

### III-161 – ACOMPANHAMENTO DE PROCESSO DE VERMICOMPOSTAGEM POR MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA

**André L. Barbosa<sup>(1)</sup>**

Graduando em Engenharia Sanitária e Ambiental. Técnico em Química, ambos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes). Auxiliar de Laboratório, Ifes, Campus Piúma

**Wanda Maria Risso Günther<sup>(2)</sup>**

Engenheira Civil e Cientista Social. Mestre e Doutora em Saúde Pública pela USP. Professora titular do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública, USP. Vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação Ambiente, Saúde e Sustentabilidade da FSP/USP.

**Adriana M. N. Korres<sup>(1)</sup>**

Bióloga pela UFES, Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia, Professora do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental e do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Sustentáveis, Ifes, Campus Vitória

**Jacqueline R. Bringhenti<sup>(1)</sup>**

Engenheira Civil pela UFES, Doutora em Saúde Pública pela USP, Professora do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental e do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Sustentáveis, Ifes, Campus Vitória

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Vitória, 1729 - Jucutuquara - Vitória - ES - CEP: 29040-780 - Brasil - Tel: (27) 3331-2237 - e-mail: [akorres@gmail.com](mailto:akorres@gmail.com)

**Endereço<sup>(2)</sup>:** Av. Dr. Arnaldo 715 – Pinheiros - São Paulo – SP - CEP: 01255-001 - Brasil - Tel: (11) 3331-2237 - e-mail: [wgunther@usp.br](mailto:wgunther@usp.br)

#### RESUMO

No Brasil aproximadamente 51% dos resíduos sólidos urbanos coletados são constituídos por resíduos orgânicos. Entre as formas de valorização de resíduos orgânicos e destinação ambientalmente adequada, a compostagem é um método de tratamento preconizado pela Política Nacional de Resíduos Sólidos. Entre os métodos de compostagem, destaca-se a vermicompostagem pela inserção de minhocas que contribuem para o processo de humificação da matéria orgânica. O presente trabalho visa entender como se comportam visual, biológica e microbiologicamente, as etapas por que passa o processo da degradação e humificação da matéria orgânica e das estruturas vegetais durante o processo de vermicompostagem de resíduos de uma instituição de ensino, com a utilização de microscopia. Para tanto foram montadas 3 vermicomposteiras com resíduos orgânicos gerados em 10 setores da instituição, das quais 2 foram selecionadas. Foram inseridas 80 lâminas de vidro (40 em cada vermicomposteira), como meio suporte à adesão de biofilmes e material em decomposição, sendo as amostragens realizadas em intervalos de 15 dias, num período total de 60 dias. As amostras foram fixadas e preparadas para registro em microscopia óptica e eletrônica de varredura. Os resultados indicam a degradação da matéria orgânica das fibras vegetais concomitantemente ao aumento da biodiversidade da microbiota, no decorrer das campanhas de coleta. Após os 60 dias é nítido o desenvolvimento fúngico, característico da fase de maturação por esse método de tratamento de resíduos orgânicos. Estudos como este, ainda escassos, visam colaborar com a geração de conhecimento sobre compostagem quanto à produção de informações sobre a degradação de matéria orgânica, em nível microscópico, com vistas a otimizar o processo que se desencadeia na compostagem e na vermicompostagem. Considerando que se trata de um método naturalmente simples, seguro e nobre de destinação final de resíduos sólidos orgânicos, o acompanhamento da compostagem pela microscopia pode vir a colaborar com a celeridade e indicar fases específicas do processo, com vistas ao seu gerenciamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Vermicompostagem, Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura, Lâminas de vidro.

## INTRODUÇÃO

Qualquer ser vivo em suas atividades diárias produz alguma forma de rejeito que lhe é peculiar, nesse sentido é de se imaginar que quanto maior a biodiversidade e a quantidade de seres vivos maior será a gama de rejeitos produzidos. Também é naturalmente notório que aquilo que é considerado rejeito para uns, para outros pode ser aproveitável (nesse sentido surge o termo resíduo). Um bom exemplo são as folhas que caem da copa das árvores e que são aproveitadas por outros indivíduos como pássaros, fungos, bactérias, microartrópodes etc. Enfim, o que se observa na natureza é uma harmonia na reciclagem de matéria. Contudo, quando um dos pesos no prato dessa balança tende a desequilibrá-la, uma cadeia de eventos pode surgir e, eventualmente, perturbar o equilíbrio natural estabelecido.

