



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

**Marcela Vieira Leite**

**FUNGOS FILAMENTOSOS DO LODO DE ESGOTO:  
IMPACTO NA MICROBIOTA FÚNGICA E POTENCIAL  
ENZIMÁTICO**

**Recife**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Marcela Vieira Leite**

**FUNGOS FILAMENTOSOS DO LODO DE ESGOTO:  
IMPACTO NA MICROBIOTA FÚNGICA E POTENCIAL  
ENZIMÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kaoru Okada

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

**Recife  
2009**

L533f

Leite, Marcela Vieira

Fungos filamentosos do lodo de esgoto : impacto na microbiota fúngica e potencial enzimático / Marcela Vieira Leite ; orientador Kaoru Okada ; co-orientador Carlos Alberto Alves da Silva, 2009.  
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2009.

1. Lodo de esgoto. 2. Fungos filamentosos. 3. Enzimas Microbianas hidrolíticas. I. Título

CDU 628.3

Leite, Marcela Vieira

Fungos Filamentosos do Lodo de Esgoto: Impacto na Microbiota Fúngica e Potencial Enzimático, Recife-PE, 2009, 65.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2009.

1. Lodo de Esgoto. 2. Fungos Filamentosos. 3. Enzimas Microbianas Hidrolíticas. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

# **FUNGOS FILAMENTOSOS DO LODO DE ESGOTO: IMPACTO NA MICROBIOTA FÚNGICA E POTENCIAL ENZIMÁTICO**

**Marcela Vieira Leite**

**Examinadores:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Kaoru Okada (Orientadora)  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba de Campos Takaki  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Norma Buarque de Gusmão  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

**Dedico**

À meu pai, Acélio de Vasconcelos Leite,  
a minha mãe, Célia Vieira Leite e  
a meus familiares e amigos  
por me apoiarem nos momentos difíceis e por  
sempre me incentivarem na busca pela felicidade e sucesso.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente, dando sentido a todos os passos de minha vida;

À CAPES, pela bolsa de mestrado e intercâmbio UNICAP/UNICAMP realizado no primeiro semestre de 2008;

À FIUC, pelo apoio financeiro;

À Universidade Católica de Pernambuco, em especial a coordenação geral de pós-graduação e ao Reitor Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., pela realização do curso;

À meus orientadores Prof<sup>a</sup> Dra Kaoru Okada e Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, pela orientação, ensinamentos, incentivo, paciência, amizade e confiança constantes;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki, Coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB/UNICAP e do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, pela sempre amável disponibilidade;

Ao Prof. Dr. Valdemir Alexandre, pela ajuda com as análises estatísticas.

À meus pais Acélio de Vasconcelos Leite e Célia Vieira Leite, pelo amor e compreensão, sempre presentes e acreditando na conclusão de mais uma etapa de minha vida;

Aos meus familiares pelo incentivo na busca pelo sucesso profissional e pessoal;

À minhas amigas Aline Alves, Karla Costa e Leonila Acioly que sempre me deram conselhos e me apoiaram nas horas fáceis e difíceis;

Aos amigos do NPCIAMB: Amanda Sales, Ednaldo Ramos, Geisane Messias, Grayce Kelli Barbosa, Leandro Barbosa, Luíz Neto, Marta Cristina Freitas, Mayara Nunes, Narjara Thums, Priscilla Andrade e Rodolfo Burgos, pela deliciosa convivência, trocas intelectuais e amizade;

Aos funcionários da UNICAP, Humberto de Almeida, Moacir Silva, Salatiel Joaquim de Santana e Sônia Maria de Souza pela agradável convivência e solicitude;

Aos amigos e professores do Mestrado pela troca de conhecimentos e convívio;

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>SUMÁRIO</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1.1 Introdução</b> .....	14
<b>1.2 Objetivos</b> .....	16
1.2.1 Objetivo Geral .....	16
1.2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>1.3 Revisão da Literatura</b> .....	17
1.3.1 Lodo de Esgoto: Considerações Gerais .....	17
1.3.2 Poluentes do Lodo de Esgoto .....	18
1.3.3 Propriedades Físicas e Químicas .....	20
1.3.4 Microbiota do Solo e do Lodo de Esgoto .....	21
1.3.5 Fungos Filamentosos .....	23
1.3.6 Enzimas .....	25
1.3.7 Enzimas Hidrolíticas .....	27
1.3.7.1 Celulase .....	27
1.3.7.2 Lipase .....	28
1.3.7.3 Urease .....	29

<b>1.4 Referências Bibliográficas</b> .....	31
<b>CAPÍTULO II – Fungos filamentosos do lodo de esgoto: impacto na microbiota do solo e detecção de enzimas hidrolíticas</b> .....	41
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Conclusões Gerais</b> .....	62
<b>ANEXOS</b> .....	63

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1. Fotografias microscópicas dos isolados do lodo de esgoto, corados com Azul de Aman. (a) *Penicillium* sp.; (b) *Monotospora* sp.; (c) *Scedosporium* sp.; (d) *Chrysosporium* sp.; (e) *Aspergillus* sp ..... 51
- Figura 2. Fotografias microscópicas dos isolados do solo agricultável, corados com Azul de Aman. (a) *Aspergillus* sp.; (b) *Penicillium* sp. biverticilado; (c) *Penicillium* sp. monoverticilado; (d) *Cladosporium* sp.; (e) *Mucor* sp ..... 52
- Figura 3. Fotografias microscópicas dos isolados do solo com adição de lodo de esgoto. (a) *Aspergillus* sp.; (b) *Penicillium* sp ..... 53
- Figura 4. Atividade celulásica dos fungos filamentosos do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE, cultivados em meio sólido por 4 dias nas temperaturas de 28°C e 35°C ..... 54
- Figura 5. Atividade lipásica dos fungos filamentosos do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE, cultivados em meio sólido por 4 dias nas temperaturas de 28°C e 35°C..... 55
- Figura 6. Atividade ureásica dos fungos filamentosos do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE, cultivados em meio sólido por 4 dias nas temperaturas de 28°C e 35°C ..... 56

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Relação do estudo da micobiota predominante no lodo de esgoto de acordo com vários autores ..... 22

Tabela 2. Nomenclatura das enzimas com respectivas características (Garrett; Grisham, 1999)..... 27

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Fungos filamentosos isolados do lodo de esgoto, do solo agricultável e do solo com adição de lodo em diferentes doses ..... 49

Tabela 2. Caracterização química (metais pesados) do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE..... 49

## RESUMO

As Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) surgiram para amenizar a poluição nos fluxos hídricos decorrentes dos despejos desse resíduo, como por exemplo, o lodo de esgoto. Esse resíduo está sendo muito utilizado na agricultura por ser rico em matéria orgânica e nutrientes, ajudando na produtividade e fertilidade do solo e contribuindo para o aumento da microbiota no mesmo. Neste trabalho, foram caracterizados os fungos residentes no lodo de esgoto, no solo e no solo com adição de lodo, avaliando o potencial biotecnológico da micobiota do lodo com breve estudo sobre o efeito da temperatura na atividade enzimática dos mesmos. O lodo de esgoto foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto Mangueira, Recife-PE e o solo coletado na Estação Experimental de Itapirema-IPA, município de Goiana-PE. As adições de lodo ao solo foram feitas nas doses de 0, 25, 50 e 75 ton/ha. Para o isolamento da microbiota fúngica foi utilizada a técnica da diluição seriada e posterior plaqueamento em meios seletivos. A identificação da micobiota foi feita através das análises das características macroscópicas e microscópicas dos isolados, baseadas nos trabalhos descritos por alguns autores. A detecção da atividade enzimática da celulase, lipase e urease foi baseada na metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), com análise da influência da temperatura nas atividades. Os resultados mostram que no lodo de esgoto estão presentes os gêneros *Aspergillus* sp., *Chrysosporium* sp., *Monotospora* sp., *Penicillium* sp. e *Scedosporium* sp.; no solo os gêneros *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp. e *Penicillium* sp. e no solo com adição de lodo de esgoto os gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., mostrando o impacto causado na micobiota do solo. Os fungos do lodo mostraram melhores resultados na atividade lipásica, destacando o gênero *Chrysosporium* sp. como o que melhor apresentou atividade enzimática na celulase e lipase nas duas temperaturas testadas (28°C e 35°C). A atividade ureásica mostrou-se com valores pouco significantes em relação aos resultados das demais enzimas.

Palavras-Chave: Lodo de Esgoto, Fungos Filamentosos, Enzimas Hidrolíticas

## ABSTRACT

The Stations Wastewater Treatment Plant appeared to lessen the pollution in water flows resulting from dumping of waste, such as sewage sludge. This residue is widely used in agriculture to be rich in organic matter and nutrients, helping in the productivity and soil fertility and contributing to the increase in the microbiota. In this work, we characterized the fungi living in the sewage sludge, soil and soil with the addition of sludge, assessing the potential of biotechnology mycobiota the mud with a brief study on the effect of temperature on enzyme activity of the same. The sewage sludge was collected at the Wastewater Treatment Plant Mangueira, Recife-PE and soil collected at the Experimental Station of Itapirema-IPA, city of Goiana-PE. The additions of sewage sludge to the soil were made at doses of 0, 25, 50 and 75 ton/ha. For the isolation of fungal microbiota was the technique of serial dilution and subsequent plating on selective media. The identification of mycobiota was made through the analysis of macroscopic and microscopic characteristics of the isolates, based on the work described by other authors. The detection of enzyme activity of cellulase, lipase and urease was based on the methodology described by Hankin and Anagnostakis (1975), with analysis of the influence of temperature on activities. The results show that the sewage sludge are present the genera *Aspergillus* sp., *Chrysosporium* sp., *Monotospora* sp., *Penicillium* sp. and *Scedosporium* sp.; soil the genera *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp. and *Penicillium* sp. and soil with the addition of sewage sludge the genera *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., showing the impact on mycobiota soil. Fungi the sludge showed better results in the lipase activity, with the genus *Chrysosporium* sp. presented as the best enzyme activity in cellulase and lipase in the two tested temperatures (28°C and 35°C). The urease activity was shown with little significant value in relation to the results of other enzymes.

Key Words: Sewage Sludge, Filamentous Fungi, Microbial Hydrolitic Enzyme

# CAPÍTULO I

## 1.1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional mundial tem ocorrido de uma maneira rápida e desordenada, resultando no aparecimento e formação de cidades sem infra-estrutura e sem disponibilidade de serviços urbanos capazes de comportar a população, aumentando os problemas ambientais. Há alguns anos, a maioria das cidades brasileiras jogava seu esgoto diretamente nos sistemas hídricos, poluindo-os e contribuindo assim para formação de situações caóticas (PIRES, 2007). Para tentar reverter ou ao menos amenizar o problema, foram criadas diversas políticas de incentivo ao saneamento básico e as instalações de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) na maioria das cidades, para que as águas residuárias fossem coletadas e tratadas de uma maneira correta, antes de sua devolução aos cursos hídricos. Com a instalação das ETEs, um novo problema ambiental foi gerado: a disposição final do lodo de esgoto, resíduo produzido durante o processo de tratamento das águas residuárias (ANDRADE, MATTIAZZO, 2000).

Esse resíduo é considerado um dos mais prejudiciais a vida dos seres humanos, pois causa a poluição dos rios e afeta a saúde da população. Porém é muito rico em matéria orgânica e em macro e micronutrientes (SANTOS, BETTIOL, 2001). Devido a essa característica, o lodo de esgoto está sendo muito utilizado na agricultura aumentando a produtividade e a fertilidade do solo. Porém, ele pode causar sérios danos aos diversos ecossistemas existentes e a saúde humana por trazer em sua composição diversos poluentes, como metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), além da presença de diversos organismos considerados patogênicos (vírus, fungos e bactérias) que se acumulam no solo e afetam a população humana (KACPRZAK, STANCZYK-MAZANEK, 2003).

O impacto do lodo em solos tem alterado a presença de fatores físicos e químicos, que envolvem os parâmetros de produtividade em plantas. Avaliações feitas em campos de experimentos demonstram que os tratamentos orgânicos utilizados não só melhoram a estrutura química do solo, como também influenciam na estrutura da microflora presente nesse solo (PÉREZ-PIQUERES et al, 2006). A aplicação do lodo de esgoto a curto e longo prazo pode afetar diretamente ou indiretamente a estrutura e diversidade de comunidades de plantas, de animais e de microrganismos presentes (SULLIVAN et al, 2006).

Diversos estudos realizados comprovam que a aplicação do lodo de esgoto pode estimular o crescimento microbiano do solo, devido ao aumento de material orgânico, carbono orgânico e nutrientes (nitrogênio e fósforo) presentes em sua composição original, e que contribuem influenciando as diversas características bioquímicas microbianas e também na qualidade do solo (PASCUAL et al, 2007).

Entretanto, as contaminações do solo por metais pesados provocam mudanças drásticas nos microrganismos residentes. Algumas espécies podem ser eliminadas, enquanto outras aumentam em demasia, ocorrendo assim um desequilíbrio do consórcio microbiano existente no local. A presença de metais em excesso diminui a diversidade funcional dos microrganismos, enquanto que sua aplicação nas doses corretas (controle de poluentes) aumentam a atividade microbiana do solo (BANERJEE et al, 1997). A aplicação do lodo de esgoto com grandes concentrações de metais pesados no solo diminui o número de fungos comparado com a aplicação do lodo de esgoto com baixas concentrações desses poluentes (STOVEN et al, 2005).

São descritos no lodo de esgoto a existência de diversos gêneros de fungos filamentosos, como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Spicaria* e *Hyaloflorae*. Alguns são identificados taxonomicamente em nível de espécie, como o *Penicillium* (*P. corylophilum*, *P. waksmanii*, *P. citrinum*) e o *Aspergillus* (*A. terreus*, *A. flavus*) (FAKHRU'L-RAZI et al, 2002). Estão também presentes os fungos queratinolíticos, que são capazes de atacar e destruir a queratina, produzindo estruturas como hifas radiais que penetram e destroem a superfície de cabelos e unhas (ULFIG, 2007). Esses microrganismos contribuem para a decomposição dos substratos queratinosos e fornecem a outros fungos não queratinolíticos os produtos da decomposição da queratina (FILIPELLO-MARCHISIO, 2000).

