

VILLAS BÔAS (1990) realizou um estudo sobre contagens de bactérias anaeróbias hidrolítico-fermentativas em amostras de resíduos sólidos a dois metros de profundidade em dois aterros sanitários experimentais. A contagem das bactérias foi realizada empregando técnicas de bacteriologia desenvolvidas por HUNGATE (1969). Também foram realizadas contagens do mesmo grupo bacteriano em amostras do percolado e um dos aterros experimentais, e em amostras de resíduos sólidos da cidade de São Carlos aterrados há 5 e 10 anos. Nesse mesmo trabalho, cinco culturas puras de bactérias hidrolítico-fermentativas foram obtidas, pertencendo aos gêneros *Megasphaera sp.* e *Selenomonas sp.* Os valores de contagens estiveram na faixa de 10⁵ a 10⁸ UFC/gRS seco nos aterros experimentais, 10⁷ UFC/mL nas amostras de percolado e 10⁷ UFC/gRS seco nos aterros de 5 e 10 anos .

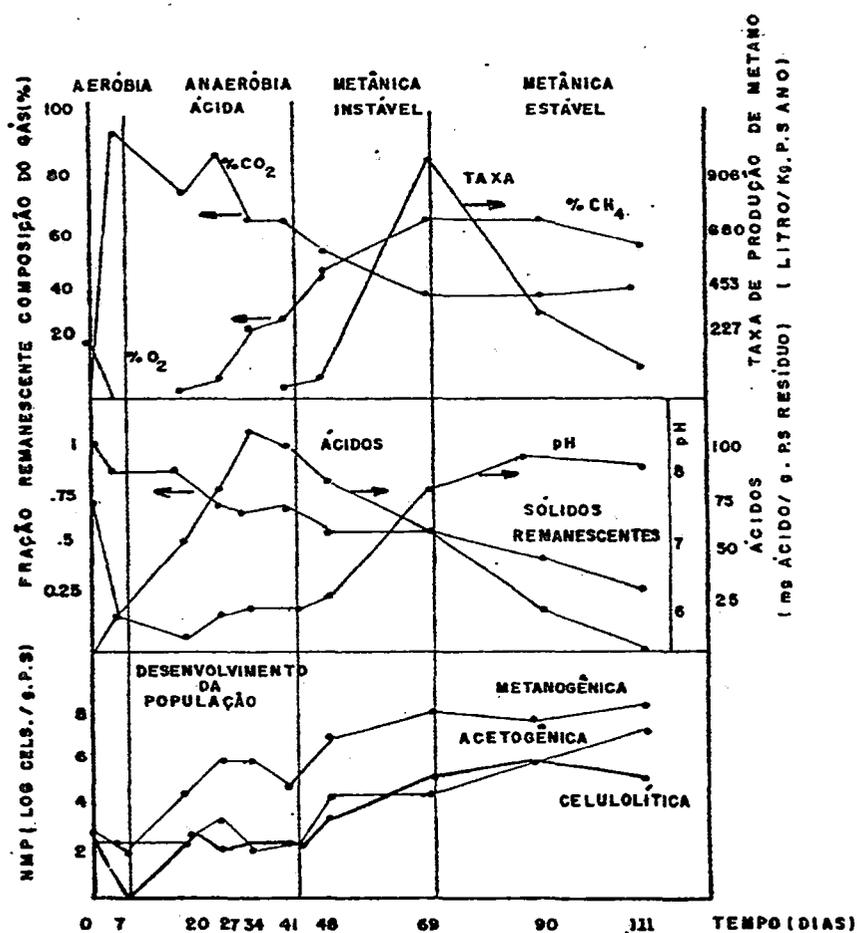


Figura 16 - Caracterização Geral da Degradação de Resíduos Sólidos Urbanos em Aterro Sanitário, através da utilização de um bioreator de escala laboratorial com recirculação de chorume (BARLAZ apud VILLAS-BÔAS, 1990).

GIAJ-LEVRA (1991) estudou metodologias para a contagem de bactérias anaeróbias celulolíticas para posterior aplicação na avaliação quantitativa de dez inóculos de origens diferentes. O autor verificou que nos vários inóculos estudados, como chorume, lodos anaeróbios oriundos de diferentes sistemas e líquidos de origem ruminal, aquele com maior concentração bacteriana e maior eficiência em degradar a fita de celulose foi o fluido de rúmen de biodigestor. Os resultados mostraram que, a partir de quatro meios de cultura avaliados, o meio BCYT (meio Basal-Carbonato-Extrato de Levedura-Tripticase), sob pH neutro e temperaturas de 35 e 55° C acrescido de fita de papel de filtro Whatman nº1, foi adequado para estimar o número de bactérias celulolíticas dos diferentes inóculos, através do método do Número Mais Provável (NMP). Nas contagens de bactérias anaeróbias celulolíticas no chorume, ou líquido percolado de aterro sanitário, foram obtidos valores médios de 5,15 Log NMP cél./mL, e 8,97 Log NMP cél./g SSV.

Os estudos relativos às populações microbianas envolvidas no processo de degradação de resíduos em aterros estão baseados na elucidação da hidrólise dos materiais celulósicos, já que os resíduos sólidos domésticos constituem-se aproximadamente de 15 % de material lignocelulósico. Este fato torna a etapa de hidrólise da celulose sob condições anaeróbias um passo limitante no tratamento biológico de resíduos, uma vez que depende de uma série de fatores, incluindo qualidade e quantidade de substrato, enzimas microbianas e suas interações, condições físicas e químicas de fermentação.

As informações sobre a microbiologia do aterro sanitário resumem-se em estudos com bactérias aeróbias e anaeróbias celulolíticas, e algumas citações sobre de fungos aeróbios. A viabilização do processo de degradação dos resíduos sólidos compactados é decorrente da presença das populações microbianas citadas e as interações bioquímicas advindas do seu metabolismo. No rúmen, um hábitat anaeróbio estrito, a degradação da fibra de celulose está relacionada com a presença de muitos grupos bacterianos celulolíticos, e também com a presença de fungos anaeróbios celulolíticos. A existência de tais fungos em ecossistemas como um aterro sanitário constitui-se numa questão a ser amplamente investigada, uma vez que até o momento, o processo de estabilização dos resíduos orgânicos dispostos nesses habitats tem sido, quase que exclusivamente, relacionada a presença de grupos bacterianos anaeróbios.

4. METODOLOGIA

No presente trabalho, com o objetivo de estudar organismos fúngicos em ecossistemas anaeróbios, foram obtidos inóculos de dois sistemas, um de procedência do conteúdo ruminal de bovino, e outro proveniente de amostras de resíduo aterrado. As atividades relacionadas com o estudo do inóculo ruminal foram desenvolvidas no Laboratório de Processos Anaeróbios-SHS-EESC, da Universidade de São Paulo, e das amostras de resíduo aterrado foram realizadas no Laboratório de Saneamento-DENQ, da Universidade de Caxias do Sul.

As técnicas utilizadas para manipulação dos organismos fúngicos foram baseadas em HUNGATE (1969) e MILLER & WOLIN (1974). A constituição e preparo dos meios de cultivo, bem como das soluções estoques foram baseadas em BAUCHOP (1979), VILLAS BÔAS (1990), MOUNTFORT & ASHER (1989), JOBLIN (1981), DUBOURGUIER e VAZOLLER (1988), VAZOLLER (1989).

4.1. Equipamentos

- Cilindros de gases dióxido de carbono (100% CO₂) e nitrogênio (100% N₂) , de qualidade ultra-pura (White-Martins).
- Forno de aquecimento com coluna catalítica de cobre para a remoção de oxigênio dos gases (Instrumentos Científicos - CG)
- Misturador de gases

- Microscópio BHT - OLYMPUS
- Banho-maria (FANEM)
- Medidor eletrométrico de pH
- Balanças semi-analítica e analítica
- Autoclave vertical
- Estufa bacteriológica para operar entre 37 a 39° C (FANEM)
- Agitador magnético
- Centrífuga (FANEM)
- Trado mecanizado para coleta de resíduo sólido aterrado
- Bomba à vácuo
- Forno tipo mufla
- Estufa para operar entre 105°C +/- 5°C
- Triturador de material (Multiprocessador ARNO)
- Absorção atômica para determinação de metais (VARIAN - Spectra-A5)

4.2. Vidrarias e outros materiais

- Balões com fundo arredondado em formato de pêra (500 mL), com vidro de espessura reforçada.
- Frasco tipo "xarope" (100 mL), fechado com rosca de alumínio com rosca e borracha na parte interior;
- Frascos de "antibiótico" de vidro com capacidade de 10, 20 e 35 mL, fechados com tampa de borracha e lacre de alumínio.
- Frascos de "soro" de vidro para estoque de inóculo, extrato de fluido de rúmen e extrato de aterro, com capacidade de 500 mL e fechados com tampa de borracha e rosca ou fixada com arame.
- Tubo de ensaio (18 x 150 mm) com 35 mL de volume, fabricado com vidro de espessura reforçada e fechados com tampa de borracha e lacre de alumínio.
- Vidraria de uso comum em laboratório de microbiologia: pipetas, balões de fundo chato, erlenmeyers, kitassatos, pérolas de vidro, bastões de vidro, difusores de vidro (para o fluxo de gases no preparo de meios e soluções), cadinhos de porcelana e sistema MILLIPORE;

- Outros materiais: rolhas e tampas fabricadas com borracha de butila para os balões, tubos e frascos; lacres de alumínio; lacreador para frascos de antibiótico; seringas hipodérmicas de tuberculina, 1,0 mL e agulhas hipodérmicas; membranas filtrantes AP20, 0,45 μm , alça de platina; pinça, gaze, algodão, papel-alumínio.

4.3. Técnicas para manipulação de microrganismos anaeróbios estritos

Para o desenvolvimento do referido trabalho foram utilizadas técnicas de manipulação de organismos anaeróbios obrigatórios baseadas em HUNGATE (1969) e MILLER & WOLIN (1974). Os meios de cultura e soluções complementares foram preparados e distribuídos segundo descrito por BAUCHOP (1979), VILLAS BÔAS (1990), MOUNTFORT & ASHER (1989), JOBLIN (1981), DUBOURGUIER e VAZOLLER (1988), VAZOLLER (1989) com algumas adaptações na composição dos mesmos, conforme descrito posteriormente.

Este trabalho de investigação foi realizado em duas etapas e desenvolvidas em laboratórios diferentes. Na primeira etapa, desenvolvida no Laboratório de Processos Anaeróbios do SHS-EESC-Universidade de São Paulo, foram realizados ensaios com o objetivo de detectar fungos anaeróbios em amostras provenientes do conteúdo ruminal. Na segunda etapa do trabalho, foram realizados ensaios com o intuito de observar os mesmos organismos porém em amostras de resíduos sólidos aterrados, desenvolvida no Laboratório de Saneamento-DENQ -Universidade de Caxias do Sul, após a implantação do sistema de distribuição simultânea de gases, o qual pode ser visualizado na Figura 17. Este sistema foi adaptado de BALCH et al. apud VAZOLLER (1995) pelo Laboratório de Processos Anaeróbios do SHS-EESC-USP, e descrito por VAZOLLER (1995). Na Figura 17 está apresentado o sistema implantado com algumas adaptações, na qual pode-se visualizar o conjunto formado pelos cilindros de gases (100% CO_2 e 100% N_2), coluna redutora e sistema de distribuição simultânea de gases e bomba a vácuo.

A implantação do sistema de distribuição simultânea de gases no Laboratório de Saneamento da UCS permitiu a reprodução das técnicas desenvolvidas na primeira etapa do trabalho, realizada no Laboratório de Processos Anaeróbios-SHS-EESC-USP. Na Figura 18 pode-se observar o conjunto que compõe o sistema de distribuição simultânea, utilizado para a introdução de gases nos meios de cultura e soluções-estoque. Ainda nesta figura, pode ser observada a coluna redutora, a qual é basicamente composta por um tubo de vidro com sistema de aquecimento externo, e limalha de cobre na parte interior, construída conforme descrito por HUNGATE (1969). Os gases foram comprados em cilindros distintos, e neste caso não foi instalado um misturador de gases, então a coluna redutora juntamente com o sistema de distribuição de gases cumpriram esta função já que a mistura devreia ocorrer obrigatoriamente. Além disso, anteriormente aos gases dióxido de carbono e o nitrogênio serem fornecidos aos frascos contendo soluções e/ou meio de cultura, estes passam pelo interior da coluna redutora a qual permitirá a remoção de quantidades traços de oxigênio que podiam estar presentes.

Figura 17 - Bancada para manipulação de microrganismos anaeróbios- Cilindros de gases, coluna redutora e sistema de distribuição de gases - Laboratório de Saneamento-DENQ- Universidade de Caxias do Sul - RS.

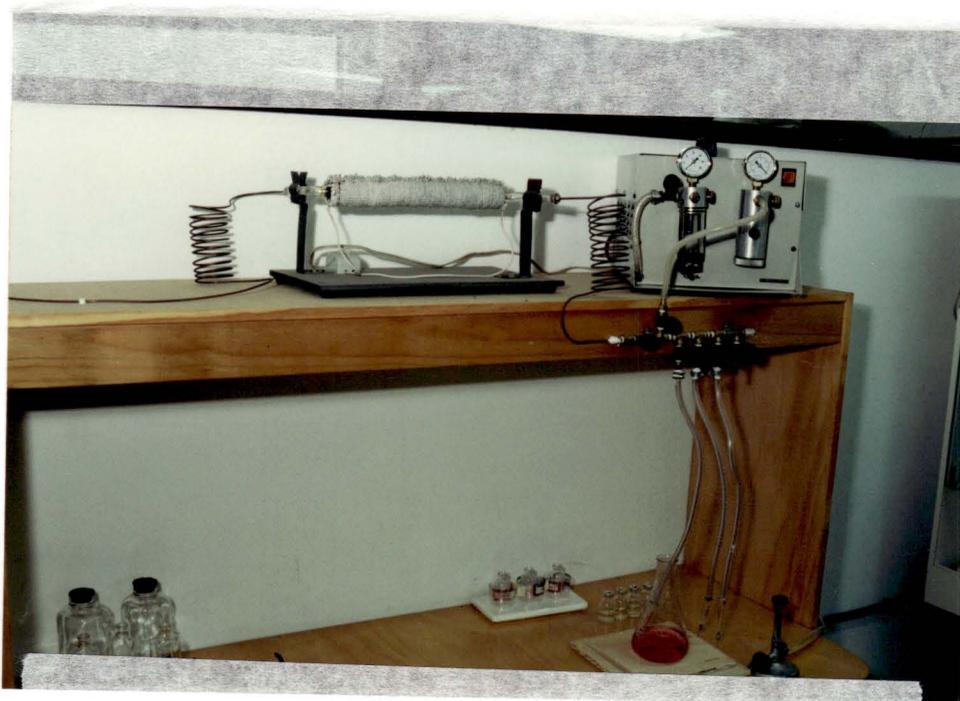


Figura 18 - Sistema de distribuição simultânea de gases- coluna redutora e bomba vácuo - Laboratório de Saneamento-DENQ- Universidade de Caxias do Sul - RS.

4.4. Preparo dos Meios para Cultivo de Microrganismos

4.4.1. Meio básico de enriquecimento para cultivo de fungos anaeróbios celulolíticos

O meio de ORPIN (1975) modificado por BAUCHOP (1979) foi utilizado inicialmente, no enriquecimento das culturas de fungos anaeróbios obtidos do rúmen, bem como na manutenção dos mesmos. Posteriormente, este meio foi testado no estudo dos organismos fúngicos anaeróbios em amostras de resíduos sólidos aterrados. O meio foi utilizado com pH $5,0 \pm 0,5$ para a fase de enriquecimento I das amostras, e pH 6,0 para a fase de enriquecimento II.

Nos ensaios de enriquecimento dos organismos anaeróbios a partir de inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado, o extrato de fluido de rúmen foi substituído pelo extrato de resíduo aterrado, obtido através de um ensaio conduzido de modo a facilitar a fermentação de compostos orgânicos (item 4.5.8.).

A composição do meio foi descrita por ORPIN (1975) e modificada por BAUCHOP (1979):

- Solução mineral I	17,0 mL
- Solução mineral II	17,0 mL
- Extrato de fluido de rúmen	15,0 mL
- Extrato de levedura	0,1 g
- Peptona	0,1 g
- Pó de Papel Filtro Whatmann n°1	0,2 g
- Solução de Resazurina 0,1%	0,3 mL
- Solução de Na ₂ CO ₃ 8%	2,5 mL
- Solução redutora de cisteína-sulfeto	4,0 mL
- Água destilada (q.s.p.)	50,0 mL
- Atmosfera	100% CO ₂

O meio de cultura para os ensaios de enriquecimento dos fungos anaeróbios foi preparado sob uma atmosfera de 100% dióxido de carbono, sendo o substrato pó de celulose de papel filtro Whatman nº1, em uma concentração de 0,2%, nos frascos contendo 15 mL de meio de cultura. As soluções estoques empregadas no meio de cultura serão descritas posteriormente, no item 4.5.

O roteiro utilizado para a preparação do meio de anaeróbios estritos baseado em MILLER & WOLIN (1974), DUBOURGUIER e VAZOLLER (1988), é descrito a seguir:

- o volume de água destilada era colocado em um balão de fundo chato e submetido a fervura;
- após a fervura, passou-se o líquido para um erlenmeyer e rapidamente introduzia-se dióxido de carbono através do uso de difusores de vidro, conforme apresentado na Figura 19.
- nos frascos colocados sobre o agitador magnético, adicionavam-se os sais e as soluções, exceto a solução de carbonato de sódio e solução redutora de cisteína-sulfeto;
- após a adição da solução de resazurina, o meio era resfriado até atingir a temperatura de 50°C, sob fluxo de dióxido de carbono;
- o pH do meio era ajustado para $5,0 \pm 0,5$ nos experimentos que constituíram os ensaios de enriquecimento em frascos de soro, e 6,0 para os ensaios de enriquecimento II em frascos de antibiótico;
- distribuiu-se o meio de cultura em frascos de soro e de antibiótico da seguinte maneira: primeiramente, era introduzido um fluxo de gás nos frascos com o auxílio de agulhas hipodérmicas por 1 minuto, e mantendo-se o fluxo, o meio era dispensado nos frascos (no caso dos frascos de soro, adicionavam-se 100 mL, e nos frascos de antibiótico, 9 mL); o fluxo gasoso era mantido em 1 minuto com o frasco semi-tampado, após o que era retirado, e os frascos eram fechados com tampa de butila e lacre de alumínio, conforme pode ser observado nas Figuras 20 e 21; os frascos de soro eram fechados com tampa de borracha de butila e arame;

- os frascos eram esterilizados em autoclave a 121°C e 15 psi, por 20 minutos; após o resfriamento, os frascos eram estocados na ausência da luz;
- os meios de cultura eram suplementados após a autoclavagem, com as soluções de carbonato de sódio e redutora empregando-se seringas hipodérmicas de tuberculina pré-reduzidas (a seringa era preenchida com solução redutora, deixando-se agir por alguns segundos e desprezando-se a solução - a operação era feita de duas a três vezes). A manipulação dos frascos sempre foi realizada sob condições de assepsia, em que as tampas dos frascos lacrados e estéreis eram colocadas em contato com álcool e flambadas no fogo;
- após a adição da solução redutora, esperava-se a mudança de coloração do meio, geralmente da cor rosa para incolor ou amarelo claro, e após, procedia-se à inoculação.

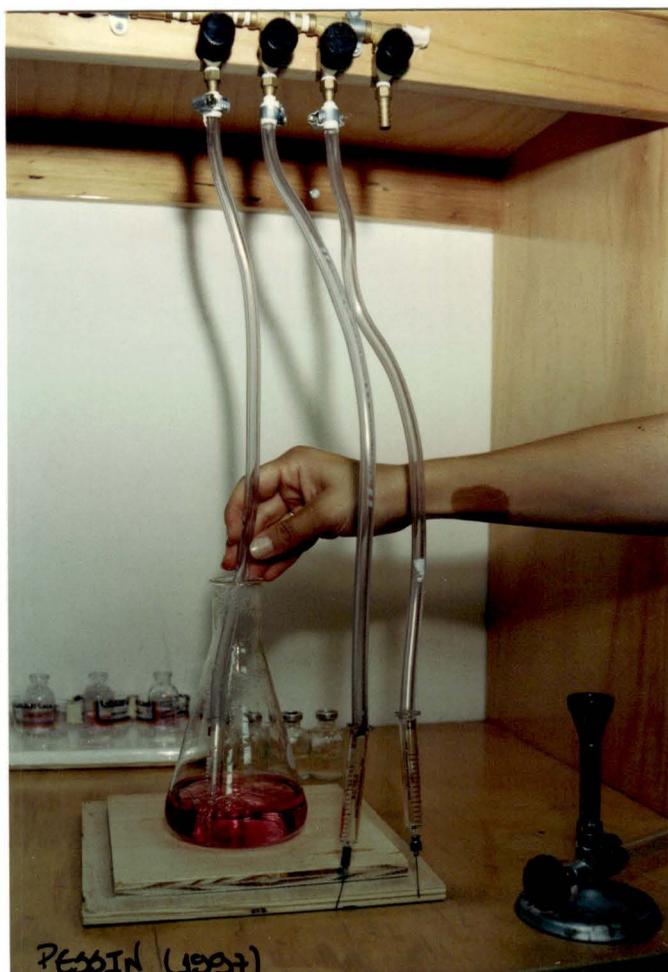


Figura 19 - Introdução de fluxo de gás no meio de cultura, através da utilização de difusores de vidro.



Figura 20 - Introdução do gás nos frascos tipo “antibiótico” contendo meio de cultura.



Figura 21 - Lacreador de frascos tipo “antibiótico” - fixação do lacre de alumínio nos frascos.

4.4.2. Meio Semi-sólido para Isolamento de Culturas de Fungos Anaeróbios Celulolíticos

Este meio foi utilizado para a obtenção de colônias de fungos anaeróbios, presentes em inóculo proveniente do conteúdo ruminal. A composição deste meio é basicamente a mesma do meio utilizado nos ensaios de enriquecimento, diferencia-se apenas pela adição de solução de antibióticos, concentração de celulose, adição de glicose ou celobiose e ágar. O pH do meio era ajustado para 6,0.

A composição deste meio de cultura baseada em ORPIN (1975) e modificada por BAUCHOP (1979), é a seguinte:

- Solução mineral I	17,0 mL
- Solução mineral II	17,0 mL
- Extrato de fluido de rúmen	15,0 mL
- Extrato de levedura	0,1 g

- Peptona	0,1 g
- Papel Filtro Whatman n.1	0,05 g
- Glicose	0,05 g
- Solução de Resazurina 0,1%	0,3 mL
- Solução de Na ₂ CO ₃ 8% (p/v)	2,50 mL
- Solução redutora de cisteína-sulfeto	4,0 mL
- Solução de antibióticos	0,4 mL
- Ágar	2,0 g
- Água destilada (q.s.p.)	50,0 mL
- Atmosfera	100% CO ₂

Nos ensaios de isolamento das culturas a partir de inóculo ruminal foi empregado o método do "roll-tube" (HUNGATE, 1969), porém com a substituição dos tubos de ensaios para os frascos tipo "xarope". As soluções estoques empregadas no meio de cultura serão descritas no item 4.5.