Toda espécie, em especial a humana, desde seu surgimento buscou maneiras energeticamente mais econômicas para sobreviver. Particularmente importante, um marco nessa busca foi o desenvolvimento industrial iniciado no século XVIII. O aumento significativo da produção de consumíveis, juntamente com a redução da mortalidade em função da melhoria da qualidade de vida proporcionada por ações de saneamento, vieram acompanhadas de notável crescimento populacional. Imagine a situação hipotética: um lugar onde cerca de 7 bilhões de habitantes, ainda em crescimento, são habitualmente influenciadas a consumirem desenfreadamente qualquer sorte de produtos, mesmo que desnecessariamente. Pois bem, este é o cenário mundial atual.

Colocada a dimensão e visando sua mitigação - ao menos em parte - hoje a problemática enfrentada em relação aos resíduos sólidos gerados é motivo de preocupação internacional. Muitas são as tentativas de encontrar soluções rápidas, porém duradoras. Inúmeros são as práticas e os estudos em torno do reaproveitamento, reciclagem e reutilização de resíduos sólidos. De todos os resíduos sólidos gerados, os orgânicos, em algumas situações, podem figurar em posição de destaque; por vezes constituindo proporções superiores a 50% da totalidade dos Resíduos Sólidos Urbanos (RSU), em especial em países em desenvolvimento.

No Brasil aproximadamente 51% dos resíduos sólidos urbanos coletados são constituídos por resíduos orgânicos (ALVAREZ, 2012), que poderiam ser desviados aos aterros sanitários e receber outra forma de destinação. Notadamente em nosso país a Política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei 12.305/2010) sugere, entre as formas ambientalmente adequadas de destino de resíduos sólidos, a compostagem. A compostagem é um método de decomposição aeróbia acelerada e controlada de substratos orgânicos realizada por microrganismos cujo resultado é um produto estabilizado e enriquecedor do solo (MEIRA; CAZZONATTO; SOARES, 2012). Optar por essa alternativa, na destinação da fração de resíduos orgânicos, aumentaria significativamente a vida útil dos aterros sanitários e reduziria os impactos decorrentes da geração de gases de aterro (biogás), de importante contribuição para os gases de efeito estufa (GEE). Além disso, os aterros sanitários, pela necessidade de constante monitoramento, incrementam os custos operacionais dessa modalidade de destino de RSU, ainda muito utilizada no país. Embora a disposição final de RSU tenha avançado nos últimos anos, segundo informações da Abrelpe (2015) ainda não é satisfatória. Apenas 58,7% vai para disposição adequada em aterros sanitários, enquanto aterros controlados e lixões recebem, respectivamente, 24,1% e 17,2%.

Nesse sentido, a compostagem configura-se não apenas como alternativa viável aos problemas enfrentados pelos aterros sanitários, mas como opção para transformar resíduos sólidos orgânicos em produto final (composto orgânico), rico em nutrientes que pode ser empregado como condicionador do solo.

Mundialmente, dois processos de estabilização da matéria orgânica se destacam: a compostagem e a vermicompostagem (DORES-SILVA; LANDGRAF; REZENDE, 2013). A vermicompostagem caracteriza-se por, adicionalmente à degradação aeróbia da matéria orgânica, utilizar minhocas nessa transformação que, neste caso, é realizada pela ação combinada entre a minhoca e a microbiota que vive em seu trato digestivo (AQUINO; ALMEIDA; SILVA, 1992). Também difere a vermicompostagem da compostagem convencional pela necessidade de se controlar a temperatura do processo - que não deve ultrapassar os 35°C e que pode ser conseguida reduzindo-se a espessura da leira (ou pilha de resíduo). A não necessidade de revolvimento, pois o material é revirado pelo deslocamento das minhocas (AQUINO; ALMEIDA; SILVA, 1992), também é outra vantagem da vermicompostagem em relação à compostagem, visto que a geração de bioaerossóis durante os estágios de revolvimento mecânico do material pode acarretar riscos à saúde do operador (FRACCHIA et al., 2006). O monitoramento e controle da temperatura e de outros parâmetros como a umidade podem reduzir o tempo de decomposição e aumentar a qualidade do composto final.