Os microrganismos são extremamente versáteis na produção de inúmeras substâncias de grande importância biotecnológica, entre elas as enzimas microbianas. As enzimas são catalisadores orgânicos produzidos por células vivas e que participam das reações químicas nos processos vitais. São capazes de atuar especificamente em todas as principais macromoléculas biológicas, proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos, como também em moléculas menores como os aminoácidos, os açúcares e as vitaminas (SOLEWICZ, 1987).

As enzimas industriais são usadas numa variedade de aplicações diferentes variando de detergentes, alimentos e bebidas até o processamento de couro. Muitas dessas enzimas são produzidas por fungos filamentosos, que tem a capacidade de produzir e secretar a enzima desejada em altas concentrações (HAACK et al, 2006). Algumas enzimas regulam o funcionamento do ecossistema e desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes. Estas enzimas determinam os processos metabólicos do solo que dependem das propriedades físicas, químicas, microbiológicas e bioquímicas do mesmo (MAKOI, NDAKIDEMI, 2008).

Neste trabalho, foram caracterizados os fungos filamentosos residentes no lodo de esgoto, no solo agricultável e no solo com adição de lodo e, avaliada as atividades de enzimas hidrolíticas do lodo.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar o impacto da utilização do lodo de esgoto sobre a micobiota presente em solos agricultáveis e analisar o perfil biotecnológico dos isolados desse resíduo através da detecção da atividade enzimática.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Isolar e identificar os fungos filamentosos presentes no lodo de esgoto, no solo agricultável e no solo com adição de lodo;
- Verificar a atividade enzimática da celulase, da lipase e da urease nos fungos filamentosos isolados do lodo de esgoto;
- Estudar a influência da temperatura na atividade enzimática desses isolados do lodo.

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.3.1 Lodo de Esgoto: Considerações Gerais

A geração de resíduos está relacionada com a atividade humana e com o aumento da população, sendo a produção de esgoto um dos mais prejudiciais ao ambiente. Geralmente, o esgoto produzido é lançado diretamente nos cursos d'água e para reduzir a poluição ambiental, há necessidade de se realizar a coleta e o tratamento do mesmo. Nesse processo é gerado um resíduo denominado lodo de esgoto, rico em matéria orgânica e nutrientes, o qual necessita de uma adequada disposição final (BETTIOL, CAMARGO, 2000).

Segundo Tsutiya et al (2001) as alternativas mais usuais para o aproveitamento e/ou destino final de lodos são as seguintes:

- Uso agrícola;
- Aplicação em plantações florestais;
- Disposição em aterro sanitário;
- Reuso industrial (produção de agregado leve, fabricação de tijolos e cerâmicas e produção de cimento);
- Incineração;
- Recuperação de solos (áreas degradadas e áreas de mineração);
- Disposição oceânica.

Entre as alternativas de disposição final, a para fins agrícolas apresenta-se como uma das mais convenientes, pois combina disposição com reciclagem, gerando uma maior economia de energia e de recursos naturais, na medida em que diminui as necessidades de fertilização mineral. Sendo assim, o lodo de esgoto tem se revelado uma alternativa viável e conveniente, por ser rico em matéria orgânica e outros elementos (macro e micro nutrientes), melhorando assim as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (COLODRO et al, 2007).

Durante as últimas décadas, foram levantadas questões sobre os riscos relacionados com os metais pesados e os compostos orgânicos xenobióticos (XOCs) presentes no lodo de esgoto, por conter restos de materiais de construção, produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal entre outros. A questão do risco a saúde e ao ambiente tem sido bastante

discutida, principalmente pelo fato da acumulação de metais pesados em vegetais e animais, gerando transtornos nos diversos ecossistemas (ERIKSSON et al, 2008).

No Brasil, em agosto de 2006, entrou em vigor a Resolução 375/06 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) que define critérios para o uso agrícola de lodos de esgotos gerados em indústrias ou estações de tratamento sanitário. Pelo fato do lodo apresentar características dúbias, é necessário uma constante revisão das normas regulando o uso agrícola do lodo de esgoto e a continuidade dos estudos envolvendo o tema, garantindo que uma atividade considerada ambientalmente desejável não se torne prejudicial ao próprio meio ambiente e, conseqüentemente, aos seres humanos (PIRES, 2006; CONAMA, 2008).

### **1.3.2 Poluentes do Lodo de Esgoto**

Existe um consenso entre muitos países que o uso de lodo de esgoto na agricultura é o caminho mais apropriado para reciclagem de materiais biodegradáveis, embora o seu uso na agricultura seja restrito uma vez que o mesmo está contaminado com poluentes orgânicos e inorgânicos em vários graus de contaminação, baseados na toxicidade humana e ecotoxicidade (LITZ, 2000).

Devido ao fato de conter em sua composição diversos poluentes, o lodo de esgoto se for usado de modo contínuo e sem critérios técnicos na agricultura, pode resultar no aumento dos teores de elementos químicos no solo, principalmente o cádmio (Cd), zinco (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni) e chumbo (Pb), que são os metais mais encontrados nesse material (RANGEL et al, 2006). O acúmulo de metais pesados em solos agrícolas é o aspecto que causa maior preocupação com relação à segurança ambiental, necessária a viabilização dessa prática. Esses elementos podem expressar seu potencial poluente diretamente nos organismos do solo, pela disponibilidade às plantas em níveis fitotóxicos, além da possibilidade de transferência para a cadeia alimentar através das próprias plantas ou pela contaminação das águas de superfície e subsuperfície (OLIVEIRA, MATTIAZZO, 2001). De acordo com Eriksson et al (2008), a avaliação dos riscos ambientais tem sido realizada no lodo de esgoto no que diz respeito a presença de metais pesados e o estabelecimento de uma regulamentação nos limites de carga máxima de metais foi feita com base nesta avaliação.

A acumulação dos metais (Zn, Pb, Cd e Cu) em níveis considerados críticos, pode ser fitotóxico e causar uma redução no crescimento dos vegetais. Além disso, os microrganismos presentes no solo e suas atividades são essenciais para a manutenção da fertilidade do solo, existindo assim uma grande preocupação de que esses metais pesados possam ter efeitos adversos sobre a qualidade do solo e produção vegetal (ASADU et al, 2008).

A contaminação do solo com altas taxas de Cd causam um significativo decréscimo no número da microbiota, enquanto que baixas e médias concentrações desse metal estimula a proliferação de alguns microrganismos (WYSZKOWSKA, WYSZKOWSKI, 2002). Conforme reportado por Plaza et al (1998), o Cd afeta o crescimento micelial de alguns fungos patogênicos do solo. Alguns grupos de fungos queratinolíticos mostraram-se resistentes ao Cd (*Arthrographis*, *Trichophyton* e *Chrysosporium*) enquanto outros apresentaram sensibilidade. Amostras de fungos não queratinolíticos pertencentes aos gêneros *Pseudallescheria*, *Absida* e *Rhizopus* apresentaram-se com resistência ao Cd.

Smejkalova et al (2003), afirmam que as concentrações de todos os metais aumentam com a aproximação das fontes de contaminação. A elevada concentração de Cd e Zn crescem mais que as frações orgânicas, acontecendo o contrário com o Pb. Geralmente, os valores das atividades enzimáticas no solo aumentam quando estão longe dos contaminantes e diminuem com a aproximação dos mesmos. Portanto, a inibição do C-biomassa ocorre em solos altamente contaminados com metais pesados.

As concentrações de metais pesados nas raízes da plantas variam de acordo com a espécie vegetal. Segundo Jia-yin et al (2006), algumas plantas acumulam metais pesados como Pb, Cd e cromo (Cr), enquanto outras se apresentam com níveis altos de Ni, Zn e mercúrio (Hg). É preciso notar que apenas uma fração dos metais presentes no lodo e consequentemente no solo é facilmente assimilável pelas plantas, além disso, quando o lodo é adicionado ao solo alguns parâmetros físico-químicos são modificados, podendo assim afetar a disponibilidade dos metais existentes (FUENTES et al, 2008).

Em relação à aplicação em curto prazo de lodo de esgoto na agricultura, Antoniadis (2008) descreveu em seus experimentos que a quantidade de matéria orgânica do solo é crescente, porém, a capacidade de retenção de metais pesados também aumenta, ou seja, ambos são diretamente proporcionais.

A mobilidade dos metais pesados no solo depende da forma química sob a qual o metal se apresenta e das características do solo como pH, teor de matéria orgânica e capacidade de troca de cátion (CTC), que têm importância fundamental na mobilidade de cátions metálicos (LOPES et al, 2005). A fim de minimizar os riscos a saúde, foram realizadas várias pesquisas usando vários métodos que determinam a fração química e a remediação dos metais pesados do solo. A solubilidade de metais pesados em solos tratados com lodo está associada diretamente com o pH do solo, a disponibilidade e a distribuição de metais pesados nas imediações das raízes desses solos tratados (WANG et al, 2008).

### 1.3.3 Propriedades Físicas e Químicas

Um aspecto de suma importância quando se considera o uso agrônômico do lodo de esgoto, diz respeito ao nitrogênio (N) aplicado via resíduo. Em função da taxa de mineralização do N, que é dependente de características do lodo de esgoto e do local onde é aplicado, pode haver caminamento de nitrato no perfil do solo e conseqüente contaminação de águas subterrâneas (ANDRADE, MATTIAZZO, 2000). A quantidade de nitrogênio mineralizado da matéria orgânica de lodos de esgoto é variável de acordo com o material de origem e com o processo de tratamento utilizado. De forma geral, são resíduos com estreita relação C:N, com baixo suprimento de material energético, e protéico, e de fácil degradação pelos microrganismos. Estas propriedades possibilitam rápida liberação de N mineral, em quantidades proporcionais às quantidades de N orgânico aplicado (BOEIRA et al, 2002).

O conhecimento da dinâmica da mineralização de materiais orgânicos adicionados ao solo é importante para prever os efeitos das possíveis perdas de N para o ambiente. As quantidades de lodo de esgoto a serem aplicadas ao solo, devem ser diferentes nos períodos da seca e das águas mesmo quando se baseiam nas necessidades de N, em decorrência das perdas desse elemento em períodos de intensas precipitações. Com o aumento da umidade e da temperatura, aumentam-se os processos de mineralização do N orgânico (VIEIRA, CARDOSO, 2003).

Os processos de mineralização e umidificação da matéria orgânica do lodo que acompanham o crescimento dos microrganismos podem afetar nas propriedades químicas, físicas e físico-químicas do solo, como também nas condições de nutrição das plantas (FURCZAK, JONIEC, 2007). O tipo de lodo influencia na quantidade de fungos filamentosos que são necessários para a mineralização da matéria orgânica, melhorando a estrutura do solo (ESTRADA et al, 2006).

Um dos principais efeitos da matéria orgânica nos atributos físicos do solo está associado diretamente ao aumento da agregação do solo, a redução da densidade do solo e ao aumento da porosidade total do solo. A resistência do solo a penetração diminui em função do aumento da porosidade e agregação do solo, melhorando o desenvolvimento das raízes e proporcionando assim maiores produtividades. Portanto, solos com teores mais elevados de matéria orgânica apresentam densidades menores, conseqüentemente esses possuem maior capacidade de retenção de água (BARBOSA et al, 2007; OJEDA et al, 2008). A matéria orgânica do solo desempenha um papel essencial nos ciclos de nutrientes, na estabilidade do solo e no aspecto ecológico e ambiental da sustentabilidade da fertilidade do solo, pois nela está presente uma grande quantidade de carbono (C) (GÁRCIA-GIL et al, 2004).

O impacto do lodo de esgoto no solo com a aplicação da matéria orgânica, mudanças na densidade e porosidade total são aspectos importantes. Comparando um solo que passou por um tratamento com fertilização e um solo sem tratamento, observa-se que a aplicação de lodo de esgoto melhora as propriedades físicas do solo, influenciando na macroporosidade e microporosidade, afirmando ser positiva a utilização de lodo na produção agrícola (ASADU et al, 2008).

O pH é um dos indicadores físicos mais conhecidos que controla a velocidade e direção dos processos biológicos e a fertilização aumenta o pH do solo, devido a presença de Ca e outros cátions presentes nesse resíduo (LÓPEZ-DÍAZ et al, 2007). Porém, essa aplicação do lodo, mesmo aumentando o pH, não interfere no número de comunidades fúngicas do solo (KACPRZAK, STANCZYK-MAZANEK, 2003).

### **1.3.4 Microbiota do Solo e do Lodo de Esgoto**

Estudos a respeito da fertilização com lodo de esgoto mostram a importância do carbono orgânico para os microrganismos existentes no solo, modificando a estrutura das comunidades microbianas e influenciando no aumento de nutrientes para o desenvolvimento dos vegetais (MARSCHNER et al, 2003). As populações microbianas e as atividades enzimáticas do solo tratado com lodo têm relação direta com a decomposição da matéria orgânica. As atividades enzimáticas correlacionam com o número de microrganismos, portanto, aumentam a atividade microbiana do solo e cresce também a taxa de decomposição da matéria orgânica (SASTRE et al, 1996; STOVEN et al, 2005). Zhang et al (2008) em suas pesquisas, mostraram que a irrigação com lodo possui um efeito positivo sobre a comunidade microbiana do solo, mas, é necessário atenção no caso da irrigação a longo prazo, pois pode causar mudanças na população microbiana existente no solo alterando sua qualidade.

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e vitais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares, na reciclagem de nutrientes e nos diversos ciclos biogeoquímicos existentes. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. (HUNTER-CEVERA, 1998; BULL et al, 2000).

Com lodo de esgoto sendo utilizado na agricultura, é importante que haja um conhecimento da microbiota presente, pois existe a possibilidade de introdução no solo de uma microbiota selvagem que pode causar sérios danos para humanos, animais e até mesmo

plantas (KACPRZAK et al, 2005). A tabela 1 aborda as mais frequentes espécies de fungos presentes no lodo de esgoto, citado por diversos autores.

Tabela 1 – Relação do estudo da microbiota predominante no lodo de esgoto de acordo com vários autores.