Para o preparo deste meio de cultura baseou-se na técnica descrita por MILLER & WOLIN (1974) e DUBOURGUIER & VAZOLLER (1988), conforme descrito no item 4.4.1. No meio de isolamento foram utilizadas a celulose e a glicose como fonte de carbono. O meio foi preparado de acordo com a ordem dos componentes antes listados, sendo importante ressaltar o seguinte:

- dissolvia-se os componentes em balão de fundo reforçado em formato de pera, sob fluxo gasoso de dióxido de carbono, e ajustava-se o pH para 6,0;
- adicionava-se o ágar, e submetia-se o meio à fervura até a completa homogeneização do composto, sempre sob fluxo gasoso de dióxido de carbono;
- antes de distribuir o meio nos frascos, deixava-se passar fluxo gasoso nos frascos, tipo "xarope", com o auxílio de agulhas hipodérmicas por 1 minuto;
- adicionava-se 14 mL de meio nos frascos, deixando-se o fluxo gasoso por mais um minuto com o frasco semi-tampado, sendo que os mesmos foram mantidos em banho-maria a uma temperatura de 50⁰C aproximadamente;

- retirava-se a agulha de fluxo do gasoso, e pressionou-se a tampa, fechando-se com invólucro de alumínio;
- os frascos eram esterilizados em autoclave a 121 °C e 15 psi, durante 20 minutos;
- após o processo de esterilização, os frascos eram transferidos para o banho-maria, e resfriados a 48 °C;
- as soluções de carbonato de sódio e solução redutora de cisteína-sulfeto e solução de antibióticos eram adicionadas ao meio;
- a inoculação das culturas era realizada após a completa redução do meio, ainda liquefeito.

4.5. Soluções Estoques dos Meios de Cultura

4.5.1. Solução redutora de cisteína - sulfeto

Para o preparo dessa solução foi necessário:

- | | |
|---------------------------------------|----------------------|
| - cisteína HCl. H ₂ O | 12,5g |
| - Na ₂ S.9H ₂ O | 12,5g |
| - água destilada (q.s.p) | 1.000 mL |
| - solução de NaOH 3N | até pH determinado |
| - atmosfera | 100 % N ₂ |

Um volume de 500 mL de água destilada, previamente fervida em balão de fundo chato e resfriada a 40°C foi submetido ao fluxo gasoso de 100% nitrogênio através da introdução de uma mangueira contendo difusores de vidro. Neste volume, dissolvia-se o cloridrato de cisteína. Imediatamente após, ajustava-se o pH a 10, utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio 3N, adicionava-se o sulfeto de sódio e completava-se o volume total de água destilada. Sob fluxo de 100% nitrogênio, a solução era submetida à fervura por 30 segundos.

Após ferver a solução, procedia-se a filtração em condições assépticas através do sistema de microfiltração Millipore, utilizando-se membranas 0,45 µm de poro de

acetato-celulose, previamente esterilizadas por autoclavação a 121°C e 15 psi, por 20 minutos. A distribuição da solução era realizada sob fluxo de gás nitrogênio constante, em alíquotas de 10 mL em frascos de antibiótico de 20 mL, sob condições de assepsia. Os frascos e as respectivas tampas, assim como o sistema de mangueiras e seringas utilizadas, como difusores de gases, eram previamente esterilizados, e, antes da distribuição da solução, os frascos eram submetidos a fluxo de gás por 1 minuto, sendo então lacrados e armazenados em local escuro.

4.5.2. Solução de carbonato de sódio a 8% (p/v)

A composição desta solução foi baseada em VILLAS-BÔAS (1990) sendo a seguinte:

- Na ₂ CO ₃	24,0 g
- água destilada (q.s.p)	300,0 mL
- atmosfera	100 % CO ₂

Em um balão de fundo chato, colocou-se um volume de 500 mL de água destilada, sendo o mesmo submetido à fervura, e fluxo de gás de dióxido de carbono 100%, até a água atingir a temperatura de 40°C. Logo após, o sal era dissolvido na quantidade de água recomendada e submetido a filtração com membrana de 0,45µm de poro de acetato-celulose em sistema de microfiltração em Millipore estéril. A distribuição da solução nos frascos tipo antibiótico seguiu o procedimento descrito no item 4.5.1..

4.5.3. Solução de resazurina 0,1% (p/v)

Para o preparo dessa solução foi necessário o seguinte:

- Resazurina	0,1 g
- água destilada (q.s.p.)	100,0 mL

A solução de resazurina ou solução indicadora de anaerobiose era preparada dissolvendo-se 0,1 g de resazurina em 100 mL de água destilada, acondicionada em frascos escuros e estocada sob refrigeração sob temperaturas de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.5.4. Solução Mineral I

A composição da solução foi baseada nos estudos de MOUNTFORT & ASHER (1989), sendo a seguinte:

- KH_2PO_4	0,30g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,30g
- NaCl	0,60g
- Mg_2SO_4	0,03g
- CaCl_2	0,03g
- água destilada	100,0 mL

Solução Mineral II

A composição da solução foi baseada nos estudos de MOUNTFORT & ASHER (1989), sendo a seguinte:

- K_2HPO_4	0,3 g
- água destilada	100,0 mL

Na preparação das soluções Mineral I e II, os sais eram dissolvidos na ordem indicada. Volumes iguais a 100 mL eram distribuídos em frascos com capacidade de 300mL, fechados com tampão de algodão e papel alumínio. As soluções eram autoclavadas a 121°C e 15 psi, durante 20 minutos, e estocadas sob refrigeração em temperaturas em torno de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.5.5. Solução de solubilização

A solução de solubilização foi utilizada para a homogeneização, acondicionamento e transporte das amostras provenientes do conteúdo ruminal bovino, bem como para as amostras de resíduo sólido provenientes de aterro sanitário.

A composição da solução utilizada foi a seguinte (VILLAS BOAS, 1990):

- solução de resazurina	0,25 mL
- solução de Na ₂ CO ₃ 8% (p/v)	7,50 mL
- solução redutora de Cisteína-Sulfeto	10,75 mL
- água destilada (q.s.p)	250,0 mL
- atmosfera	100%CO ₂

Em um balão de vidro reforçado eram colocadas 230 mL de água destilada e 0,25 mL de solução de resazurina. Este volume era submetido à fervura por um minuto, sob fluxo de 100 % dióxido de carbono. Após a fervura, o balão era fechado com rolha de borracha, fixado com arame e autoclavado por 20 minutos, a 121°C e 15 psi. Depois da esterilização e resfriamento à temperatura ambiente, a solução de carbonato de sódio e redutora eram adicionadas ao líquido, e sob condições de anaerobiose e assepsia, eram transferidos volumes de 250 mL para um frasco de soro estéril, contendo 20g de pérolas de vidro, que era fechado com tampa de borracha e fixada com arame.

4.5.6. Solução de antibióticos

A solução de antibióticos foi utilizada nos ensaios de isolamento, com o objetivo de eliminar alguns grupos bacterianos presentes nas amostras, sendo sua composição baseada em JOBLIN (1981):

- penicilina G-potássica	2 x 10 ⁴ IU/mL
- cloranfenicol	0,4 mg/mL

- etanol	4,0 mL
- água destilada (q.s.p.)	6,0 mL
- atmosfera	100%CO ₂

A solução de antibióticos não era autoclavada. A água destilada era fervida e resfriada a 40°C, sob fluxo de 100% CO₂. Após dissolver os antibióticos na água destilada, submetia-se a solução à filtração em sistema Millipore estéril, empregando-se membranas 0,45 µm de acetato-celulose. Sob condições de assepsia e anaerobiose, eram distribuídas alíquotas de 10mL da solução em frascos de antibiótico previamente esterilizados, sendo tampados com tampas de butila e lacre de alumínio, e estocados sob refrigeração (4°C ± 1°C). O cloranfenicol caracteriza-se por ser um composto que não é totalmente solúvel em água, motivo pelo qual, utilizou-se até 40% de etanol do volume total da solução para promover a total dissolução do composto.

4.5.7. Extrato de Fluido de Rúmen

O conteúdo ruminal foi obtido de um animal bovino não submetido a tratamento com antibióticos, logo após o abate na Fazenda de Palmeiras, no município de Araraquara-SP. O rúmen foi retirado do animal, e imediatamente seu conteúdo foi colocado em um vasilhame para promover homogeneização do volume ruminal. Logo após, o volume foi submetido a filtração em tecido de linho para a retirada do material grosseiro, e transportado ao Laboratório de Processos Anaeróbios do SHS-EESC-USP em vasilhame térmico.

No laboratório procedeu-se a uma nova homogeneização do volume ruminal coletado, e divisão deste em duas partes. Uma parte do material foi utilizada no preparo do inóculo, descrita posteriormente no item 4.6.1., e outra para o preparo do extrato de fluido de rúmen.

O volume do conteúdo ruminal reservado ao preparo do extrato de fluido de rúmen foi submetido à nova filtração com tecido de algodão, para a retirada das fibras vegetais não-retidas na primeira filtração realizada em campo. O líquido viscoso resultante do processo de filtração foi fervido por 30 segundos, e após seu resfriamento, centrifugado por 45 minutos a 30.000g (15000 rpm em rotor SS-34). O sobrenadante foi disposto em frascos de 300 mL estéreis, tampados e estocados em freezer em temperaturas abaixo de 0°C.

4.5.8. Extrato preparado a partir de amostras de resíduos sólidos aterrado

O extrato de resíduo aterrado foi preparado com base na metodologia descrita por VAZOLLER (1989) no preparo do extrato de lodo. A amostra de resíduo sólido doméstico foi coletada junto ao Aterro Sanitário São Giácomo, no município de Caxias do Sul-RS. A amostra foi retirada a dois metros de profundidade do aterro, sendo submetida à triagem manual e descarte dos materiais inertes, armazenada em saco plástico e levada ao Laboratório de Saneamento da Universidade de Caxias do Sul.

O sistema para fermentação de compostos, para obtenção do extrato de aterro consistiu de um erlenmeyer de 2 litros de volume total, fechado por uma rolha de borracha perfurada por um tubo de vidro, conectado a uma mangueira de silicone (4 cm) vedada em sua extremidade por uma pequena tampa de plástico. Ao longo da mangueira de silicone, para facilitar a saída gases formados durante a fermentação, foi realizado um corte longitudinal. Uma alíquota de 1,0 g do resíduo foi submetida a um período de fermentação em torno de 96 horas, a 35 °C, sob agitação de 150 rpm, em meio de cultura para o enriquecimento fungos anaeróbios descrito no item 4.4.1., sem o acréscimo da fonte de carbono, no caso papel filtro Whatman n°1. O pH do meio foi ajustado entre 6,0 e 6,5, antes da inoculação.

Foram empregados no ensaio 300 mL de meio de enriquecimento dispensados no erlenmeyer de 2 litros, posteriormente inoculados com 1% de resíduo sólido doméstico em digestão. A atmosfera gasosa foi de 100% de nitrogênio. Após um período de 96 horas, o caldo fermentado foi centrifugado por 15 minutos a 30.000g, fervido por 30 segundos e resfriado à temperatura ambiente. O extrato obtido foi armazenado em frascos estéreis e estocados em freezer a temperaturas de abaixo de 0°C.

4.6. Origem e preparo dos inóculos

4.6.1. Inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino

O conteúdo ruminal foi obtido de um animal bovino, preparado e estocado conforme descrito no item 4.5.7.. Para o preparo do inóculo uma porção de aproximadamente 100 mL do volume coletado foi acondicionada em frasco de soro, com 20g de pérolas de vidro e 250 mL de solução de solubilização, previamente esterilizada e mantida sob condições de anaerobiose. No frasco foi introduzido fluxo gasoso 100% dióxido de carbono por 10 minutos. Após, o frasco foi imediatamente fechado com tampa de borracha e fixada com arame, e submetido à agitação manual por um período de 30 minutos a temperatura ambiente, afim de proporcionar a homogeneização da amostra. Após este procedimento, o frasco foi estocado sob refrigeração $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Deste material, 10 mL foram utilizados como inóculo para os ensaios iniciais de enriquecimento.

4.6.2. Inóculo proveniente da solubilização de amostras de resíduos sólidos aterrados

As amostras de resíduos aterrados que constituíram os inóculos provenientes de aterro foram coletadas até 3,5 metros de profundidade como auxílio de um trado mecanizado. Para a obtenção desse inóculo foram realizadas quatro amostragens de resíduos aterrados no Aterro Sanitário de São Giacomo no município de Caxias do

Sul-RS, como pode ser observado na Tabela 5. As amostras codificadas de A1 a J4, logo após a coleta, foram acondicionadas sob condições de anaerobiose, em solução de solubilização, da mesma forma descrita no item 4.5.8..

Tabela 5 - Amostragens de Resíduo Aterrado (inóculo)

Coletas	Data	Local	Temp. Amb.	Camada de Cobertura	Tempo de aterramento do resíduos (meses)	Amostra
01	15.03.9 4	Célula C3/ cota 682 metros	23°C	0,40 m	07	A1- até 1,0 m B1- até 2,0 m
02	13.04.9 4	Célula C3/ cota 680 metros	22°C	0,50 m	09	C2- até 3,0 m D2- até 3,5 m
03	14.06.9 4	Célula C3/ cota 684 metros	17°C	1,40 m	07	E3- até 1,0 m F3- até 2,0 m G3- até 2,6 m
04	08.08.9 4	Célula C3/ cota 689 metros	14°C	0,30 m	05	H4- até 0,9 m I4- até 2,0 m J4- até 3,2 m

As coletas das amostras foram realizadas em diferentes locais da célula de aterramento denominada C3, do Aterro Sanitário de São Giacom. Os diferentes locais estão indicados por cotas, as quais traduzem o tempo de aterramento dos resíduos dispostos.

Cada amostra foi constituída de resíduos aterrados e compactados, obtidas da seguinte maneira:

- sólidos obtidos no primeiro metro de profundidade, solubilizados separadamente;
- sólidos obtidos nos dois metros finais, ou seja, após o primeiro metro, também solubilizados separadamente;

- sólidos obtidos nos três metros de profundidade, solubilizados separadamente dos dois metros iniciais.

Este procedimento foi denominado "ensaio de varredura", e teve por objetivo observar, separadamente, o desenvolvimento de populações fúngicas anaeróbias ao longo do perfil de profundidade e em função do tempo de disposição dos resíduos aterrados, bem como verificar o crescimento de fungos provenientes das amostras obtidas mais próximas à superfície, e das amostras obtidas depois de dois metros de profundidade. Coletando-se e solubilizando-se separadamente o material obtido próximo a superfície, procurou-se evitar o crescimento de fungos aeróbios facultativos nas amostras obtidas a dois ou três metros.

O procedimento para coleta e preparo dos inóculos de resíduo aterrado está apresentado a seguir:

- 1- Após chegar à superfície, cada amostra de resíduo aterrado obtida nas diferentes profundidades, foi disposta sobre uma lona plástica e submetida à triagem manual dos materiais, descartando-se os materiais considerados de difícil degradação (plásticos, papel, latas, vidros, entre outros). A composição da amostra/inóculo foi material orgânico envolvido por solo e argila, e ainda alguns fragmentos de papel e papelão empregnados de argila (denominada no estudo por fração pastosa);
- 2- A cada profundidade obteve-se, aproximadamente cinco quilogramas de fração pastosa. Um quilograma da fração foi disposto em saco plástico (marca Conserv - Atóxico/Inodoro/Impermeável) com capacidade de 10 litros, na presença de solução de solubilização;
- 3- A amostra no saco plástico foi homogeneizada manualmente. O conteúdo foi transferido para um um frasco de soro contendo pérolas de vidro, previamente esterilizado. O frasco foi fechado com tampa de borracha, fixada com arame;
- 4- Os frascos foram transportados ao Laboratório de Saneamento da Universidade de Caxias do Sul, submetidos a fluxo gasoso 100% dióxido de carbono e agitação manual por um período de 20 minutos, afim de promover a homogeneização das amostras;

5- Após este procedimento, os frascos vedados, correspondentes a cada profundidade, foram estocados em geladeira a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após a triagem manual, em cada coleta e para cada profundidade, parte das amostras foram reservadas para a determinação de alguns parâmetros físico-químicos e para a determinação da concentração de metais.

4.7. Caracterização dos inóculos

4.7.1. Amostra proveniente do conteúdo ruminal

Após a obtenção da amostra do conteúdo ruminal, no Laboratório de Processos Anaeróbios do SHS-EESC-Universidade de São Paulo, foi efetuado o exame microscópico da mesma. Uma alíquota de aproximadamente 50 mL da amostra foi disposta em um erlenmeyer de 100 mL, e efetuada a leitura do pH da mesma. Para verificação microscópica uma gota da amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro juntamente com uma gota de água destilada, e sobre a mistura foi disposta uma lamínula, e o excesso de líquido foi retirado com papel absorvente. A verificação da morfologia dos microrganismos foi efetuada através de microscopia de luz, contraste de fases e técnica de fluorescência.

4.7.2. Amostra de resíduo aterrado

Para cada amostra de resíduo aterrado coletada foi determinada a composição gravimétrica dos resíduos, o teor de umidade, o teor de sólidos voláteis e não voláteis, a concentração de metais a partir do extrato lixiviado e solubilizado dos resíduos aterrados. Observa-se que não foram realizadas observações para verificação de morfologias microbianas presentes nas amostras coletadas de resíduos aterrados.

4.7.2.1. Composição gravimétrica dos resíduos

As amostras de resíduos sólidos, que constituíram o inóculo proveniente do aterro sanitário foram coletadas num perfil de até 3,5 metros de profundidade e em diferentes cotas de disposição do Aterro Sanitário de São Giácomo. A metodologia de amostragem foi definida e adaptada pelo Laboratório de Saneamento da Universidade de Caxias do Sul, a partir da Norma NBR 10007 - Amostragem de Resíduos (1987). Nas amostras sólidas coletadas foi determinada a composição física, em função da segregação dos seguintes componentes: fração pastosa (mistura de matéria orgânica, argila e inertes agregados, e fragmentos de papel), papel, papelão, plástico, metais, vidros, entre outros. Na fração pastosa, que constituiu o inóculo descrito no item 4.6.2, foi determinado o teor de umidade, sólidos totais, voláteis e fixos, como também pH e metais nos extratos obtidos a partir dos testes de lixiviação e solubilização.

A determinação de tais parâmetros na fração pastosa teve por objetivo verificar o potencial de material orgânico disponível e facilmente degradável, bem como a presença de metais que poderiam exercer algum efeito inibitório sobre o crescimento da população microbiana presente no aterro sanitário estudado.

4.7.2.2. Determinação do teor de umidade

A metodologia para determinação deste parâmetro foi baseada em em STANDARD METHODS (1985) e adaptada pelo Laboratório de Saneamento da Universidade de Caxias do Sul. Após a segregação e a pesagem dos materiais parte da fração pastosa foi disposta em bandejas de alumínio, pesadas e submetidas ao processo de secagem em estufa à temperatura de 105°C, até o resíduo apresentar peso constante. Após a obtenção do peso constante determinou-se o teor de umidade do resíduo por diferença de peso, conforme apresentado na fórmula a seguir:

$$U (\%) = [(A - B) / A] \times 100$$

$$RS (\%) = (100 - U)$$

onde :

U = teor de água na massa (%)

A = peso inicial da amostra (g)

B = peso final da amostra (g)

RS = teor de resíduo seco (%)

4.7.2.3. Determinação do teor de sólidos voláteis e não-voláteis

A metodologia para determinação deste parâmetro foi baseada em STANDARD METHODS (1985) e adaptada pelo Laboratório de Saneamento da Universidade de Caxias do Sul. O material seco foi triturado em multiprocessador e peneirado em malha de abertura 2,38 mm (peneira ABNT 8), afim de obter uma amostra de granulometria homogênea para determinação do teor de sólidos voláteis e fixos. O resíduo foi então calcinado em cadinhos de porcelana colocados em mufla a 550°C, por um período de duas horas, e o teor de sólidos fixos e voláteis foi determinado segundo a fórmula:

$$SV (\%) = [(A - B) / A] \times 100$$

$$SF (\%) = (100 - SV)$$

onde:

SV = teor de sólidos voláteis (%)

A = peso inicial da amostra (g)

B = peso final da amostra (g)

SF = teor de sólidos fixos (%)

4.7.2.4. Determinação da concentração de metais

O teste de lixiviação foi realizado segundo a Norma NBR 10005 - Lixiviação de Resíduos (1987), sendo determinada a concentração dos seguintes metais: prata, arsênio, bário, cádmio, cromo, chumbo, selênio e mercúrio. O teste de solubilização foi realizado segundo a Norma NBR 10006 - Solubilização de Resíduos (1987), sendo determinada a concentração dos seguintes metais: alumínio, prata, arsênio, bário, cádmio, cromo, ferro, zinco, cobre, manganês, chumbo, selênio e mercúrio.

A determinação da concentração dos metais nos extratos lixiviado e solubilizado, antes mencionados, foi realizada por método de determinação de metais em águas e efluentes por Espectrometria de Absorção Atômica, pelo laboratório da empresa Pró-Ambiente, no município de Porto Alegre - RS.

4.8. Procedimentos de Execução dos Ensaios de Enriquecimento

4.8.1. Enriquecimentos de culturas a partir do inóculo obtido do conteúdo ruminal de bovino

Os ensaios de enriquecimento constituíram-se de duas etapas, experimentos de enriquecimento I e II. Os ensaios de enriquecimento I caracterizaram-se pelo subcultivo de 03 frascos, sendo que as culturas resultantes destes foram subcultivadas em 24 frascos, dando origem aos experimentos de enriquecimento II. Para os ensaios de enriquecimento I e II foram utilizados os frascos tipo "soro" e "tubos de ensaio" com tampa de borracha e lacre de alumínio, respectivamente. Nas Figuras 22 e 23 estão apresentadas os frascos utilizados respectivamente, na fase de enriquecimento I e II. A inoculação dos meios de cultura de enriquecimento I consistiu na utilização de 10 mL da amostra obtida a partir do conteúdo ruminal, conforme descrito no item 4.6.1.. O volume de 10 mL foi inoculado em frasco tipo soro contendo 1/3 do volume de meio de cultura descrito no item 4.4.1, sendo que o

pH do meio foi ajustado para $5,0 \pm 0,5$ antes da inoculação das amostras, e a incubação foi efetuada sob temperatura de $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Durante o período de incubação das amostras do enriquecimento I, foram realizadas verificações da morfologia dos microrganismos desenvolvidos nestes cultivos, através de microscopia de luz e contraste de fase. Eventualmente, os cultivos foram submetidos à técnica de coloração de Gram baseada na técnica descrita pela DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen VAZOLLER (1995) através de microscopia óptica comum, para observação dos grupos bacterianos.

Após o desenvolvimento dos microrganismos, as amostras foram subcultivadas em meio de enriquecimento novo, porém distribuído em frascos do tipo "ensaio" vedados com tampa de borracha e lacre de alumínio. O procedimento de preparo do meio de cultura nesta fase ocorreu de forma semelhante à descrita no item 4.4.1., dando origem aos ensaios de enriquecimento II. Deve-se ressaltar que em cada frasco, foi distribuído meio em 1/3 do volume do frasco com pH ajustado para 6,0. O inóculo para os ensaios nestes frascos, que caracterizaram a fase de enriquecimento II, consistiu de 0,3 mL do líquido proveniente dos frascos do enriquecimento I descrito neste ítem.

A incubação dos frascos do enriquecimento II foi efetuada sob temperatura de $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Durante o período de incubação, foram realizadas verificações da morfologia dos microrganismos desenvolvidos nestes cultivos, através de microscopia de luz e contraste de fase, e visualização do consumo de celulose do meio.

A Figura 24 mostra as etapas desenvolvidas a partir da coleta do conteúdo ruminal, desde a solubilização da amostra, ensaios de enriquecimento, até os ensaios de isolamento, previstos para o inóculo de rúmen bovino. Esta figura representa de forma sucinta a metodologia empregada, porém não indicando o número de subcultivos realizados para cada amostra.

Figura 22 - Frascos tipo "soro" utilizados na fase de enriquecimento I das amostras estudadas - Frasco 01: inóculo ruminal solubilizado. Frasco 02: meio de cultura inoculado na fase de enriquecimento I.