Em termos de monitoramento do processo de biodegradação, esta pode ser acompanhada por meio de microscopia óptica e eletrônica de varredura pode-se acompanhar como acontece a biodegradação dos resíduos, até a conversão da matéria orgânica em composto orgânico, assim como se processa a mineralização dos resíduos em escala microscópica.

Estudos conduzidos por microscopia eletrônica de varredura têm mostrado a possibilidade de acompanhar o processo de biodegradação que ocorre na compostagem. O monitoramento é uma etapa importante para viabilizar as iniciativas de compostagem no sentido de se conhecer e acompanhar a maturidade do vermicomposto (SENTHIL KUMAR et al., 2014) e analisar a distribuição de microrganismos e o estágio de degradação da lignina durante a compostagem (ZOU et al., 2015). O acompanhamento dos parâmetros físicos e químicos nos processos de compostagem são bastante utilizados, no entanto, dados sobre o monitoramento microbiológico e, principalmente por imagem, ainda são recentes nesta modalidade de tratamento de resíduos orgânicos.

O presente trabalho surge do interesse em ampliar conhecimentos sobre metodologias de monitoramento em vermicompostagem e, com isso, contribuir com as ações de sustentabilidade já em andamento na Instituição de Ensino em questão. Visa entender como se comportam, biológica e microbiologicamente, cada um dos estágios por que passa o processo da degradação e humificação da matéria orgânica e das estruturas vegetais. Também visa verificar visualmente a sucessão da biota no período de 60 dias, estabelecido para o processo.

Para tanto este trabalho apresenta como objetivo realizar um estudo sobre a microbiota e a degradação das fibras vegetais e da matéria orgânica durante as fases do processo de biodegradação de resíduos orgânicos por vermicompostagem, por meio da observação de amostras por microscopia óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Preparação das Vermicomposteiras**

Os trabalhos se iniciaram em 05 de agosto de 2016, quando, na instituição de ensino, foram montadas três vermicomposteiras com as dimensões de 62 cm x 39 cm x 59 cm, constituídas de material plástico opaco e perfuradas na base para a drenagem de chorume (eventualmente). Cada vermicomposteira foi carregada com resíduos orgânicos proveniente de 9 setores da instituição (setores de geração de resíduos orgânicos), entre os quais: direção de ensino, coordenadorias, laboratórios, setores administrativos, assim como resíduos provenientes dos pesquisadores participantes do projeto e de seus professores seus respectivos orientadores. Em cada vermicomposteira foi adicionado 1 litro de minhocas (AQUINO; OLIVEIRA; LOUREIRO, 2005) e, na cobertura, uma fina camada de serragem a fim de controlar a umidade e recobrir os resíduos, conforme Figura 1.

### **Inserção do meio suporte (lâminas)**

Finalizada a preparação das vermicomposteiras (Figura 1a), duas foram selecionadas (C4 e C5) e nelas foram inseridas 80 lâminas de vidro (40 em cada) de dimensões de 2 x 5 cm, devidamente espaçadas entre si e das paredes da caixa plástica (Figura 1b e c).



**Figura 1: Montagem das composteiras (a). Identificação das lâminas para inserção nas composteiras (b). Acomodação das lâminas identificadas nas composteiras (c).**

A coleta das lâminas foi realizada em períodos de 15 dias, quando 10 lâminas foram sendo retiradas de cada vermicomposteira; totalizando 4 campanhas de coleta em 60 dias. Dessas 10 lâminas, 5 foram separadas e preparadas de forma a ser encaminhadas à análise por MO e outras 5 para análise por MEV. Aquelas destinadas à MO foram imersas em solução de Ácido Acético 40% (fixador) durante 2 minutos, secadas ao ar livre e guardadas em estojo próprio. Posteriormente foram coradas pela técnica de Gram e observadas em microscópio óptico em aumento de até 400 vezes (400x).

As lâminas dedicadas à análise por MEV foram coletadas com bastante cuidado, com vistas a preservar ao máximo o material aderido, de tal forma que a fixação do mesmo às lâminas foi realizado gotejando-se solução de Ácido Acético 40%, sendo posteriormente secadas ao ar livre e guardadas no interior de placas de Petri grandes, e estas protegidas no interior de bandejas plásticas embrulhadas em sacolas plásticas.