MICROBIOTA	REFERÊNCIA
<i>Arthroderma quadrifidum</i> <i>Arthroderma uncinatum</i> <i>Chrysosporium keratinophilum</i> <i>Microsporium gypseum</i> <i>Trichophyton terrestre</i> <i>Trichophyton ajelloi</i>	Ulfig et al (1996)
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Chrysosporium pannicola</i> <i>Microsporium gypseum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Muhsin, Hadi (2001)
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Chrysosporium keratinophilum</i> <i>Chrysosporium queenslandicum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Microsporium gypseum</i> <i>Paecilomyces lilacinus</i> <i>Phialophora melinii</i> <i>Plectosphaerella cucumerina</i> <i>Pseudallescheria boydii</i> <i>Trichophyton terrestre</i> <i>Verticillium lecani</i>	Ulfig (2003); Ulfig (2007) Ulfig et al (2007)

O tratamento orgânico com lodo de esgoto no solo é considerado adequado porque não só aumenta a matéria orgânica do solo como também melhora sua qualidade microbiológica. Esse tratamento ativa o ciclo biogeoquímico do solo, envolvendo grande atividade enzimática intervindo nesses ciclos. Portanto, esse tratamento tanto reflete no aumento da população microbiana do solo, como interfere diretamente nas mudanças da estrutura dessa comunidade

(BASTIDA et al, 2008). O aumento da atividade microbiana no solo é avaliada pela determinação de carbono do CO<sub>2</sub> liberado, o qual constitui um indicativo de qualidade adequado ao monitoramento na melhoria de áreas em recuperação para um curto período de observação. Os níveis de carbono na biomassa microbiana não se mostram afetados pelo tratamento com lodo de esgoto (COLODRO et al, 2007).

O lodo de esgoto abriga uma grande variedade de patógenos hábeis em causar ou espalhar um grande número de doenças transmissíveis para humanos e animais. A utilização do lodo é consistente com o esforço mundial para redução da poluição ambiental e a reciclagem de frações orgânicas dos resíduos no solo. Os conflitos decorrentes das características prejudiciais do lodo e sua utilidade na agricultura e na recuperação de solos pode ser resolvido pelo uso adequado de tratamentos sanitários (DUMONTET et al, 2001).

Até a presente data, poucos estudos foram realizados sobre a presença de fungos patogênicos no lodo ambiental. Devido a altas quantidades, no lodo de esgoto, de resíduos queratinosos de origem humana e animal (principalmente cabelo e pele), este ambiente favorece o crescimento de fungos queratinolíticos (MUHSIN, HADI, 2001; ULFIG, 2003; ULFIG, 2007). Esses fungos são hábeis no ataque e destruição da queratina, observando que a atividade desses microrganismos no cabelo *in vitro* é expressa pela erosão da superfície e a produção de estruturas como hifas radiais que penetram no cabelo (ULFIG et al, 1996; ULFIG et al, 2007).

A análise da microfauna como indicador da atividade do lodo na performance de plantas está sendo cada vez mais comum. Essas análises fornecem informações sobre a atividade biológica do lodo com base na estrutura das comunidades dos microrganismos presentes, tornando muito mais fácil e aplicável a identificação de grupos da microfauna de acordo com a sua morfologia e comportamento (ZHOU et al, 2008).

### **1.3.5 Fungos Filamentosos**

Os fungos constituem um grupo de organismos heterotróficos, eucarióticos e desprovidos de clorofila, portanto, não realizam fotossíntese. São geralmente filamentosos e multicelulares, possuem parede celular rígida e se reproduzem por meio de esporos. A estrutura vegetativa consiste de hifas que são filamentos de células que formam uma rede chamada de micélio. As hifas podem ser asseptadas ou cenocíticas quando não apresentam células individualizadas e são preenchidas por uma massa citoplasmática contínua e, septadas quando apresentam septos ou paredes transversais que podem delimitar compartimentos (TRABULSI, 1999).

Esses microrganismos ocorrem em todos os ambientes e incluem importantes decompositores e parasitas, porém a grande maioria dos fungos que habitam o solo, auxiliam na ciclagem dos diversos materiais na natureza. Gams (2007) afirma que o número de espécies de fungos presentes no solo, com o passar dos anos pode aumentar e ultrapassar as 3300 espécies descritas atualmente.

A nutrição dos fungos se dá pela absorção dos nutrientes, através da liberação de enzimas digestivas no ambiente externo que quebram moléculas grandes e praticamente insolúveis, tais como carboidratos, proteínas e lipídios, em moléculas menores e mais solúveis que podem ser absorvidas. Os fungos apresentam a capacidade de utilizar praticamente qualquer fonte de carbono como alimento, porém, cada espécie apresenta uma necessidade nutricional diferente (KLEIN, PASCHKE, 2004).

Muitos parâmetros interferem na morfologia dos fungos como aeração, pH, temperatura e nutrição, podendo alterar os processos de produção de metabólitos primários, secundários e enzimas com potencial industrial (PAZOUKI, PANDA, 2000).

Muitos fungos produzem esporos sexuais e corpos de frutificação somente sob certas condições ambientais. Aqueles que possuem todos os estágios sexuais conhecidos são denominados fungos perfeitos; e os que não possuem, fungos imperfeitos. Os fungos imperfeitos são classificados de acordo com a forma de reprodução e colocados numa classe especial denominada *Deuteromycetes*. A reprodução assexuada pode ser por fragmentação, brotamento ou esporulação. A reprodução sexuada ocorre quando micélios de sexos diferentes se encontram e suas hifas se fundem e formam um micélio com células binucleadas (PELCZAR Jr. et al, 1996).

Existem quatro principais classes de fungos terrestres: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Deuteromycetes*. Os zigomicetos são formados por hifas cenocíticas ou esparsamente septadas e ausência de esporos móveis. A reprodução assexuada ocorre por meio de esporangiósporos que se desenvolvem no interior de esporângios rompendo-se quando maduros. Reprodução sexuada com a formação de zigosporos (LACAZ et al, 1998).

Nos ascomicetos, quando o micélio é presente, apresenta-se septado e suas células podem possuir um ou mais núcleos. Na fase sexuada da reprodução, produzem ascósporos contidos em ascos que se localizam no interior de corpos de frutificação denominados ascocarpos. Na fase assexuada da reprodução, os esporos são produzidos nas extremidades das hifas e apresentam-se geralmente em cadeia (RAPER, FENNELL, 1977).

Os basidiomicetos distinguem-se de todos os outros fungos por possuírem basídio (estrutura reprodutiva) com seus quatro basidiósporos. Compreendem tanto formas multicelulares como formas unicelulares, e ocorrem em ambientes terrestres e aquáticos. Sua

reprodução assexuada da-se por fragmentação e na reprodução sexuada hifas compatíveis sofrem plasmogamia para formar um micélio dicariótico (ALEXOPOULOS, 1996).

Os fungos imperfeitos ou deuteromicetos se reproduzem somente por conídios assexuados que se desenvolvem em micélios septados. Apesar de não possuírem estágio sexuado, no qual a meiose contribui para a variação das espécies, o fenômeno da parassexualidade, que é a recombinação cromossômica na mitose, lhes garante a variabilidade e abundância (SCHLEGEL, 1997).

Os microrganismos, principalmente os fungos filamentosos, tem contribuído para a indústria e são os responsáveis por uma elevada diversidade do conteúdo enzimático. Novas expressões foram desenvolvidas, os caminhos biossintéticos se modificaram através da engenharia genética originando novos metabólitos, e a direção da evolução tem providenciado enzimas com habilidade modificada, melhorando a atividade catalítica e a estabilidade (DEMAIN, ADRIO, 2008). Os fungos são microrganismos de fácil cultivo, portanto são utilizados em muitos processos industriais na produção de alguns produtos potencialmente úteis na biotecnologia (enzimas extracelulares) e outros produtos de interesse comercial (produtos farmacêuticos, papel, vitaminas, bebidas e alimentos) (GUIMARÃES et al, 2006; ADRIO, DEMAIN, 2003).

### **1.3.6 Enzimas**

As enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza geralmente protéica que se apresentam como catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos. Elas mostram-se com atividade intra ou extracelular com alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e, ainda, funcionam em soluções aquosas e em condições variadas de temperatura e pH (LEHNINGER et al, 2000; AGARWAL, 2006).

Esses biocatalizadores baixam a energia de ativação características das reações, acelerando a velocidade destas. Praticamente todas as reações químicas têm uma barreira de energia separando os reagentes e produtos. Essa barreira é denominada energia de ativação que é o estado de transição no qual um intermediário de alta energia é formado durante a conversão do reagente ao produto. Para as moléculas reagirem, devem conter energia suficiente para romper essa barreira de energia do estado de transição, por isso, a velocidade da reação é determinada pelo número destas moléculas energizadas. Na ausência de uma enzima, apenas uma pequena quantidade de moléculas possui energia suficiente para atingir o estado de transição entre reagente e produto. Uma enzima permite que uma reação ocorra rapidamente sob condições normais na célula, ao oferecer uma rota de reação alternativa com

uma menor energia de ativação. Portanto, quanto menor a energia de ativação, mais moléculas têm energia suficiente para superar o estado de transição, e assim, mais rápida é a velocidade da reação (CHAMPE, HARVEY, 1997).

As enzimas são altamente específicas tanto na reação catalisada como na escolha do substrato. Cada enzima contém um sítio ativo, a parte da molécula na qual ocorre a combinação com o substrato, que consiste em diferentes partes da cadeia protéica (a enzima). A atividade enzimática ocorre em duas etapas, onde, na primeira o sítio ativo da enzima combina com o substrato para formar um complexo enzima-substrato. Esse complexo enzima-substrato em seguida rompe-se para formar os produtos e uma enzima livre, a qual reage novamente. De acordo com essa teoria o substrato deve ajusta-se ao sítio ativo da enzima, por isso a especificidade dessa enzima (SACKHEIM, LEHMAN, 2001).

As enzimas exercem funções bioquímicas em todos os processos de decomposição da matéria orgânica nos sistemas do solo. Elas são importantes na catálise de várias reações necessárias para o processo de vida dos microrganismos em solos e na estabilização de estruturas do solo, na decomposição de resíduos orgânicos, formação de matéria orgânica e ciclo de nutrientes (MAKOI, NDAKIDEMI, 2008).

No solo, as enzimas desempenham um papel importante nos processos de mineralização da matéria orgânica. São provenientes de animais, vegetais e fontes microbianas e da consequente atividade biológica, incluindo os processos metabólicos de todos esses organismos. As informações da atividade enzimática do solo usadas para determinar as características microbiológicas são importantes para a qualidade do solo (AŞKIN, KIZILKAYA, 2005). As enzimas livres normalmente têm vida curta porque podem ser rapidamente desnaturadas, degradadas ou irreversivelmente inibidas. As enzimas extracelulares são normalmente associadas com os colóides do solo, como argilas e substâncias húmicas e atuam como um núcleo estável da atividade do solo (BASTIDA et al, 2008).

Dentre os fatores externos que influenciam na atividade enzimática do solo, a temperatura é um parâmetro físico muito importante. Com o aumento da temperatura aumenta-se a velocidade das reações de hidrólises até atingir a temperatura ótima (LONGO, MELO, 2005). A temperatura influencia quase todas as reações celulares e, em geral, as reações procedem mais rapidamente em temperaturas mais altas, mas todas as enzimas têm temperatura ótima e uma tolerância abaixo e acima dependendo da utilização do substrato (BURGESS, PLETSCHE, 2008).

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, 2008) classificou as enzimas em seis grandes grupos (tabela 2), de acordo com o tipo de reação que catalisam.

Tabela 2 – Nomenclatura das enzimas com respectivas características (Garrett, Grisham, 1999)

ENZIMA	CARACTERÍSTICAS
Oxido-redutases	Catalisam reações de oxidação-redução; O substrato oxidado é um hidrogênio ou doador de elétrons.
Transferases	Catalisam a transferência de grupos entre duas moléculas; O doador pode ser um cofator (coenzima) que carrega o grupo a ser transferido.
Hidrolases	Catalisam a reação de hidrólise de varias ligações covalentes.
Liases	Catalisam a clivagem de ligações C-C, C-O, C-N através de hidrólise ou oxidação; Tem dois substratos envolvidos em uma direção e apenas um na direção contraria da reação.
Isomerases	Catalisam a modificação de uma única molécula sem participação de outra.
Ligases	Catalisam reações de síntese de uma nova molécula a partir da ligação entre duas moléculas com a hidrólise de ATP ou outro composto trifosfatado.

## 1.3.7 Enzimas Hidrolíticas

### 1.3.7.1 Celulase

As hidrólises enzimáticas são consideradas como métodos com grande potencial para amenizar a poluição ambiental e melhorar os processos biotecnológicos, porém o maior problema a superar é o alto custo das enzimas celulolíticas. A decomposição do material vegetal na natureza é, em parte, devido à produção das enzimas celulolíticas pelos microrganismos. De acordo com Krogh et al (2004), os fungos filamentosos como *Trichoderma reesei* e *Penicillium pinophilum*, demonstram capacidade em secretar grandes quantidades de enzimas celulolíticas.

A celulose que é responsável por 40% da biomassa vegetal, é um polímero linear com moléculas de glicose formada por ligações  $\beta$ . A hidrólise enzimática da celulose requer um

consórcio de enzimas, incluindo a endo- $\beta$ -1,4-glucanase, exo- $\beta$ -1,4-glucanase e  $\beta$ -glucanase (DUTTA et al, 2008).

A maioria das celulases microbianas são enzimas induzíveis, como as outras enzimas hidrolíticas extracelulares, sendo secretadas quando os microrganismos crescem em meio à celulose. Sobre o mecanismo de indução de celulases em microrganismos, é evidenciada a participação de dissacarídeos como a celobiose (SEHNEM et al, 2006).

O crescimento e sobrevivência de microrganismos importantes em solos agricultáveis dependem da fonte de carbono contida na celulose ocorrida no solo. Portanto, para o carbono ser liberado como fonte de energia para uso dos microrganismos, a celulose dos restos vegetais tem que ser degradada pelas celulases em glicose, celobiose e oligossacarídeos de alto peso molecular (MAKOI, NDAKIDEMI, 2008). Dentre os microrganismos que produzem celulases, alguns são capazes de degradar a celulose natural, enquanto outros, em condições laboratoriais, utilizam algodão e papel como substratos indutores para produção de exo-glicosidases. Essas enzimas são usadas na indústria alimentícia para extração de componentes do chá verde, da proteína de soja, aromatizantes, amido de batata doce e na clarificação de sucos de frutas cítricas (RUGGER, TAUK-TORNISIELO, 2004).