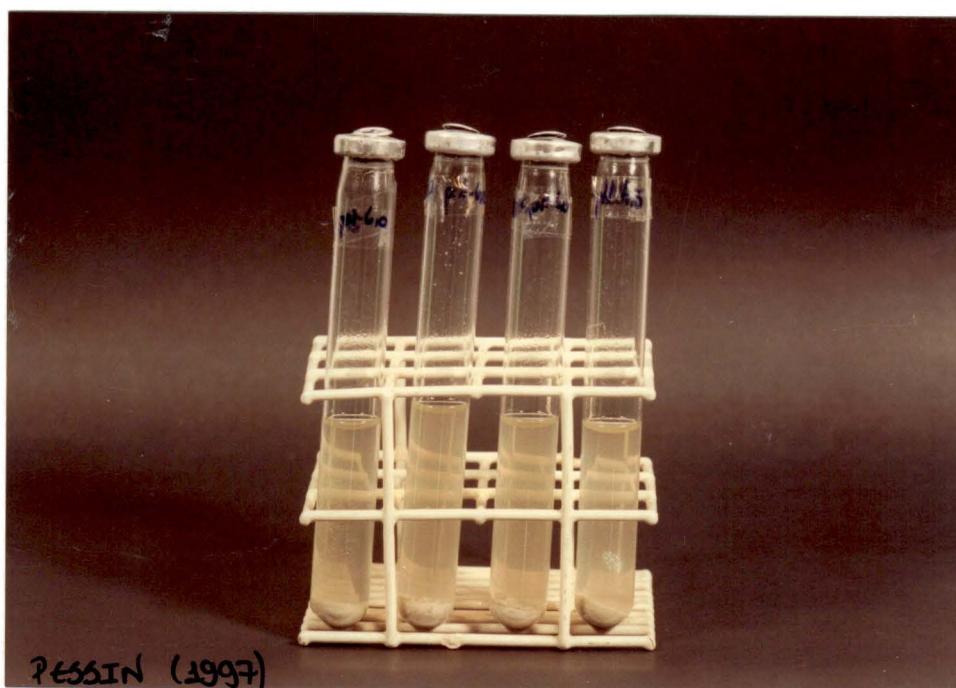


Figura 23 - Frascos tipo "ensaio" com lacre de alumínio, utilizados na fase de enriquecimento II para as amostras provenientes do rúmen.

COLETA DO
CONTEÚDO RUMINAL

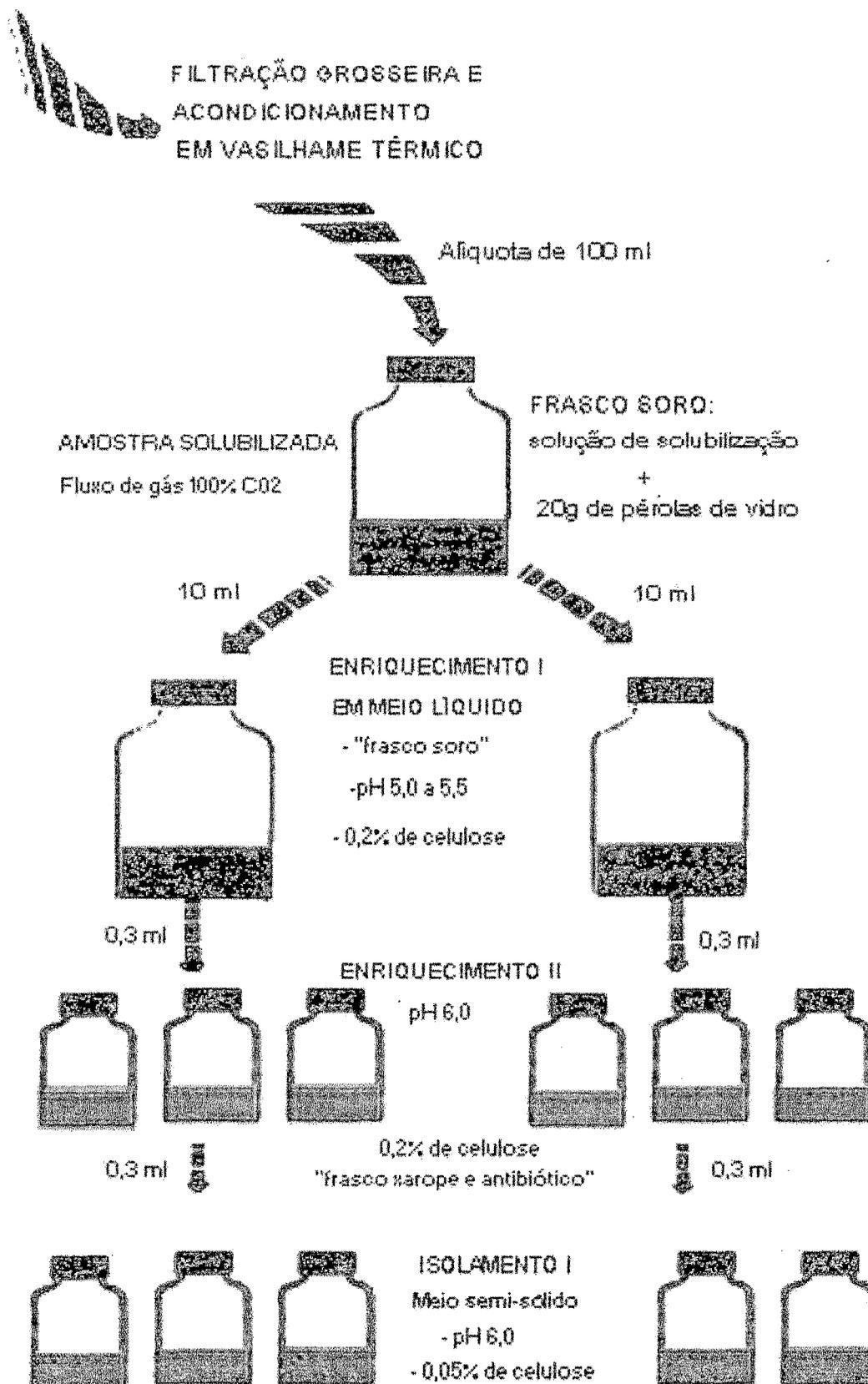


Figura 24 - Representação esquemática dos ensaios desenvolvidos a partir da coleta de amostras do conteúdo ruminal bovino.

4.8.2. Enriquecimentos de culturas a partir do inóculo proveniente da solubilização de amostras de resíduos sólidos aterrado

Para as amostras provenientes da solubilização de resíduo aterrado, foram realizados experimentos de enriquecimento, os quais constituíram-se de duas etapas, enriquecimento I e II. Os ensaios de enriquecimento I caracterizaram-se pela inoculação em meio líquido de 20 frascos, e os ensaios de enriquecimento pelo subcultivo de 83 frascos, cujo inóculo foi procedente das culturas líquidas obtidas na fase de enriquecimento I. Para os ensaios de enriquecimento I e II foram utilizados os frascos tipo "soro" e "antibiótico".

A inoculação dos meios de cultura previstos para os ensaios de enriquecimento I, consistiu na utilização de 10 mL de inóculo obtido a partir da solubilização de amostras de resíduos aterrados, conforme descrito nos itens 4.6.2. O volume de 10 mL de cada amostra solubilizada, foi inoculado em frasco tipo "soro" contendo 1/3 do volume de meio de cultura descrito no item 4.4.1., sendo que o pH do meio foi ajustado para $5,0 \pm 0,5$ antes da inoculação das amostra, e a incubação foi efetuada sob temperatura de 37 a 39°C.

Durante o período de incubação, foram realizadas observações da morfologia dos microrganismos desenvolvidos nestes cultivos, através de microscopia óptica comum.

Após o desenvolvimento dos microrganismos, as amostras foram subcultivadas em meio de enriquecimento novo, porém distribuídas em frascos do tipo "antibiótico". Dos frascos com culturas líquidas correspondentes à fase de enriquecimento I, foram retiradas alíquotas de 0,3 mL e inoculadas em meio de cultura líquido com celulose em frascos tipo "antibiótico" com capacidade volumétrica 20 a 35 mL, constituindo desta forma os ensaios de enriquecimento II. Para cada amostra proveniente dos frascos da fase de enriquecimento I foram inoculados, em média 20 frascos contendo meio de cultura líquido.

O procedimento de preparo do meio de cultura para estes ensaios de enriquecimento II ocorreu de forma semelhante à descrita no item 4.4.1.. Deve-se ressaltar que em cada frasco foi distribuído meio em 1/3 do volume do mesmo, sendo o pH do meio ajustado para 6,0. A incubação dos frascos do enriquecimento II foi efetuada sob temperatura de $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até a verificação de crescimento de organismos, bem como da visualização do consumo de celulose do meio.

Na Figura 25 mostra um esquema das etapas desenvolvidas a partir da coleta de amostras de resíduo sólido aterrado, desde a solubilização das amostras de resíduo aterrado até os ensaios de enriquecimento. Ressalta-se que as etapas apresentadas no esquema da Figura 25, foram definidas somente após os ensaios realizados com as amostras provenientes do conteúdo ruminal bovino, porém não indicado o número de frascos utilizados para cada sub-cultivo.

COLETA DO MATERIAL SÓLIDO

Trado mecanizado

Descarte de materiais não biodegradáveis

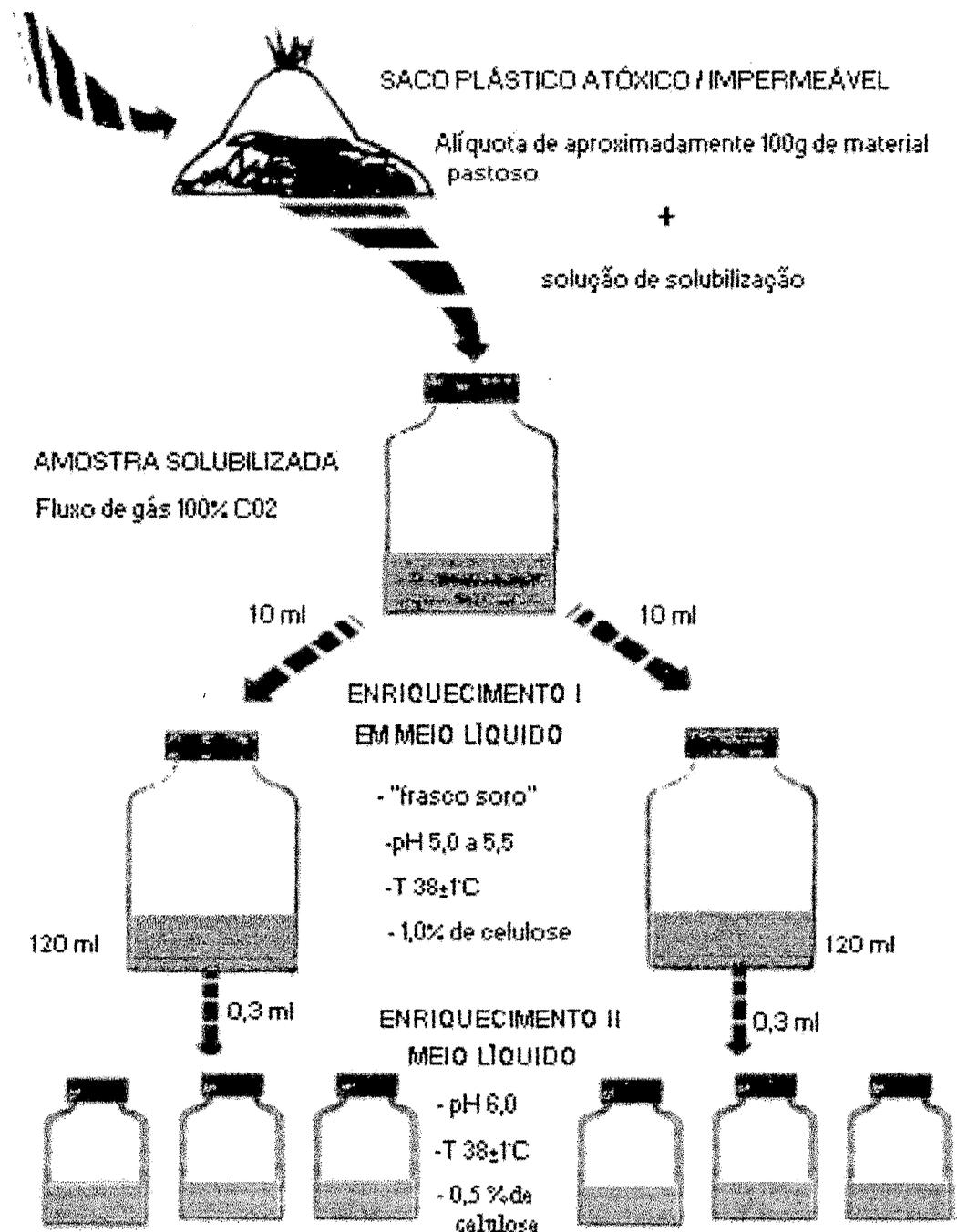


Figura 25 - Representação esquemática dos ensaios desenvolvidos a partir de amostras de resíduo sólido aterrado.

4.9. Ensaio de Isolamento de Fungos Anaeróbios

4.9.1. Isolamento de culturas a partir do inóculo obtido do conteúdo ruminal de bovino

Os inóculos para os ensaios de isolamento foram originados das culturas líquidas obtidas na fase de enriquecimento II, descritos no item 4.8.1., que apresentaram o desenvolvimento de culturas fúngicas anaeróbias. Tais culturas foram subcultivadas em 28 frascos do tipo "xarope" e "antibiótico" cilíndricos, nos quais foram distribuídos 1/3 do volume de meio de cultura descrito no item 4.4.2., com adição de 0,4 mL de solução de antibióticos.

A inoculação nestes ensaios constitui-se de alíquotas de 0,3 mL das culturas líquidas procedentes dos ensaios da fase de enriquecimento II, descrito no item 4.8.1. Para cada cultura resultante da fase de enriquecimento II, foram inoculados três frascos (sub-cultivos em triplicata), os quais caracterizaram os ensaios iniciais da etapa de isolamento em meio semi-sólido. A inoculação sobre o meio semi-sólido foi realizada segundo a técnica "pour-plate". Deve-se salientar que não foram realizadas diluições seriadas para a inoculação dos meios semi-sólidos.

A incubação foi efetuada sob temperatura de $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até a verificação do crescimento dos organismos de interesse no meio semi-sólido, bem como do consumo de celulose do meio.

A identificação dos organismos foi efetuada através da análise das microfotografias efetuadas com o equipamento disponível no Laboratório de Processos Anaeróbios da EESC - USP e no Laboratório de Saneamento da Universidade de Caxias do Sul. As referências de BARR (1988), MUNN et al. (1989), HERRERA & ULLOA (1990) foram adotadas para a identificação dos organismos isolados.

4.10. Procedimentos para análise microscópica de amostras

Durante o período de incubação das amostras de rúmen submetidas a fase de enriquecimento I e II, foram realizadas verificações microscópicas da morfologia dos microrganismos que eventualmente desenvolviam-se nestas culturas.

Alíquotas das culturas eram retiradas através do auxílio de seringas hipodérmicas previamente reduzidas com solução redutora (a seringa era preenchida por solução redutora, deixando-a agir por alguns segundos desprezando-se a solução, e o procedimento era repetido entre duas a três vezes). Após a flambagem da tampa do frasco, a seringa era introduzida para a retirada de uma alíquota de aproximadamente 0,1 mL da cultura líquida. Após, o líquido era disposto entre lâmina e lamínula, procedendo a retirada do excesso com papel absorvente. Após as amostras eram analisadas em microscópio ótico de contraste de fase. Para os ensaios de enriquecimento com amostras de rúmen a verificação microscópica era efetuada diariamente.

Nos ensaios de enriquecimento com amostras de resíduos sólido foram também foram realizadas observações microscópicas das culturas líquidas obtidas. O procedimento de retirada das amostras dos frascos foi exatamente o mesmo descrito para as amostras de rúmen. No entanto as observações microscópicas foram realizadas em um microscópio ótico de luz comum de dois em dois dias.

5. RESULTADOS

O presente trabalho constituiu-se de duas etapas distintas de ensaios, os quais caracterizaram-se pela utilização de inóculos diferentes. A primeira etapa foi realizada a partir da utilização de inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino, e a segunda etapa a partir de inóculo proveniente de amostras de resíduo sólido aterrado. Na Tabela 06 estão apresentados os ensaios realizados para cada um dos inóculos utilizados neste estudo.

Conforme apresentado na Figura 24, os experimentos realizados a partir do inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino, constituíram-se na realização de ensaios distintos, ou seja, ensaios de enriquecimento e ensaios de isolamento. Os ensaios de enriquecimento, por sua vez, também constituíram-se de duas etapas, experimentos de enriquecimento I que caracterizaram-se pelo subcultivo de 03 frascos. As culturas resultantes nos ensaios de enriquecimento I foram subcultivadas em 24 frascos, dando origem aos experimentos do enriquecimento II. As culturas obtidas nos ensaios de enriquecimento II foram subcultivadas em 28 frascos em meio semi-sólido, caracterizando os ensaios de isolamento.

Quanto aos ensaios realizados com inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado, foram realizados experimentos de enriquecimento, os quais constituíram-se de duas etapas, enriquecimento I e II, conforme apresentado na Figura

25. Os ensaios de enriquecimento I caracterizaram-se pela inoculação de 20 frascos, e os ensaios de enriquecimento II pela inoculação de 83 frascos, conforme indicado na Tabela 06. Os ensaios de isolamento correspondentes ao inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado não foram executados.

Tabela 06 - Ensaio realizados a partir dos inóculos utilizados neste estudo

Ensaio	Inóculo proveniente do conteúdo ruminal		Inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado	
	n° de subcultivos	Execução	n° de subcultivos	Execução
I	03	realizado	20	realizado
II	24	realizado	83	realizado
Isolamento	28	realizado sem a purificação das culturas	-	não foi realizado

5.1. Ensaio realizados a partir do inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino

5.1.1. Caracterização microscópica do inóculo - exame do material à fresco

O inóculo proveniente do conteúdo ruminal caracterizou-se por apresentar pH em torno de 6,6, e presença de algumas estruturas celulares eucariotas e procariotas. Na Figura 26 estão apresentadas estruturas arredondadas encontradas nas amostras deste inóculo.

Células procaritas foram observadas através da técnica de fluorescência, como bactérias metanogênicas de morfologia semelhante a cocobacilos, provavelmente de gêneros hidrogenotrófico. Logo após a coleta do material, amostras também foram submetidas a coloração de Gram, e constatou-se que a



grande maioria das populações bacterianas presentes no inóculo consistiam de bacilos Gram-positivos.

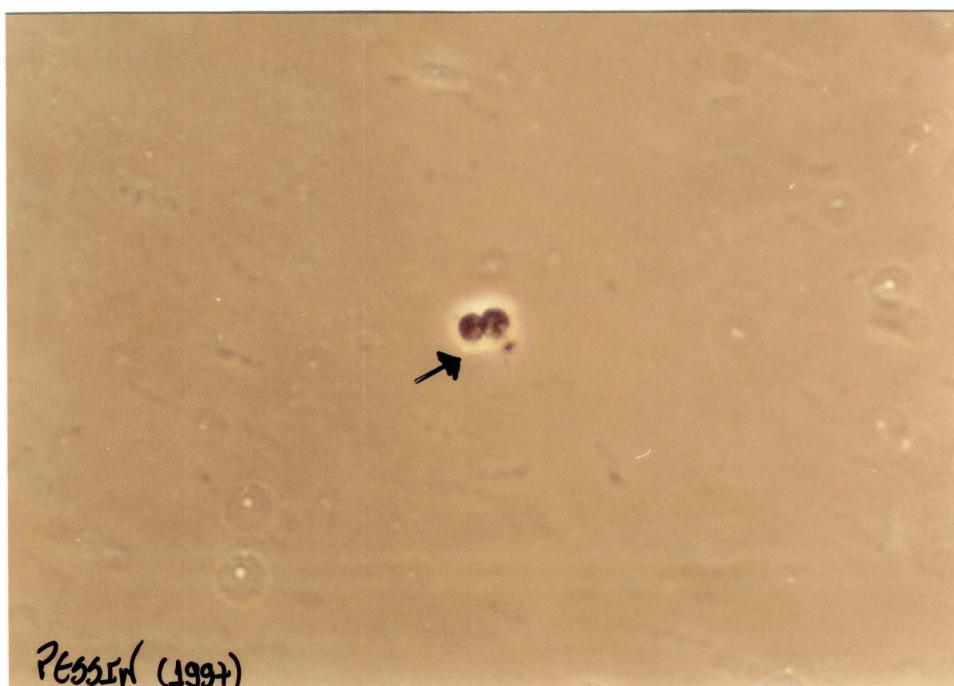


Figura 26 - Estruturas celulares encontradas no inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino - material à fresco (objetiva 40 e ocular 10).

5.1.2. Ensaio de enriquecimento com inóculo proveniente de rúmen bovino

Na Tabela 07 estão apresentadas as etapas de enriquecimento I e II, com o respectivo número de frascos inoculados em cada etapa, bem como alterações observadas no meio de cultura ao longo do período de incubação para cada um dos frascos inoculados.

Para os ensaios correspondentes a fase de enriquecimento I foram realizadas inoculações em triplicata com pH ajustado para $5,0 \pm 0,5$ onde pode-se constatar a

turvação gradativa do meio de cultura, ao longo do tempo de incubação. Após um período em torno de 45 a 50 dias de incubação, observou-se o desenvolvimento de hifas fúngicas, sobre a superfície do meio líquido, estendendo-se pela parede do frasco tipo “soro”, conforme apresentado na Figura 27.

Quanto aos ensaios correspondentes à fase de enriquecimento II, após vinte dias de incubação, nas condições previstas, ocorreu a formação de colônias fúngicas sob a camada de celulose depositada no fundo do frasco, conforme pode ser observado na Figura 28. Algumas amostras destes ensaios foram observadas através de microscopia de luz, e notou-se a presença de estruturas arredondadas, muito semelhantes àquelas encontradas no inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino - material à fresco, apresentadas na Figura 26.

Tabela 07 - Alterações macroscópicas das culturas nos ensaios de enriquecimento I e II, realizados com inóculo proveniente do conteúdo ruminal, observadas ao longo do período de incubação.

Ensaio de Enriquecimento I			Ensaio de Enriquecimento II		
<i>Nº de Frasco</i>	<i>Período de Incubação</i>	<i>Alterações do meio de cultura</i>	<i>Nº de Frasco</i>	<i>Período de Incubação</i>	<i>Alterações do meio de cultura</i>
01 frasco "A"	10 dias	- turvação do meio e mudança na coloração, com consumo do pó de celulose	12 frascos "A"	05 dias	- turvação e mudança na coloração do meio
	45 dias	- aparecimento de filamentos esbranquiçados sobre a superfície do meio		10-20 dias	- turvação e mudança na coloração do meio; surgimento de um depósito sobre a camada de celulose no fundo do frasco, de cor cinza-esbranquiçada e formato regular.
	50 dias	- toda a superfície do meio estava coberta por filamentos cinza-esbranquiçados			
01 frasco "B"	10 dias	- turvação e mudança de coloração do meio e consumo do pó de celulose	12 frascos B"	5 dias	- turvação e mudança na coloração do meio
	45 dias	- aparecimento de filamentos esbranquiçados sobre a superfície do meio		10-20 dias	- turvação e mudança na coloração do meio; surgimento de um depósito sobre a camada de celulose no fundo do frasco, de cor cinza-esbranquiçada e formato regular.
	55 dias	- toda a superfície do meio estava coberta por filamentos cinza-esbranquiçados			
01 frasco "C"	03 dias	- não foi possível manter as condições de anaerobiose			

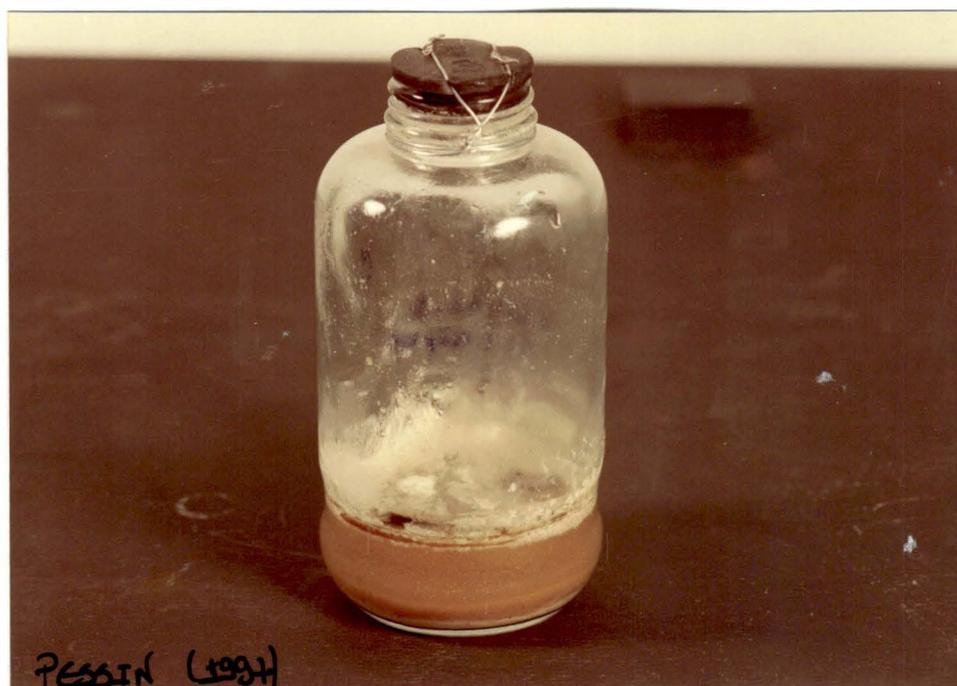


Figura 27 - Frasco correspondente ao ensaio de enriquecimento I- crescimento fúngico sobre a superfície do meio líquido.