### **Operação das vermicomposteiras**

Semanalmente e de forma revezada, de dois a três pesquisadores se reuniram para coletar os resíduos orgânicos nos setores de geração, pesar e fracionar quantitativa e qualitativamente o que cada vermicomposteira receberia para degradar. À medida que iam sendo gerados nos setores, esses resíduos foram mantidos sob refrigeração no interior de embalagem plásticas (com capacidade para aproximadamente 1,5 litros) entre uma e outra campanha de coleta. Predominantemente os resíduos eram compostos por borra de café, cascas de frutas e verduras e serragem de madeira.

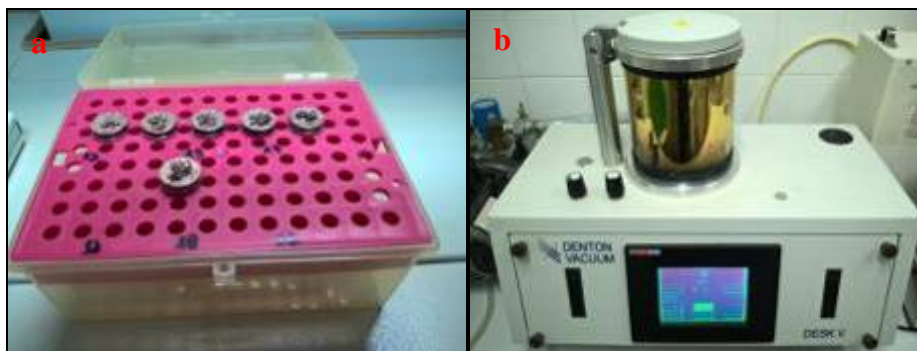
## Análise dos resultados

As lâminas coradas pela técnica de Gram foram observadas em microscópio óptico Leica modelo DM200, utilizando-se as objetivas de 4x, 10x e 40x (respectivamente, ampliações de 40x, 100x e 400x).

As lâminas dedicadas à observação por MEV, antes de serem preparadas para uso nessa instrumentação, foram visualizadas em Microscópio Estereoscópio (Estereomicroscópio) (Leica modelo EZ4 HD) nas ampliações de até 35x. O objetivo dessa observação foi registrar a biota presente no material aderido nas lâminas, assim como o aspecto de apresentação das fibras vegetais e matéria orgânica.

Finalizadas as observações no estereomicroscópio, foi selecionada 1 lâmina de cada vermicomposteira de cada uma das campanhas de coleta (8 lâminas). Dessas e de cada foi removido um pequeno fragmento, com o máximo cuidado para preservar a amostra, e depositado sobre *stubs* (Figura 2a), a adesão do material ao *stub* foi garantido por meio de fita fixadora de carbono dupla face. Esse procedimento foi requerido porque a câmara de amostras do MEV trabalha com alto vácuo, evitando que o despreendimento de fragmentos aderidos às lâminas causassem avarias no sistema de sucção do MEV caso elas fossem encaminhadas diretamente à câmara.

As amostras fixadas aos *stubs* foram, posteriormente, encaminhadas ao metalizador (para deposição de uma fina camada de ouro) onde permaneceram por cerca de 10 minutos (Figura 2b).