As celulases produzidas por fungos têm potencial aplicação na agricultura para o controle de doenças em plantas, bem como, na melhora do crescimento e desenvolvimento vegetal. De acordo com Bhat (2000), amostras de *Trichoderma* e *Penicillium* são usadas para produção de plantas e protoplastos fúngicos. Estes protoplastos podem ser usados para produzir híbridos ou mutantes com características desejadas. As celulases também são usadas como uma importante ferramenta para geração de novas amostras capazes de produzir enzimas de interesse comercial.

### 1.3.7.2 Lipase

Os lipídios são essenciais aos sistemas vivos, sendo os mais potentes armazenadores de energia molecular, apresentam-se na estrutura das membranas e estão envolvidos nos acontecimentos celulares. A participação de lipídios em todos estes papéis requer lipases durante seu metabolismo. Segundo Gilham e Lehner (2005), existe uma evolução a respeito da identidade das enzimas envolvidas nesses processos e os mecanismos que regulam suas atividades ou o acesso ao substrato.

O Triacilglicerol acil hidrolase, comumente conhecida como lipase é uma enzima catalítica natural com função de hidrolisar ésteres em triglicerídeos para produzir diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol (SINGH et al, 2006). Essas reações apresentam

vantagens dando as enzimas potencial biotecnológico, como estabilidade em solventes orgânicos, não requerimento de cofatores e ampla especificidade (AZEREDO et al, 2007). As lipases recebem atenção especial por conta da sua utilização industrial, principalmente, na indústria de detergentes, óleos e gorduras, alimentos e produtos farmacêuticos (SARKAR et al, 1998). Segundo Ruiz et al (2001) e Huang et al (2004), os fungos filamentosos são os preferidos na utilização industrial da lipase por suas enzimas serem extracelulares. As espécies mais utilizadas são pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Geotricum*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

As lipases microbianas podem ser obtidas tanto por fermentação submersa como por fermentação em estado sólido, sendo este último, vantajoso devido ao baixo custo dos resíduos industriais que podem ser usados como matéria prima, além de apresentarem algumas propriedades importantes como estabilidade, seletividade e versatilidade que contribuem também com a diversidade de uso (CAMMAROTA, FREIRE, 2006).

As enzimas lipolíticas também estão envolvidas na desagregação e na mobilização de lipídios no interior das células de organismos individuais, bem como na transferência de lipídios de um organismo para outro. Os microrganismos podem produzir agentes emulsificantes e biossurfactantes para ajudar a solubilizar os lipídios (HASAN et al, 2006).

Devido a sua natureza extracelular, muitas lipases microbianas são produzidas em grandes quantidades e são bastante estáveis sob condições não naturais, como altas temperaturas e atuação em meio não aquoso, sendo aproveitadas em muitas aplicações. Sua estabilidade, de baixo custo, bem como seu amplo potencial sintético, faz da lipase microbiana biocatalizadores ideais para a síntese orgânica e oleoquímica (SCHMIDT-DANNERT, 1999).

### **1.3.7.3 Urease**

A urease é a enzima que catalisa a hidrólise da uréia para dióxido de carbono e amônia, afetando a utilização desses importantes fertilizantes nitrogenados. Sua ocorrência é grande em plantas e microrganismos e tem sido detectada na mucosa gástrica do homem e de outros animais (LONGO, MELO, 2005). No solo ela pode ser encontrada como uma enzima livre em solução, ligada a partículas coloidais e no interior de células microbianas. A atividade da urease aumenta quando ocorre uma elevação da taxa de matéria orgânica contida no solo e um aumento da biomassa microbiana, numa relação diretamente proporcional (ROSCOE et al, 2000).

A uréia é um dos mais importantes fertilizantes químicos nitrogenados e suas aplicações têm sido recomendadas no setor agrícola. A urease do solo está envolvida na

mineralização do nitrogênio e no fornecimento de nitrogênio as plantas a partir de fontes naturais e de fertilizantes. A taxa da hidrólise de uréia depende de vários fatores como tipo de solo, teor de matéria orgânica, teor de umidade do solo, temperatura e níveis de salinidade e alcalinidade. Alguns desses fatores aceleram e outros retardam a taxa de hidrólise de uréia no solo (SHAHINROKHSAR et al, 2008). Apesar de ser uma das principais fontes de nitrogênio para as culturas, a uréia tem mostrado baixa eficiência por conta do nitrogênio perdido na atmosfera através da volatilização, um processo mediado pela urease que causa poluição ambiental (NOURBAKHSH, MONREAL, 2004; MAKOI, NDAKIDEMI, 2008).

Quanto maior for à razão enzima/uréia, mais curto o tempo necessário para a completa decomposição da uréia. Uma determinada quantidade de enzima decompõe por unidade de tempo a mesma quantidade de uréia. O tempo requerido para completa decomposição da amostra de uréia pode, portanto ser reduzido na proporção exata que diminui a quantidade de uréia na amostra ou aumenta a quantidade de enzima. (SLYKE, CULLEN, 2007).

## 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v.6, p.191-199, 2003.

AGARWAL, P. K. Enzymes: an integrated view of structure, dynamics and function. **Microbial Cell Factories**, n.2, v.5, p.1-12, 2006.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

ANDRADE, C. A.; MATTIAZZO, M. E. Nitratos e metais pesados no solo e nas árvores após aplicação de biossólido (lodo de esgoto) em plantações florestais de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, n.58, p.59-72, 2000.

ANTONIADIS, V. Sewage sludge application and soil properties effects on short-term zinc leaching in soil columns. **Water, Air and Soil Pollution**, Netherlands, v.190, p.35-43, 2008.

ASADU, C. L. A.; UCHEONYE-OLIOBI, C.; AGADA, C. Assessment of sewage application in southeastern Nigeria – Part 1: Impact on selected soil morphological and physical properties. **Outlook on Agriculture**, n.1, v.37, p.57-62, 2008.

ASADU, C. L. A.; UKADIKE, B.; AGADA, C. Assessment of sewage application in southeastern Nigéria – Part 2: Impact on soil chemical properties, trace and heavy metal accumulation in soil and underground water. **Outlook on Agriculture**, n.1, v.37, p.63-69, 2008.

AŞKIN, T.; KIZILKAYA, R. The spatial variability of urease activity of surface agricultural soils within an urban area. **Journal Central European Agriculture**, n.2, v.6, p.161-166, 2005.

AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANNA Jr., G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v.54, p.361-365, 2007.

BANERJEE, M. R.; BURTON, D. L.; DEPOE, S. Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.66, p.241-249, 1997.

BARBOSA, G. M. C.; TAVARES FILHO, J.; FONSECA, C. B. Efeito do lodo de esgoto em propriedades físicas de um Latossolo Vermelho eutroférico. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, n.1, v.28, p.65-70, 2007.

BASTIDA, F.; KANDELER, E.; HERNÁNDEZ, T. Long-term effect of municipal solid waste amendment on microbial abundance and humus-associated enzyme activities under semiarid conditions. **Microbial Ecology**, New York, v.55, p.651-661, 2008.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, 2000.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p.355-383, 2000.

BOEIRA, R. C.; LIGO, M. A. V.; DYNIA, J. F. Mineralização de nitrogênio em solo tropical tratado com lodos de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.1639-1647, 2002.

BULL, A. T.; WARD, A. C. and GOODFELLOW, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: The Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, n.3, v.64, p.573-606, 2000.

BURGESS, J. E.; PLETSCHE, B. I. Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: a mini-review. **Water SA**, n.3, v.34, p. 343-349, 2008.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzyme in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v.97, p.2195-2210, 2006.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Química Ilustrada**. 2ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997.

COLODRO, G.; ESPÍNDOLA, C. R.; CASSIOLATO, A. M. R.; ALVES, M. C. Atividade microbiana em um Latossolo degradado tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Paraíba, n.2, v.11, p.195-198, 2007.

CONAMA. **Resolução CONAMA nº 375/2006.** Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/CONAMA>>. Acesso em: 28 dez. 2008.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v.38, p.41-55, 2008.

DUMONTET, S.; SCOPA, A.; KERJE, S.; KROVACEK, K. The importance of pathogenic organisms in sewage and sewage sludge. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v.51, p.848-860, 2001.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S. S.; BHATTAXHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.35, p.275-282, 2008.

ERIKSSON, E.; CHRISTENSEN, N.; SCHMIDT, J. E.; LEDIN, A. Potential priority pollutants in sewage sludge. **Desalination**, v.226, p.371-388, 2008.

ESTRADA, I. B.; GÓMEZ, E.; ALLER, A.; MORÁN, A. Microbial monitoring of the influence of the stabilization degree of sludge when applied to soil. **Bioresource Technology**, v.97, p.1308-1315, 2006.

FAKHURU'L-RAZI, A.; ALAM, M. Z.; IDRIS, A.; ABD-AZIZ, S.; MOLLA, A. H. Filamentous fungi in Indah Water Konsortium (IWK) sewage treatment plant for biological treatment of domestic wastewater sludge. **Jornal of Environmental Science**, New York, USA, n.3, v.37, p.309-320, 2002.

FILIPELLO-MARCHISIO, V. Keratinophilic Fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), *Biology of Dermatophytes and other Non-keratinolytic Fungi*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Bilbao, p.86-92, 2000.

FUENTES, A.; LLORÉNS, M.; SÁEZ, J.; AGUILAR, M. I.; ORTUNO, J. F.; MESEGUER, V. F. Comparative study of six different sludges by sequential speciation of heavy metals. **Bioresource Technology**, v.99, p.517-525, 2008.

FURCZAK, J.; JONIEC, J. Preliminary study of sludge effect on soil microbial activity of a podzolic soil under willow culture. **International Agrophysics**, Poland, v.21, p.39-48, 2007.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and conservation**, Netherlands, v.16, p.69-72, 2007.

GARCÍA-GIL, J. C.; PLAZA, C.; SENESI, N. BRUNETTI, G. Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.39, p.320-328, 2004.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. 2ed. New York: Saunders College, 1999.

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**, Berlin, v.36, p.139-147, 2005.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, p.474-480, 2006.

HAACK, M. B.; OLSSON, L.; HANSEN, K.; LANTZ, A. E. Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, n.4, v.70, p.482-487, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.235-251, 2006.

HUANG, Y.; LOCY, R.; WEETE, J. D. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Geotrichum marinum*. **Lipids**, n.3, v.39, p.251-257, 2004.

HUNTER-CEVERA, J. C. The Value of Microbial Diversity. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, n.1, p.278-285, 1998.

IUBMB. **Enzyme Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

JIA-YIN, D.; LING, C.; JIAN-FU, Z.; NA, M. Characteristics of sewage sludge and distribution of heavy metal in plants with amendment of sewage sludge. **Journal of Environmental Sciences**, Netherlands, n.6, v.18, p.1094-1100, 2006.

KACPRZAK, M.; NECZAJ, E.; OKONIEWSKA, E. The comparative mycological analysis of wastewater and sewage sludges from selected wastewater treatment plants. **Desalination**, v.185, p.363-370, 2005.

KACPRZAK, M.; STANCZYK-MAZANEK, E. Changes in the structure of fungal communities of soil treated with sewage sludge. **Biology and Fertility of Soil**, Berlin, v.38, p.89-95, 2003.

KLEIN, D. A.; PASCHKE, M. W. Filamentous fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. **Microbial Ecology**, New York, v.47, p.224-235, 2004.

KROGH, K. B. R.; MØRKEBERG, A.; JØRGENSEN, H.; FRISVAD, J. C.; OLSSON, L. screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.113-116, 2004.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MELO, N. T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier FAPESP. 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier. 2000.

LITZ, N. Assessment of organic constituents in sewage sludge. **Water Science and Technology**, London, n.9, v.42, p.187-193, 2000.

LONGO, R. M.; MELO, W. J. M. Hidrólise da uréia em latossolos: efeito da concentração de uréia, temperatura, pH, armazenamento e tempo de incubação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.651-657, 2005.

LOPES, J. C.; RIBEIRO, L. G.; ARAÚJO, M. G.; BERALDO, M. R. B. S. Produção de alface com doses de lodo de esgoto. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.143-147, 2005.

LÓPEZ-DÍAZ, M. L.; MOSQUERA-LOSADA, M. R.; RIGUEIRO-RODRÍGUEZ, A. Lime, sewage

sludge and mineral fertilization in a silvopastoral system developed in very acid soil. **Agroforest Systems**, v.70, p.91-101, 2007.

MAKOI, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, n.3, v.7, p.181-191, 2008.

MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p.453-461, 2003.

MUHSIN, T. M.; HADI, R. B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. **Mycopathologia**, Netherlands, v.154, p.185-189, 2001.

NOURBAKHS, F.; MONREAL, C. M. Effects of soil properties and trace metals on urease activities of calcareous soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.40, p.359-362, 2004.

OJEDA, G.; ALCAÑIZ, J. M.; LE BISSONNAIS, Y. Differences in aggregate stability due to various sewage sludge treatments on a Mediterranean calcareous soil. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v.125, p.48-56, 2008.

OLIVEIRA, F. C.; MATTIAZZO, M. E. Metais pesados em latossolo tratado com lodo de esgoto e em plantas de cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, São Paulo, n.3, v.58, p.581-593, 2001.

PASCUAL, I.; ANTOLÍN, M. C.; GARCÍA, C.; POLO, A.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Effect of water deficit on microbial characteristics in soil amended with sewage sludge or inorganic fertilizer under laboratory conditions. **Bioresource Technology**, v.98, p.29-37, 2007.

PAZOUKI, M.; PANDA, T. Understanding the morphology of fungi. **Bioprocess Engineering**, v.22, p.127-143, 2000.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books. 1996.

PÉREZ-PIQUERES, A.; EDEL-HERMANN, V.; ALABOUVETTE, C.; STEINBERG, C. Response of soil microbial communities to compost amendments. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38,

p.460-470, 2006.

PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: aspectos legais**. Jaguariúna: Embrapa – Meio Ambiente, 2006.

PIRES, A. M. M. **Lodo de Esgoto**. Portal Ambiental. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/residuos/artigos/lodoesgoto.html>>. Acesso em: 10 mai. 2007.

PLAZA, G.; LUKASIK, W.; ULFIG, K. Effect of cadmium on growth of potentially pathogenic soil fungi. **Mycopathologia**, Netherlands, v.141, p.93-100, 1998.