Figura 28 - Crescimento fúngico ocorrido sob a camada de celulose nos frascos correspondentes a fase de enriquecimento II.

5.1.3. Ensaio de isolamento com inóculo proveniente de rúmen de bovino

Deve-se salientar que não foram realizadas diluições seriadas para a inoculação dos meios semi-sólidos. As inoculações do meio de cultura nos ensaios de isolamento, foram realizados a partir da retirada de 0,3 mL das culturas líquidas provenientes dos ensaios da fase de enriquecimento II. Para cada cultura resultante da fase de enriquecimento II, foram inoculados três frascos (sub-cultivo em triplicata), os quais caracterizaram os ensaios iniciais da etapa de isolamento em meio semi-sólido. Na Tabela 08 está apresentado os ensaios de isolamento realizados a partir do inóculo proveniente do conteúdo ruminal, na qual destaca-se o número de subcultivos realizados em cada ensaio, bem como as alterações macroscópicas no meio de cultura ocorridas ao longo do período de incubação para cada um dos frascos inoculados.

Tabela 08 - Ensaio de isolamento realizados após os subcultivos correspondentes ao enriquecimento I e II com inóculo proveniente do conteúdo ruminal.

Ensaio de Isolamento		
Nº de Frascos	Período de Incubação	Alterações do meio de cultura
14 frascos codificados de A1 a A7	10 dias	- não ocorreu crescimento em nenhum dos frascos
	20 dias	- surgimento de crescimento de colônias sobre o ágar em dois frascos
	30 dias	- crescimento das colônias foi observado somente nos dois frascos citados anteriormente
14 de frascos codificados de B1 a B7	10 dias	- em nenhum dos frascos ocorreu crescimento
	20 dias	- em nenhum dos frascos ocorreu crescimento
	30 dias	- em nenhum dos frascos ocorreu crescimento

Após um período de 15 dias de incubação constatou-se, sobre a camada de ágar, algumas colônias de crescimento radial e de coloração amarelo-pardo. As colônias apresentaram um crescimento acompanhando a superfície do ágar, onde os filamentos tinham início de um mesmo ponto para o substrato em forma de raios. Esses filamentos apresentaram-se bastante quebradicos e de consistência mole ao serem tocados. Na Figura 29 está apresentado um frasco no qual foi constatado o crescimento das colônias descritas. Em apenas 7% dos frascos inoculados nos ensaios de isolamento, pode-se observar o surgimento das colônias citadas, ou seja dois dos vinte oito frascos inoculados.



Figura 29 - Crescimento fúngico ocorrido sobre meio semi-sólido, nos ensaios de isolamento com inóculo proveniente dos ensaios da fase de enriquecimento II.

Após a obtenção das colônias nos dois frascos referentes aos ensaios de isolamento, iniciaram os trabalhos de manutenção destas colônias, uma vez que subcultivadas em meio sólido, não apresentaram crescimento satisfatório. Então submeteu-se as culturas ao um novo sub-cultivo em meio líquido afim de revigorar o seu crescimento. O meio de cultura líquido utilizado consistiu do meio de enriquecimento, diferenciando-se somente pela adição da fonte de carbono, pois substituiu-se a celulose pela celobiose e glicose.

Nos primeiros experimentos realizados com as culturas obtidas nos ensaios de isolamento e inoculadas em meio líquido sem a adição de solução de antibióticos, realizou-se um acompanhamento microscópico a cada dois dias de incubação, e foram registradas estruturas microscópicas apresentadas nas Figuras 30, 31 e 32. Estas estruturas foram encontradas em 50% dos subcultivos somente a partir do nono dia de incubação. Após um período de 13 dias de incubação, nessas mesmas culturas foram detectadas outras estruturas microscópicas apresentadas nas Figuras 33 e 34.



Figura 30 - Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - nove dias de incubação(a) / (objetiva 40 e ocular 10).

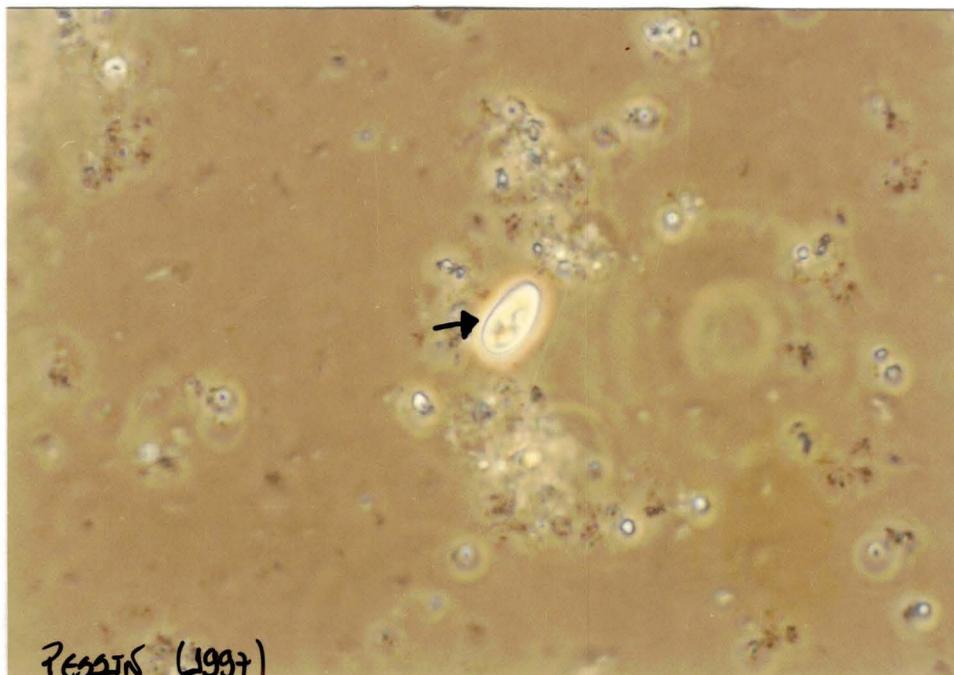


Figura 31 - Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - nove dias de incubação(b)/ (objetiva 40 e ocular 10).

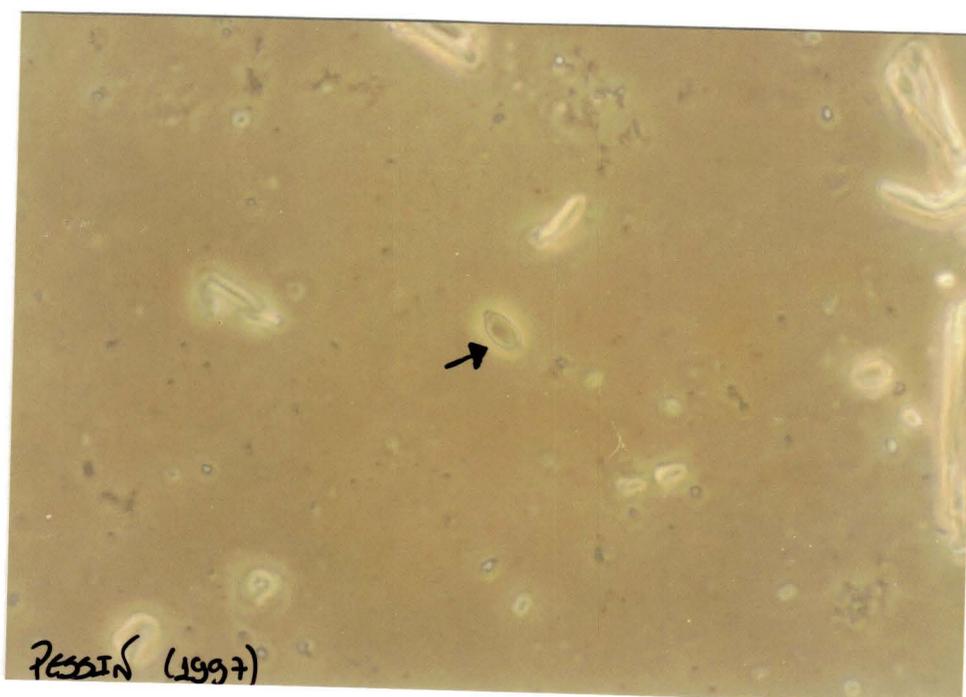


Figura 32 - Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo - nove dias de incubação(c)/ (objetiva 40 e ocular 10).

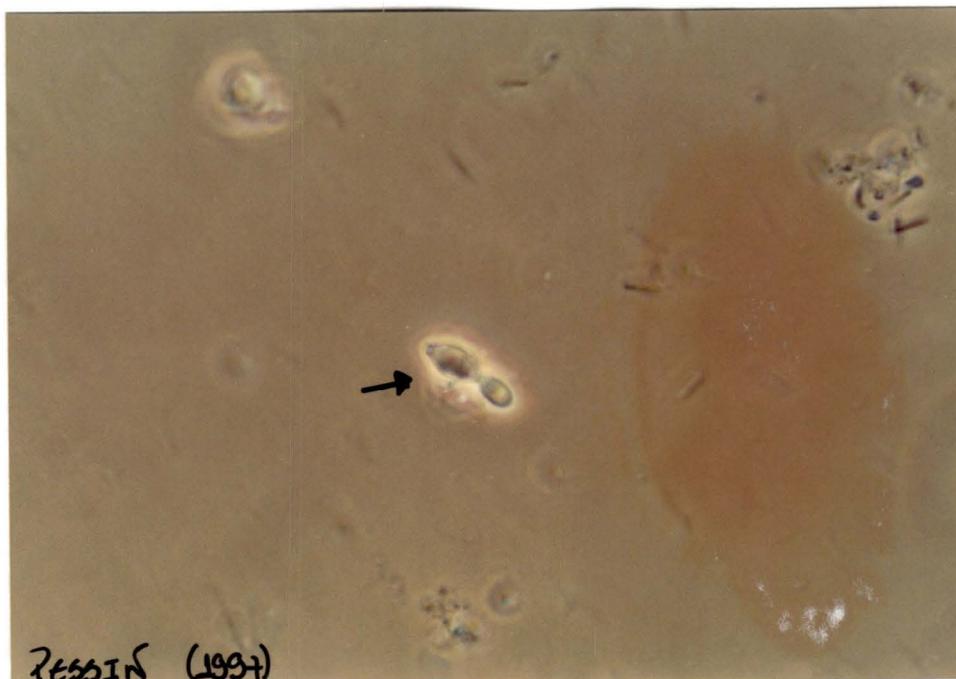


Figura 33 - Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - após treze dias de incubação(a)/(aumento de 400x).

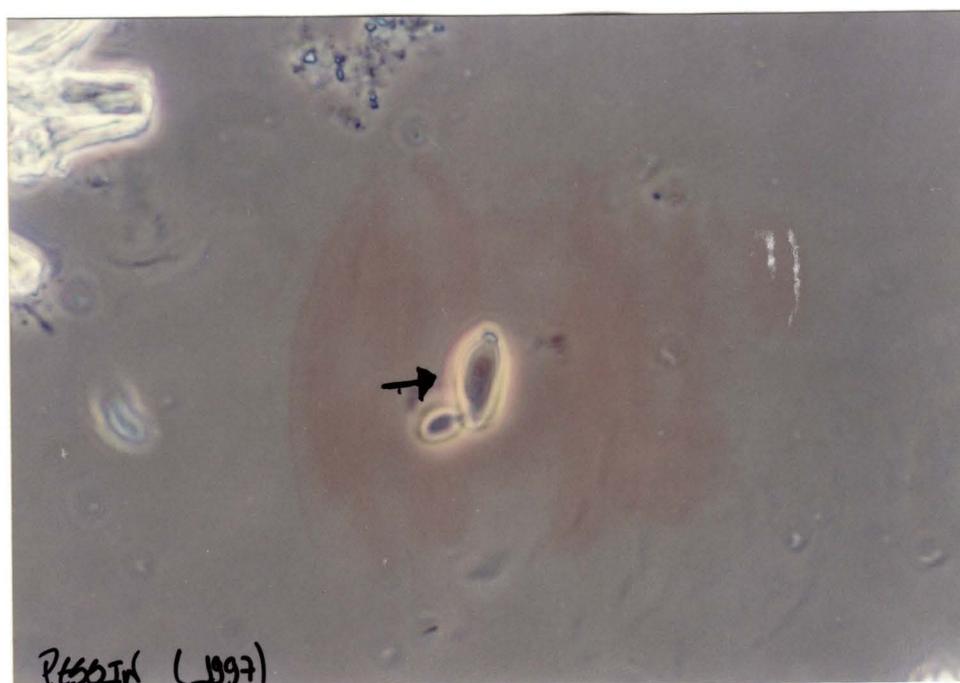


Figura 34 - Subcultivos em meio líquido das culturas provenientes dos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - treze dias de incubação(b)/ (objetiva 40 e ocular 10).

As culturas obtidas no experimento anterior foram monitoradas até vinte dias de incubação, e naqueles frascos nos quais foram detectados a ocorrência das estruturas apresentadas nas figuras 30 a 34, amostras foram sub-cultivadas em meio líquido constituído de glicose como fonte de carbono, e solução de antibióticos, sendo os mesmos incubados nas condições descritas. Aliquotas dessas culturas foram observadas diariamente por microscopia indicando a presença de estruturas apresentadas nas figuras 35, 36 e 37, respectivamente após dois, cinco e nove dias de incubação. A estrutura apresentada na Figura 35 foi encontrada em 70% das culturas observadas.

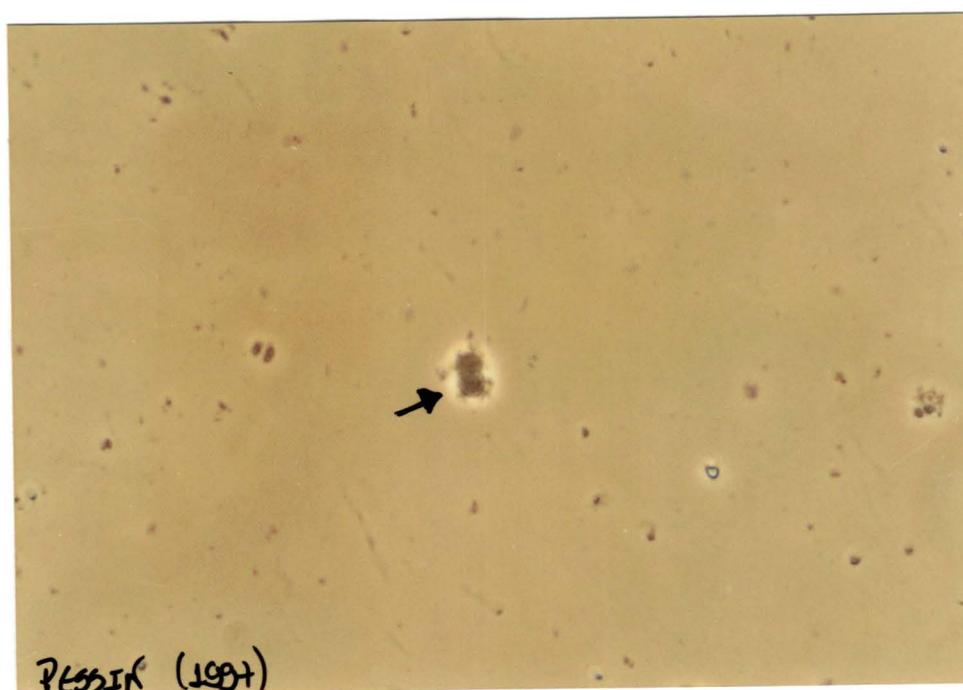


Figura 35- Estrutura detectada após dois dias de incubação nos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - culturas líquidas (objetiva 40 e ocular 10).

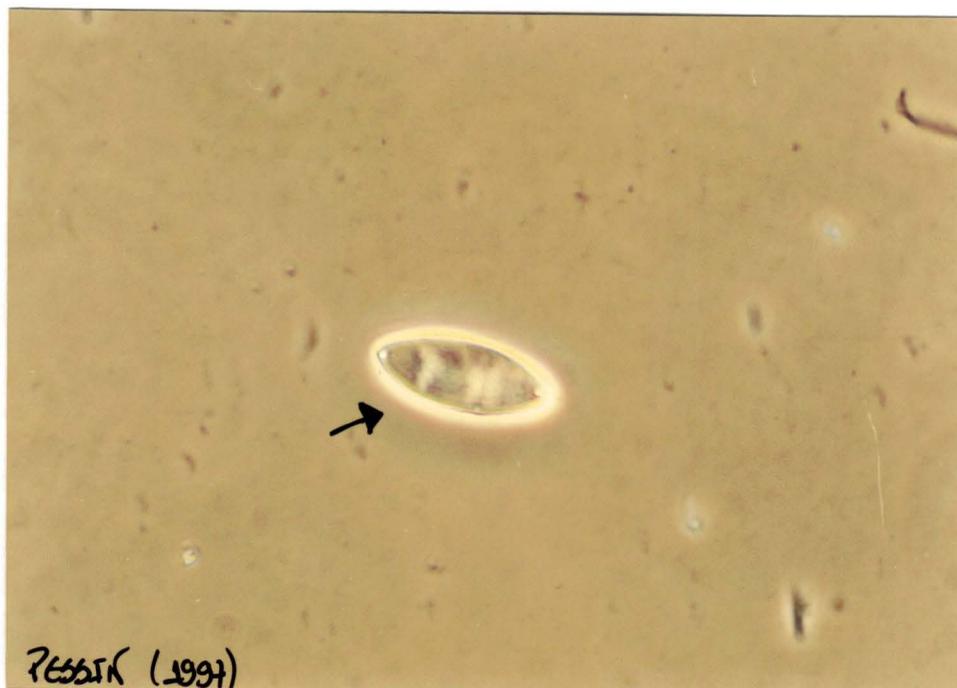
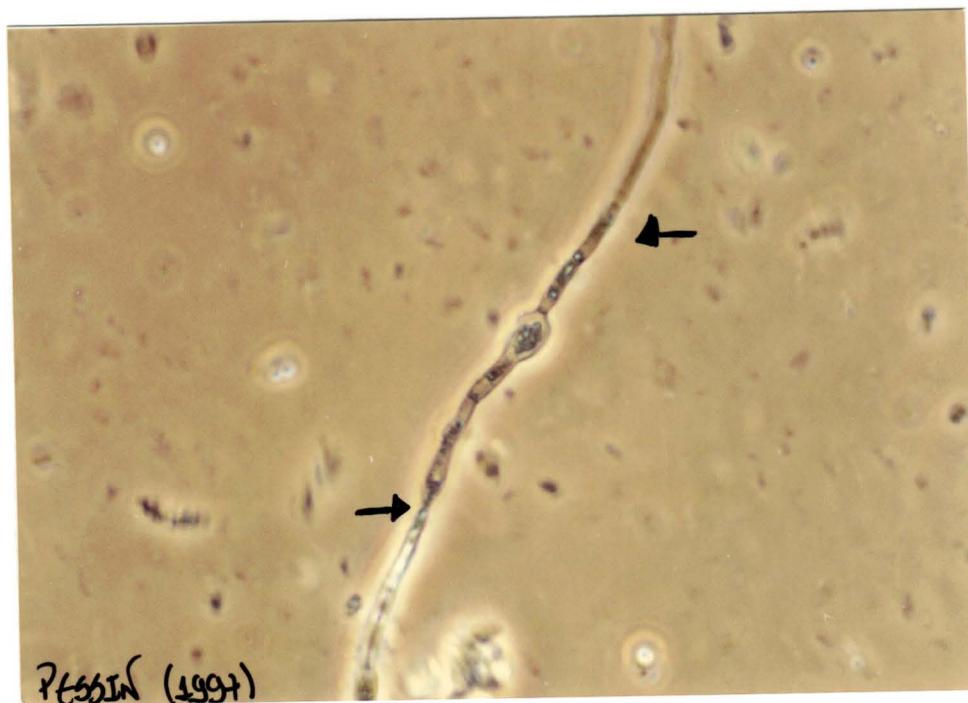


Figura 36 - Estrutura detectada após cinco dias de incubação nos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - culturas líquidas (objetiva 40 e ocular 10).



Estrutura 37- Estrutura detectada após nove dias de incubação nos ensaios de isolamento com inóculo proveniente do conteúdo ruminal - culturas líquidas (objetiva 40 e ocular 10).

5.2. Ensaio realizados a partir do inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado

5.2.1. Caracterização físico-química das amostras coletadas

Na tabela 9 pode-se observar os resultados das análises físico-químicas realizadas para cada uma das amostras coletadas. Os resultados obtidos para sólidos voláteis e fixos foram expressos em base úmida

Nas amostras coletadas também foi determinada a concentração de metais a partir dos extratos obtidos no Teste de Lixiviação e Teste de Solubilização (NBR 10005 e NBR 10006). As concentrações dos metais, obtidas para as amostras citadas, estão apresentadas nas Tabelas 10 e 11. Nestas tabelas as concentrações de metais obtidas para as amostras estão indicadas em mg de metal por litro de extrato analisado. O extrato de lixiviado foi obtido a partir da agitação constante da mistura de 100 g de resíduo e 1.700 mL de água deionizada, por um período de 24 horas. Já o extrato solubilizado foi obtido a partir de 250 g de resíduo e 1.000 mL de água deionizada, após um período de 7 dias sem agitação.

Tabela 9 - Análises Físico-Químicas das Amostras Coletadas (inóculos)

Amostras	Profundidade (metros)	Tempo de aterramento (meses)	Umidade (%)	Sólidos voláteis (%) base úmida	Sólidos fixos (%) base úmida	pH	Papel/ Papelão (%) base úmida
Amostra A1	1,0	7	32,69	12,40	54,91	6,22	11,5
Amostra B1	2,0	7	46,61	17,34	36,05	6,19	22,0
Amostra C2	3,0	9	34,66	15,30	50,04	5,92	8,6
Amostra D2	3,5	9	39,00	13,39	47,61	6,18	8,7
Amostra E3	1,0	7	29,08	17,61	53,31	7,20	5,1
Amostra F3	2,0	7	43,42	5,23	51,35	5,57	18,6
Amostra G3	2,6	7	42,06	6,10	51,84	ND	ND
Amostra H4	0,9	9	29,12	9,64	61,24	5,49	4,5
Amostra I4	2,0	9	32,10	16,30	51,60	5,33	13,5
Amostra J4	3,2	9	36,41	10,62	52,97	ND	ND
MÉDIAS	-	-	36,5	12,3	87,7	-	-

Obs: ND-Valores não determinados.