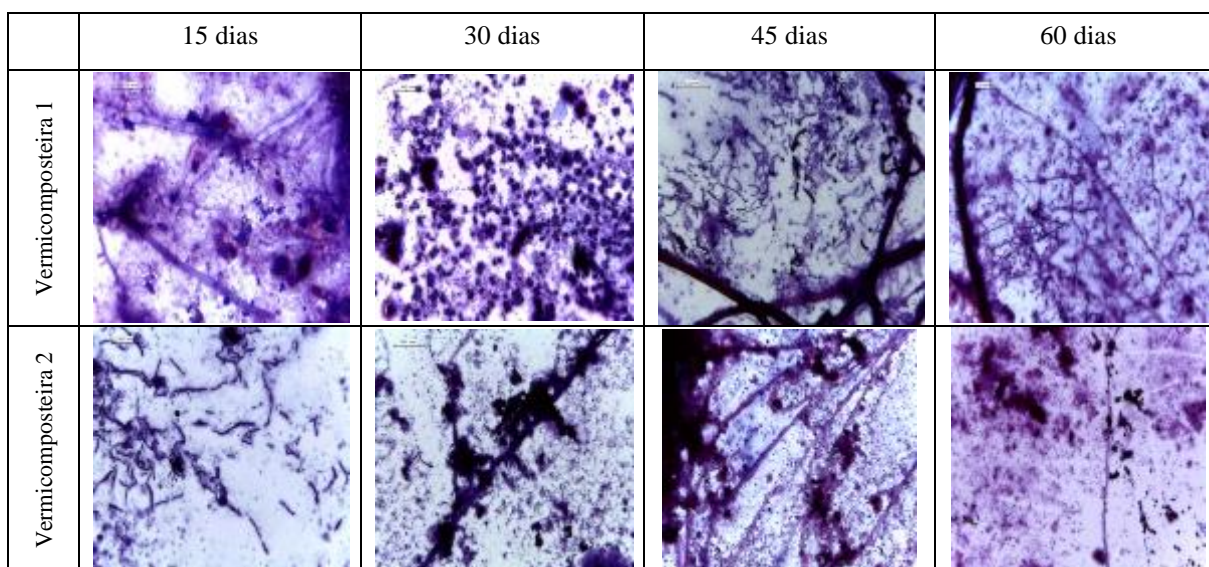
**Figura 2: Preparo da amostra para microscopia eletrônica de varredura. *Stubs* com amostra aderida e já metalizada (a), metalizador em operação (b)**

As amostras metalizadas foram inseridas na câmara do MEV para registro de imagens ampliadas em até 10.000 vezes. O MEV utilizado para tanto foi o Jeol modelo JSM-6610LV.

## RESULTADOS

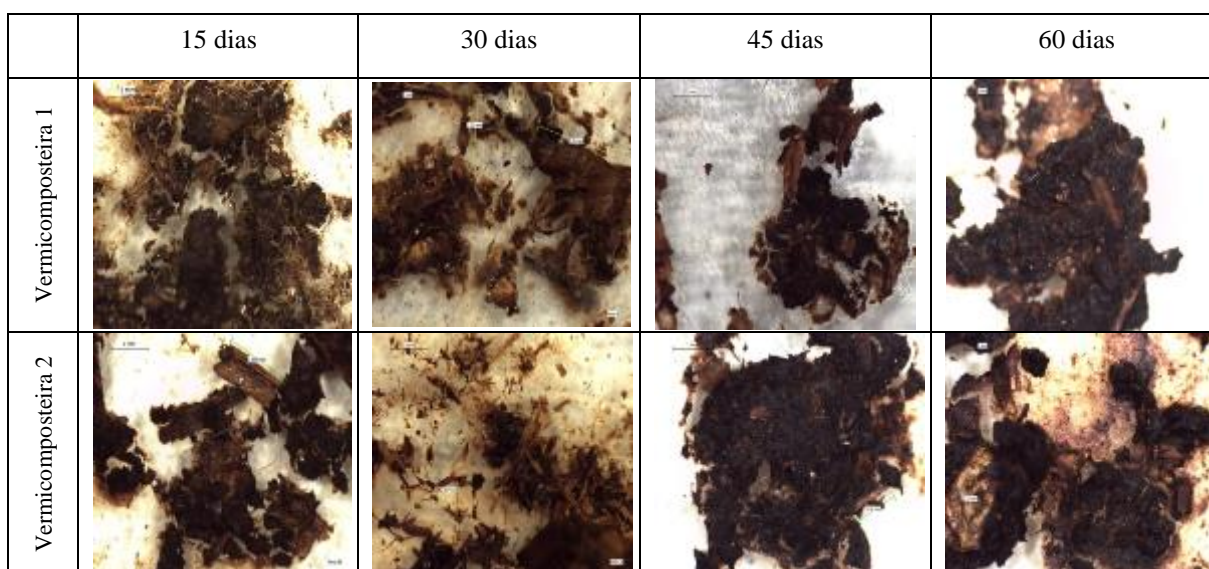
Os resultados obtidos por microscopia óptica a fim de se averiguar microbiologicamente o biofilme aderido nas lâminas (Figura 3), em sentido positivo demonstram a presença tanto de organismos Gram positivos quanto de Gram negativos, corroborando, dessa maneira, com a heterogeneidade da microbiota participante na degradação da matéria orgânica. Também se observa a presença de hifas fúngicas logo na primeira campanha de coleta, o que vai ao encontro daquilo levantado por Amir et al (2008) quando avaliou os níveis de ácido graxo fosfolipídico indicativos da presença de fungos, que aumentou logo no início da compostagem.