RANGEL, O. J. P.; SILVA, C. A.; BETTIOL, W.; DYNIA, J. F. Efeito de aplicações de lodo de esgoto sobre os teores de metais pesados em folhas e grãos de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n.3, v.30, p.583-594, 2006.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The Genus Aspergillus**. Flórida: Robert E. Krieger Publishing Company, 1977.

ROSCOE, R.; VASCONCELLOS, C. A.; FURTINI NETO, A. E.; GUEDES, G. A. A.; FERNANDES, L. A. Urease activity and its relation to soil organic matter, microbial biomass nitrogen and urea-nitrogen assimilation by maize in a Brazilian Oxisol under no-tillage and tillage systems. **Biology and Fertility of soils**, Berlin, v.32, p.52-59, 2000.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, n.2, v.27, p.205-211, 2004.

RUIZ, B.; FARRÉS, A.; LANGLEY, E.; MASSO, F.; SÁNCHEZ, S. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**, Berlin, n.3, v.36, p.283-289, 2001.

SACKHEIM, G. I.; LEHMAN, D. D. **Química e Bioquímica para Ciências Biomédicas**. São Paulo: Manole. 2001.

SANTOS, I.; BETTIOL, W. Efeito do lodo de esgoto no crescimento micelial de fitopatógenos habitantes do solo e na podridão do colo de plântulas de feijoeiro, causadas por *Sclerotium rolfsii*, em condições controladas. **Revista Ecosystema**, São Paulo, n.2, v.26,p.159-161, 2001.

SARKAR, S.; SREEKANTH, B.; KANT, S.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Production and optimization of microbial lipase. **Bioprocess Engineering**, v.19, p.2932, 1998.

SASTRE, I.; VICENTE, M. A.; LOBO, M. C.; Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity. **Bioresource Technology**, v.57, p.19-23, 1996.

SCHLEGEL, H. G. **General Microbiology**. 7ed. New York: Cambridge University, 1997.

SCHMIDT-DANNERT, C. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.7, p.2123-2130, 1999.

SEHNEM, N. T.; BITTENCOURT, L. R.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.72, p.163-167, 2006.

SHAHINROKHSAR, P.; VAHED, H. S.; HAGHDADI, A. Evaluation of some paddy soil properties on urease enzyme activity. In: Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development, 2008, Stuttgart-Hohenheim. **Conferência...**Göttingen: Cuvillier Verlag Göttingen, 2008.

SINGH, R.; GUPTA, N.; GOSWAMI, V. K.; GUPTA, R. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.70, p.679-682, 2006.

SLYKE, D. D. V.; CULLEN, G. E. A permanent preparation of urease, and its use in the determination of urea. **The Journal of Biological Chemistry**, p.211-228, 2007.

ŠMEJKALOVÁ, M.; MIKANOVA, O.; BORŮVKA, L. Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. **Plant Soil and Environment**, Czech Republic, n.7, v.49, p.321-326, 2003.

SOLEWICZ, E. **Biotecnologia: Enzimas na Síntese Orgânica**, INT, 19, n.40, p.20-25, 1987.

STÖVEN, K.; AL-ISSA, A.; ROGASIK, J.; KRATZ, S.; SCHNUG, E. Effect of long term sewage sludge applications on micro-organisms in an arable soil. **Landbauforschung Völkenrode**, n.4, v.55, p.219-226, 2005.

SULLIVAN, T. S.; STROMBERGER, M. E.; PASCHKE, M. W. Parallel shifts in plant and soil microbial communities in response to biosolids in semi-arid grassland. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.449-459, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu. 1999.

TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; ALEM-SOBRINHO, P.; HESPANHOL, I. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001.

ULFIG, K. Influence of peptone, ammonia water and urea supplements on keratinolytic and associated non-keratinolytic fungus in sewage sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.59, p.62-68, 2007.

ULFIG, K. Studies of keratinolytic and keratinophilic fungi in sewage sludge by means of a multi-temperature hair baiting method. **Polish Journal of Environmental Studies**, Poland, n.4, v.12, p.461-466, 2003.

ULFIG, K.; TERAKOWSKI, M.; PLAZA, G.; KOSAREWICZ, O. Keratinolytic fungi in sewage sludge. **Mycopathologia**, Netherlands, v.136, p.41-46, 1996.

ULFIG, K.; PLAZA, G.; TERAKOWSKI, M.; MANKO, T. Investigation of keratinolytic and non-keratinolytic fungi grown above or below a 1-cm sewage sludge blanket. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.59, p.119-124, 2007.

VIEIRA, R. F.; CARDOSO, A. A. Variações nos teores de nitrogênio mineral em solo suplementado com lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n.7, v.38, p.867-874, 2003.

WANG, P.; ZHANG, S.; WANG, C.; HOU, J.; GUO, P.; LIN, Z. Study of heavy metal in sewage sludge and in chinese cabbage grown in soil amended with sewage sludge. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.1329-1334, 2008.

WYSZKOWSKA, J.; WYSZKOWSKI, M. Effect of cadmium and magnesium on microbiological activity in soil. **Polish Journal of Environmental**, Poland, n.5, v.11, p.585-591, 2002.

ZHANG, Y. L.; DAI, J. L.; WANG, R. Q.; ZHANG, J. Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. **European Journal of Soil Biology**, v.44, p.84-91, 2008.

ZHOU, KX.; XU, MQ.; LIU, BA.; CAO, H. Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. **Journal of Environmental Sciences-China**, Netherlands, n.4, v.20, p.482-486, 2008.

# **CAPÍTULO II**

## **FUNGOS FILAMENTOSOS DO LODO DE ESGOTO: IMPACTO NA MICROBIOTA DO SOLO E DETECÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTIICAS**

**Manuscrito a ser submetido para publicação na Revista Brazilian Archives of Biology and Technology.**

# FUNGOS FILAMENTOSOS DO LODO DE ESGOTO: IMPACTO NA MICROBIOTA DO SOLO E DETECÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

**Leite, M. V.; Alves da Silva, C. A; Okada, K.**

*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco.*

---

## ABSTRACT

This study investigated the fungi present in sewage sludge, soil and soil treated with sludge, evaluating the activity cellulase, lipase and urease isolated from the sludge. The sewage sludge was isolated from the Sewage Treatment Station of Mangueira, Recife-PE and soil collected at the Experimental Station of Itapirema-IPA, city of Goiana-PE. The isolation was performed using the technique of serial dilution and identifications made by observing the macroscopic and microscopic characteristics of the isolates based on the work described by some authors. The hydrolytic enzymes were detected by the methods described by Hankin and Anagnostakis (1975). The results show the occurrence of the impact on mycobiota soil. The genus *Chrysosporium* sp. was the best presented cellulase and lipase enzyme activity at temperatures of 28°C and 35°C. The urease activity was shown with little significant value in relation to the results of other enzymes.

**Keywords:** Sewage Sludge, Filamentous Fungi, Microbial Hydrolitic Enzyme

## INTRODUÇÃO

As Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) foram criadas com a intenção de minimizar a poluição das águas e os diversos problemas de saúde pública existentes, porém desse tratamento é gerado um resíduo denominado de lodo de esgoto, rico em matéria orgânica e nutrientes, mas com grandes quantidades de metais pesados e microrganismos patogênicos. Por esse motivo, o lodo precisa de uma disposição final adequada evitando, assim, problemas ambientais. O uso agrícola é o meio ideal para utilização desse resíduo, pois pesquisas mostram que a irrigação com lodo de esgoto melhora as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, aumentando a qualidade do mesmo (ASADU et al, 2008;

FUENTES et al, 2008; ZHANG et al, 2008).

Nas últimas décadas, o crescente aumento da utilização do lodo de esgoto na agricultura tem incentivado o estabelecimento de critérios para o seu uso, tais como a determinação do compulsório biológico, o tratamento químico, o armazenamento a longo prazo, ou mesmo algum procedimento para redução significativa do poder de fermentação do lodo junto com as inúmeras desvantagens sanitárias do seu uso. Os três principais objetivos para estabilização são a redução de patogênicos, a eliminação do cheiro desagradável e a prevenção ou redução do potencial de apodrecimento (ESTRADA et al, 2006).

No lodo de esgoto encontram-se espécies de fungos que são conhecidos como queratinolíticos, por possuírem habilidade em degradar compostos queratinosos (MUHSIN; HADI, 2001). Existem também os fungos queratinofílicos que utilizam os componentes não protéicos do substrato ou produto de decomposição da queratina (ULFIG et al, 2007). Esses microrganismos do lodo, do ponto de vista enzimático, desempenham processos aeróbicos e anaeróbicos, com enzimas secretadas ou associadas a essa microbiota, importante nos processos de hidrólises (BURGESS; PLETSCHKE, 2008). Os microrganismos do solo produzem enzimas extracelulares que mineralizam a matéria orgânica e liberam o carbono e nutrientes na forma que podem ser assimilados. Teorias econômicas do metabolismo microbiano predizem que a produção de enzimas aumenta quando nutrientes simples estão escassos e nutrientes complexos estão em abundância (ALISSON; VITOUSEK, 2005).

Geralmente, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando raízes de vegetais e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, a qual determina a ocorrência e a distribuição desses organismos. O conhecimento da micobiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos tornando-se importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas (RUEGGER, TAU-K-TORNISIELO, 2004).

Embora existam diversas lipases comerciais, a partir de várias origens e com diferente seletividade, uma intensa aplicação industrial dessas enzimas depende da redução dos custos de produção através da seleção de amostras altamente produtivas, desenvolvimento e otimização dos processos fermentativos e um bom entendimento dos mecanismos fisiológicos que conduzem as respostas microbianas para mudanças nas condições ambientais (CAMMAROTA, FREIRE, 2006).

Os fungos filamentosos são preferência industrial como produtores de enzimas, devido às fermentações industriais terem familiaridade com as condições requeridas para maximizar a

produção de proteínas homólogas por eles. São considerados também como fonte de cerca de 40% de todas as enzimas disponíveis no setor industrial, como exemplo temos a urease que catalisa a hidrólise da uréia para produção de amônia e carbamato. Este último composto decompõe espontaneamente para gerar uma segunda molécula de amônia e dióxido de carbono. A urease tem muitas aplicações industriais, como por exemplo, em bebidas alcoólicas como agente redutor de uréia, em kits de diagnósticos para medir a uréia e em biossensores de sistemas de hemodiálises para determinação de uréia no sangue (GHASEMI et al, 2004).

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar os fungos filamentosos presentes no lodo de esgoto, no solo agricultável e no solo tratado com lodo, avaliando a atividade celulásica, lipásica e ureásica dos isolados do lodo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Lodo de Esgoto, Solo Agricultável e Solo com Adição de Lodo**

O lodo de esgoto foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto Mangueira, localizada no bairro da Mangueira, Região Metropolitana do Recife-PE, oriundo do tratamento de esgoto tipicamente doméstico. O sistema de tratamento é formado por Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e manta de lodo (UASB) e lagoa de polimento, com desidratação natural do lodo de excesso do UASB em leitos de secagem, com produção de aproximadamente 10 ton/mês (massa seca com 60% de umidade) de lodo de esgoto. O solo agricultável foi coletado na Estação Experimental de Itapirema-IPA, município de Goiana-PE, que, após coleta foi seco ao ar e peneirado (5 mm). O solo agricultável recebeu doses de lodo de esgoto nas proporções de 0, 25, 50 e 75 ton/ha.

### **Isolamento da Microbiota Fúngica**

O isolamento dos fungos filamentosos presentes no lodo de esgoto, no solo agricultável e no solo com adição de lodo foi realizado através da utilização da técnica da diluição seriada e posterior plaqueamento em meios seletivos. Foi preparada a suspensão de lodo de esgoto/água, solo/água e solo fumigado/água utilizando as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Foram retirados 1mL das três últimas diluições e colocados em placas de Petri. Foi utilizado o meio de Martin ( $K_2HPO_4$  1,0g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5g; Peptona 5,0g; Dextrose 10,0g; Rosa de Bengala 0,03g; Agar 20,0g e Água Destilada 1000mL) contendo o antibiótico Cloranfenicol (0,008%). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram inoculadas a 28°C, com

observação diária para visualização das características macroscópicas das colônias.

Para o isolamento dos fungos queratinolíticos do lodo de esgoto foi utilizado o método descrito por Vanbreuseghen (1952). Amostras do lodo de esgoto foram depositadas em placas de Petri esterilizada e em seguida uma pequena quantidade de cabelos esterilizados foi depositada como fonte de queratina sobre a superfície do lodo. Um volume de água destilada estéril foi acrescentado para aumentar a umidade do sistema. As placas de Petri foram incubadas a 28°C e observadas diariamente.

### **Manutenção das Culturas**

Após a seleção, as culturas de fungos foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o Meio BDA (Batata 4,0g; Dextrose 20,0g; Agar 15,0g; Água Destilada 1000mL; pH 5,6), incubadas para crescimento a 28°C por 5 dias e mantidas a temperatura de 5°C.

### **Obtenção das Culturas Monospóricas**

Os esporos das linhagens foram transferidos do tubo de ensaio para um vidro com tampa de rosca, contendo 2ml de solução 0,1% de "Tween" 80. A suspensão foi agitada para desagregação dos esporos. Estes foram contados em câmara de Neubauer e feitas diluições apropriadas, de maneira a se conseguir de 20 a 100 colônias por placa. Um volume de 0,1mL da suspensão foi espalhado com alça de Drigalsky sobre a superfície de cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram mantidas a temperatura ambiente. A germinação dos esporos foi observada a partir de 12 até 72 horas de crescimento. Após a germinação dos esporos, com o auxílio de uma lupa, apenas um só esporo foi transferido para um tubo de ensaio, contendo BDA, para o desenvolvimento das colônias.

### **Identificação dos Fungos Filamentosos**

Foram observadas as características macroscópicas das colônias e as características morfológicas microscópicas dos isolados. Para observar as estruturas microscópicas dos isolados fúngicos foi realizada a técnica de microcultivo em lâmina (RIDDELL, 1950), com crescimento em meio BDA e logo em seguida a lâmina foi corada com Azul de Aman. As identificações foram feitas baseadas nos trabalhos descritos por RAPER e FENNEL, 1977; REBELL e TAPLIN, 1979; LARONE, 1993; ALEXOPOULOS et al, 1996; FISHER e COOK, 1998; HUNDER-CEVERA, 1998. Todos os isolados obtidos foram depositados no Banco de

Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, Recife.

