

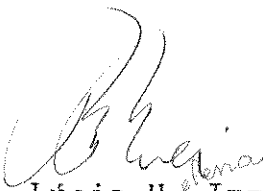
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUIMICA

AREA DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

PROCESSOS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES:

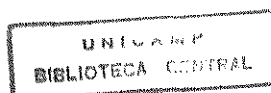
UTILIZAÇÃO DE UM BIORREATOR DE LEITO RECHEADO.
aplicação

Este exemplar corresponde à redação final da tese de Mestrado defendida por Elisa Esposito, aprovada pela comissão julgadora em 20/07/92.


Prof. Dra. Lúcia H. Innocentini Mei
(Orientador)

Julho 1992.

Campinas - SP - Brasil



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

PROCESSOS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES:
APLICAÇÃO EM UM BIOREATOR DE LEITO RECHEADO

Autor: Elisa Esposito

Tese submetida à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada por:



Prof. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei
(Orientador)



Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Julho 1992.

Campinas - S.P. - Brasil.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Nelson Durán pelo apoio, orientação e disposição de seus laboratórios, além da oportunidade de aprender com ele.

Ao Instituto de Química pelas facilidades concedidas.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Lúcia H. Innocentini Mei pelo apoio e colaboração no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Vanderlei P. Canhos pelo incentivo constante e facilidades concedidas.

A Giselle pela amizade e paciência na correção desta tese.

Ao Jaime, pela amizade e valiosas discussões acadêmicas no transcorrer deste trabalho

Ao Prof. Dr. Geraldo Lippel Sant'Anna, pelas colocações esclarecedoras a respeito do biorreator utilizado neste trabalho.

A Roni, Kathy e Alexandre pelo carinho e incentivo constante.

Ao Maurício Durán, pela amizade e auxílio na confecção de vários gráficos.

A Daniela e Carla pela amizade e apoio na realização de alguns experimentos.

A Angela, Regina, Raquel, Adriane, Norma, Rose, Márcia, Maurício, Aida, Cláudia, Joceli, Vera, Líliliane, Cida, Chico, Vanda, Rosinha e Laurindo péla colaboração e amizade.

Aos biólogos, Marcos R. Ortolano e Jonas Vitti, da Ripasa pela realização dos testes de toxicidade.

A todo o pessoal do bloco D (departamento de química orgânica IQ-UNICAMP) e da Faculdade de Engenharia Química, pelo agradável convívio diário.

Ao CNPq, a FAPESP e FINEP pelo apoio financeiro.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO ACADÊMICO NA UNICAMP

CONGRESSOS

1. E. Esposito, Lina Bettucci, V. Canhos e N. Durán, "Wood Chemistry: Kraft mill effluent treatment", 14^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Maio, Caxambu, M.G., Brasil (1991).
2. E. Esposito, M. Barbosa, V. Canhos e N. Durán, "Control of Chemical Oxygen Demand (COD) by biological treatment", 14^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Maio, Caxambu, M.G., Brasil (1991).
3. E. Esposito, V. Canhos e N. Durán. "Photochemical Pre-Treatment of Kraft Effluent: Biobleaching With *Lentinus edodes*", Second Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, Setembro Campinas, S.P., Brasil (1991).
4. C. Soares, M. Barbosa, E. Esposito e N. Durán. "Mechanistic Studies on Kraft Effluent (E_1) Biobleaching", Second Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, Setembro, Campinas, S.P., Brasil (1991).
5. E. Esposito, V. Canhos e N. Durán. "Effluent Decolorization: Factors Which Are Involved In The Fungal Bleaching". VIII Biorganic Workshop (Brasil-Chile), Outubro, Talca, Chile (1991).
6. N. Durán, N. de M. Erismann, A. M. F. Milagres, E. Curotto, E. Esposito e V. Canhos. "Biotechnology In Pulp And Paper Industry". VIII Biorganic Workshop (Brasil-Chile), Outubro, Talca,

Chile (1991).

7. N. Durán, E. Esposito e V. Canhos. "Kraft Mill Effluent: Biological Treatment". Cellulose '91. Dezembro, New Orleans, Louisiana, USA (1991).
8. N. Durán, E. Esposito, M. Barbosa e V. Canhos, " Biotecnologia em Polpa e Papel: Tratamento Combinado Foto- e Biológico de Efluentes", XXXXI Congresso Brasileiro de Química, Outubro , Recife, PE, Brasil (1991).
9. E. Esposito, M. Barbosa, V. Canhos e N. Durán, "Photochemistry as Pre-treatment on Biological Decontamination in Kraft Effluent", 3^o Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica e Fotobiología, Outubro, Mar del Plata, Argentina (1991).
10. J. Rodriguez, E. Esposito, J. Freer e J. Baeza, "Manganese Effect on Chlorolignin Biodegradation by *Lentinus edodes*", XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Maio Caxambu, MG, Brasil (1992).
11. E. Esposito, V. Canhos, L. Innocentini-Mei e N. Durán, " *Pycnoporus sanguineus* UEC-2050: A new Strain Producing Ligninolytic Enzymes", XXI Reunião Anual Soc. Brasileira Bioquímica, Maio, Caxambu, MG, Brasil (1992).
12. M. Barbosa, E. Esposito, L.H. Innocentini-Mei e N. Durán, " Production of Ligninolytic Enzymes by *Lentinus edodes* in Kraft Effluent", XXI Reunião Anual Soc. Bras. Bioquim., Maio, Caxambu, M.G. Brasil (1992).
13. J. Rodriguez, J. Baeza, J. Freer, E. Esposito, N. Durán e A. Faljoni-Alario, " Biotreatment of Kraft Pulp Bleaching Effluent", Second European Workshop on Lincellulosics and Pulp

(EWLP) Setembro, Grenoble, França (1992).

CONFERENCIAS E SEMINARIOS

1. E. Esposito, "Metodologia Utilizada na Seleção de Fungos Ligninolíticos para Tratamentos de Efluentes". Seminário, Lab. Química Biológica, UNICAMP, Campinas, S.P., Janeiro (1991).
2. E. Esposito, "Tratamento Biológico de Efluentes da Indústria Papeleira: Processo Kraft". Seminário, Lab. Química Biológica, UNICAMP, Campinas, S.P., outubro (1991).
3. E. Esposito, "Tratamento Biológico de Efluentes sem Fonte Adicional de Carbono e Nitrogênio", Seminário Grupo Química Biológica, Universidade Estadual de Campinas, Janeiro, Campinas, S.P., Brasil (1992).