Também é possível verificar o crescimento microbiano (com produção de material extracelular) e decomposição das fibras vegetais, cronologicamente, com o aparecimento de estruturas esféricas regulares e escuras após 60 dias na vermicomposteira 2. Desavisadamente essas estruturas poderiam ser confundidas com células de *Staphylococcus aureus* – objeto de preocupação encontrado por Fracchia et al (2006) em bioaerossóis em plantas de compostagem -, caso não se considerasse magnificação da imagem. Em vista disso, pressupõe-se que essas estruturas sejam células de leveduras.



**Figura 3: Material aderido em lâminas pelo processo de vermicompostagem, ampliado em 400 vezes e corado pela técnica de Gram.**

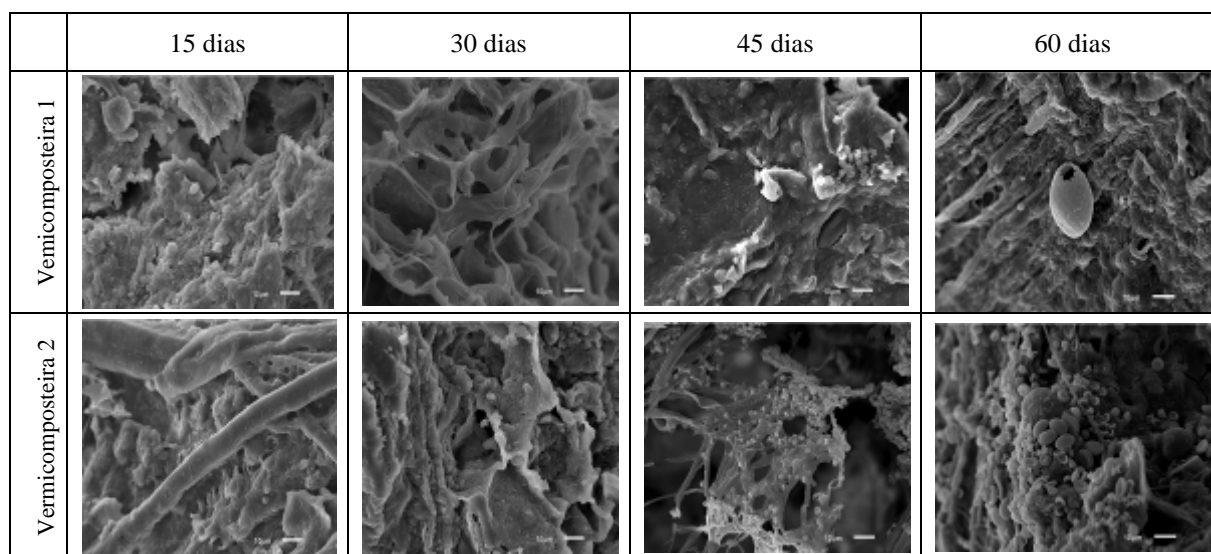
Resultados das imagens obtidas por estereomicroscópio (Figura 4) demonstram, cronologicamente, que houve degradação da matéria orgânica. O material que inicialmente se apresentava sob a forma de fragmentos orgânicos maiores e fibrosos foram decompostos em menores e com aspecto liquefeitos, indicando a ocorrência de processos predominantemente aeróbios, ou seja, processos cuja água foi um dos produtos do metabolismo microbiano.



**Figura 4: Material aderido em lâminas pelo processo de vermicompostagem, ampliado em 16 vezes.**

Os resultados dos registros em MEV (Figura 5) reacendem a suspeita levantada anteriormente por microscopia óptica ao pela presença de estruturas ovaladas que se assemelham a leveduras, mas também com presença de hifas e esporos fúngicos, após 45 dias e, mais intensa e diversamente, após 60 dias na vermicomposteira 2. Essa diversidade após os 60 dias poderia, inclusive, sugerir a cooperação entre fungos, actinobactérias e bactérias durante a fase de maturação, conforme levantado por Yu et al. (2007), ao monitorar a sucessão da comunidade microbiana e a degradação de lignocelulose durante a compostagem de resíduos agrícolas por intermédio do método do perfil de quinonas.