### **Detecção da Atividade Enzimática**

#### **Detecção da Celulase**

Para a detecção da atividade celulásica foi utilizada a metodologia descrita por HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975). O meio de cultura (HCl 3,8g;  $K_2HPO_4$  2g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1g;  $(NH_4)_2SO_4$  1,0g; Extrato de Malte 0,5g; Carboximetilcelulose 10g; Agar 15g; Água Destilada 1000mL; pH 7.0) foi distribuído em placas de Petri, e após solidificação, um furo de 0,8cm de diâmetro foi feito no centro da placa. Alíquotas de 100 $\mu$ L da suspensão esporíca foram inoculadas e as placas incubadas à 28°C e 35°C, durante 96 horas, com acompanhamento diário. Após o período de crescimento microbiano, as placas foram reveladas com uma solução de Vermelho Congo 0,025% em tampão TRIS-HCl 0,1M (pH 8.0) durante 30 minutos, em seguida foram lavadas com uma solução de NaCl 0,5M em tampão TRIS-HCl 0,1M (pH 8.0) durante 10 minutos. A formação de um halo leitoso foi evidenciada mostrando a presença da celulase. Todos os ensaios foram efetivados em triplicata.

#### **Detecção da Lipase**

Para a detecção da atividade lipolítica foi utilizada a metodologia descrita por HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), usando meio lipase (Peptona 10g; Cloreto de Sódio 5g; Cloreto de Cálcio Bihidratado 0,1g; Agar 20g; Tween 20 10mL; Água Destilada 1000mL; pH 6.0), posteriormente distribuído em placas de Petri que após solidificação foi realizado um furo no centro da placa, onde amostras de 100 $\mu$ L da suspensão esporíca foram inoculadas e incubadas à 28°C e 35°C, durante 96 horas, com acompanhamento diário. A produção da enzima foi evidenciada com o aparecimento de um precipitado visível, devido à formação de um halo opaco em volta da colônia. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

#### **Detecção da Urease**

Para a detecção da atividade ureásica foi empregado o método de HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), utilizando Ágar Sabouraud (camada inferior), com adição de 5% de uréia. A camada superior foi feita com Agar Tampão Fosfato, acrescido de 5% de solução de

uréia e 5% de solução de Azul de Bromotimol. Após solidificação do meio de cultura, foi realizado um furo no centro da placa de Petri com diâmetro 0,8cm, onde foram inoculados 100µL da suspensão de esporos previamente preparada. As placas foram incubadas à 28°C e 35°C, durante 96 horas, com acompanhamento diário. Após o período de crescimento microbiano, a presença de um halo amarelo claro em torno da colônia indicou a presença da urease. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Análises Estatísticas**

As análises estatísticas das atividades enzimáticas foram realizadas utilizando o Software Statistica versão 7.0 da Stat Soft.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Isolamento e Identificação dos Fungos Filamentosos do Lodo de Esgoto, do Solo e do Solo com Adição de Lodo**

Foram isolados fungos filamentosos presentes no lodo de esgoto, no solo agricultável e no solo com adição de lodo e, posteriormente identificados a nível de gênero, como descrito na tabela 1.

No lodo de esgoto foram isoladas 10 amostras de fungos filamentosos que após identificação, constatou-se a presença de 5 gêneros. Desses isolados 4 colônias são pertencentes ao gênero *Monotospora* sp., 2 colônias ao gênero *Scedosporium* sp., 2 colônias ao gênero *Penicillium* sp., 1 colônia ao gênero *Chrysosporium* sp. e 1 colônia ao gênero *Aspergillus* sp. Resultados semelhantes à presença de fungos no lodo de esgoto, pertencentes aos gêneros *Chrysosporium* (*C. keratinophilum*, *C. zonatum*, *C. europae*, *C. anamorph*, *C. queenslandicum*), *Penicillium* (*P. janthinellum*) e *Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. fumigatus*, *A. alutaceus*), foram encontrados por outros autores (Ulfig et al, 1996; Marchisio (2000); Ulfig (2003); Ulfig (2007); Ulfig et al, 2007). Muhsin e Hadi (2001) isolaram e identificaram fungos do lodo de esgoto das espécies *Aspergillus flavus* e *Chrysosporium pannicola*. De acordo com Kacprzak et al (2005) o lodo de esgoto é um ambiente propício para crescimento e esporulação de diferentes grupos de fungos alguns pertencentes ao gênero *Penicillium* (*P. commune*, *P. lividum*, *P. vulpinum* e *P. granulatum*) e outros pertencentes ao gênero *Aspergillus* que também é citado por Dumontet et al (2001), como fungos oportunistas e causadores de doenças alérgicas mais encontrados nesse tipo de resíduo.

No solo agricultável foram isoladas e identificadas 23 culturas de fungos filamentosos, verificando-se a presença de 4 gêneros distintos. Dentre os fungos isolados 10 amostras pertencem ao gênero *Aspergillus* sp., 11 amostras ao gênero *Penicillium* sp.; 1 amostra ao gênero *Cladosporium* sp. e 1 amostra ao gênero *Mucor* sp. Resultados semelhantes a respeito do isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo foram encontrados no trabalho de Gams (2007), onde em seus experimentos verificou-se a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* na microbiota do solo agricultável. De acordo com Cavalcanti et al (2006) no solo estão presentes fungos filamentosos de espécies variadas e os mais frequentes entre os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* são: *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *P. canescens*, *P. corylophilum*, *P. implicatum*, *P. restrictum*. No isolamento de fungos filamentosos do solo agricultável, o maior número de isolados fúngicos foi para *Aspergillus* e *Penicillium*, como mostram também os resultados de Prade et al (2007), onde observaram a presença de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium digitatum*.

O solo agricultável recebeu doses de lodo de esgoto nas proporções de 0 (controle), 25, 50 e 75 ton/ha, as quais modificaram a quantidade de colônias existentes no solo. Com esse acréscimo do lodo ao solo, observou-se que apenas prevaleceram no solo culturas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Esses resultados sugerem que aplicações de lodo de esgoto possivelmente operam como com agente seletivo, estreitando a diversidade da população microbiana, porém para as espécies que permanecem, o lodo de esgoto não tem efeito negativo ou pode mesmo aumentar o crescimento. Os estudos semelhantes realizados por Banerjee et al (1997), mostram a diminuição da diversidade da população microbiana do solo após aplicações de lodo de esgoto, porém verificando igual ou maior biomassa total do solo. Em relação às culturas permanentes no solo após tratamento com lodo de esgoto, observamos resultados parecidos nas pesquisas desenvolvidas por Kacprzak e Stańczyk-Mazanek (2003), onde amostras do gênero *Penicillium* sp. foram encontradas no solo (controle) e no solo com adição de lodo. A presença de metais pesados no lodo de esgoto utilizado neste trabalho (tabela 2) pode ter afetado na diversidade e crescimento dos fungos habitantes do solo, como citado nos experimentos de Silva Júnior e Pereira (2007), afirmando que dentre os isolados do solo contaminado com metais, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados mais tolerantes a altas concentrações desse solo.

Tabela 1 – Fungos filamentosos isolados do lodo de esgoto, do solo agricultável e do solo com adição de lodo em diferentes doses.

Fungos Isolados	LE	SA	SA + LE		
			25 ton/ha	50 ton/ha	75 ton/ha
<i>Aspergillus</i> sp.	1	10	3	5	1
<i>Chrysosporium</i> sp.	1	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	1	-	-	-
<i>Monotospora</i> sp.	4	-	-	-	-
<i>Mucor</i> sp.	-	1	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	2	11	4	2	4
<i>Scedosporium</i> sp.	2	-	-	-	-

**Legenda:**

LE: lodo de esgoto (n° colônias)

SA: solo agricultável (n° colônias)

SA + LE: solo agricultável com adição de lodo de esgoto (n° colônias)

(-): não encontrado

Tabela 2 – Caracterização química (metais pesados) do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE.

Metais Avaliados	Teor Encontrado (mg/Kg)
Ca	1180 ± 0,02
Mg	755 ± 0,004
Al	14600 ± 0,3
Zn	600 ± 0.01
Cu	909.8 ± 0.001
Ni	10 ± 0,01
Cd	2,2 ± 0.0004
Fe	2390 ± 0,2
Mn	189 ± 0,003
Cr	22 ± 0,001

O lodo de esgoto não apresentou fungos queratinolíticos, possivelmente devido a sua eliminação em algumas das etapas de produção desse resíduo, acentuando mais ainda o uso do lodo na agricultura. Isso ressalva que a probabilidade de haver patógenos é mínima, proporcionando menor risco a saúde do agricultor que manuseia o solo com acréscimo de lodo. Existem outras técnicas para o isolamento desses queratinolíticos, usando diferentes tipos de iscas (crina de cavalo e unhas); isso pode justificar o fato da ausência desses fungos no isolamento feito através da técnica escolhida neste trabalho.

### **Características Microscópicas dos Isolados**

Foram observadas as características microscópicas dos isolado do lodo de esgoto. Nas amostras pertencentes ao gênero *Penicillium* sp. (figura 1a) observam-se as estruturas de hifas hialinas septadas, conidióforos monoverticilado, fiálides e conídios em cadeia, e conídios esféricos e lisos. Nas amostras pertencentes ao gênero *Monotospora* sp. (figura 1b), mostram-se hifa septada sub-hialina, conídios arredondados com parece celular espessa dispostos lateralmente ou no ápice de conidióforos bastante curtos. As amostras do gênero *Scedosporium* sp. (figura 1c), apresentam-se com hifas hialinas septadas, conídios subglobosos com parede celular espessa, dispostos lateralmente ou no ápice de conidióforos curtos. A amostra do gênero *Chrysosporium* sp. (figura 1d), mostra-se com hifas septadas hialinas, conídios piriformes e clavados dispostos de modo isolado nas extremidades ou ao lado das hifa. A amostra pertencente ao gênero *Aspergillus* sp. (figura 1e), apresenta hifas septadas hialinas e largas, cabeças conidiais azuis e conídios esféricos em cadeias.

Foram observadas as características microscópicas dos isolado do solo agricultável. Nas amostras do gênero *Aspergillus* sp. (figura 2a), observam-se as estruturas de hifas hialinas septadas e espessas, cabeças conidiais azuis e conídios esféricos em cadeias longas. As amostras pertencentes ao gênero *Penicillium* sp. que são biverticilados (figura 2b), apresentam-se com estruturas de hifas hialinas septadas, conidióforos biverticilados, fiálides e conídios em cadeia e conídios esféricos. Nas amostras do gênero *Penicillium* sp. monoverticilado (figura 2c), mostram hifas hialinas septadas, conidióforos monoverticilados, fiálides e conídios em cadeia. Na amostra do gênero *Cladosporium* sp. (figura 2d), verificam-se hifas são septadas, mostrando longas cadeias de conídios esparsamente ramificados, nascendo diretamente das hifas, cadeias de conídios alongados, sub-hialinos com extremidades afiladas. Na amostra do gênero *Mucor* sp. (figura 2e), observa-se a presença de hifas não septadas, esporangióforos eretos, terminais, globosos ou esféricos e esporângio multiesporulado.

Foram observadas as características microscópicas dos isolados do solo com adição de lodo de esgoto nas doses de 0, 25, 50 e 75 tons/ha. Nas três doses foram encontrados fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. As amostras do gênero *Aspergillus* sp. (figura 3a), apresentam-se com hifas hialinas septadas e largas, cabeças conidiais azuis e conídios esféricos em cadeias longas. Nas amostras pertencentes ao gênero *Penicillium* sp. (figura 3b), verificam-se hifas hialinas septadas, conidióforos biverticilados, fiálides e conídios em cadeia e conídios esféricos.

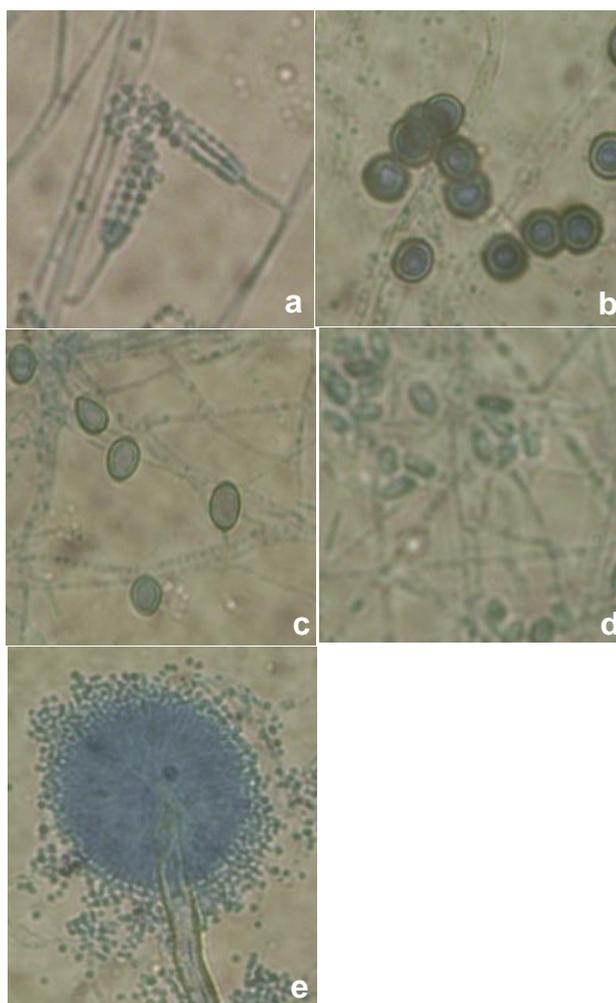


Figura 1 – Fotografias microscópicas dos isolado do lodo de esgoto, corados com Azul de Aman. (a) *Penicillium* sp.; (b) *Monotospora* sp.; (c) *Scedosporium* sp.; (d) *Chrysosporium* sp.; (e) *Aspegillus* sp.