PUBLICAÇÕES

1. E. Esposito e R.T. Guerrero, "Estudos de Cultura de Cinco Espécies de NIDULARIACEAE (BASIDIOMYCETES) do Rio Grande do Sul", NAPAEA, 4, 1-9 (1988).
2. E. Esposito, V. Canhos e N. Durán, "Screening of Lignin-Degrading Fungi for Removal of Color from Kraft Mill Wastewater in With no Additional Extra Carbon-Source". Biotechnol. Lett., 13 (8), 571-576 (1991).
3. E. Esposito, V.P. Canhos e N. Durán, "Photochemical Pre-treatment of Kraft Effluent: Biobleaching with *Lentinus*

- edodes", Proc. Second Braz. Chem. Lignin and Other Wood Components, (Durán, N. e Esposito, E. Eds.), vol. III: 356 (1992).
4. I. Ferrer, E. Esposito e N. Durán. "Lignin Peroxidase from *Chrysonilia sitophila*: Heat-Denaturation Kinetics and pH Stability". *Enzyme Microb. Technol.*, 14: 402 (1992).
 5. N. Durán; E. Esposito, L. H. Innocentini-Mei e V. P. Canhos "A New Alternative Process for Kraft Effluent Treatment: A Combination of Photochemical and Biological Method", *Biodegradation*, submetido (1992).
 6. N. Durán, E. Esposito e V.P. Canhos, "Kraft Mill Effluent: Biological treatment", *Proc. Cellulose-91* (Ellis Horwood Publ) J.F. Kennedy, Ed), no prelo (1992).
 7. A. Castro e Silva, E. Esposito, A. Ferraz e N. Durán, "Amazonian Lignocellulosic Materials-II: *Pycnoporus sanguineus* Acting on *Parkia oppositifolia* Wood. Its Potentiality" *Holzforschung*, submetido (1992).
 8. S.M.D S. Carvalho, M.F. Teixeira, E. Esposito, A. Machuca, A. Ferraz e N. Durán, "Amazonian Wood Chemistry-II: Fungal Screening from decayed Laurel and Cedar Trees", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, no prelo (1992).
 9. E. Esposito, L. H. Innocentini-Mei, A. Ferraz, V. P. Canhos e N. Durán, "Phenoloxidase and Hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* UEC-2050 Strain, *J. Biotechnol.* submetido (1992).

NOMENCLATURA

a^*	=	área específica de empacotamento (cm^{-1})
a_t	=	área superficial total de empacotamento (cm^2)
AOX	=	halogênios orgânicos adsorvíveis
C_f	=	concentração final
C_o	=	concentração inicial
DBO	=	demanda bioquímica de oxigênio
DQO	=	demanda química de oxigênio
E	=	enzima
K	=	constante cinética (h^{-1})
K_s	=	constante média de velocidade (mg L^{-1})
k_1 e k_2	=	constantes de formação do produto
k^{-1}	=	constante de dissociação do complexo ES
K_m	=	relação entre constantes cinéticas
m_b	=	massa de biomassa fixa (mg VS)
P	=	produto
Q	=	fluxo de entrada ($\text{m}^3 \text{ dia}^{-1}$)
q_s	=	velocidade específica do consumo de substrato
$q_{s_{\max}}$	=	constante de velocidade
S	=	substrato (DQO, DBO, cor, fenóis)
t	=	tempo (h ou dia)
V	=	volume do líquido no reator (L ou m^3)
V_o	=	velocidade inicial
$V_{\max.}$	=	constante que depende da concentração de enzima
TDCI	=	cloro orgânico total
X	=	concentração de biomassa ($\text{mg L}^{-1}\text{VS}$)

$Y_{x/s}$ = coeficiente de rendimento

Letras Gregas

β = coeficiente de conversão da biomassa de empacotamento
(mg cm^{-2})

τ = tempo de residência da fase líquida ($\tau = V/Q$) (h ou dia)

u = velocidade de crescimento

Subscrições

o = entrada

e = saída

HISTÓRICO

Desde 1983, um grupo de pesquisadores dentro da Faculdade de Engenharia Química, juntamente com pesquisadores de outras instituições de renome, vem se dedicando ao estudo e aplicação dos materiais nas mais diversas áreas de interesse para o País, incluindo-se aí a Área Médica e Biotecnológica. Dentro desta última, houve uma grande contribuição dada pelo Professor Dr. Edison Bittencourt e colaboradores, da Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Materiais da FEQ, os quais desenvolveram um suporte à base de resina uréia-formaldeído e de N-metilolacrilamida de ampla aplicação no campo das análises clínicas, envolvendo o Instituto de Medicina Tropical da USP e também o Laboratório de Análises e Pesquisas Gastão Fleury S.C. Ltda., originando posteriormente a atual Biolab Diagnóstica.

Atualmente a Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Materiais (ACCTM), criada em 1990, vem mantendo várias linhas de pesquisa de grande importância, tais como; Desenvolvimento de Processos para Preparação de Membranas Dinâmicas, Estudo de Polímeros com Propriedades ópticas Não-lineares, Desenvolvimento de Resinas Fotocuráveis de Alta Estabilidade e Adesão para Recobrimento de Fibras ópticas, Estabilidade de Poliolefinas Submetidas à Radiação Gama em Doses Esterilizantes, Propriedades de Filmes de PVC Esterilizáveis para Utilização em Bolsas de Sangue, dentre outras.

Dando continuidade às pesquisas de Bittencourt e colaboradores, a ACCTM vem trabalhando numa linha de pesquisa na Área de Saúde e Biotecnologia, sobre o desenvolvimento e funcionalização de suportes poliméricos, orgânicos e inorgânicos para a imobilização de antígenos ou anticorpos, enzimas e microorganismos, tendo já defendidas duas outras teses de Mestrado relacionadas à imobilização de enzimas.