Tabela 10 - Concentrações de metais obtidas a partir do teste de lixiviação nas amostras de resíduo sólido aterrado.

Metais(mg/L)	Amostra A1	Amostra B1	Amostra C2 e D2	Amostra E3	Amostra F3 e G3	Amostra H4 e I4	Amostra J4
Prata	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*
Arsênio	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*
Bário	0,012	0,014	0,012	0,051	0,048	0,753	0,923
Cádmio	0,0009	0,0008	0,0007	0,0002	0,002	0,0008	0,0009
Cromo	0,008	0,007	0,013	0,008	0,010	0,042	0,066
Chumbo	0,041	0,055	0,041	0,021	0,043	0,077	0,086
Selênio	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*
Mercúrio	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*

Obs: ND-Valores não determinados

Tabela 11 - Concentração de metais obtidas a partir do teste de solubilização nas amostras de resíduo sólido aterrado.

Concentração (mg/L)	Amostra A1	Amostra B1	Amostra C2 e D2	Amostra E3	Amostra F3 e G3	Amostra H4 e I4	Amostra J4
Alumínio	0,072	0,136	0,147	0,148	0,178	0,091	0,138
Prata	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*
Arsênio	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*
Bário	0,012	0,010	0,008	0,026	0,026	0,492	0,461
Cádmio	0,0003	0,0005	0,0004	0,0008	0,001	0,0005	0,0006
Cromo	0,005	0,004	0,009	0,0005	0,007	0,023	0,047
Ferro	1,023	1,597	1,804	0,902	2,471	7,503	9,823
Zinco	0,034	0,078	0,080	0,098	0,073	0,268	0,903
Cobre	0,022	0,040	0,038	0,014	0,036	0,034	0,043
Manganês	0,009	0,020	0,028	0,018	0,032	-	-
Chumbo	0,020	0,026	0,019	0,013	0,028	0,051	0,052
Selênio	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*
Mercurio	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*

Obs: ND-Valores não determinados

5.2.2. Ensaio de Enriquecimento com Inóculo Proveniente de Amostras de Resíduo Aterrado

Na tabela 12 está apresentada as características das culturas após o subcultivo correspondente a fase de enriquecimento I, ao longo do período de incubação, bem como o número de subcultivos realizados para cada amostra coletada.

Tabela 12 - Alterações macroscópicas das culturas após o subcultivo correspondente ao enriquecimento I com amostras de resíduo sólido aterrado, ao longo do período de incubação

Ensaio de Enriquecimento I			
Amostras	Nº de Frascos (subcultivos)	Período de incubação	Alterações do meio de cultura
A1 (1,0 metros)	02	10 dias	- turvação do meio
		15 dias	- mudança na coloração pardo para cinza escuro (com formação de bolhas e sedimento de coloração escura); consumo de celulose
		30 dias	- coloração escura; consumo de celulose
B1 (2,0 metros)	02	10 dias	- turvação do meio
		15 dias	- mudança na coloração pardo para cinza escuro (com formação de bolhas e sedimento de coloração escura); consumo de celulose
		30 dias	- coloração escura; consumo de celulose
C2 (3,0 metros)	02	02 dias	- turvação e mudança na coloração do meio (pardo para cinza escuro)
D2 (3,5 metros)	02	05 dias	- meio com coloração escura e formação de pequenas e inúmeras partículas escuras (cheiro forte ao abrir a estufa incubadora)
E3 (1,0 metros)	02	05 dias	- não foi possível manter as condições de anaerobiose

Continua.....

Continuação da Tabela 12

F3 (2,0 metros)	02	02 dias	- turvação e mudança na coloração do meio (pardo para cinza escuro)
		05 dias	- meio com coloração escura e formação de pequenas e inúmeras partículas escuras (cheiro forte ao abrir a estufa incubadora)
		10 dias	- formação de bolhas de gases sobre a superfície do meio
G3 (2,6 metros)	02	02 dias	- turvação e mudança na coloração do meio (pardo para cinza escuro)
		05 dias	- meio com coloração escura e formação de pequenas e inúmeras partículas escuras (cheiro forte ao abrir a estufa incubadora)
		10 dias	- formação de bolhas de gases sobre a superfície do meio
H4 (0,9 metros)	02	02 dias	- turvação e mudança na coloração do meio (pardo para cinza escuro)
		05 dias	- meio com coloração escura e formação de pequenas e inúmeras partículas escuras
		10 dias	- formação de bolhas de gases sobre a superfície do meio
I4 (2,0 metros)	02	05 dias	- turvação e mudança na coloração do meio (pardo para cinza escuro)
		10 dias	- meio com coloração escura
J4 (3,2 metros)	02	02 dias	- turvação e mudança na coloração do meio (pardo para cinza escuro)
		05 dias	- meio com coloração escura e formação de pequenas e inúmeras partículas escuras
		10 dias	- formação de bolhas de gases sobre a superfície do meio

Após um período de quatro dias de incubação, em todos os frascos, independente do inóculo utilizado, o meio de cultura tornou-se acinzentado, e gradativamente apresentou uma coloração próxima ao preto. Esta coloração permaneceu aproximadamente até o décimo dia de incubação, período no qual ocorreu a deposição de grânulos escuros sobre a camada de celulose no fundo do frasco, dificultando até mesmo a visualização do seu consumo pelos organismos presentes.

Na Figura 38 está apresentado um frasco tipo “soro”, no qual o meio de cultura inoculado adquiriu, ao longo do período de incubação, uma coloração escura, mesmo após ocorrer a deposição dos grânulos sobre a celulose no fundo do frasco. No período de vinte cinco dias de incubação, não foi detectado o desenvolvimento de hifas sobre o meio, nem tão pouco de estruturas semelhantes àquelas típicas de organismos fúngicos, como as encontradas nos ensaios realizados com inóculo ruminal. Através do acompanhamento microscópico dessas amostras, foi detectado apenas a presença de inúmeras bactérias esporuladas. Deve-se salientar ainda, que a concentração de celulose no meio de cultura variou entre 1% a 2%, verificando-se visualmente um maior e mais rápido consumo naqueles frascos inoculados com 1% de celulose.

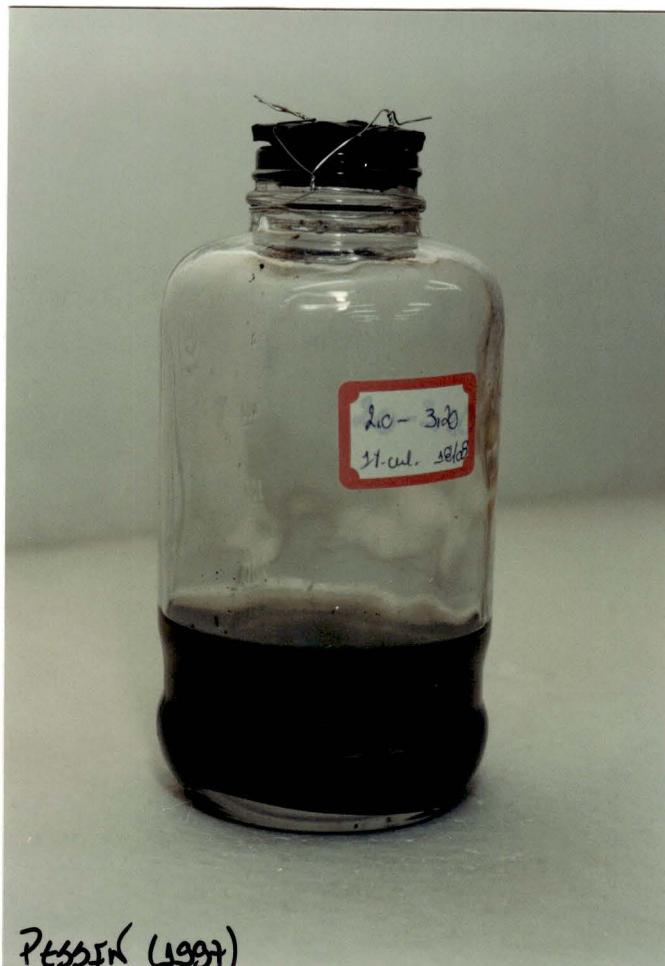


Figura 38- Frasco correspondente a fase de enriquecimento I com inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado - meio de cultura adquiriu uma coloração escura após dez dias de incubação.

Dos frascos com culturas líquidas correspondentes a fase de enriquecimento I, foram retiradas alíquotas de 0,3 ml e inoculadas em meio de cultura líquido com celulose em frascos tipo antibiótico de capacidade volumétrica 20 e 35 ml, constituindo desta forma os ensaios da fase de enriquecimento II. Para cada amostra proveniente dos frascos da fase de enriquecimento I foram inoculados, em média, 20 frascos tipo antibiótico com meio de cultura líquido. A concentração da celulose utilizada nesses ensaios foi de 0,5 %, conforme indicação de literatura.

Na Tabela 13 estão apresentadas as características das culturas após o subcultivo correspondente a fase de enriquecimento II, ao longo do período de incubação, bem como o número de frascos inoculados para cada amostra.

Tabela 13 - Características das culturas após o subcultivo correspondente ao enriquecimento II com amostras de resíduo sólido aterrado, ao longo do período de incubação

Ensaio de Enriquecimento II				
Amostras	Nº de Frascos	Período de incubação	Consumo de celulose	Turvação e coloração do meio
A1	06	até 10 dias	não apresentou	não apresentou
		20 dias	não apresentou	leve turvação sem mudança na coloração
		30 dias	não apresentou	leve turvação sem mudança na coloração
B1	06	até 15 dias	não apresentou	não apresentou
		até 30 dias	não apresentou	não apresentou
C2	11	02 dias	apresentou	leve turvação
		10 dias	apresentou	coloração amarelada
		20-30 dias	apresentou	coloração amarelada
D2	11	02	apresentou	leve turvação
		10	apresentou	coloração amarelada
		20	apresentou	coloração amarelada
		30	apresentou	coloração amarelada com precipitado da mesma cor
F3	08	até 15 dias	não apresentou	não apresentou
		até 30 dias	não apresentou	não apresentou
G3	08	02	pouco acentuado	leve turvação
		10	pouco acentuado	turvaçãõ
		20-30 dias	pouco acentuado	turvação acentuada com alguns pontos de precipitado amarelo

Continua...

Continuação da Tabela 13

H4	11	02	apresentou	leve turvação
		10	apresentou	turvação e mudança na coloração
		20-30 dias	apresentou	turvação acentuada e cor amarelada intensa
I4	11	02	pouco acentuado	turvação
		10	pouco acentuado	turvação e mudança na coloração
		20-30 dias	pouco acentuado	turvação acentuada com alguns pontos de precipitado amarelo
J4	11	02	apresentou	turvação
		10	apresentou	turvação e mudanças na coloração
		20 -30 dias	apresentou	turvação acentuada com precipitado amarelo

Deve-se ressaltar que em algumas amostras sub-cultivadas para os ensaios da fase de enriquecimento II, após um período de cerca vinte dias de incubação, notou-se uma intensa atividade celulolítica, ocorrendo o completo consumo da celulose depositada no fundo do frasco, e em seu lugar surgiu um precipitado de cor amarelo-ouro. Este precipitado ocorreu principalmente quando dos repiques provenientes das amostras obtidas de numa profundidade superior a 2,0 metros.

A coloração amarelada do meio de cultura nestes frascos após vinte dias de incubação, pode ser visualizada na Figura 39. Observa-se que esta coloração difere do meio de cultura inicialmente incubado, apresentado na Figura 40.

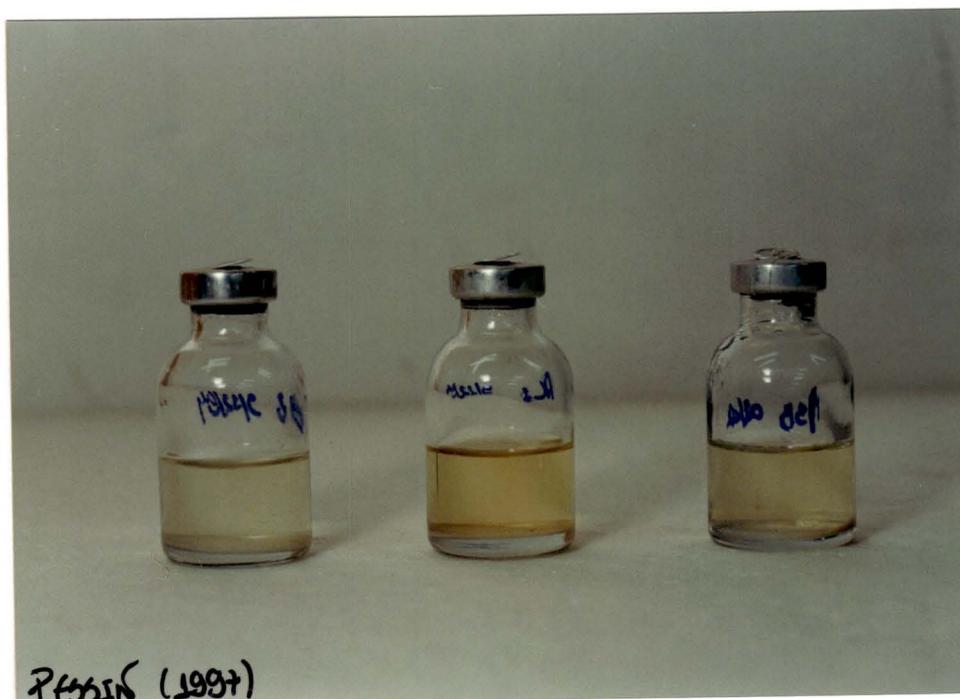


Figura 39 - Cultivos correspondentes a fase de enriquecimento II com inóculo proveniente dos frascos da fase de enriquecimento I a partir de inóculo de resíduo aterrado - meio de cultura adquiriu coloração amarelada após vinte dias de incubação (amostras C2, H4 e D2)

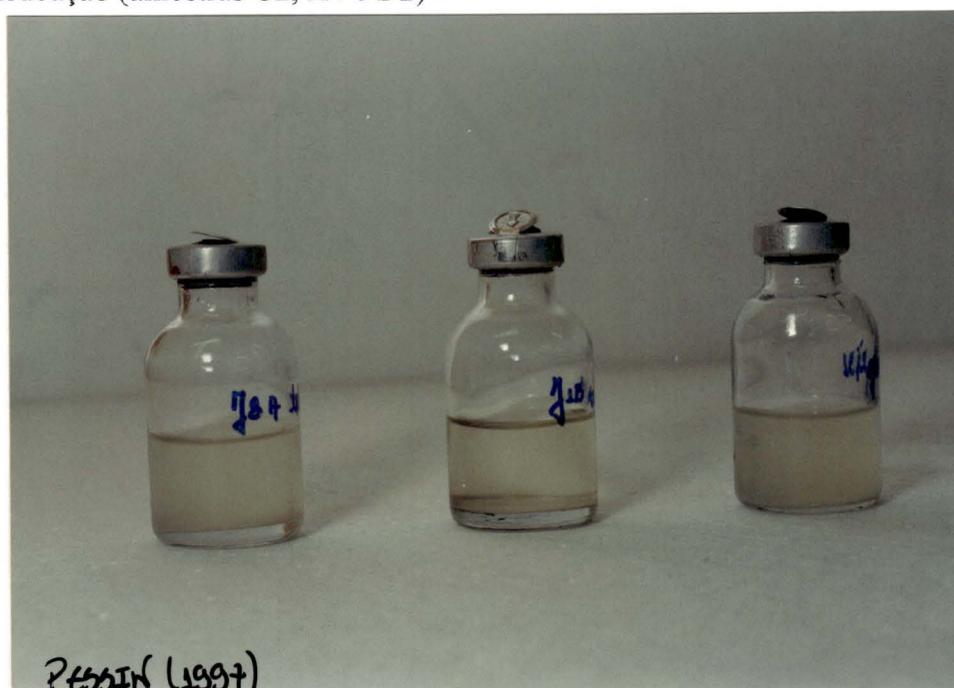


Figura 40 - Frascos correspondentes a fase de enriquecimento II inoculados com amostras dos frascos da fase de enriquecimento I a partir do inóculo de resíduo aterrado - meio de cultura não sofreu mudança de coloração após vinte dias de incubação (amostras A1, B1 e F3)

5.2.3. Ensaios de Isolamento com Inóculo Proveniente de Amostras de Resíduo Aterrado

As culturas líquidas obtidas nos ensaios de enriquecimentos foram submetidas a experimentos, nos quais o objetivo era buscar o isolamento de organismos fúngicos nas amostras estudadas. Para tanto, as culturas foram inoculadas em frascos contendo meio líquido e 0,4 ml de solução estoque de antibióticos, caracterizando o início dos ensaios de isolamento, nos quais foram repicados 20 frascos para cada inóculo estudado. Nesses ensaios, após 30 dias de incubação, visualmente não foi observado consumo da celulose em nenhum dos frascos inoculados, nem tão pouco a mudança de coloração ou turvação do meio de cultura. Nos ensaios de isolamento não foi também observado a deposição de precipitado de coloração amarela no fundo do frasco, bem como, não ocorreu a mudança de coloração do meio para amarelo intenso, conforme observado nos ensaios de enriquecimento, para amostras de resíduo sólido aterrado.

6. DISCUSSÃO

No rúmen, similarmente ao que ocorre num reator anaeróbio aplicado ao tratamento de rejeitos, a alimentação não é constituída de compostos químicos puros, mas por uma mistura heterogênea de materiais, envolvendo não apenas uma única reação, mas várias reações dependentes de uma complexa interação entre populações bacterianas diferentes, nas etapas metabólicas de todo o processo. Muitas informações obtidas no estudo do ecossistema do rúmen, favoreceram a compreensão de outros ecossistemas anaeróbios microbianos, como os biodigestores aplicados ao tratamento de resíduos orgânicos, aterros sanitários, entre outros.

Os estudos sobre a avaliação da microbiota atuante na estabilização dos resíduos dispostos em aterro sanitário apresentam-se escassos, provavelmente devido ao ponto de vista técnico-científico em que a microbiologia ainda é muito pouco considerada como um parâmetro de otimização desses sistemas. Uma vez realizada a disposição, compactação e cobertura dos resíduos em sistemas de aterramento, promove-se condições ambientais propícias para que seja estabelecido um ecossistema que se caracteriza pela evolução de populações microbianas anaeróbias. Muitas informações a respeito do processo de estabilização dos resíduos nestes sistemas foram obtidas a partir do conhecimento do processo de degradação anaeróbia em ecossistemas como o aparelho gastro-intestinal de animais ruminantes.

Nesse sentido, um dos principais objetivos desta dissertação constitui-se na operacionalização de procedimentos e técnicas para enriquecimento e isolamento de fungos a partir de amostras provenientes de ecossistemas anaeróbios contendo elevada porcentagem de material celulósico, como por exemplo, do rúmen. É imprescindível, então, discutirmos os principais aspectos relativos a esta fase, no que se refere aos procedimentos aplicados para enriquecimento e isolamento de fungos anaeróbios a partir de amostras do conteúdo ruminal, e a adequação de tais procedimentos para a execução dos ensaios com amostras de resíduos aterrados solubilizados.

Além disso, através da realização dos ensaios com amostras provenientes do conteúdo ruminal, foi possível obter informações a respeito de tempo de incubação, meio de cultivo, formas de crescimento dos fungos anaeróbios, entre outros, permitindo um diagnóstico preliminar da morfologia predominante de tais organismos. Este aspecto é de relevante importância, no momento em que a grande maioria dos trabalhos consultados na literatura descrevem estruturas de crescimento do ciclo de vida dos fungos anaeróbios obtidas a partir da inoculação de cepas puras destes organismos em meios de isolamento.

As informações levantadas nos ensaios com amostras do conteúdo ruminal, foram essenciais para a execução e monitoramento dos ensaios com amostras de resíduos aterrados, uma vez que a literatura consultada, não faz menção a estudos com fungos anaeróbios provenientes de sistemas de aterramento de resíduos, tão pouco cita a importância de tais organismos na degradação de material celulósico nestes sistemas. Ainda, a respeito dos ensaios realizados a partir de amostras de resíduos aterrados, observa-se que um sistema como Aterro Sanitário de São Giacomo, no qual foram obtidas as amostras descritas, constitui-se de inúmeros microecossistemas com potencial de degradação diferenciado em função dos organismos predominantes. Este fato caracterizou-se como provável interferente na obtenção de amostras representativas do universo de microrganismos atuantes no processo de degradação e estabilização dos resíduos sólidos aterrados.

6.1. Ensaio realizados a partir do inóculo proveniente do conteúdo ruminal de bovino.

Para a realização desta etapa foi necessária a obtenção do conteúdo ruminal de um animal bovino logo após o abate do mesmo. Após a obtenção do conteúdo ruminal, parte foi utilizado para a constituição do inóculo para os ensaios de enriquecimento, e o restante empregado para a obtenção do fluido ruminal centrifugado, o qual foi adicionado aos meios de cultivo. Logo após a coleta deste material, foi executada a observação microscópica das amostras, tendo em vista a avaliação preliminar dos organismos predominantes na mesma.

Desta forma, parte do conteúdo ruminal obtido foi acondicionado em frascos com solução de solubilização para constituição do inóculo propriamente dito. A solução de solubilização anaeróbia teve por finalidade manter as condições do ambiente cuja amostra foi coletada, condições estas intrínsecas ao meio de origem. Pode-se citar o potencial redox (Eh) como um fator ambiental limitante, e que deve ser mantido em caso de coleta, por ser determinante para a sobrevivência da microbiota presente, principalmente no que diz respeito a uma população microbiana anaeróbia mais sensível a mudanças de potencial redox, já que este expressa as condições de oxidação e redução do meio. A faixa de Eh ideal para o desenvolvimento de organismos anaeróbios estritos situa-se entre -100 a -450 mV. Estes valores de Eh são alcançados através da adição de solução redutora de cisteína-sulfeto, que constitui-se num bom agente redutor, e introdução do fluxo de gás carbônico e nitrogênio ao meio de cultura e soluções complementares.

Os ensaios com amostras provenientes do conteúdo ruminal foram conduzidos de maneira que as mesmas fossem primeiramente inoculadas em meios de enriquecimento, e após em meios de isolamento. Os ensaios de enriquecimento constituiram-se de duas fases, ou seja enriquecimento I e II, nos quais as culturas resultantes dos ensaios de enriquecimento I foram utilizadas como inóculo para os ensaios de enriquecimento II. Os cultivos obtidos nos ensaios de enriquecimento II foram inoculados em meio de cultura semi-sólido. Ao longo do tempo de incubação,

as culturas resultantes dos ensaios de enriquecimento e isolamento foram monitoradas através de observações microscópicas periódicas, e foram detectadas algumas estruturas de crescimento que quando comparadas com àquelas apresentadas em literatura, eram semelhantes as formas de crescimento de fungos anaeróbios. Isto demonstra que os métodos empregadas nesta fase apresentaram-se adequadas aos cultivos de fungos anaeróbios, a partir de amostras do conteúdo ruminal de um animal bovino.

6.1.1. Caracterização do inóculo por análises microscópicas

Na Figura 26 foram apresentadas as estruturas celulares arredondadas as quais podem ser comparadas ao que se denomina de esporângios de latência, pertencentes a células eucariotas. Estas estruturas poderiam ser comparadas, ao que se denomina de talos jovens de fungos da Classe Chytridiomycetes, os quais podem ser visualizados e comparados as estruturas apresentadas na Figura 41 (01-02). BAUCHOP (1979), em seus estudos com fungos de rúmen de ovinos e bovinos citou que os esporângios desenvolvidos por tais organismos, atingiram tamanhos de 40 a 90 μm de comprimento. Nos estudos realizados por ORPIN (1975), utilizando fungos de rúmen de bovinos e ovinos, foi relatado que o tamanho dos esporângios observado no conteúdo ruminal de animais "in vivo", atingiu até 35 μm de comprimento. Por outro lado, este autor constatou nas obsevações "in vitro", esporângios com dimensões de 21x9 μm até 74x52 μm .