Verifica-se que na primeira campanha o material apresentava-se mais íntegro, sendo, ao longo do tempo, convertido/degradado em material mais poroso e menos fibroso. Também, nessa perspectiva, é perceptível o aumento na biodiversidade.



**Figura 5: Fragmentos de material aderido em lâmina pelo processo de vermicompostagem observado em MEV, ampliação de 10.000x.**

## CONCLUSÕES

Atendendo às expectativas, no processo de biodegradação via vermicompostagem foi verificada a decomposição da matéria orgânica e de fibras vegetais. Sob a ótica microbiana constatou-se aumento na biodiversidade, bem nítida quando se observa morfologicamente a variedade de tipologias apresentada após 60 dias na vermicomposteira 2 (Figura 5).

Microbiologicamente observa-se que a heterogeneidade na composição do material aderido nas lâminas constitui alvo de pesquisa mais detalhada/aprofundada. Sobretudo, porque a literatura sobre o assunto é muito escassa ou, quando muito, se preocupa em focar na contagem de microrganismos pré-definidos - notadamente aqueles cuja preocupação é com saúde pública. Por esse motivo, recomenda-se a continuidade dos estudos nesta área ainda pouquíssimo abordada, assim como a extensão no tempo de acompanhamento do processo, consequentemente aumentando o número de amostragens.

Por esses e outros motivos, estudos como este visam colaborar com ações sustentáveis no gerenciamento de resíduos sólidos. Pois, ao fornecer informações sobre a degradação de matéria orgânica, em nível microscópico, também se estará evoluindo ao propor medidas - ou desencadear um conjunto de ideias - no sentido de otimizar o método de compostagem (no geral) e vermicompostagem (em particular), com vistas a incentivar sua utilização. Uma vez que se trata de um método naturalmente simples, seguro e nobre de destinação de resíduos sólidos orgânicos, o investimento em novas pesquisas e em métodos de acompanhamento e otimização dos processos são fundamentais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVAREZ, A. R. et al. Plano Nacional de Resíduos Sólidos: diagnóstico dos resíduos urbanos, agrosilvopastoris e a questão dos catadores. 2012.
2. AMIR, S. et al. Microbial community dynamics during composting of sewage sludge and straw studied through phospholipid and neutral lipid analysis. *Journal of hazardous materials*, v. 159, n. 2, p. 593-601, 2008.
3. AQUINO, A. M.; ALMEIDA, D. L.; SILVA, V. F. Utilização de minhocas na estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem. EMBRAPA-CNPBS, 1992.
4. AQUINO, A. M.; OLIVEIRA, A. M. G.; LOUREIRO, D. C. Integrando compostagem e vermicompostagem na reciclagem de resíduos orgânicos domésticos. Comunicado Técnico 12. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa Biológica do Solo, 2005. 5 p.
5. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS. (ABRELPE). Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2015. São Paulo, 2015.

6. BRASIL, 2010. Política Nacional de Resíduos Sólidos. Lei n. 12.305 de 02 de agosto de 2010. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm)>. Acesso em: 27 set. de 2015.
7. DORES-SILVA, Paulo R.; LANDGRAF, Maria Diva; REZENDE, Maria Olímpia de O. Processo de estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem versus compostagem. Química Nova, São Paulo, v.36, n.5, p. 640-645, 2013.
8. FRACCHIA, L. et al. The assessment of airborne bacterial contamination in three composting plants revealed site-related biological hazard and seasonal variations. Journal of applied microbiology, v. 100, n. 5, p. 973-984, 2006.
9. MEIRA, A. M.; CAZZONATTO, A. C.; SOARES, C. A. Adaptado de Manual básico de compostagem - série: conhecendo os resíduos. 2003. Piracicaba, USP Recicla, 2012.
10. SENTHIL KUMAR, D. et al. Evaluation of vermicompost maturity using scanning electron microscopy and paper chromatography analysis. Journal of agricultural and food chemistry, v. 62, n. 13, p. 2738-2741, 2014.
11. YU, H. et al. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. Biodegradation, v. 18, n. 6, p. 793-802, 2007.
12. ZOU, A. et al. An Electron Microscope Study on Different Spent Mushroom in a Compost Environment. Advance Journal of Food Science and Technology, v. 9, n. 8, p. 643-650, 2015.