Com o intuito de ampliar as aplicações de suportes poliméricos na imobilização de microorganismos, a ACCTM se associou ao Laboratório de Química Biológica do Instituto de Química da Unicamp, chefiado pelo Dr. Nelson Durán, numa pesquisa conjunta sobre imobilização de fungos lignolíticos em nylon e em cavacos de madeira, e sua aplicação em biopolpação. Deste modo, resultou este primeiro trabalho de tese de Mestrado, na ACCTM, onde se demonstrou a utilidade de suportes poliméricos na imobilização de fungos de grande interesse no tratamento biológico de efluentes.

Prof. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei

RESUMO

Foi realizada uma seleção entre 51 cepas de fungos ligninolíticos para descoloração de efluentes fenólicos industriais. A seleção mostrou que a cepa *Lentinus edodes* UEC-2019 remove 73 % da cor, 60 % da DQO (Demanda Química de Oxigênio), 30 % da DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), 70 % da massa molecular e 30 % de fenóis em 120 horas, sem fonte adicional de carbono. Sob estas condições *L. edodes* foi mais eficiente que o conhecido *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). Observou-se uma pequena remoção de cor devida à adsorção micelial (13 %) durante 120 horas em efluente Kraft. Foi avaliada, em escala de bancada, a remoção de cor do efluente E1 em um biorreator de leite recheado modificado (330 mL) operado em estado estacionário, utilizando-se *L. edodes* imobilizado em nylon e em cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis*. No biorreator, operado durante 120 horas, observou-se 70 % de redução de cor, 36 % de fenóis e 67 % de DQO na imobilização em nylon. Na imobilização nos cavacos encontrou-se 42 % de remoção de cor e 26 % de redução de fenóis. Esses métodos parecem ser eficientes no processo de descontaminação, representando um grande potencial no tratamento de efluentes industriais.

ABSTRACT

A screening of 51 ligninolytic strains of fungi to examine their ability to decolorized phenolic industrial effluents was carried out. The selection showed that *Lentinus edodes* UEC-2019 strain removed 73 % of color, 60 % of COD (Chemical Oxygen Demand), 30 % of BOD (Biochemical Oxygen Demand), 70 % of molecular mass decrease and 30% phenols in 120 hours, without any additional carbon sources. Under these conditions *L. edodes* was more efficient than the known *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). A little color removal adsorption on the mycelium (13 %) was observed during the 120 hours in Kraft mill effluent. The steady-state color removal from the effluent E1 in a bench-scale modified packed-bed bioreactor (330 mL) using *L. edodes* immobilized in nylon and wood chips of *Eucalyptus grandis* was evaluated. In a bioreactor, which operated by 120 hours a reduction of 70 % of color, 36 % of phenols and 67 % of COD immobilized in nylon were found, also a 42 % of color and 26 % of phenols in wood immobilized chips were found. These methods appeared to be an efficient process of decontamination with a great industrial potential in effluent treatment.

INDICE

CAPITULO I - INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS -----	01
1.2 A MADEIRA E A INDÚSTRIA DE POLPA E PAPEL-----	05
1.3 COMPOSIÇÃO DA MADEIRA -----	06
1.4 A FABRICAÇÃO DO PAPEL -----	08
1.5 NOMENCLATURA E SEQUENCIA DE BRANQUEAMENTO -----	09
1.6 EFLUENTES PRODUZIDOS DURANTE O PROCESSO -----	10
DE BRANQUEAMENTO DA POLPA	
1.7 CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES DE BRANQUEAMENTO -----	12
1.8 MÉTODOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES: -----	14
NOVAS TENDÊNCIAS	
1.9 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES -----	18
1.10 FUNGOS IMOBILIZADOS -----	20
1.11 FUNGOS: UM CONCEITO -----	22
1.12 ENZIMAS -----	25
A) FENÓLÓXIDASES (LACASE E PEROXIDASE) -----	25
B) LIGNINA-PEROXIDASE OU LIGNINASE -----	27
C) Mn-PEROXIDASE -----	30
D) B-GLICOSIDASE -----	30
1.13 BIORREATORES -----	32
2. OBJETIVOS -----	41

CAPITULO II DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPAMENTOS -----	42
3.2 REAGENTES -----	42
3.3 MICROORGANISMOS -----	43
3.4 MEIO DE CULTURA E INOCULO -----	45
3.5 METODO DE SELEÇÃO -----	46
3.6 EFLUENTES -----	47
3.7 INDUÇÃO ENZIMÁTICA -----	48
3.8 METODOS ANALITICOS -----	48
A) DETERMINAÇÃO DA COR -----	48
B) DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS -----	49
C) DETERMINAÇÃO DA DQO E DBO -----	49
D) DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS -----	50
1. FENÓLASE (LACASE E PEROXIDASE) -----	50
2. LIGNINA PEROXIDASE -----	51
3. Mn-PEROXIDASE -----	52
4. B-GLICOSIDASE -----	53
5. DESCOLORAÇÃO POR "REMAZOL BRILLIANT BLUE" -----	53
E) DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES -----	54
F) DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL -----	54
G) DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR PERMEAÇÃO EM GEL ---	55
H) DETERMINAÇÃO DA ADSORÇÃO DO MICÉLIO NO EFLUENTE -----	55
I) TESTE DE TOXICIDADE -----	56
J) CARACTERÍSTICA DA COR DO EFLUENTE ANTES E -----	57
APÓS TRATAMENTO	
3.9 BIORREATOR -----	57

1. DESENHO DO BIORREATOR -----	57
2. CONDIÇÕES DE USO -----	58
3. SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DO FUNGO -----	60
4. CARREGAMENTO E INOCULAÇÃO DO REATOR -----	60
5. CÁLCULOS DE EFICIÊNCIA PARA COR, FENÓIS E DQO -----	61

CAPÍTULO III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS -----	62
PARA DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES KRAFT	
4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA -----	65
4.3 CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO E pH -----	67
4.4 DQO -----	70
4.5 MICÉLIO INATIVADO -----	70
4.6 MINERALIZAÇÃO -----	71
4.7 MECANISMO DE DESCOLORAÇÃO DO EFLUENTE KRAFT -----	74
POR <i>Lentinus edodes</i>	
4.8 UTILIZAÇÃO DE EFLUENTE E1 COMBINADO COM C1 -----	74
A DISTINTAS PROPORÇÕES	
4.8.1 MISTURA DE EFLUENTES: E1 (70 %) + C1 (30 %) -----	76
4.8.2 MISTURA DE EFLUENTES: E1 (55,3 %) + C1 (44,7 %) -----	78
4.8.3 EFLUENTE E1 (100 %) -----	81
4.9 APLICAÇÃO DO SISTEMA EM BIORREATOR -----	83
4.10 FUNGO IMOBILIZADO -----	86
4.10.1 IMOBILIZAÇÃO EM NYLON -----	87
4.10.2 IMOBILIZAÇÃO EM MADEIRA -----	89
4.11 INDUÇÃO ENZIMÁTICA -----	93