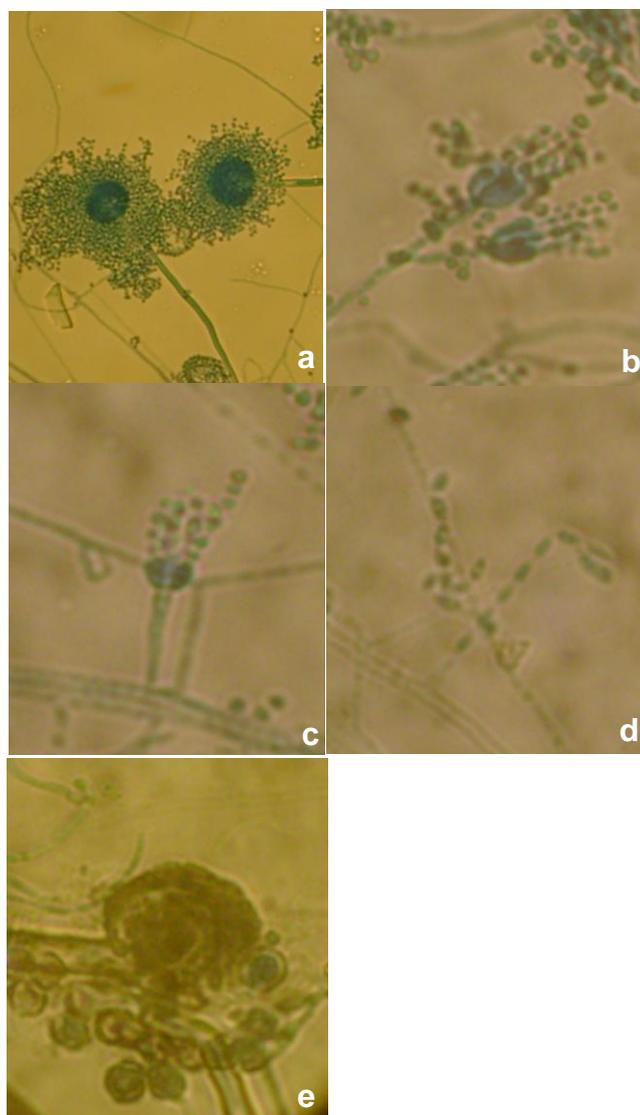


Figura 2 – Fotografias microscópicas dos isolados do solo agricultável, corados com Azul de Aman. (a) *Aspergillus* sp.; (b) *Penicillium* sp. biverticilado; (c) *Penicillium* sp. monoverticilado; (d) *Cladosporium* sp.; (e) *Mucor* sp.

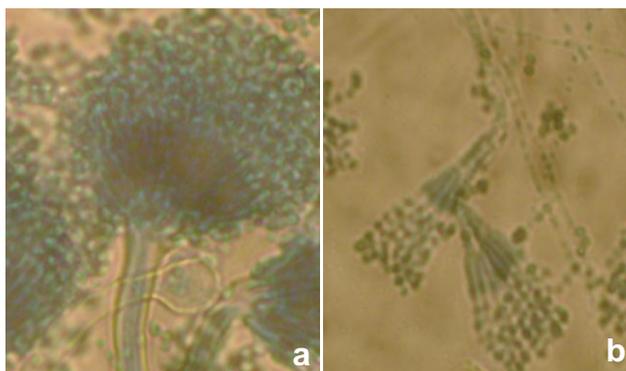


Figura 3 – Fotografias microscópicas dos isolados do solo com adição de lodo de esgoto. (a) *Aspergillus* sp.; (b) *Penicillium* sp.

### Perfil Enzimático da Micobiota Isolada do Lodo de Esgoto

Foram analisadas as detecções das atividades celulásica, lipásica e ureásica dos fungos filamentosos isolados do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE, cultivados em meio sólido por 4 dias, nas temperaturas de 28°C e 35°C, como mostram as figuras 4, 5 e 6.

Na atividade enzimática da celulase a 28°C, as amostras do gênero *Penicillium* sp. e a amostra do gênero *Scedosporium* sp. (FL-3) não apresentaram atividade enzimática; os demais isolados mostraram resultados pouco significantes, exceto a amostra do gênero *Chrysosporium* sp. que apresentou uma boa atividade com 10 mm de diâmetro de halo. Na temperatura de 35°C, todas as amostras apresentaram atividade celulásica, exceto os isolados do gênero *Penicillium* sp. A cultura do gênero *Chrysosporium* sp. destacou-se também nesta temperatura com formação de halo de 17 mm de diâmetro. Analisando a influência da temperatura na atividade celulásica, observa-se que a temperatura de 35°C foi a que melhor detectou a presença dessa enzima, afirmando que a atividade enzimática é influenciada pela temperatura neste caso, como verificado na figura 4.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), mostrando que a zona mais clara ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação da carboximetilcelulose, foi observada em 45% dos fungos. Apenas 36% não apresentaram halo indicador da degradação da carboximetilcelulose considerado como fonte de carbono e 19% não cresceram nas condições oferecidas pelo experimento. Segundo Massadeh et al (2001), amostra de *Aspergillus terreus* apresenta alto potencial hidrolítico para as enzimas celulolíticas na fermentação em substrato sólido.

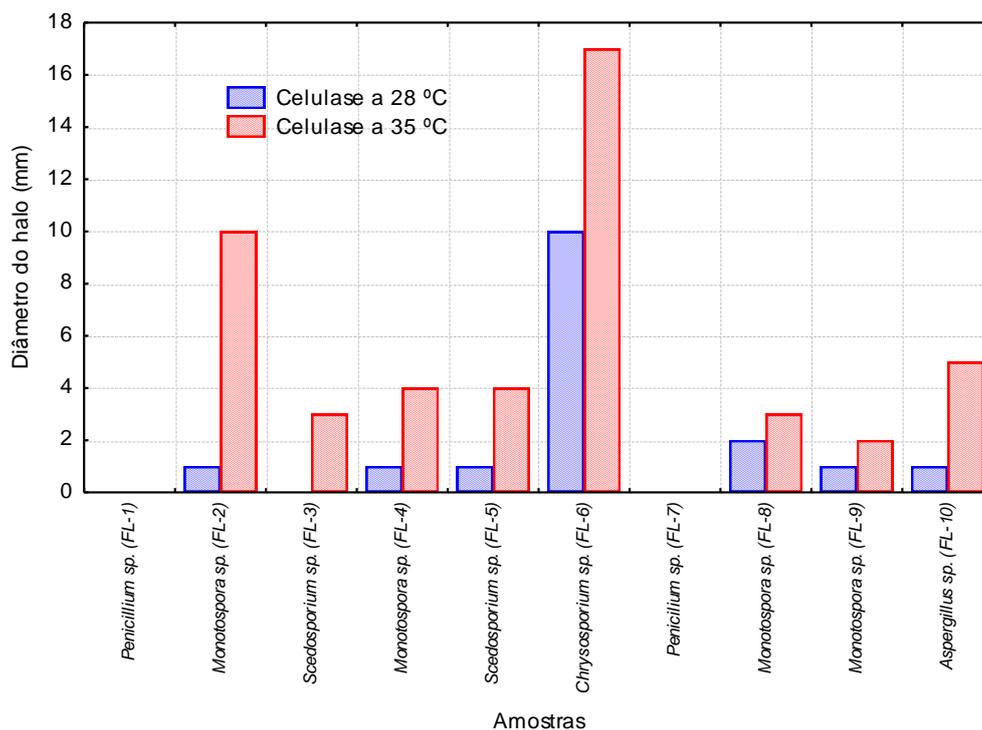


Figura 4 – Atividade celulásica dos fungos filamentosos do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE, cultivados em meio sólido por 4 dias nas temperaturas de 28°C e 35°C.

No estudo da lipase, apenas uma amostra do gênero *Penicillium sp.* (FL-7) mostrou resultado negativo à 28°C, as demais culturas apresentaram resultados razoáveis quanto a detecção lipásica, com exceção das amostras dos gêneros *Monotospora sp.* (FL-4) e *Chrysosporium sp.* que apresentaram os maiores resultados com diâmetro de halo 10 mm. Na temperatura de 35°C, verificou-se atividade lipolítica em todas as culturas testadas, com destaque para *Monotospora sp.* (FL-2) e *Chrysosporium sp.* apresentando valores de 10 mm de diâmetro de halo. Assim como na celulase, na atividade enzimática da lipase também houve uma positiva influência da temperatura, mostrando melhor atuação na detecção para a temperatura de 35°C como apresentado na figura 5.

Azeredo et al (2007) usaram os lipídios como fonte de carbono para produção de lipase por *Penicillium restrictum* e observaram atividade lipásica na fermentação em estado sólido. Dutra et al (2008) mostrou resultados similares na produção de lipase através da fermentação em estado sólido usando *Aspergillus niger*, onde a atividade lipásica variava significativamente entre 24 e 96 horas de fermentação, observando que a atividade máxima da lipase ocorria com 72 horas.

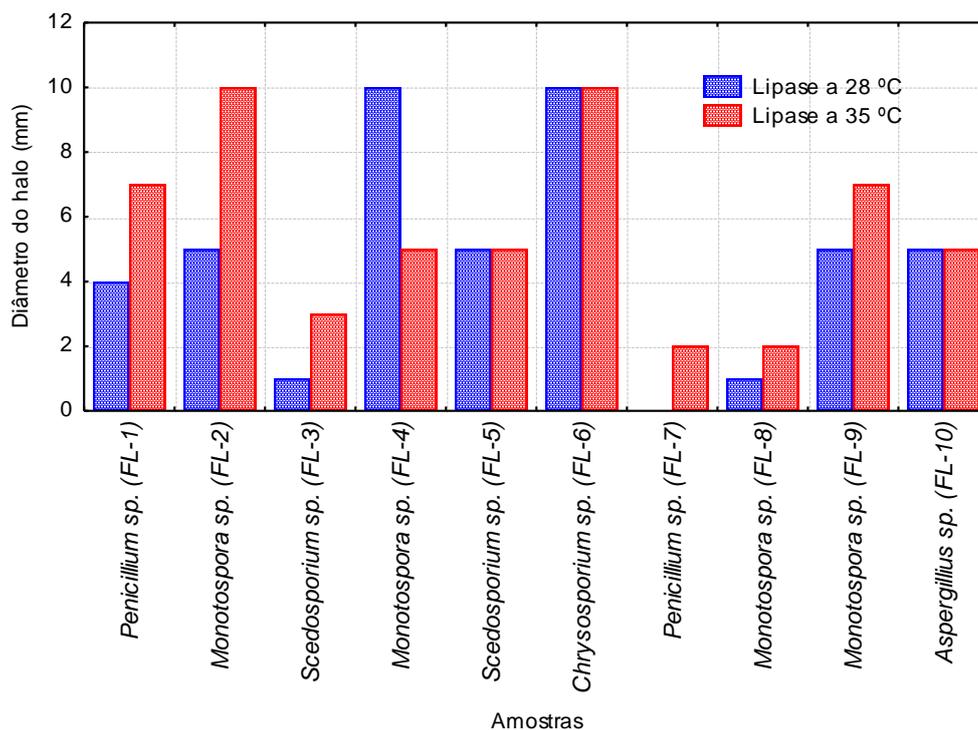


Figura 5 – Atividade lipásica dos fungos filamentosos do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE, cultivados em meio sólido por 4 dias nas temperaturas de 28°C e 35°C.

Na detecção da urease foram obtidos resultados inferiores em relação à atividade das outras enzimas já citadas. As amostras dos gêneros *Scedosporium sp. (FL-3)*, *Chrysosporium sp.* e *Monotospora sp. (FL-8)* foram as únicas que apresentaram atividades enzimáticas na temperatura de 28°C. Na temperatura de 35°C apenas as amostras pertencentes ao gênero *Chrysosporium sp.* e duas do gênero *Monotospora sp. (FL-8 e FL-9)* apresentaram atividade ureolítica. A temperatura praticamente não influenciou na atividade ureásica como observado na figura 6.

Os resultados da urease não se mostraram satisfatórios, possivelmente devido a presença de metais pesados no lodo de esgoto, como reportado por Nourbakhsh e Monreal (2004), onde a presença de metais inibe a urease, citando o Cr, Pb e Cd que causam esse efeito inibitório para atividade ureásica. Smejkalová et al (2003), também citam que concentrações de metais pesados afetam a atividade enzimática do solo, diminuindo as espécies microbianas existentes no local estudado.

Comparando as três atividades enzimáticas detectadas pelos fungos filamentosos, observamos que a atividade lipásica foi a de maior destaque, com aproximadamente 90% de

hidrólise de lipídios. Em relação as temperaturas testadas, observa-se que todas as amostras que apresentaram atividade enzimática, mostraram melhor capacidade hidrolítica na temperatura de 35°C.

A influência da temperatura é um fator importante na detecção enzimática e segundo Sarkar et al (1998), a seleção da temperatura ótima para produção de lipase varia entre 25 e 45°C, mantendo outros processos de condições semelhantes. A atividade da lipase foi máxima no terceiro dia de incubação a 37°C. De acordo com Longo e Melo (2005), a temperatura de incubação influencia na velocidade da hidrólise enzimática e, em seu experimento sugerem o uso da temperatura aproximada do local onde foi isolado o microrganismo para que obtenha a máxima atividade enzimática possível.