Além dos esporângios de latência, também foram detectados no inóculo proveniente do conteúdo ruminal, células bacterianas do tipo cocobacilos Gram positivos, semelhantes a anaeróbios estritos do tipo clostrídios. Para BROCK & MADIGAN (1991), a população microbiana típica do aparelho gastro-intestinal de ruminantes é constituída de uma microbiota variada, composta por microrganismos gram-positivos e gram negativos.

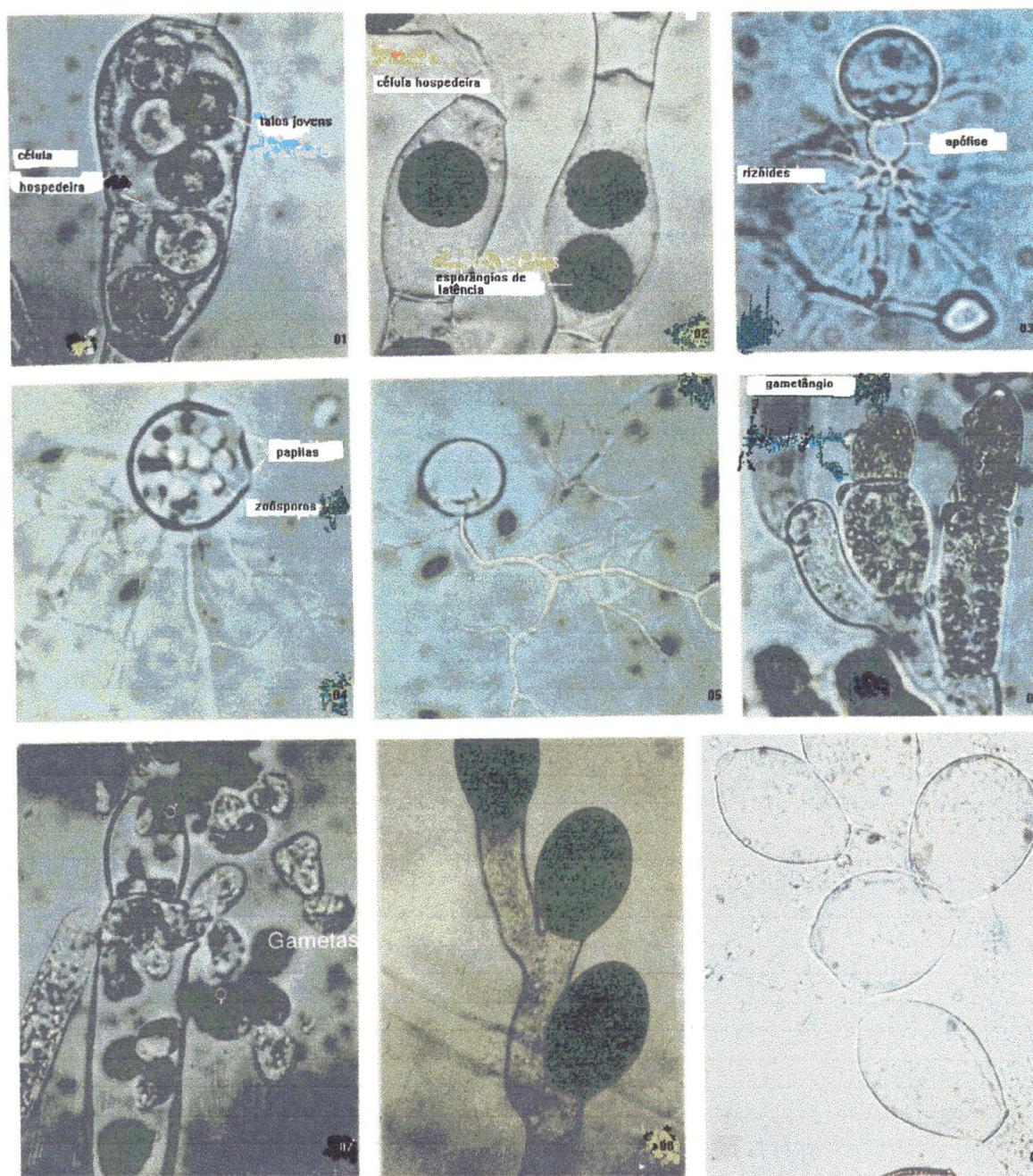


Figura 41 - Estruturas de crescimento e reprodução típicas da classe Chytridiomycetes. 01- talos jovens desenvolvidos em uma célula hospedeira. 02- esporângios de latência. 03- esporângio em formação (apófisis = brotamento). 04- esporângios maduros (contêm zoósporos). 05- talo jovem (apresenta rizóides em desenvolvimento). 06- Gametângio. 07- Gametas móveis. 08- Esporângios de latência. 09- Esporângios em desenvolvimento (zoósporos em estágio de formação). Fonte: HERRERA & ULLOA (1990)

6.1.2. Ensaio de Enriquecimento

O procedimento de inoculação para a fase de enriquecimento I foi realizado a partir das amostras solubilizadas do conteúdo ruminal, após as mesmas permanecerem por um período de 12 horas sob refrigeração, a uma temperatura entre $4 \pm 1^\circ\text{C}$. No entanto, a ocorrência de crescimento fúngico sobre a parede do frasco tipo “soro”, na fase de enriquecimento I, indicou a presença de organismos nas amostras, e que o período de refrigeração, o qual as culturas foram submetidas, não comprometeu o desenvolvimento das mesmas.

Quanto ao procedimento de estocagem de amostras ou culturas microbianas por refrigeração, deve-se salientar que temperaturas inferiores ao ponto ótimo para crescimento microbiano diminuem o ritmo metabólico, no entanto são úteis na manutenção de culturas, já que a maioria dos microrganismos apresentam boa capacidade de sobrevivência sob temperaturas de refrigeração, em torno de 4 e 7 °C. Estas temperaturas são amplamente empregadas na armazenagem de muitas culturas durante longos períodos de tempo, inclusive culturas de microrganismos anaeróbios.

As amostras solubilizadas e estocadas sob refrigeração foram utilizadas como inóculo nos ensaios de enriquecimento. Estes ensaios consideraram as observações de GIAJ-LEVRA (1991), em que a adição de extratos naturais que simulam o habitat microbiano, ou de outros extratos, como por exemplo, de levedura, além de um fonte de substrato específica, caracteriza o meio como de enriquecimento. Além disso, HUNGATE apud GIAJ-LEVRA (1991), estudando bactérias provenientes do rúmen, afirmou que a utilização de meios simuladores do habitat possibilitava a presença de fontes nutricionais para um desenvolvimento microbiano seguro, como por exemplo, em cultivos com extrato de fluido de rúmen, em que as fontes nutricionais provenientes do extrato, permitiam um rápido desenvolvimento de bactérias anaeróbias celulolíticas.

No presente estudo, para os ensaios de enriquecimento, foi adicionado ao meio de cultura 15 % de fluido de rúmen centrifugado, entre outros componentes já descritos. Nos ensaios de enriquecimento, realizados em duas etapas denominadas de enriquecimento I e II, as culturas permaneceram sob um período de incubação de respectivamente, 50 e 20 dias. Cabe observar, que o período de incubação definido na fase de enriquecimento I foi bastante longo, ocorrendo o surgimento de hifas fúngicas somente após 45 dias de incubação. O pH do meio de cultura utilizado para as etapas de enriquecimento I e II foi de 5,0 e 6,0, respectivamente.

Após um período de incubação de 50 dias ocorreu o surgimento de hifas fúngicas em alguns dos frascos monitorados, e as culturas resultantes nesses ensaios da fase de enriquecimento I foram inoculadas em novo meio de cultura dando origem aos cultivos da fase de enriquecimento II. Nos ensaios da fase de enriquecimento II foi possível detectar o crescimento de colônias fúngicas sob a camada de celulose após vinte dias de incubação. O período de incubação constituído de vinte dias obtido na fase de enriquecimento II, quando comparado ao período da fase de enriquecimento I de 50 dias, sofreu uma redução de 30 dias, o que pode estar relacionado com a faixa de valores de pH do meio utilizado nesta fase. Nesta fase, o valor do pH foi ajustado para 6,0, ou seja, mais próximo a faixa de valores tipicamente encontrada no rúmen (HOBSON, 1976; LIN. et. al., 1985), valores estes também verificados nas amostras originais utilizadas neste estudo.

Ainda a respeito do diferencial no período de incubação, observado na fase de enriquecimento I quando comparado ao período de incubação da fase de enriquecimento II, pode-se dizer que este fato reflete uma tendência lógica e até previsível, uma vez que a fase de enriquecimento I teve por função proporcionar o primeiro contato das células microbianas originárias de ecossistemas com as novas condições de crescimento e meios de cultura utilizados. Em função das diferenças das condições de crescimento entre o ecossistema natural e as impostas na fase de enriquecimento I, o primeiro contato das células com os meios de cultura de

enriquecimento constituiu-se numa fase de adaptação, minimizado posteriormente na fase de enriquecimento II.

A variação dos valores de pH nos meios de enriquecimento constitui-se num fator ambiental de influência direta no crescimento de certos grupos microbianos provenientes de um mesmo hábitat. Assim, a inoculação de culturas em pH com valor abaixo da neutralidade, pode constituir-se num procedimento satisfatório na fase de enriquecimento de culturas, quando da necessidade de promover uma seleção no desenvolvimento de microrganismos, como por exemplo, dificultar o crescimento bacteriano. Apesar da grande maioria dos “fungos” apresentarem uma maior resistência as variações de pH em relação as faixas ácidas, desconhece-se a real influência deste fator sobre o crescimento de fungos anaeróbios de rúmen, pois todos os trabalhos realizados com tais organismos fazem referência a meios preparados com pH na faixa de 6,5-7,0 (ORPIN, 1975; BAUCHOP, 1979; JOBLIN, 1981; BARR et al, 1989).

Ainda, a respeito dos ensaios de enriquecimento, é importante salientar que as mesmas estruturas encontradas quando da caracterização microscópica dos inóculos proveniente do conteúdo ruminal apresentadas na Figura 26, também foram detectadas nas culturas obtidas na fase de enriquecimento II, evidenciando-se desta forma, que os procedimentos adotados permitiram o desenvolvimento de estruturas microbianas, supostamente consideradas de organismos fúngicos, nas condições de inoculação e incubação descritas no presente estudo.

Quanto a metodologia empregada neste estudo, a qual constituiu-se de fase de enriquecimento e isolamento das culturas de fungos anaeróbios provenientes do rúmen, ressalta-se que em estudos mencionados na literatura não há descrição de ensaios de enriquecimento para o cultivo destes organismos, nos quais foram utilizados somente meios semi-sólido contituídos por fonte de carbono e valor de pH na faixa da neutralidade, caracterizando-se apenas como meios de cultivo de isolamento.

Neste sentido, as técnicas de solubilização e enriquecimento das amostras utilizados neste estudo com amostras de conteúdo ruminal apresentaram-se eficientes no sentido de que os microrganismos aderidos as partículas de fibra vegetal desprenderam-se para a solução de solubilização, uma vez que foi constatado a presença de estruturas celulares nos meios de cultivos, o que sugeriu o crescimento de organismos fúngicos nas culturas observadas.

6.1.3. Ensaios de Isolamento

Nos ensaios de isolamento, utilizando amostras do conteúdo ruminal bovino, o período de incubação necessário para o aparecimento de colônias fúngicas sobre o ágar, foi de aproximadamente 20 dias. O período de incubação para a observação de crescimento de fungos anaeróbios de rúmen, segundo ORPIN (1975), BAUCHOP (1979), JOBLIN (1981), LOWE et al. (1987) e BARR (1989), foi de, respectivamente, 2, 1, 3, 2 e 5 dias. Diante dos períodos de incubação mencionados em literatura, pode-se afirmar que o período de incubação determinado nesta dissertação apresentou-se bastante longo. LOWE et al. (1987) avaliaram o ciclo de vida de fungos anaeróbios de rúmen e constataram que o desenvolvimento de tais organismos pode ocorrer entre 26 e 32 horas. BARR (1989) obteve zoósporos fúngicos de rúmen provenientes de equinos, em cultivos após um período de até cinco dias de incubação. As diferenças nos períodos de incubação podem estar relacionadas, entre outros fatores, com as cepas de organismos utilizadas nos experimentos desenvolvidos nestes estudos. ORPIN (1976) e BAUCHOP (1979) utilizaram cepas de fungos anaeróbios de rúmen de ovinos e bovinos, JOBLIN (1981) e LOWE et al. (1987), entre outros tantos autores, realizaram experimentos com cepas puras de fungos anaeróbios de rúmen provenientes de ovinos.

A comparação entre os tempos de incubação verificados na literatura (ORPIN, 1976; BAUCHOP, 1979; JOBLIN, 1981; LOWE et al. 1987; BARR, 1989) e os tempos de incubação obtidos neste trabalho, em relação ao desenvolvimento de fungos anaeróbios, deve ser feita considerando as condições de crescimento

empregadas nos experimentos. Quanto à composição do meio de cultivo e demais condições empregadas neste trabalho, observa-se que tanto o meio de enriquecimento, como o meio utilizado para os ensaios de isolamento, foram acrescidos por fontes orgânicas com pó de celulose, além daquelas oriundas do conteúdo ruminal, e provenientes do extrato de levedura, peptona, solução de sais minerais, que após a inoculação, foram incubados a uma temperatura de 39°C, e sem agitação. Ressalta-se no entanto, que no meio de isolamento, além de 0,05% de celulose, foi acrescido 0,05% de glicose, ágar e solução de antibióticos, sendo que o meio após inoculação foi incubado a 39°C. Os meios de cultura utilizados neste estudo foram baseados em ORPIN (1975) e modificados por BAUCHOP (1979) os quais foram preparados segundo técnica descrita por MILLER & WOLIN (1974) e DUBOURGUIER & VAZOLLER (1988).

O extrato de fluido de rúmen vem sendo empregado na composição de meios de cultura como fonte dos requisitos nutricionais para os organismos anaeróbios, já que entende-se que no mesmo estão presentes os produtos decorrentes do processo de fermentação das fibras vegetais, essenciais ao ruminante, bem como equilíbrio metabólico requerido pelos microrganismos atuantes no processo. No presente estudo, para os ensaios com inóculo do conteúdo ruminal, foi adicionado ao meio de cultura tanto na fase de enriquecimento como para a fase de isolamento, 15 % de fluido de rúmen centrifugado, cujo objetivo de utilizá-lo, foi proporcionar algumas condições nutricionais encontradas no ambiente natural dos fungos anaeróbios de rúmen. Esperava-se que as fontes nutricionais provenientes do fluido de rúmen centrifugado permitisse um meio de cultivo no qual os fungos anaeróbios pudessem desenvolver-se com rapidez. Porém, como o período de incubação apresentou-se bastante longo, pode-se dizer que a quantidade de 15% de fluido ruminal centrifugado utilizado na constituição dos meios de cultivo, talvez tenha sido insuficiente para proporcionar condições ideais de crescimento fúngico "in vitro". LOWE et.al. (1987), em seus experimentos, não utilizaram fluido de rúmen centrifugado nos meios de cultivo, adicionando todas as fontes de macro e micro

nutrientes através de compostos de fonte direta, como por exemplo, ácidos graxos, coenzimas, entre outros compostos.

Em relação as condições de crescimento empregadas por ORPIN (1975), BAUCHOP (1979), JOBLIN (1981) e LOWE et. al. (1987) para o estudo dos fungos anaeróbios de rúmen, pode-se destacar que a composição dos meios de culturas basearam-se na adição de extrato de levedura, peptona ou triptona, fontes de carbono como glicose e maltose, e em alguns casos pó de celulose Whatman nº1. Os cultivos líquidos foram realizados em tubos Bellco e o pH ajustado na faixa de 6,5-6,8, e incubados a 39°C, sem agitação. Com exceção de LOWE et. al. (1987), o restante dos autores mencionados, utilizaram de 15 a 40% da composição do meio de fluido de rúmen centrifugado. JOBLIN (1981) não utilizou peptona e extrato de levedura em seus cultivos.

Em relação às condições de crescimento empregadas é interessante ressaltar que as principais diferenças entre os experimentos realizados com fungos anaeróbios, realizados por outros autores, constituem-se na composição dos meios de cultivo, bem como a procedência do material de rúmen estudado. Em sua maioria, os estudos realizados pela literatura citada, os meios de cultivos são constituídos de fluido ruminal centrifugado, e com raras exceções, como no caso dos estudos desenvolvidos por LOWE et al. (1985), nos quais os autores realizaram avaliações do desenvolvimento fúngico através da presença e ausência de peptona e extrato de levedura, com adição de fluido ruminal ao meio. Os experimentos de tais autores demonstraram que existe uma considerável habilidade dos fungos anaeróbios em se desenvolverem em meio que contenha componentes como os mencionados. Neste sentido, ressalta-se que na presente dissertação foi utilizado na composição do meio de cultura peptona e extrato de levedura, não sendo possível afirmar a real influência de tais compostos no desenvolvimento de fungos anaeróbios. Observa-se no entanto, que um fator que pode influenciar diretamente o desenvolvimento dos organismos de rúmen "in vitro", é a composição do próprio fluido ruminal, que segundo LOWE et. al. (1985) pode variar ao longo do dia de alimentação do ruminante em função da

composição da dieta e da microbiota atuante no rúmen, evidenciando que cada animal tem características próprias de digestão da fibra vegetal, o que acarreta em diferenças na composição do fluido ruminal.

Nos ensaios de isolamento realizados no presente trabalho, foi possível obter o desenvolvimento de colônias fúngicas em apenas dois dos frascos contendo meio de cultura semi-sólido acrescido de fluido de rúmen centrifugado. Então, em apenas 7% dos frascos inoculados nos ensaios que caracterizaram o primeiro isolamento foi evidenciado o crescimento de colônias fúngicas sobre o ágar. No entanto, nos demais ensaios de isolamento realizados não foi observado o desenvolvimento de colônias fúngicas, apesar do período de incubação ter correspondido a 50 dias.

Desta forma, as colônias fúngicas obtidas no primeiro ensaio de isolamento foram subcultivadas em meio líquido com glicose e celobiose, sem adição de antibióticos. O acompanhamento microscópico das culturas resultou na detecção das estruturas apresentadas nas Figuras 30 a 34, as quais assemelham-se a esporângios de latência, característicos da classe Chytridiomycetes, de acordo com a figura 41 apresentada por HERRERA & ULLOA (1990). As Figuras 31 e 32 apresentam formas de vida muito semelhantes àquelas descritas por ORPIN (1975), o qual menciona a presença de esporângios, cuja parte basal era em forma quadrada, no fluido ruminal logo após a sua retirada do animal. Já, as estruturas apresentadas nas Figuras 33 e 34 assemelham-se aos esporângios em estágio de desenvolvimento, os quais apresentam um segmento do corpo celular em fase de brotamento, conforme pode ser visualizado na Figura 41 (03 e 04), apresentada anteriormente. Ainda, a respeito das Figuras 33 e 34, pode-se mencionar a semelhança das estruturas observadas com as formas descritas por BARR et al. (1989), ao apresentar o ciclo de vida do fungo anaeróbio *Piromyces communis*. Em seu estudo BARR et al. (1989) descreveu tais formas como estágios imaturos do desenvolvimento endógeno e exógeno dos esporângios. Estes estágios da germinação e desenvolvimento do esporângio ocorrem a partir de um cisto proveniente do zoósporo, no qual no seu interior, ou sobre ele, ocorre a formação de um esporângio.

As culturas obtidas do subcultivo em meio líquido, foram novamente subcultivadas no mesmo meio líquido, e monitoradas por um período de vinte dias. O acompanhamento microscópico de tais culturas resultou na detecção das estruturas apresentadas nas Figuras 35 a 37. Quanto a estrutura apresentada na Figura 35, a mesma pode ser comparada àquelas encontradas quando da análise do fluido ruminal, logo após sua coleta. Estas estruturas detectadas após 02 dias de incubação, foram comparadas aos esporângios em fase de desenvolvimento e esporângios de latência, apresentados por HERRERA & ULLOA (1990) na Figura 41 (01-02), como anteriormente mencionado. A Figura 36 apresenta uma estrutura encontrada no meio de cultura após cinco dias de incubação, a qual se assemelha as formas de vida descritas por ORPIN (1975), em seu estudo com o microrganismo *Neocallimastix frontalis*. A estrutura da Figura 37 indica semelhanças com uma hifa fúngica capaz de desenvolver-se sob condições de anaerobiose estrita, durante investigações sobre morfologia e crescimento de três fungos anaeróbios de rúmen *Neocallimastix sp.*, *Piromyces communis* e *Orpinomyces bovis* (BARR et. al., 1989).

Nos experimentos de enriquecimento e isolamento desenvolvidos no presente trabalho, envolvendo amostras de rúmen de bovino, pode-se dizer que a metodologia empregada procurou manter aquelas condições de crescimento recomendadas pela literatura. Contudo, algumas alterações foram efetuadas em relação a composição dos meios de cultivos citados em literatura. As principais diferenças na composição dos meios de cultivos utilizados, poderiam ser considerados como fatores intervenientes no desenvolvimento dos fungos anaeróbios de rúmen para este estudo, sobretudo, interferindo no tempo de desenvolvimento dos fungos na fase de isolamento dos mesmos.

6.2. Ensaios realizados a partir do inóculo proveniente de amostras de resíduo aterrado

Para realização desta etapa foi necessária a obtenção de um inóculo preparado a partir de resíduos aterrados solubilizados. A coleta de amostras de resíduo sólido aterrado foi efetuada na área de São Giácomo, atual aterro sanitário da cidade de Caxias do Sul-RS. A área de São Giácomo foi impactada pela disposição descontrolada de resíduos sólidos de origem doméstica (50%), industrial (25%), comercial (20%) e de serviços de saúde (15%), totalizando 64.000 m³ de resíduos dispostos no período de 1988 e 1990 (AKUTSU, 1991).

Em 1990, foi assinado um Convênio de Cooperação Técnica entre o Poder Público Municipal e a Universidade de Caxias do Sul, visando conjugar esforços para a implantação de um projeto de remediação da área citada, entendendo-se por remediação, o conjunto de medidas voltadas a minimizar os impactos negativos que uma determinada ação, no caso disposição de resíduos sólidos, pode acarretar ao meio local. Nessa fase, o conjunto de técnicas utilizadas para remediar 1,4 hectares já impactados, compreendeu a co-disposição dos resíduos, já existentes no local, com os resíduos provenientes da coleta diária, sendo os mesmos compactados e cobertos em rampa, com inclinação de talude 1 para 3 (vertical-horizontal), dando início à primeira célula de aterramento denominada de C1. Cabe ressaltar, que na célula C1, não foi realizada a impermeabilização de fundo, em função das dificuldades de remoção de todo o resíduo disposto no local, porém foram implantadas na mesma, sistemas de drenagem de líquidos e gases (ARRUDA, et.al., 1995).

É fundamental observar, que a partir do início das obras na área de São Giácomo, apenas os resíduos de origem domiciliar foram dispostos neste local. Assim, em caráter emergencial, a implantação da célula C1 teve duas funções: a de remediar a área impactada e a de tratar os resíduos sólidos domésticos gerados diariamente pela população da Caxias do Sul. Na fase II-definitiva, a disposição dos

resíduos em células de aterramento C3 e C4 foi feita segundo os critérios técnicos estabelecidos nas normas brasileiras para aterro sanitário (NBR-8419,1984).