CAPITULO IV CONCLUSOES

5. CONCLUSOES GERAIS -----	95
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS -----	97
7. GLOSSARIO -----	109
APENDICE I - MEIO DE CULTURA -----	111
APENDICE II - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE FENOIS TOTAIS -----	112
APENDICE III - CALCULOS DE BALANÇO ENERGETICO -----	113

1. INTRODUÇÃO:

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em 1987 a produção mundial de papel foi estimada em 227 milhões de ton/ano e a produção de polpa em 50 milhões de ton/ano. Diariamente são liberados mais de $62 \times 10^6 \text{ m}^3$ de efluentes. Esse valor corresponde ao consumo doméstico diário de água de aproximadamente 200 milhões de pessoas (Sant'Anna, 1992). Poucas indústrias possuem reservas de água tão elevadas para seus processos de fabricação como as de produção de polpa e papel.

O impacto ambiental, causado por estas descargas líquidas, é um problema cada vez mais agravante (Ribó, 1992).

O processo de polpação predominante no Brasil e no mundo é o denominado Kraft (que emprega NaOH e Na_2S). O processo Kraft produz efluentes com alta DBO (demanda bioquímica de oxigênio), turbidez, cor, sólidos suspensos e baixas concentrações de oxigênio dissolvido (Araújo e col. 1991). Este tratamento remove aproximadamente 90 % da lignina, deixando resíduos fibrosos, os quais podem ser eliminados por processos de branqueamento.

Durante o branqueamento convencional das polpas químicas ocorrem reações complexas envolvendo cloração, oxidação e desmetilação das unidades fenil propano da lignina residual. Essas reações resultam na formação de um grupo de compostos estruturalmente diverso, coletivamente designados "cloroligninas" (Kirkpatrick, 1991). Estes efluentes são altamente coloridos e contêm muitas substâncias deletérias, prin-

principalmente fenóis clorados, os quais são tóxicos para muitos organismos aquáticos e altamente resistentes ao ataque microbiano.

As polpas são branqueadas em uma primeira etapa mediante cloração com Cl_2 e ClO_2 . O cloro converte a lignina residual em produtos solúveis em água e álcali. Assim, a cloração é geralmente seguida por uma extração alcalina (1ª extração alcalina) (Fig. 1) em um processo de múltiplas etapas (Fengel e Wegener, 1984).

O cloro orgânico unido a moléculas orgânicas contém compostos clorados de toxicidade aguda determinados como TOCl (cloro orgânico total), materiais genotóxicos e materiais clorados de massa molecular elevada que lentamente transformam-se em organoclorados tóxicos como catecol e guaiacol (Eriksson, 1990). Mais de 300 compostos orgânicos diferentes foram encontrados nos efluentes de branqueamento, além de uma pequena quantidade de dioxinas altamente tóxicas.

Os tratamentos clássicos de efluentes das indústrias de polpa e papel são lagoas aeróbias, lagoas anaeróbias e lodos ativados. Esses tratamentos diminuem as demandas químicas e bioquímicas de oxigênio (DQO e DBO, respectivamente) porém mostram-se ineficientes quanto a remoção da cor. Segundo alguns autores, há até mesmo um aumento na intensidade de cor destes efluentes após o tratamento (Cammarota e Sant'Anna, 1992). São ineficientes também na eliminação de clorofenóis e de ligninas cloradas de alto peso molecular. Entre outros métodos alternativos de remoção de cor encontram-se os métodos mistos de ultrafiltração/tratamento biológico, ultrafiltração apenas, absorção em carbono ativado, precipitação com sais de alumínio e carbonatos, radiação ultravioleta e osmose reversa, entre outros (Fairbanks, 1992; Eriksson, 1992).