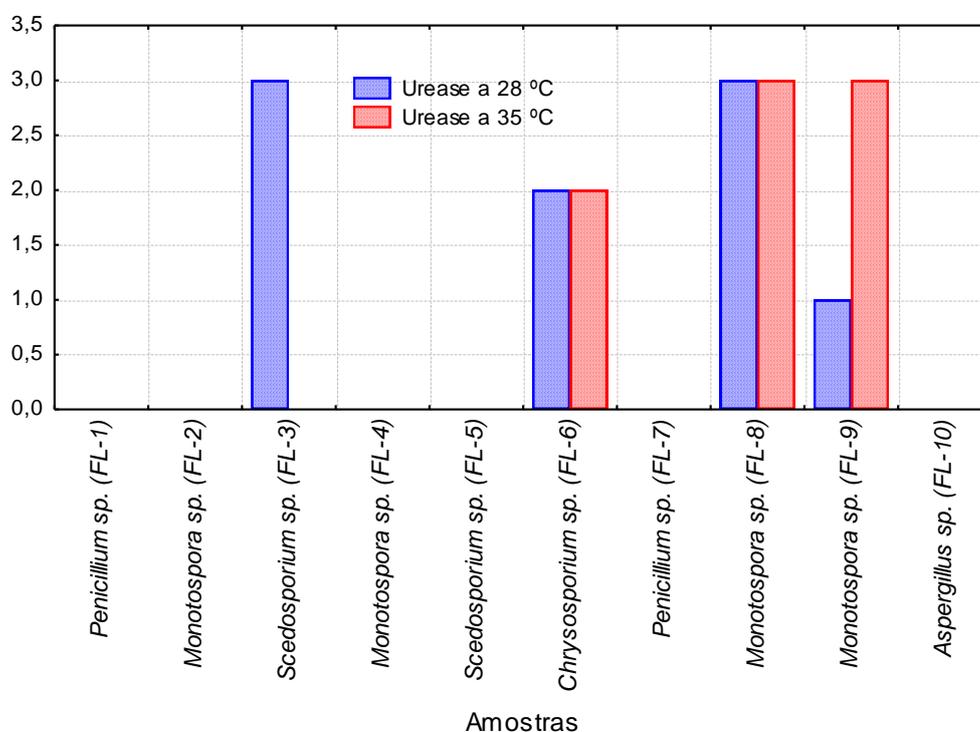


Figura 6 – Atividade ureásica dos fungos filamentosos do lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-PE, cultivados em meio sólido por 4 dias nas temperaturas de 28°C e 35°C.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, a FIUC e a UNICAP pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Este trabalho objetivou estudar os fungos filamentosos presentes no lodo de esgoto, no solo e no solo tratado com lodo, avaliando a atividade celulásica, lipásica e ureásica dos isolados do lodo. O lodo de esgoto foi isolado da Estação de Tratamento de Esgoto Mangueira, Recife-PE e o solo coletado na Estação Experimental de Itapirema-IPA, município de Goiana-PE. O isolamento foi realizado através da utilização da Técnica da Diluição Seriada e as identificações feitas através da observação das características macroscópicas e microscópicas dos isolados baseadas nos trabalhos descritos por alguns autores. As enzimas hidrolíticas foram detectadas pela metodologia descrita por HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975). Os resultados mostram a ocorrência do impacto na micobiota do solo. O gênero *Chrysosporium* sp. foi o que melhor apresentou atividade enzimática celulásica e lipásica nas temperaturas de 28°C e 35°C. A atividade ureásica mostrou-se com valores pouco significantes em relação aos resultados das demais enzimas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. (1996), *Introductory Mycology*, ed. 4. John Wiley & Sons, New York
- ALLISSON, S. D.; VITOUSEK, P. M. (2005), Response of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**, 937-944
- ASADU, C. L. A.; UKADIKE, B.; AGADA, C. (2008), Assessment of sewage application in southeastern Nigéria – Part 2: Impact on soil chemical properties, trace and heavy metal accumulation in soil and underground water. *Outlook on Agriculture*, **37**, 63-69
- AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANNA Jr., G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. (2007), Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*, **54**, 361-365
- BANERJEE, M. R.; BURTON, D. L.; DEPOE, S. (1997), Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **66**, 241-249
- BURGESS, J. E.; PLETSCHKE, B. I. (2008), Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: a mini-review. *Water SA*, **34**, 343-349
- CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. (2006), A review on hydrolytic enzyme in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, **97**, 2195-2210

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. (2006), Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, **20**, 831-837

COLODRO, G.; ESPÍNDOLA, C. R.; CASSIOLATO, A. M. R.; ALVES, M. C. (2007), Atividade microbiana em um Latossolo degradado tratado com lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **11**, 195-198

DUMONTET, S.; SCOPA, A.; KERJE, S.; KROVACEK, K. (2001), The importance of pathogenic organisms in sewage and sewage sludge. *Journal of the Air & Waste Management Association*, **51**, 848-860

DUTRA, J. C. V.; TERZI, S. C.; BEVILAQUA, J. V.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; LANGONE, M. A. P.; SENNA, L. F. (2008), Lípase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Applied Biochemistry Biotechnology*, **147**, 63-75

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S. S.; BHATTAXHARJEE, A.; GHOSH, S. (2008), Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**, 275-282

ESTRADA, I. B.; GÓMEZ, E.; ALLER, A.; MORÁN, A. (2006), Microbial monitoring of the influence of the stabilization degree of sludge when applied to soil. *Bioresource Technology*, **97**, 1308-1315

FISHER, F.; COOK, N. B. (1998), *Fundamentals of Diagnostic Mycology*. W.B. Saunders Company, Totowa

FUENTES, A.; LLORÉNS, M.; SÁEZ, J.; AGUILAR, M. I.; ORTUNO, J. F.; MESEGUER, V. F. (2008), Comparative study of six different sludges by sequential speciation of heavy metals. *Bioresource Technology*, **99**, 517-525

FURCZAK, J.; JONIEC, J. (2007), Preliminary study of sludge effect on soil microbial activity of a podzolic soil under willow culture. *International Agrophysics*, **21**, 39-48

GAMS, W. (2007). Biodiversity of soil-inhabiting fungi. *Biodiversity and conservation*, Netherlands, **16**, 69-72

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKI, S. L. (1975), The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, **67**, 597-607

HUNTER-CEVERA, J. C. (1998), The Value of Microbial Diversity. *Current Opinion in Microbiology*, **1**, 278-285

KACPRZAK, M.; NECZAJ, E.; OKONIEWSKA, E. (2005), The comparative mycological analysis of wastewater and sewage sludges from selected wastewater treatment plants. *Desalination*, **185**, 363-370

KACPRZAK, M.; STANCZYK-MAZANEK, E. (2003), Changes in the structure of fungal communities of soil treated with sewage sludge. *Biology and Fertility of Soil*, **38**, 89-95

LARONE, D.H. (1993), *Medically Important Fungi: a guide to Identification*. American Society for

Microbiology. New York

LONGO, R. M.; MELO, W. J. M. (2005), Hidrólise da uréia em latossolos: efeito da concentração de uréia, temperatura, pH, armazenamento e tempo de incubação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, **29**, 651-657

MARCHISIO, V. F. (2000), Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 86-92

MASSADEH, M. I.; YUSOFF, W. M. W.; OMAR, O.; KADER, J. (2001), Synergism of cellulase enzyme in mixed culture solid substrate. *Biotechnology Letters*, **23**, 1771-1774

MUHSIN, T. M.; HADI, R. B. (2001), Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia*, **154**, 185-189

NOURBAKHSH, F.; MONREAL, C. M. (2004), Effects of soil properties and trace metals on urease activities of calcareous soils. *Biology and Fertility of Soils*, **40**, 359-362

PRADE, C. A.; MATSUMURA, A. T.; OTT, A. P.; PORTO, M. L. (2007), Diversidade de fungos do solo em sistemas agroflorestais de *Citrus* com diferentes tipos de manejo no município de Roca Sales, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, **15**, 73-81

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. (1977), *The Genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company, Flórida.

REBELL, G.; TAPLIN, D. (1979), *Dermatophytes: their Recognition and Identification*. University of Miami Press, Florida

RIDDELL, R. W. (1950), Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*, **42**, 265-270

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. (2004), Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **27**, 205-211

SARKAR, S.; SREEKANTH, B.; KANT, S.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. (1998), Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess Engineering*, **19**, 29-32

SEHNEM, N. T.; BITTENCOURT, L. R.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. (2006), Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Applied Microbiology Biotechnology*, **72**, 163-167

SILVA JÚNIOR, F. M. R.; PEREIRA, S. V. (2007), Ecologia e fisiologia de fungos filamentosos isolados de solo contaminado por metais pesados. *Revista Brasileira de Biociências*, **5**, 903-905

ŠMEJKALOVÁ, M.; MIKANOVÁ, O.; BORŮVKA, L. (2003), Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. *Plant Soil and Environment*, **49**, 321-326

STÖVEN, K.; AL-ISSA, A.; ROGASIK, J.; KRATZ, S.; SCHNUG, E. (2005), Effect of long term sewage sludge applications on micro-organisms in an arable soil. *Landbauforschung Völkenrode*, **55**, 219-226

ULFIG, K.; TERAKOWSKI, M.; PLAZA, G.; KOSAREWICZ, O. (1996). Keratinolytic fungi in sewage sludge. *Mycopathologia*, Netherlands, **136**, 41-46

ULFIG, K. (2003), Studies of keratinolytic and keratinophilic fungi in sewage sludge by means of a multi-temperature hair baiting method. *Polish Journal of Environmental Studies*, **12**, 461-466

ULFIG, K.; PLAZA, G.; TERAKOWSKI, M.; MANKO, T. (2007), Investigation of keratinolytic and non-keratinolytic fungi grown above or below a 1-cm sewage sludge blanket. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **59**, 119-124

ULFIG, K. (2007), Influence of peptone, ammonia water and urea supplements on keratinolytic and associated non-keratinolytic fungus in sewage sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **59**, 62-68

VANBREUSEGHEM, R. (1952), Technique biologique pour l'isolament des dermatophytes du sol. *Annales de La Societe Belge de Me'dicine Tropicale*, **32**

ZHANG, Y. L.; DAI, J. L.; WANG, R. Q.; ZHANG, J. (2008), Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. *European Journal of Soil Biology*, **44**, 84-91

# CAPÍTULO III

## CONCLUSÕES GERAIS

- No lodo de esgoto estão presentes fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Chrysosporium* sp., *Monotospora* sp., *Penicillium* sp. e *Scedosporium* sp.;
- No solo agricultável estão presentes os fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp. e *Penicillium* sp.;
- No solo agricultável com adição de lodo de esgoto, encontram-se apenas os gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., afirmando o impacto causado na microbiota do solo após as aplicações de lodo;
- A melhor atividade celulolítica foi verificada pela amostra do gênero *Chrysosporium* sp. nas temperaturas de 28°C e 35°C;
- Todas as culturas de fungos filamentosos apresentaram atividade lipolítica, destacando o gênero *Chrysosporium* sp. com melhores resultados nas duas temperaturas testadas.
- A atividade enzimática da urease mostrou-se com valores pouco significantes em relação aos resultados das demais enzimas;
- As amostras de fungos filamentosos apresentaram melhor capacidade hidrolítica na temperatura de 35°C.

# **ANEXOS**

## Instruções da Revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*

### INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

**Submission of papers:** *Brazilian Archives of Biology and Technology* publishes original research papers, Short notes and Review articles in English in the interdisciplinary areas of biological sciences and engineering/technology. Submission of paper implies that it has not been published or being considered for publication elsewhere. Care should be taken to prepare a compact manuscript with precision in presentation, which will help authors in its acceptance. All the papers are subjected to review by referees.

**Manuscript:** Three copies of the single-spaced typed manuscript (maximum 12 pages for original and review articles and 2-4 pages for short notes) on a high grade A-4 size paper (210x297 mm), with margins (left 25, right 20, superior and inferior 30 mm) should be prepared. This should be divided under the following headings: ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS, RESUMO, REFERENCES. These headings should be typed in bold upper case (12 font). For review articles, authors should make their own headings along with Abstract and Introduction.

**Title:** The title (18 font, bold) of the paper should clearly reflect its contents. It should be followed by the name(s) of author(s) with expanded initials (12 font, bold) and the address(s) (*italic*, 10 font) of the institution(s) where the work has been carried out.

**ABSTRACT:** Each paper should be provided with an abstract (*italic*) of 100-150 words, describing briefly on the purpose and results of the study. It should be prepared as concisely as possible.

**Key words:** Authors should provide three to six key words that will be used in indexing their paper.

**INTRODUCTION:** This should describe the background and relevant information about the work. It should also state the objective of the work.

**MATERIALS AND METHODS:** Authors must take care in providing sufficient details so that others can repeat the work. Standard procedures need not be described in detail.

**RESULTS AND DISCUSSION:** Results and Discussion may be presented separately or in combined form (authors may decide easier way for them). Preliminary work or less relevant results are not to be described. The reproducibility of the results, including the number of times the experiment was conducted and the number of replicate samples should be stated clearly.

**RESUMO:** An abstract of the paper should also be prepared in Portuguese and placed before the list of References. Authors from other than Latin American countries can seek the help of Editor's office to prepare Portuguese resumo of their papers.

**REFERENCES:** References in the text should be cited at the appropriate point by the name(s) of the author(s) and year (e.g. Raimbault & Roussos, 1996; Raimbault *et al.*, 1997). A list of references, in the alphabetic order (10 font), should appear at the end of the manuscript. All references in the list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished results should not be included in the list. Examples of references are given below.

*In journals:*

Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, **27**, 109-117.

*Thesis:*

Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

*In books:*

Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In-*Advances in Biotechnology*, ed. A. Pandey. Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16.

Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi. *In conferences:*

Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6th International Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah.

**Tables and Figures:** Tables and figures, numbered consecutively with arabic numerals must be inserted at appropriate place in the text. These should be used to present only those data, which can not be described in the text.

**Units and Abbreviations:** The SI system should be used for all experimental data. In case other units are used, these should be added in parentheses. Only standard abbreviations for the units should be used. Full stop should not be included in the abbreviation (e.g. m, not m. or rpm, not r.p.m.). Authors should use '%' and '/' in place of 'per cent' and 'per'.

**Manuscript lay-out:** It is suggested that authors consult a recent issue of the journal for the style and layout. Except the title, abstract and key words, entire text should be placed in two columns on each page. Footnotes, except on first page indicating the corresponding author (8 font) should not be included. The entire manuscript should be prepared in Times New Roman, 11 font (except reference list, which should be in 10 font).

**Spacing:** Leave one space between the title of the paper and the name(s) of the author(s), and between the headings and the text. No space should be left between the paragraphs in the text. Leave 0.6-cm space between the two columns.

**Electronic submission:** Manuscript should be accompanied by a diskette indicating the name and version of the word processing programme used (use only MS Word 6/7 or compatible).

**Referees:** When submitting the manuscript authors may suggest up to three referees, preferably from other than their own countries, providing full name and address with email. However, the final choice of referees will remain entirely with the Editor.

**Page charges and reprints:** There will be no page charges. Reprints can be ordered up on acceptance of the paper. Manuscripts and all correspondence should be sent to the Editor: Prof. Dr. Carlos R. Soccol **Brazilian Archives of Biology and Technology** Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775-CIC 81350-010 Curitiba-PR, Brazil Fax +55-41-247 67 88 Email:niet@tecpa.br.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)