Então, as amostras de resíduos sólidos aterrados, utilizadas nesta etapa do presente trabalho, foram coletadas na célula C3 do Aterro Sanitário de São Giácomo. Como já mencionado, a célula C3 foi implantada segundo normas técnicas para construção de aterro sanitário (NBR-8419, 1984), com dimensões de 9.500 m² de área total, na qual foram dispostos aproximadamente 127.500 toneladas de resíduos de origem domiciliar no período de 1992 a novembro de 1994. No entanto, sabe-se que para a realização de uma avaliação da microbiota anaeróbia de um ecossistema desta magnitude, necessita-se de uma metodologia com rotinas pré-estabelecidas, e que possam ser consideradas eficientes para os objetivos em questão, bem como de procedimentos também previamente estabelecidos, os quais possam resultar na coleta de amostras representativas do sistema em estudo.

Para tanto, é importante considerar que a coleta de resíduos sólidos aterrados, em função das inúmeras dificuldades ocorridas quando da utilização do trado mecanizado, constituiu-se numa etapa de poucos resultados positivos, porém não definitivos. Até o presente momento, o trado mecanizado constitui-se no único dispositivo para a coleta de resíduos aterrados, apresentando porém limitações em função da própria constituição do material aterrado, o que foi crucial para o tipo de amostragem realizada neste trabalho. As dificuldades encontradas no emprego deste equipamento estão associadas a heterogeneidade da composição dos resíduos aterrados, o que contribue consideravelmente para o questionamento da representatividade das amostras coletadas e utilizadas no presente trabalho. Tais problemas e limitações relacionadas a etapa de coleta das amostras, poderiam ter influenciado na obtenção de culturas de fungos anaeróbios nos ensaios de enriquecimento inoculados com amostras de resíduo aterrado solubilizado.

Neste sentido, a discussão dos resultados obtidos nesta fase do trabalho está apresentada segundo a sequência de etapas desenvolvidas ao longo do tempo. Nessa

sequência, serão discutidos os resultados e observações obtidas a partir da coleta de amostras, caracterização físico-química das amostras e ensaios de enriquecimento a partir de amostras de resíduos aterrados coletados no aterro sanitário de São Giácomo da cidade de Caxias do Sul-RS. Como não foi constatado o crescimento fúngico nos ensaios de enriquecimento, não foram realizados ensaios de isolamento nesta etapa do trabalho, conforme realizado na fase anterior de ensaios com inóculo proveniente do conteúdo ruminal.

6.2.1. Caracterização físico-química de amostras coletadas

A coleta de resíduos sólidos aterrados foi realizada no aterro sanitário através da utilização de um trado mecanizado. O Aterro Sanitário de São Giácomo era composto de diferentes cotas de aterramento, sendo que cada cota era constituída de quatro metros de altura/profundidade, nas quais eram confinados os resíduos compactados ao longo do tempo de disposição. A realização de amostragens até quatro metros de profundidade através de perfuração com trado mecanizado constitui-se na abertura da massa de resíduos na vertical, com um diâmetro de aproximadamente de 18 cm. Foi observado que a perfuração da massa aterrada, por muitas vezes, tornou-se impraticável devido a limitação do próprio equipamento em cortar alguns materiais aterrados, como por exemplo, latas de maior tamanho, pedaços de borracha e pedras, provenientes do material de cobertura utilizado. Além disso, uma outra dificuldade constituiu-se pela retirada do material confinado na concha coletora do trado que era realizada a cada 30 cm de perfuração na massa aterrada. A dificuldade na retirada do material foi em consequência do pequeno diâmetro da concha, além da constituição do próprio material que, após aterrado e compactado, apresentava características peculiares as quais dificultaram a coleta através deste equipamento.

Após a obtenção das amostras de resíduo aterrado no local mencionado, foi realizada a caracterização das amostras utilizadas como inóculo neste estudo. O

procedimento de caracterização das amostras de resíduos aterrados deu-se através da determinação de teor de umidade, sólidos voláteis, pH, concentração de metais a partir do teste de lixiviação (prata, arsênio, bário, cádmio, cromo, chumbo, selênio, mercúrio) e teste de solubilização (alumínio, prata, arsênio, bário, cádmio, cromo, ferro, zinco, cobre, manganês, chumbo, selênio e mercúrio). A determinação de tais parâmetros teve por objetivo verificar possíveis interferências no desenvolvimento microbiano, principalmente no que diz respeito a presença de substâncias inibitórias do crescimento celular, além de obter algumas informações a respeito do processo de degradação dos resíduos aterrados.

Quanto aos valores correspondentes ao teor de umidade determinados nas amostras coletadas neste estudo, foram entre 29,0 a 46,6%, sendo que a média entre os valores determinados foi de 36,5%, com um desvio padrão de 7,3. Através dos dados obtidos pode-se notar uma variação dos valores, mesmo naquelas amostras de procedência do mesmo ponto de amostragem. Nas amostras de resíduo aterrado coletadas para o desenvolvimento do presente trabalho foram detectados valores de umidade abaixo dos valores médios de umidade observados por GOMES (1989), quando monitorou dois aterros experimentais na cidade de São Carlos-SP, em relação a alguns parâmetros de degradabilidade dos resíduos. Estes aterros experimentais apresentaram uma média anual de teor de umidade em torno 46,9 %, valor considerado satisfatório pelo autor.

Os valores de umidade obtidos nas amostras coletadas apresentaram uma média abaixo da faixa de 40%, o que representa uma porcentagem relativamente baixa quando comparadas aos teores de umidade da grande maioria dos habitats que contém uma elevada quantidade de material celulósico a ser degradado por ação microbiana. Ressalta-se que a determinação do teor de umidade, material volátil e não volátil para as amostras coletadas, auxiliaram como parâmetros indicadores da presença de microrganismos no meio. O ecossistema em estudo, caracterizou-se por apresentar algumas condições adversas para o crescimento de microrganismos, e os indicativos citados podem demonstrar uma tendência da disponibilidade de substrato

de fácil assimilação pela maioria dos microorganismos, bem como das condições de umidade, parâmetro indispensável para a sobrevivência dos organismos. Para LENINGHER (1988), a disponibilidade de água num ambiente pode constituir-se num fator limitante, já que a água possibilita o transporte de inúmeros compostos, entre os quais das enzimas indispensáveis nos processos hidrolíticos de degradação de compostos orgânicos. Os organismos dependem fundamentalmente do meio aquoso para obter os substratos necessários para o seu desenvolvimento.

No caso do presente trabalho, outro parâmetro importante, o teor de sólidos voláteis, o qual representa o conteúdo de matéria orgânica de fácil degradação, foram detectados, nas dez amostras coletadas, valores do teor de sólidos voláteis de 5,23 a 17,34%. A média entre os valores foi de 12,3 com desvio padrão de 4,44, o que demonstra diferenças acentuadas do teor de sólidos voláteis determinados a partir das amostras obtidas. Deve-se, contudo, considerar o tempo de aterramento dos resíduos coletados, o qual variou entre cinco e nove meses. MOUTON et al. apud VILLAS BÔAS (1991) avaliou um sistema de disposição de resíduos na cidade de Fretin (França), e concluíram que o sistema, com cerca de 10 anos de idade, apresentava apenas 15 a 20 % de matéria orgânica a ser decomposta.

As amostras coletadas caracterizaram-se por tempos de aterramento distintos, os quais variaram entre 5 a 9 meses, porém bastante próximos a nível de tempo de degradação. A média dos valores de sólidos voláteis obtida nas amostras com menor tempo de aterramento, ou seja cinco meses, foi de 12,2 % e desvio padrão de 3,59, porém não foi o valor mais elevado de sólidos voláteis detectado, como era o esperado, já que a relação tempo de disposição e teor de sólidos voláteis tende a ser inversamente proporcional. Nas amostras com tempo de aterramento de sete meses a média obtida foi de 11,7% com desvio padrão de 5,9, e com nove meses de 14,3% de sólidos voláteis com desvio padrão de 1,35. Por outro lado, se analisarmos a relação sólidos voláteis e profundidade das amostras, observa-se que nas profundidades de até um, dois e três metros, o teor de sólidos voláteis correspondente foi de 13,2, 11,2 e 13,1%. Os dados obtidos apresentam uma certa uniformidade, não demonstrando

uma variação significativa entre o teor de sólidos voláteis e a profundidade de amostragem. Normalmente, a relação do teor de sólidos voláteis e profundidade correspondente a amostragem, indica que a degradação de compostos orgânicos em aterros se acentuam em condições de anaerobiose, pois quanto maior a profundidade de aterramento do resíduo, menor o percentual de matéria orgânica presente.

Diariamente eram dispostos aproximadamente 150,0 toneladas de resíduos sólidos domésticos na célula C3 do Aterro Sanitário de São Giácomo, dos quais 50% caracterizam-se como matéria orgânica de fácil degradação (PESSIN et al., 1991). Considerando que as amostras de resíduos sólidos aterrados apresentaram um percentual de material volátil em torno de 13%, e que os resíduos com tempo zero de aterramento apresentaram um percentual médio em torno de 60% de material volátil, pode-se concluir que os processos de degradação biológica não foram inibidos, e que havia uma microbiota atuante e adaptada ao sistema.

O percentual de papel/papelão encontrado nas amostras coletadas foi de 4,5 a 22 % em base úmida. Entretanto, a massa de resíduo gerado no município de Caxias do Sul caracterizou-se por conter aproximadamente 21% de papel/papelão (PESSIN et al., 1991), sugerindo que em alguns pontos da célula C3, o percentual de material celulósico, principalmente nas amostras com sete meses de aterramento, ficou próximo ao percentual correspondente ao tempo zero de disposição dos mesmos. Este fato indicou uma inibição dos processos degradativos de matérias celulósicas dispostos no aterro sanitário de São Giácomo. Por outro lado, nas amostras coletadas em profundidades de dois a três metros, foram detectados percentuais de papel/papelão inferiores a 14%.

Os valores de pH das amostras coletadas variaram de 5,33 a 7,20, sendo que os mesmos foram obtidos quando da solubilização do resíduo em água deionizada no teste de lixiviação dos mesmos. Porém, na coleta número quatro, cujo tempo de aterramento dos resíduos foi de cinco meses, foram detectados os valores mais baixos de pH em relação as demais amostras. Nota-se que estas amostras

apresentaram pH na faixa de 5,33 a 5,49, ou seja, levemente ácido, o que poderia conferir condições inadequadas ao desenvolvimento de grupos bacterianos. Cabe ressaltar, que tais grupos apresentam maior sensibilidade às mudanças de pH do meio, e que desenvolvem-se adequadamente em valores de pH próximos a neutralidade.

Além dos fatores acima citados, e que são fundamentais na avaliação do presença de grupos microbianos com potencial atividade degradativa sobre os resíduos dispostos no sistema, deve-se considerar também a concentração de alguns metais pesados detectados nos inóculos, e que poderiam interferir no desenvolvimento de uma gama de microrganismos importantes ao processo de degradação dos resíduos. Dentre estes, podemos citar o bário, cádmio, cromo, e chumbo que foram detectados em todas as amostras estudadas a partir do teste de lixiviação, em concentrações médias de 0,259 mg/L de bário, 0,0009 mg/L de cádmio, 0,022 mg/L de cromo e 0,052 mg/L de chumbo. A partir do teste de solubilização podemos citar o bário, cádmio, cromo, ferro, zinco, cobre e chumbo que foram detectados em concentrações médias de 0,147 mg/L de bário, 0,0005 mg/L de cádmio, 0,0136 mg/L de cromo, 3,589 mg/L de ferro, 0,219 mg/L de zinco, 0,032 mg/L de cobre e 0,029 mg/L de chumbo.

As concentrações de metais detectadas nestes ensaios, podem ser consideradas baixas quando relacionadas a possível inibição do metabolismo microbiano do processo de digestão anaeróbia. A relação entre a concentração de metais e a inibição do processo de digestão anaeróbia de lodo de esgoto foi avaliado por MOSEY & HUGHES (1975), através da utilização de reatores de bancada. Neste estudo foram detectadas concentrações de metais com influência inibitória sobre o processo de digestão anaeróbia a partir de 200mg/L de zinco, 250 mg/l de cádmio, 150 mg/l de cobre, 500 mg/L de cromo e 2.000mg/l de ferro.

Os resíduos sólidos urbanos gerados no âmbito domiciliar ou comercial, caracterizam-se por uma massa heterogênea contendo uma grande variedade de

compostos que podem conduzir a queima, corrosão, óxido-redução ou toxicidade no meio. São exemplos destes tintas, solventes, pigmentos, vernizes, pesticidas, inseticidas, repelentes, herbicidas, óleos lubrificantes, fluidos de freio e transmissão, baterias, pilhas, lâmpadas fluorescentes, frascos de aerossóis em geral, entre outros. As pilhas e lâmpadas fluorescentes são classificadas como resíduos perigosos por terem metais pesados em sua constituição, e os frascos de aerossóis não por sua embalagem, mas sim pelo resto de substâncias químicas que essas contêm quando descartados. Ambos os materiais podem contaminar a massa de resíduos e o meio ambiente no qual são depositados, migrando para as águas superficiais e ou subterrâneas (JARDIM et al., 1995). Por isso, a determinação da concentração de metais em amostras de resíduos aterrados utilizados como objeto de estudos em microbiologia faz-se necessária e indispensável tendo em vista a presença de possíveis interferentes no crescimento microbiano de interesse.

A partir das observações realizadas, deve-se supor que a presença de metais pesados nas amostras estudadas, constituiu-se um fator de interferência na atuação dos microrganismos, em função do efeito tóxico dos metais sobre o crescimento dos mesmos. Além disso, os baixos teores de umidade também caracterizam-se como um fator ambiental que tem influência no desempenho dos microrganismos celulolíticos em relação às taxas de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos. A hidrólise da celulose sob condições de anaerobiose pode ser considerada como o passo limitante no tratamento biológico de resíduos, uma vez que depende de uma série de fatores, incluindo qualidade e quantidade de substrato, enzimas microbianas e suas interações, condições físicas e químicas de fermentação.

Neste sentido pode-se dizer que os fatores ambientais abióticos tais como temperatura, potencial hidrogeniônico, potencial de oxi-redução, teor de umidade, compostos orgânicos e inorgânicos, entre outros fatores podem exercer influência no número e composição da microbiota em cada habitat em particular, principalmente em relação aos ecossistemas anaeróbios (BROCK & MADIGAN, 1991). A determinação da influência de tais fatores é de difícil detecção em função da

interação entre os mesmos, o que pode acarretar na formação de microecossistemas, em que os organismos predominantes possuem capacidade de tolerância a oscilações de alguns fatores ambientais.

6.2.2. Ensaios de Enriquecimento

As amostras de resíduo aterrado coletadas foram acondicionadas em frascos tipo “soro” contendo solução de solubilização. Após serem solubilizadas, as amostras permaneceram 24 horas sob refrigeração a uma temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$. As amostras solubilizadas e estocadas sob refrigeração foram utilizadas como inóculo nos ensaios de enriquecimento. Observa-se no entanto, que o procedimento de estocagem dos inóculos pode interferir no ritmo metabólico dos microrganismos, mas, nesse estudo foram úteis para a manutenção das culturas microbianas presentes nas amostras. A solução de solubilização anaeróbia utilizada para o preparo dos inóculos foi a mesma empregada no preparo do inóculo a partir de amostras provenientes do conteúdo ruminal, a qual teve por finalidade manter as condições do ambiente de procedência da amostra. Ao todo foram 10 amostras coletadas, as quais deram origem a 10 diferentes inóculos que foram enriquecidos separadamente.

As amostras coletadas na amostragem 01 foram solubilizadas com solução de solubilização e chorume coletado no Aterro Sanitário de São Giácomo. Porém, em função de informações obtidas nos últimos estudos realizados com o intuito de esclarecer a influência da recirculação de chorume para o interior da célula de aterramento, não foi adicionado chorume para a solubilização das demais amostras obtidas. Não é recomendada a solubilização de amostras para fins de estudos microbiológicos com o líquido percolado (chorume), visto que alguns autores não descartam o efeito tóxico inibitório promovido pela adição de chorume não tratado sobre o processo de decomposição anaeróbia de resíduos sólidos domésticos (TEIXEIRA,1994).

Nos ensaios desenvolvidos na fase de enriquecimento I, os inóculos foram cultivados em meio líquido, e após um período de incubação de aproximadamente 10 dias foi observado a formação de bolhas de gases no interior dos frascos, e forte cheiro no interior da estufa de incubação. As bolhas de gases foram observadas principalmente nos cultivos denominados de F3, G3, H4 e J4, correspondentes as amostras provenientes respectivamente, de 1,0, 2,6, 1,0 e 3,2 metros de profundidade. Além disso, ainda nestes cultivos correspondentes a fase de enriquecimento I, deve-se ressaltar que após 30 dias de incubação todos os frascos, sem exceção, apresentaram uma mudança de coloração do meio, os quais permaneceram com coloração escura por um período de aproximadamente cinco dias, com deposição de grânulos pretos no final do período. A deposição destes grânulos escuros dificultou a visualização da possível formação de hifas, bem como do consumo de celulose ao longo do tempo de incubação. Nos cultivos denominados de E3, após cinco dias de incubação, o meio adquiriu a coloração rósea, o que nas condições de preparo de meio é um indicativo da perda das condições de anaerobiose do meio de cultura. Autores, como WIDDEL (1988), atribuíram à coloração escura em cultivos anaeróbios, a presença do produto metabólico consequente do desenvolvimento de bactérias redutoras do íon sulfato no meio. No entanto, muitas reações químicas provocam alteração na coloração do meio, particularmente as que envolvem enzimas de origem biológica e seus substratos.

Muitas células microbianas apresentam transformações complexas na estrutura celular como consequência de alterações adversas nas condições ambientais. Nem todos os microrganismos respondem igualmente frente às mudanças de fatores ambientais principalmente no que diz respeito a formação de esporos ou esporulação de resistência. Por exemplo, em meios de cultivos em que a fonte energética e nutrientes essenciais necessários ao crescimento microbiano tornam-se escassos, ou sofrem a exaustão completa, o crescimento exponencial é interrompido, e existe a tendência de ocorrer a esporulação das bactérias presentes no meio (BROCK & MADIGAN, 1991).

Nos cultivos correspondentes a fase de enriquecimento II, não foi detectado em nenhum momento a mudança de coloração escura do meio, nem tão pouco a formação de tais grânulos. No entanto, nesta fase foi detectada naqueles frascos inoculados com amostras provenientes de profundidades acima de 2,0 metros um coloração amarelada sobre a celulose depositada no frasco. Esta coloração amarelada caracteriza-se como uma atividade celulolítica intensa de origem bacteriana. Diante disto, pode-se dizer que nas profundidades maiores de 2,0 metros ocorria uma provável microbiota anaeróbia com capacidade celulolítica, e apta ao crescimento nas condições descritas. A atividade celulolítica bacteriana foi citada por TEATHER & WOOD (1982) em culturas líquidas, caracterizadas pela presença de precipitado amarelo-ouro sobre o substrato celulósico. COLBERG (1986) também mencionou a ocorrência de um precipitado amarelado em cultivos de isolamento de um anaeróbio obrigatório celulolítico, o gênero *Clostridium* sp. Além disso, deve-se destacar que esta atividade bacteriana não foi constatada nos ensaios de isolamento, nos quais foi adicionado solução de antibióticos, fato confirmatório da presença de uma população bacteriana celulolítica anaeróbia.

Quanto a concentração de celulose utilizada nos ensaios de enriquecimento II, deve-se observar que a porcentagem nos meios de culturas variaram de 1 a 2%, verificando-se um rápido consumo naqueles frascos inoculados com 1% nas amostras denominadas de A1 e B1, as quais corresponderam a um tempo médio de aterramento de 7 meses, e profundidade de 1 a 2 metros.

Nos ensaios de ambas as fases de enriquecimento I e II não foi detectado crescimento fúngico nas condições empregadas. Contudo, isto não pode ser interpretado como a inexistência de tais organismos no aterro sanitário estudado, considerando é claro, os inúmeros fatores intervenientes inerentes ao processo de digestão anaeróbia em sistemas tecnológicos, como o apresentado. Também é necessário considerar as limitações metodológicas, como o número de amostras e a heterogeneidade das mesmas, fatos que possivelmente dificultaram as práticas de solubilização e isolamento da microbiota presente.

Apesar de alguns trabalhos descritos em literatura (ORPIN, 1976; BAUCHOP, 1979; JOBLIN, 1981) apresentarem metodologias para o isolamento de fungos anaeróbios a partir de amostras do conteúdo ruminal de bovinos, ovinos e equinos, no presente estudo também foram realizados ensaios visando adaptar tais métodos para obter informações relacionadas ao desenvolvimento de tais organismos a partir de amostras provenientes do rúmen de bovino e de amostras de resíduos aterrados provenientes de aterro sanitário.

As maiores dificuldades relacionadas a execução deste trabalho foram referentes a fase que compreendeu o enriquecimento de amostras de resíduos aterrados em função da adaptação de métodos e técnicas aplicados para a obtenção de amostras em um sistema como aterro sanitário, principalmente no que diz respeito às características de homogeneidade da amostra/inóculo proveniente da mesma. Devido a escassez de metodologias aplicáveis no que tange ao isolamento de fungos anaeróbios provenientes de amostras de resíduos aterrados, buscando-se avaliação adaptação e aplicação de técnicas de enriquecimento, isolamento e manipulação para culturas microbinas descritas em sistemas anaeróbios estritos como o rúmen.

Em função das observações realizadas sugere-se para os próximos trabalhos, que os inóculos sejam constituídos de resíduos com tempo de aterramento menor que cinco meses, tendo em vista que os menores tempos de aterramento poderiam apresentar maior potencial microbiológico aderido ao material em decomposição, principalmente de eucariotos. A partícula de resíduo configura-se como um microecossistema que sustenta uma microbiota própria, razão pela qual deve-se dar condições ao despreendimento dos microrganismos aderidos ao resíduo, e inoculação desses no meio de interesse. Esta preocupação é relevante, tendo em vista a heterogeneidade do ecossistema, inerente a composição dos resíduos sólidos aterrados. Segundo VILLAS-BÔAS (1990), há uma tendência dos microrganismos de se fixarem em superfícies sólidas para desenvolverem-se, o que faz com que haja a possibilidade de adesão de microrganismos no resíduo sólido, por exemplo.

Diante disto, e já que o chorume produzido em sistema de aterramento, é consequência da solubilização dos resíduos sólidos pela atividade microbiana no interior da célula de aterramento, recomenda-se, também, a realização de ensaios de enriquecimento com o líquido percolado do aterro como inóculo, tendo em vista que um material desta natureza não apresentaria problemas, no que tange as técnicas de solubilização e inoculação das amostras em meio semi-sólido, utilizando a metodologia adaptada e descrita nesse trabalho de investigação.

De acordo com VAZOLLER (1988), a necessidade de avaliar mais adequadamente a atividade e quantidade de biomassa em sistemas anaeróbios tem estimulado a pesquisadores em várias partes do mundo a desenvolver metodologias mais eficazes e rápidas para obtenção de culturas importantes aos sistemas de degradação anaeróbia. Por exemplo, a utilização de microrganismos de rúmen em processos de digestão anaeróbia, aplicados ao tratamento de resíduos lignocelulósicos, resulta numa decomposição anaeróbia eficiente desses resíduos.

6.3. Importância do presente trabalho para a microbiologia e saneamento ambiental

O tratamento de águas residuárias e resíduos sólidos pela ação de microrganismos resulta na estabilização dos compostos orgânicos poluentes e emprega reatores (biorreatores) com diferentes configurações, constituindo verdadeiros ecossistemas microbianos. O principal produto dos processos biológicos de tratamento de rejeitos é a despoluição ambiental. Assim pode-se denominar por Biotecnologia Ambiental os métodos que utilizam microrganismos, ou que conduzam ao desenvolvimento de microrganismos em um meio, cuja finalidade é a obtenção de um produto que propicie benefícios ao homem em seu ambiente. Assim, a biotecnologia no saneamento ambiental corresponde as aplicações da tecnologia sanitária apropriadas para a otimização da qualidade ambiental principalmente em relação aos recursos hídricos, solos e ar. Atualmente, as soluções para os problemas

ambientais podem ser encontradas além do vantajoso uso dos biorreatores, ou ainda como é o caso da aplicação “in situ” de microrganismos especializados na degradação e ou transformação de substâncias químicas sintéticas tóxicas encontradas nos solos pela disposição de materiais poluentes ou aquíferos contaminados pela percolação de poluentes (VAZOLLER, 1996).