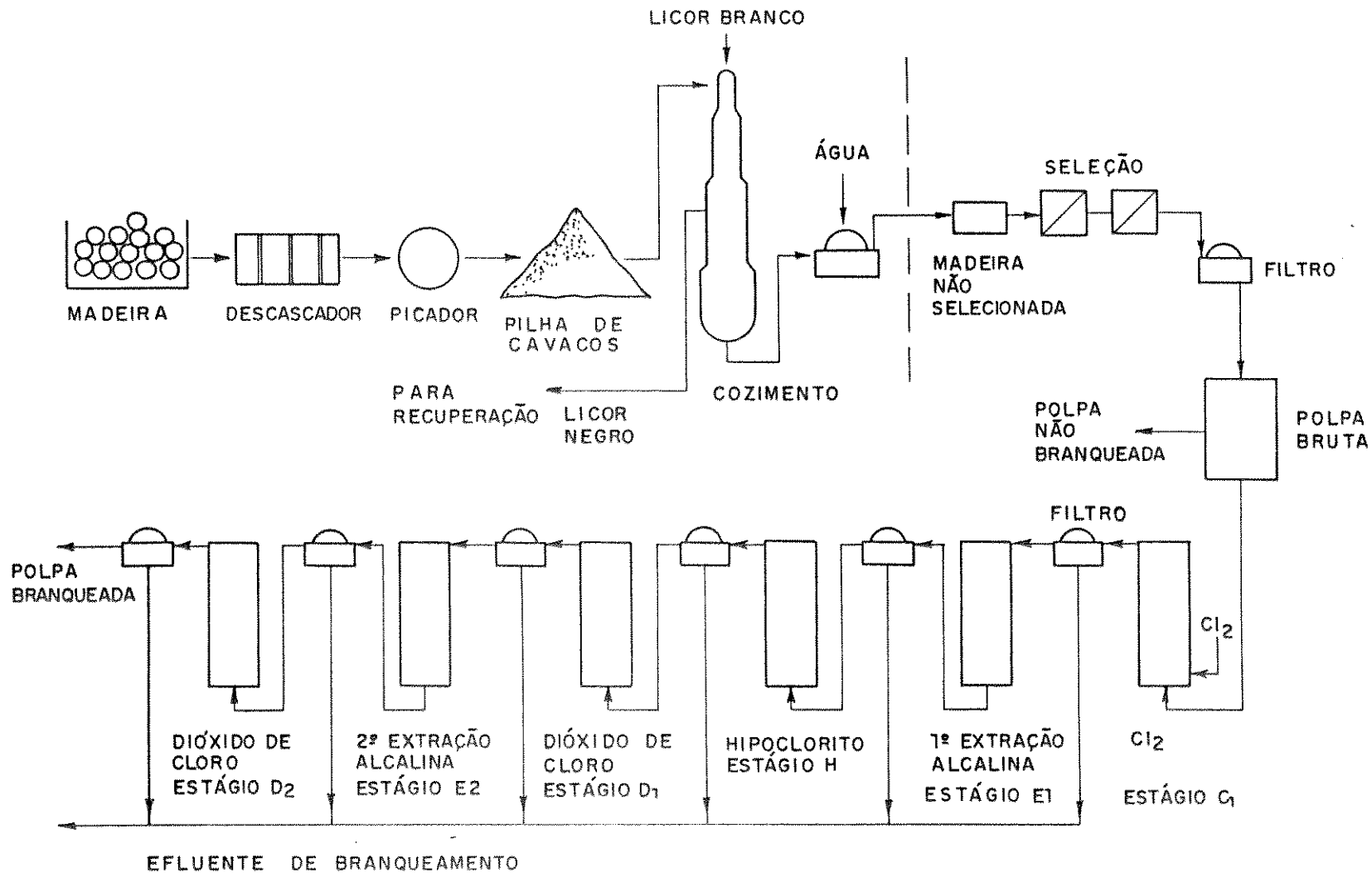


Figura 1. Processo Kraft de polpação e branqueamento convencional da polpa (Krigstad e Lindstron, 1984).

Recentemente, devido ao interesse público pelo problema ecológico e ao estudo de novas leis para proteção ambiental, o tratamento de compostos organoclorados vem ganhando uma relevada importância. Encarar positivamente o controle da poluição significa aproveitar resíduos e subprodutos de forma econômica.

A escolha de um processo de tratamento deve respeitar os critérios econômicos de custo/benefício. Segundo reportagem da revista Química e Derivados (Fairbanks, 1992), a tendência em 1991 foi a utilização de sistemas de digestão anaeróbia de resíduos industriais com alta DQO. Em geral, os tratamentos aeróbios são preferidos, embora o mais adequado fosse uma combinação das fases anaeróbia/aeróbia, reduzindo o custo dos aeradores mecânicos. O tratamento aeróbio foi estimado em 6,5 a 9,0 US\$/ton de polpa, enquanto que o tratamento por ultrafiltração tem um custo de 3,0 a 4,0 US\$/ton de polpa, similar ao biológico da ordem de 3,0 a 4,0 US\$/ton de polpa, que somado à neutralização com um custo de 1,0 a 1,5 US\$ leva a um valor de 7,0 a 10,0 US\$/ton de polpa (Ek e Eriksson, 1987). Apesar do custo ser praticamente o mesmo, a ultrafiltração/tratamento biológico é três vezes mais eficiente que a lagoa aeróbia e lodo ativado.

A capacidade de fungos de decomposição branca degradar cloroligninas e descolorar efluentes, foi tema de pesquisa nos últimos 10 anos. Estes microrganismos são considerados os mais promissores para o tratamento de efluentes (Lankinen e col. 1991).

Um processo que resultou em patente no ano de 1987 foi o processo MyCoR (Mycelial Color Removal). Este é baseado na descoloração causada pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* immobilizado em um Contactor Biológico Rotatório (RBC). Entretanto este método apresenta alguns pro-

blemas, que serão mencionados oportunamente. Na tentativa de suprir as exigências tanto em termos de eficiência de tratamento como de viabilidade econômica, outros modelos de biorreatores vem sendo estudados assim como outros fungos ligninolíticos.

2. A MADEIRA E A INDÚSTRIA DE POLPA E PAPEL

A madeira é a matéria prima utilizada na obtenção da polpa e do papel, suprimindo cerca de 93 % da necessidade de fibras virgens de todo o mundo, enquanto que outras fontes, como bagaço de cana, palhas de cereais e bambus, comportam o restante.

A madeira é um copolímero constituído de celulose, hemicelulose e lignina, com pequenas quantidades de extrativos e substâncias minerais. O maior componente em peso seco é a celulose, correspondendo de 30 a 40 %, as hemiceluloses, em estreita associação com a celulose na parede celular, constituem 20 a 30 % e fazem a ligação entre celulose e lignina. A lignina, age como um agente cimentante entre as células conferindo rigidez estrutural e servindo como um protetor contra o ataque microbiológico, constitui cerca de 20 a 30 % da madeira. Essas composições variam de acordo com o tipo de madeira, espécie e idade das mesmas. As madeiras são classificadas em madeiras duras e moles. Estes termos são aplicados para diferenciar tipos de fibras vegetais. Exemplo de madeira dura ou "hardwood" inclui o eucaliptus, sendo este amplamente utilizado pelas indústrias papeleiras nacionais. As madeiras consideradas duras possuem menor teor de lignina do que as madeiras moles. Exemplos de madeira mole ou "softwood" seriam o pinus,

cedro e cipreste entre outros.

1.3 COMPOSIÇÃO DA MADEIRA

A) Celulose: A celulose é um polissacarídeo linear formado por unidades de beta-D-glicopiranosose unidas por ligações 1-4 glicosídicas (Figura 2).

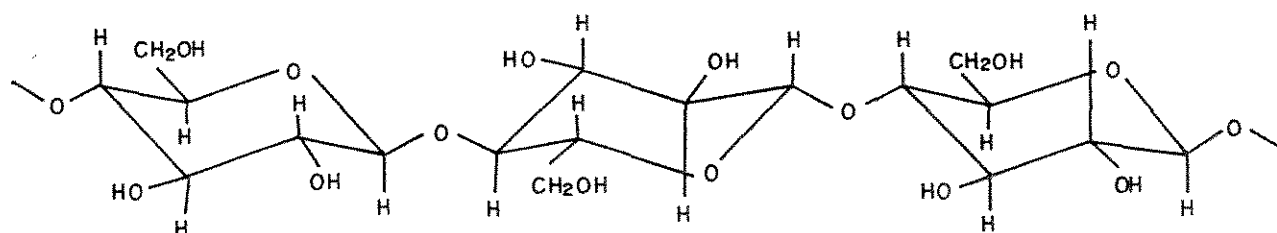


Figura 2. Estrutura linear da celulose.

B) Hemicelulose: A hemicelulose é composta de diferentes unidades de carboidratos. Estes variam consideravelmente de um tipo de madeira para outro. Nas madeiras duras predominam glicoronoxilanas (20-30 %) e glicomananas (1-5 %), enquanto que nas madeiras moles, galactoglicomananas (15-20 %), arabinoglicuronoxilanas (5-10 %) e arabinogalactanas (2-3 %).

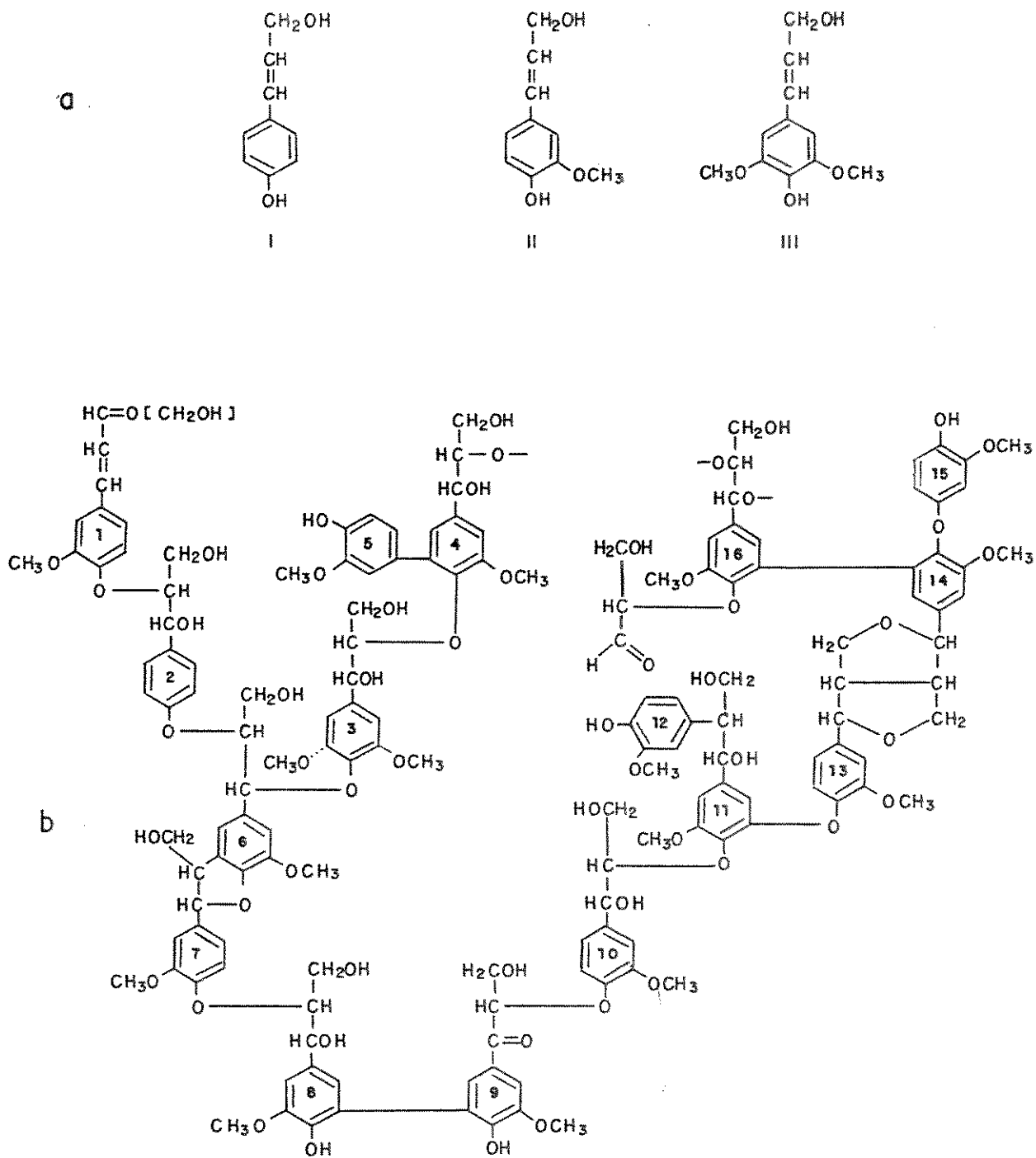


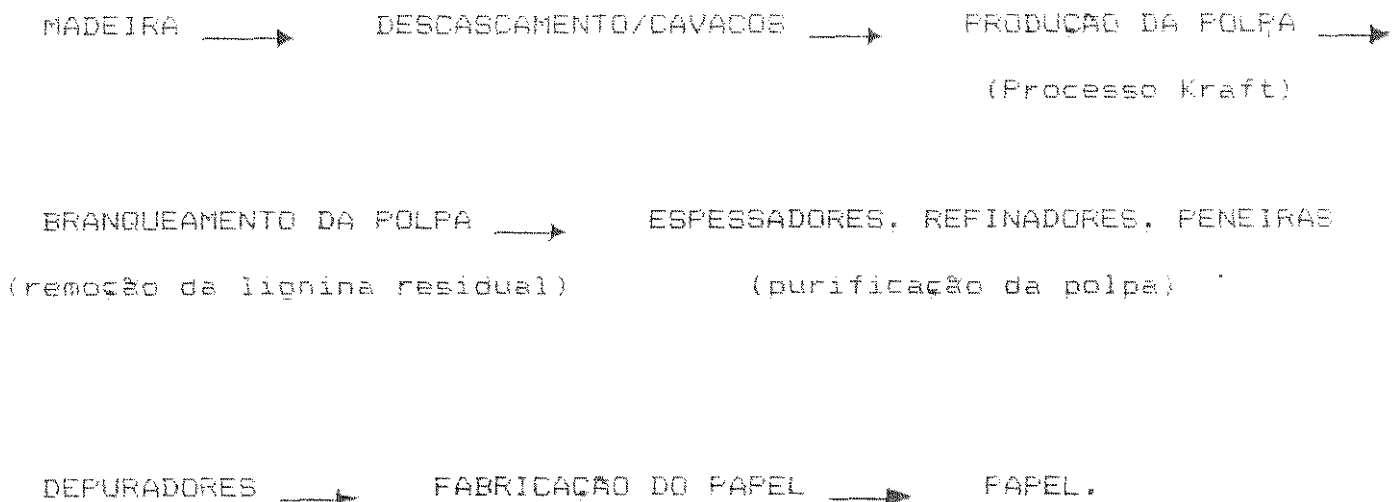
Figura 3. a) Precursores da lignina I álcool cumarílico, II álcool coniferílico e III álcool sinapílico.

b) Estrutura representativa da lignina.