Os objetivos preconizados apresentados nesta dissertação, consistiam inicialmente em isolar fungos anaeróbios presentes em amostras de rúmen, e após aplicar a metodologia testada em amostras provenientes de sistemas de aterramento de resíduos sólidos. A aplicação da metodologia em amostras provenientes do rúmen de bovino permitiu esclarecer algumas dúvidas das técnicas e procedimentos a serem adotados, bem como conhecer alguns aspectos relacionados aos organismos de interesse, já que as amostras de rúmen apresentam-se mais homogêneas e representativas do sistema em questão, quando comparadas com amostras obtidas de um sistema de aterramento de resíduos sólidos.

A implantação de um sistema de aterro sanitário permite o estabelecimento de uma microbiota predominantemente anaeróbia atuante na degradação dos resíduos dispostos. Esta microbiota é composta por inúmeras espécies microbianas cuja atividade específica e conjunta de cada grupo propicia a degradação dos resíduos aterrados. Entretanto o estudo microbiano de grupos isolados nestes sistemas parecem apresentar dificuldades, em função da presença de várias e diferentes espécies microbianas em cada tipo e fase do processo.

Conforme literatura consultada (ORPIN & LETCHER, 1979; CHENG, 1990; LI & CALZA, 1991; CHENG et al., 1994; McSWEENEY et al., 1994) fungos anaeróbios tais como o organismo *Neocallimastix frontalis*, possuem um grande potencial na degradação da fibra vegetal no sistema gastro-intestinal de ruminantes, comparável e até superior aos fungos aeróbios tradicionalmente utilizados para a otimização da degradação de materiais lignocelulósicos, porém em sistemas de

aterramento de resíduos nada se sabe a respeito da presença de organismos fúngicos anaeróbios.

Nas condições empregadas neste estudo, foi possível a identificação de estruturas de crescimento de fungos anaeróbios a partir de ensaios de enriquecimento com amostras provenientes do conteúdo ruminal, verificando-se assim a possibilidade metodológica de viabilizar o desenvolvimento de tais organismos através de práticas experimentais aplicadas ao estudo de fungos em sistemas de digestão anaeróbia, como os aterros sanitários. Uma vez que tais organismos desempenham um papel fundamental na degradação da celulose no ecossistema ruminal, torna-se imprescindível que outros estudos possam ser desenvolvidos para avaliação do potencial de degradação de fungos anaeróbios, bem como da presença destes em sistemas de aterramento, focalizando-se detalhadamente as condições desse habitat anaeróbio.

Os procedimentos metodológicos aplicados para o estudo de microrganismos provenientes das amostras de resíduo aterrado solubilizado foram baseadas nos ensaios realizados com amostras do conteúdo ruminal de bovino. O rúmen constitui-se num sistema homogêneo, e as obtidas a partir do rúmen de bovino neste estudo apresentaram-se bem representativas do sistema de origem, quando comparadas as amostras de resíduos aterrados. Um sistema de aterramento de resíduos constitui-se num ecossistema complexo, o qual é formado por inúmeros microecossistemas com potencial de degradação diferentes em função dos microrganismos predominantes. A obtenção de amostras representativas em aterros sanitários constituem-se numa fase problemática, a qual está relacionada principalmente ao local a ser amostrado, ao tipo de equipamento utilizado durante a amostragem e a determinação segura das condições simuladas do aterro em quebra nos ensaios de laboratório. Outras interferências, anteriormente comentadas, podem ter inviabilizado os enriquecimentos fúngicos, mas devem ser melhor estabelecidas.

7. CONCLUSÕES

Este trabalho foi realizado com o intuito de estabelecer procedimentos metodológicos para o isolamento de fungos anaeróbios a partir de ensaios com amostras enriquecidas provenientes do conteúdo ruminal, para posterior aplicação dos mesmos procedimentos com amostras de resíduos aterrados solubilizados. Neste sentido é imprescindível ressaltar que:

1. Através dos ensaios realizados com amostras provenientes do conteúdo ruminal de bovino foi possível determinar, nas condições empregadas neste estudo, que o tempo de incubação necessário para o desenvolvimento de fungos anaeróbios foi superior àqueles descritos em literatura.
- 2- Nos ensaios de enriquecimento com amostras provenientes do conteúdo ruminal, as culturas foram incubadas por um período de 20 a 50 dias, e nos ensaios de isolamentos as culturas permaneceram incubadas por 20 dias, aproximadamente.
- 3- Os procedimentos metodológicos aplicados no presente trabalho apresentaram-se eficientes para os objetivos propostos, uma vez que foi detectado o desenvolvimento de fungos anaeróbios nos ensaios de enriquecimento e isolamento com amostras provenientes do rúmen de bovino, utilizando-se meios com antibiótico. Nestes

ensaios, foram detectadas estruturas de crescimento de fungos anaeróbios semelhantes ao gênero *Neocallismatix sp* apresentado na literatura consultada.

4- Os cultivos de enriquecimento preparados a partir resíduos sólidos aterrados em solução de solubilização sob condições de anaerobiose, foram monitorados diariamente por um período de incubação de 50 dias. Nos cultivos de enriquecimento com amostras de resíduos aterrados solubilizados não foi detectado o desenvolvimento de fungos anaeróbios. Porém, isto não pode ser interpretado como a inexistência de tais organismos no aterros sanitário estudado, tendo em vista o pequeno número de amostras utilizadas, como também a diversidade do ecossistema em questão.

5- As dificuldades relativas a não detecção de crescimento fúngico nas amostras de resíduos sólido estudadas podem estar relacionadas a inúmeras interferências entre as quais a presença de substâncias tóxicas, como metais, grau de umidade, tempo de aterramento das amostras, bem como equipamento utilizado para amostragem e número de amostras estudadas. Além disso, é provável que fatores desconhecidos do ecossistema aterro sanitário possam ter sido negligenciados durante os ensaios de enriquecimento das culturas provenientes das amostras de resíduo sólido aterrado.

8. RECOMENDAÇÕES

1- Considerando a importância de intensificar estudos na área de microbiologia ambiental, recomenda-se a viabilização de estudos com amostras procedentes do sistema de aterramento utilizado nesta dissertação, com vistas a ampliar o número de amostras a serem avaliadas.

2- Sugere-se que em estudos posteriores, os ensaios de enriquecimento e isolamento de fungos anaeróbios com inóculo preparado a partir de resíduos aterrados solubilizados, sejam realizados paralelamente aos ensaios de enriquecimento e isolamento a partir de inóculo constituído de chorume gerado no mesmo aterro sanitário, no qual serão obtidas as amostras sólidas. Isto por que, aqueles microrganismos que apresentam uma tendência de se fixar às superfícies sólidas de um material em decomposição, geralmente estão presentes na fase líquida decorrente da degradação dos mesmos.

3- Recomenda-se a viabilização de estudos com fungos anaeróbios a partir de amostras oriundas de sistemas de digestão anaeróbia controlada em reatores para avaliação do papel desempenhado por tais organismos na degradação anaeróbia de resíduos celulósico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, G.C. et al. *The Fungi - An Advanced Treatise.- The Fungal Organisms*. Vol. IVb Academic Press, New York , 1973.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. *Introductory Micology*. Third Edition. John Wiley & Sons. Inc., 632 p.1979.

AKIN, D.E.; GORDON, G.L.R. & HOGAN, J.P. Rumem bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 46, p. 739-748, 1983.

AKIN, D.E. Interaction of ruminal bacteria and fungi with southern forages. *Journal Animal Science.*, v. 63, p. 962-977, 1986.

AKUTSU, J. Processos de remediação de áreas degradadas pela disposição de resíduos sólidos - aplicação para o caso de Caxias do Sul. IN: MANDELLI, S.M.De C. Tratamento de Resíduos Sólidos - Compêndio de Publicações. Gráfica da Universidade de Caxias do Sul, 291 p. 1991.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER POLLUTIONS CONTROL FEDERATION. Standard

- methods for the examination of water and wastewater. 16 ed. Washington, APHA, 1985. 1268 p.
- ARRUDA, A.C.; TEIXERA, C.E.; MANDELLI, S.M. De C.; PESSIN, N.; SILVA, A.R. Estudo do comportamento de parâmetros físico-químicos relacionados ao processo de estabilização de resíduos sólidos urbanos no Sistema de Remediação de São Giácomo - Caxias do Sul -RS. Anais do 18º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Disco 6/9. 17 a 21 de setembro de 1995. Salvador - BA
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 8419 - *Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos*. 13p. Março de 1984.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 10004 - *Resíduos Sólidos - Classificação*. 33 p.1987.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 10005 - *Lixiviação de Resíduos*. 10 p.1987.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 10006 - *Solubilização de Resíduos*. 2 p.1987.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 10007 - *Amostragem de Resíduos*. 25 p.1987.
- AUGENSTEIN, D. & PACEY, J. Modeling landfill methane generation. Proceedings Sardinia 91 - Third International Landfill Symposium. 1991.
- BARLAZ, M.A.; SCHAEFER, D.M. ; HAM, R.K. Effects of prechiling and sequential washing or enumeration of microorganisms from refuse. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.55, p. 50-54, 1989a.

- BARLAZ, M.A.; SCHAEFER, D.M.; HAM, R.K. Bacterial populations development and chemical characteristics of refuse decomposition in a simulated Sanitary Landfill. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, p. 55-65, 1989b.
- BARR, D.J.S. Hom modern systematics relates to the rumen fungi. *BioSystems.*, v. 21, p. 351-351, 1988.
- BARR, D.J.S.; KUDO, H; JAKOBER, K.D. & CHENG, K.J. Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix sp.*, *Piromyces communis* and *Orpinomyces bovis* gen.non., ap.nov. *Canadian Journal Bot.*, 67:2815-2824, 1989.
- BATT, C.A. Biomass. IN: MOSES, V. & CAPE, R.E. *Biotechnology, The Science and the Business*. Capítulo 28, p. 521-537. Harwood academic publishers, 1991.
- BAUCHOP, T. Rumem Anaerobic Fungi of Cattle and Sheep. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.38, n.1, p. 148-158, 1979.
- BAUCHOP, T. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agriculture and Environmental.*, v.6, p.339-348, 1981
- BAUCHOP, T. & MOUNTFORT, D.O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Applied and Environment Microbiology*. 42 (6):1103-1110, 1981.
- BENNER, R.A.; MACCUBBIN, A.E.; HODSON, R.E. Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide components of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.47, p. 988-1004, 1984.

- BEWLEY, R.J.F.; SLEAT, R. and REES, J.F. Waste Treatment and Pollution Clean-up. IN: MOSES, V. CAPE, R.E. *Biotechnology, The Science and Business*. Harwood Academic Publishers, 1991.
- BISARIA, V.S. & GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 3, p. 90-104, 1981.
- BISARIA, V.S. & MISHRA, S. Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *Critical Reviews in Biotechnology.*, v. 9, p. 61-102, 1989.
- BORNEMAN, W.S.; LJUNGDAHL, R.D.H.; AKIN, D.E. Isolation and Characterization of *p*-Coumaroyl Esterase from the Anaerobic Fungus *Neocallimastix* Strain MC-2. *Applied and Environ. Microbiology.* 57 (8). 2337-2344., 1991.
- BROCK, T.D. & MADIGAN, M.T. *Biology of Microorganisms*. Sixth Edition. Prentice Hall. New Jersey, 874 p, 1991.
- BRYANT, M.P. Normal Flora - Rumen Bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition.*, v.23, n.11, p. 1440-50, 1970.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental ; Curso: Limpeza Pública. São Paulo, SP. 1980.
- CHENG, K.J. Prevention of fungal colonization and digestion of cellulose by the addition of methylcellulose. *Can. J. Microbiol.*, v. 37, p. 484-487, 1990.
- CHENG, H ; LI, X. and LJUNGDAHL, L.G. Isolation and properties of an extracellular β -glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 60, p. 64-70, 1994.

- COLBERG, P.J. Anaerobic microbial degradation of cellulose lignin, oligolignols and monoaromatic lignin derivatives. IN: ZEHNDER, A.J.B., ed *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York : John Wiley & Sons, 1988. p.333-72.
- DEMEYER, D.I. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agriculture and Environment*, v. 6, p. 295-337, 1981.
- DUBOURGUIER, H.C ; VAZOLLER, R.F. Cursos de ecologia da digestão anaeróbia e bioquímica da digestão anaeróbia. São Paulo, CETESB, 1988. 14 p.
- FARQUAR, G.J., ROVERS, F.A. Gas production during refuse decomposition. *Water, Air and Soil Pollution*. v. 2, p. 483-495, 1973.
- FONTY, G.; GOUET, P. & NEBOUT, M. Development of the cellulolytic microflora in the rumen of lambs transferred into sterile isolators a few days after birth. *Can. J. Microbiol.*, v. 35, p. 416- 422, 1989.
- GASI, T.M.T.; EXEL, F.; FERREIRA-ARAÚJO, E.F.; JAHNEL, M. Biodigestão Anaeróbia de Resíduos Celulolíticos: Fundamentos sobre a Hidrólise do Complexo Lignocelulósico. Relatório parcial de Projeto 140600/DAE, São Paulo. CETESB, 1986. 47 p.
- GIAJ-LEVRA, L.A. *Estudo de metodologia de contagem para bactérias anaeróbias celulolíticas*. São Carlos, 1991. 140 p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- GIJZEN, H.J. *Anaerobic digestion of cellulosic waste by a rumen -Derived-process*. PhD-Thesis. The Netherlands, 1986.

- GOLD, J.J.; HEATH, I.B. and BAUCHOP, T. Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov., sp.nov., assigned to the Neocallimasticaceae. *Biosystems*, 21: 403-415, 1988.
- GOLDMAN, G.H., AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético de microrganismos produtores de celulases. *Ciência e Cultura*, v. 41 , n. 3, p.229-40, 1989.
- GOMES, L.P. *Estudo da caracterização física e da biodegradabilidade dos resíduos sólidos urbanos em aterros sanitários*. São Carlos, 1989. 167 p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- HEATH, I.B.; BAUCHOP, T.; SKIPP, R.A. Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the Spizellomycetales (Chytridiomycetes) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Can. J. Bot.*, v.61, p. 295-307, 1983.
- HERRERA, T. & ULLOA, M. *El Reino de Los Hongos: Micología Básica e Aplicada*. Universidade Nacional Autónoma de México & Fondo de Cultura Económica. México, 552 p., 1990.
- HOBSON, P.N. The microflora of the rumen. COOK, J.G., ed. England : Meadow field, 49 p., 1976.
- HOBSON, P.N ; WALLACE, R.J. Microbial ecology and activities in the rumen: Part 1. *CRC. Critical Reviews in Microbiology.*, v.9, p. 165-225., 1982.
- HUNGATE, R.E. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: NORRIS, J.R., RIBBONS, D.W., ed. *Methods in Microbiology*. New York Academic Press, 1969, v.2, p. 117-132.

- HUNGATE, R.E. The microbiology of biodigestion. In: I Simpósio Latino Americano Sobre Produção de Gás. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia e Comitê Latino- Americano de Microbiologia Ambiental, 1982. 91p.
- JARDIM, N.S. Lixo Municipal: Manual de gerenciamento integrado. IPT/Cempre. 278p 1ª Edição. São Paulo, SP, 1995.
- JOBLIN, K.N. Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in rool tubes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.42, p. 1119-1122, 1981.
- JONES, K.L & GRAINGER, J.M. The application of enzyme activity measurements to a study of factors affeting protein, starch and cellulose fermentation in domestic refuse. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 18, p. 181-185, 1983.
- JONES, K. L.; REES, J.F.; GRAINGER, J.M. Methane generation and microbiol activity in a domestic refuse Landfill site. *Eur. J. Appl. Microbiol. Technol.*, v. 18, p. 242-245, 1983.
- KIRSCH, E.J. Studies on the enumeration and isolatios of obligate anaerobic bacteria from digesting sewage sludge. *Div. Ind. Microbiol.*, v. 10, p. 170-176, 1969.
- LEHNINGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*. 4.ed. Traduzido por Lodi, W.R. & SIMÕES, A.A. Sarvier, São Paulo, 725 p.1989.
- LI, X. & CALZA, R.E. Fractionation of cellulose from tre ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 57, p. 3331-3336, 1991.

- LIN, K.W.; PATTERSON, J.A.; LADISCH, M.R. Anaerobic fermentation: microbes from ruminants. *Enzyme Microb. Technol.*, v.7, p. 98-107, 1985.
- LIMA, L.M.Q. Estudo da influência da reciclagem do chorume na aceleração da metanogênese em aterro sanitário. São Carlos, 1988, 242 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- LJUNGDAHL, L.G. & ERIKSSON, K.E. Ecology of Microbiol Cellulose Degradation. *Adv. Microbiol. Ecol.*, v. 8, p. 237-239, 1985.
- LOWE, S.E.; THEODOROU, M.K.; TRINCI, A.P.J. Grow of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. *Journal of General Microbiology*. v. 131, p. 2225-2229. 1985
- LOWE, S.E.; GRIFFITH, G.G.; MILNE, A.; THEODOROU, M.K.; TRINCI, A.P.J. The Life cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. *Journal of General Microbiology*. v. 133, p. 1815-1827.
- MASS, L.K. & GLASS, T.L. Cellobiose uptake by the cellulolytic ruminal anaerobe *Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes*. *Can. J. Microbiol.*, v. 37, p. 141-147, 1991.
- McSWEENEY, C.S.; DULIEU, A.; KATAYAMA, Y.; LOWRY, J.B. Solubilization of lignin by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriarcum*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.60, p. 2985-2989, 1994.
- MILLER, T.L. & WOLIN, M.J. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivation obligate anaerobes. *Applied Microbiology*., v. 27, p. 985-987, 1974.

- MOSEY, F.E. & HUGHES, D.A. The toxicity of heavy metal ions to anaerobic digestion. *Water Pollution Control*, v.74, p.18-39, 1975.
- MOUNTFORT, D.O. & ASHER, R. Role of Catabolite Regulatory Mechanisms in Control of Carbohydrate Utilization by the Rumen Anaerobic Fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 46, p. 1331-1338, 1983.
- MOUNTFORT, D.O. & ASHER, R. Production of Xylanase by the Ruminant Anaerobic Fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, p. 1016-1022, 1989.
- MUNN, E.A., ORPIN, C.G. and HALL, F.J. Ultrastructural studies of the free zoospore of the rumen Phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 125: 311-323. 1981.
- MUNN, E.A.; ORPIN, C.G. and GREENWOOD, C.A. The ultrastructure and possible relationships of four obligate anaerobic chytridiomycete fungi from the rumen of sheep. *BioSystems*, v.22, p.67-81, 1988.
- NOVAES, R.F.V. Microbiology of anaerobic digestion. *Wat. Sci. Tech.*, v. 18, p. 1-14, 1986.
- ODUM, E.P. *Ecologia*. Ed. Interamericana. Rio de Janeiro, 1985. 434p.
- ORPIN, C.G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiol.*, v. 91, p. 249-262, 1975.
- ORPIN, C.G. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiol.*, v. 94, p. 270-280, 1976.

- ORPIN, C.G. The rumen flagellate *Piromonas communis*: Its life-history and invasion of plant material in the rumen. *Journal of General Microbiol.*, v. 99, p. 107-117, 1977.
- ORPIN, C.G. & LETCHER, A.J. Utilization of cellulose, starch, xylan and other hemicelluloses for growth by the rumen ficomycete *Neocallimastix frontalis*. *Current Microbiology*, v. 3, p. 121-124, 1979.
- ORPIN, C.G. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Tech.*, v. 10, p. 121-143, 1984.
- PEARCHE, P.D. & BAUCHOP, T. Glicosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 49, p. 1265-1269, 1985.
- PESSIN, N.; MANDELLI, S. M.De C.; SLOMPO, M. Determinação das composição física e das características físico-químicas dos resíduos sólidos domésticos da cidade de Caxias do Sul. IN: MANDELLI, S.M.De C. Tratamento de Resíduos Sólidos - Compêndio de Publicações. Gráfica da Universidade de Caxias do Sul, 291 p. 1991.
- POHLAND, J.G. & HARPER, S.R. *Critical reviews and summary of leachate and gas production from landfills*. Atlanta, Georgia Institute of Technology, School of Civil Engineering, 1985. 165 p.
- REES, J.P. Optimization of methane production and refuse decomposition in landfills by temperature control. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 30, p. 458-465, 1980.
- RYU, D.D.Y. & MANDELS, M. Cellulases biosynthesis and applications. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 2, p. 91-100, 1980.

SCHALCH, V. Análise comparativa do comportamento dos aterros sanitários e correlações dos parâmetros do processo de digestão anaeróbia. São Carlos, 1992. 229 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SCHINK, B. Principles and Limits of anaerobic degradation: environmental and Technological aspects. IN: ZEHNDER, A.J.B. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Capítulo 14, 1988.

SEIFERT, K.A. Isolation of filamentous fungi. IN: LABEDA, D.P. *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. Capítulo p.284-307, 1990.

TEATHER, R.M. & WOOD, P. Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 43, p. 777-780, 1982.

TEIXEIRA, E. N. Efeito inibidor da recirculação direta de chorume na decomposição anaeróbia de resíduos sólidos. São Carlos, 1994. 386p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, 1994

TOERIEN, D.F. Population description of the non-methanogenic phase of anaerobic digestion. I - Isolation, characterization and identification of numerically important bacteria. *Water Research*, v. 4, p. 129-148, 1970.

VAZOLLER, R.F. Estudos sobre isolamento, caracterização e crescimento de culturas puras de bactérias metanogênicas de biodigestores de lodo de esgoto. São Paulo, 1989. 145 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo, Universidade de São Paulo.

- VAZOLLER, R.F. & CARVALHO, J de L. Curso de Digestão Anaeróbia: Aspectos Fundamentais e Tecnológicos. Universidade de Caxias do Sul. Agosto de 1993.
- VAZOLLER, R.F. Avaliação do ecossistemas microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 1995. 259p.
- VAZOLLER, R.F. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável - Microbiologia e Saneamento Ambiental - *Workshop Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas*. Campinas, 29 de abril a 01 de maio de 1996.
- VEAL, D.A. & LYNCH, J.M. Biochemistry of cellulose breakdown by mixed culturas. *Biochemical Society Transactions.*, v. 12, p. 1142-1144, 1984.
- VILLAS BÔAS, D.M.F. Estudos da Microbiota Anaeróbia Hidrolítica Fermentativa em Aterro Sanitário. São Carlos, 1990. 157p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- WEBSTER, J. *Introduction to Fungi*. Second Edition. Cambridge University Press., 1980.
- WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur reducing bacteria. In: ZENDER, A.J.B. ad. *Biology of anaerobic microorganisms*. New York: John Wiley. 1988 p.469-585.
- WILLIAMS, P.P. & DINUSSON, W.E. Ruminant volatile fatty acid concentrations and weight gains of calves reared with and without ruminal ciliated protozoa. *J. Anim. Sci.*, v. 36, p. 588-591, 1973.

- WILLIAMS, A.G. & ORPIN, C.G. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.*, v. 33, p. 418-426, 1987.
- WILSON, C.A. and WOOD, T. The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of cellulosome - type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose. *Appl. Microbiol. and Biotech.*, v. 37, p. 125-129, 1992.
- WISE, D. ed. *Bioenvironmental Systems*. Florida. CRC Press, v. 2, 217 p. 1987
- ZEIKUS, J.G. & WINFREY, M.R. Temperature limitation of methanogenesis on aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 31, p. 99-107, 1976.
- ZINDER, S.H. Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: Recent developments. *Asm. News.*, v. 50, 2p. 294-298, 1984.