C) Lignina: A lignina é um polímero aromático tridimensional, de estrutura não uniforme, composto basicamente de três tipos diferentes de álcoois p-hidroxinamílicos (Figura 3). A quantidade relativa destes álcoois determina o tipo de lignina. Ligninas de madeiras duras são polímeros mistos dos álcoois coniferílico e sinapílico. As ligninas de madeiras moles são principalmente polímeros do álcool coniferílico.

1.4 A FABRICAÇÃO DO PAPEL

Simplificando todas as etapas, desde a matéria prima ao papel, temos o seguinte esquema geral:



1.5) NOMENCLATURA E SEQUENCIA DE BRANQUEAMENTO

Tabela I. Nomenclatura (Fengel e Wegner, 1984 e referências citadas)

ESTAGIOS	COMPOSIÇÃO QUIMICA	SÍMBOLOS
Cloração	Cl_2	C
Extração alcalina	NaOH	E
Hipoclorito	NaOCl + NaOH	H
Dioxido de cloro	ClO_2	D
Peróxido	Na_2O_2 + NaOH	F ou F/E
	H_2O_2 + NaOH	
Oxigênio	O_2 + NaOH	O
Cloração com pequenas concentrações de ClO_2	Cl_2 + (ClO_2)	C_D
Sequência de Branqueamento sem lavagem intermediária.	ClO_2/Cl_2	D/C
	$Cl_2/NaOCl$ + NaOH	C/H
	$ClO_2/NaOCl$ + NaOH	D/H
Branqueamento com a mistura Cl_2 e ClO_2	Cl_2 + ClO_2	C + D
Cloração a baixas concentrações	Cl_2	(C)
Branqueamento fase gasosa	Cl_2	C_g
	ClO_2	D_g
Ozônio	O_3	Z
Ácido	ex.: CH_3CO_3H	A

Tabela II. Sequência de Branqueamento mais Utilizada na Indústria (Fengel e Wegner, 1984 e referências citadas).

Processo Kraft	C-E-H D/C-O-D
Três estágios (semi-branqueados)	C-E-H-P C-E-H-H
Quatro estágios (parcialmente semi-branqueados)	C-H-E-H C-D-E-D C-E-H-D O-C-E-H O-C-E-D G-D-O-D
Cinco Estágios	C-E-H-P-D C-E-H-D-P C-E-H-E-H C-E-D-E-D C-E-D-P-D C-E-H-E-D C-H-D-E-D D-E-D-E-D C-C/H-E-H-H

1.6) EFLUENTES PRODUZIDOS DURANTE O PROCESSO DE BRANQUEAMENTO DA POLPA

Os efluentes originados durante o branqueamento das polpas químicas com Cl_2 e/ou ClO_2 (estágio conhecido como cloração ou estágio C) (Figura 1) seguida por extração com NaOH , com ou sem oxigênio, no segundo estágio conhecido como extração alcalina (E1) são em geral compostos orgânicos clorados, mais conhecidos como cloroligninas. As cloroligninas são compostos de elevada massa molecular e os principais responsáveis pela coloração escura dos efluentes.

Foram identificados mais de 300 compostos orgânicos clorados nestes efluentes (Eriksson, 1992), desde os mais simples como, compostos fenólicos clorados, ácidos carboxílicos e hidrocarbonetos até uma classe definida de cloroligninas nocivas, com peso molecular médio maior ou igual a 1 kDa (1000 g/mol). Cerca de 70 % dos compostos orgânicos clorados são encontrados sob a forma de cloroligninas (Haggbloom e Salkinoja-Salonen, 1991 e referências incluídas). Uma pequena quantidade de dioxinas (dioxanos e furanos clorados) também foram encontradas. Estes compostos são bio-acumulativos e genotóxicos apesar de estarem presentes a níveis de traços. Entretanto as dioxinas poderiam ser reduzidas quase completamente por exclusão do cloro molecular da sequência de branqueamento (Eriksson, 1992).

Na polpa Kraft obtida a partir de madeiras duras, estima-se que cerca de 3 kg de compostos orgânicos clorados são formados por tonelada de polpa, durante o branqueamento convencional. A maioria destes compostos são recalcitrantes. Foi demonstrado que clorofenóis e derivados são acumulados nos sedimentos das lagoas de tratamento, além de muitos outros compostos orgânicos que também se acumulam ao longo da cadeia alimentar (Haggbloom e Salkinoja-Salonen, 1991 e referências in-

cluídas). As cloroligninas não podem penetrar na membrana celular dos organismos vivos, porém podem ser degradadas lentamente pela ação combinada de fatores físicos, químicos e biológicos gerando compostos de massa molecular reduzida que igualmente seriam nocivos ao ecossistema aquático. Estes compostos também impedem a absorção de luz nos corpos receptores (Cammarota, 1991).

Durante a degradação da clorolignina e cloração de resíduos fenólicos, são formados os clorofenóis, compostos de baixo peso molecular. Estudos realizados por Heimburger e col. (1988) mencionam que os fenóis clorados representam menos de 2 % do cloro orgânico nos efluentes de branqueamento, embora contribuam enormemente para a toxicidade do efluente. São três os tipos de fenóis clorados predominantes: cloroguaiacóis, clorocatecóis e clorofenóis (Figura 4). Deste grupo, o tetracloroguaiacol é o mais tóxico. Os efeitos tóxicos dos líquidos de cloração são normalmente mais baixos do que os da extração alcalina; entretanto, devido a liberação de grandes volumes dos líquidos de cloração produzidos, a toxicidade é muito alta.

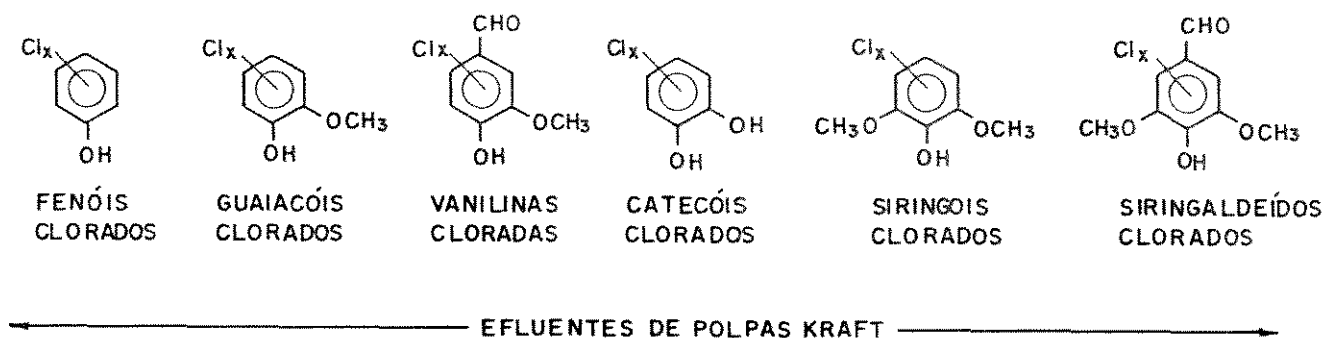


Figura 4. Fenóis clorados predominantes (Kringstad e Lindstrom, 1984).

Estão presentes nos efluentes, em pequenas proporções, compostos ácidos. Estes podem ser subdivididos em cinco categorias segundo Kringstad e Lindstrom (1984): ácidos graxos, hidroxiácidos, ácidos dicarboxílicos, ácidos aromáticos e ácidos resinosos. Os ácidos acético e fórmico são quantitativamente os ácidos mais importantes. Apesar da pequena concentração nos efluentes, os compostos ácidos contribuem em até 90 % para a toxicidade dos efluentes (Cammarota, 1991).

O metanol e várias hemiceluloses são os compostos neutros dominantes. O metanol é formado pela degradação oxidativa dos grupos metoxila da lignina residual. Compostos neutros consistem de hidrocarbonetos clorados saturados e insaturados, aldeídos, cetonas, benzeno clorados e vários ésteres. O caráter apolar lipídico de alguns destes compostos sugere uma propensão à bioacumulação nos tecidos vivos, apesar de estarem presentes em pequenas proporções (Voss, 1983)

1.7) CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES DE BRANQUEAMENTO

Os efluentes são caracterizados por sua DBO, DQO, cor, mutagenicidade, e toxicidade aguda e crônica.

A DQO (demanda química de oxigênio) e a DBO (demanda bioquímica de oxigênio) estão relacionadas com a quantidade de oxigênio requerido, no corpo receptor, para oxidar os compostos presentes no efluente.

Os efluentes da polpa branqueada, além de apresentarem uma coloração escura possuem elevada carga orgânica. A cor indica a presença

de compostos inibidores que podem ser extremamente deletérios no ambiente aquático. Os componentes cromóforos do efluente E1 são principalmente fragmentos poliméricos oxidados de lignina contendo cloro.

A mutagenicidade é uma medida da capacidade do efluente em induzir mutações genéticas, sendo comumente determinada pelo teste de Ames, o qual, utiliza a bactéria *Salmonella typhimurium* TA 1535.

A toxicidade aguda é definida como os efeitos decorrentes em um período curto de tempo, de 24 a 96 horas. Os testes empregam, geralmente microcrustáceos (*Daphnia similis*), peixes (*Cheirodon notomelas*) e algas (*Chlorella vulgaris*) (Araújo e col. 1991) com uma restrita utilização também de bactérias, especificamente *Spirillum volutans*.

A toxicidade crônica é definida como os efeitos decorrentes da exposição ao efluente por longos períodos de tempo no mínimo 7 dias.

Neste teste qualifica-se crescimento, metabolismo e habilidade reprodutiva. Em geral empregam-se peixes (*Truta arcoires*) como organismos teste.

O Fator de Emissão de Toxicidade (TEF) é determinado em "m³ de efluente letal" por tonelada de polpa. Calcula-se utilizando-se a concentração média letal (LC₅₀) para peixes ou outros organismos teste (Sprague, 1991).

média da liberação de efluente m³/ton de produto

TEF =

LC₅₀

1.8) METODOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES: NOVAS TENDENCIAS

As técnicas atualmente empregadas no tratamento de efluentes são lagoas aeróbias e plantas de lodo ativado. As lagoas aeradas (Figura 5) são tanques, de profundidade média entre 2 e 5 metros, equipadas com rotores de aeração. A vantagem das lagoas aeradas artificialmente sobre as "naturais" é a menor área ocupada e a possibilidade de controlar o teor de oxigênio dissolvido independentemente das condições atmosféricas. A maior desvantagem reside no custo dos equipamentos e no gasto de energia elétrica (Branco e Hess, 1975). Normalmente a toxicidade aguda é removida nas lagoas aeróbias. Entretanto, Eriksson e Kolar (1985), demonstraram que ligninas cloradas de alto peso molecular não podem ser degradadas por um consórcio de bactérias isolado destas lagoas. Este tratamento poderia ser mais efetivo se a biomassa pudesse ser separada do efluente e recirculada (Ek e Kolar, 1990). Os lodos (Figura 6) proporcionam uma melhor redução dos compostos clorados (40 %) do que as lagoas aeróbias (25 %), (Eriksson 1992). O processo consiste basicamente na agitação dos efluentes em presença de microrganismos e de oxigênio atmosférico, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica (Branco e Hess, 1975) Entretanto, apesar de mais eficiente, o lodo ativado apresenta uma séria desvantagem, que é a formação exacerbada de lodo. Atualmente já existem programas que consideram a bioremediação deste lodo como fertilizante para o solo (comunicação pessoal de M. Ortolando, biólogo da Ripasa S.A.).

A ultrafiltração do efluente de extração alcalina é uma ótima alternativa, além de apresentar um custo razoável (3-4 US\$/ton polpa)

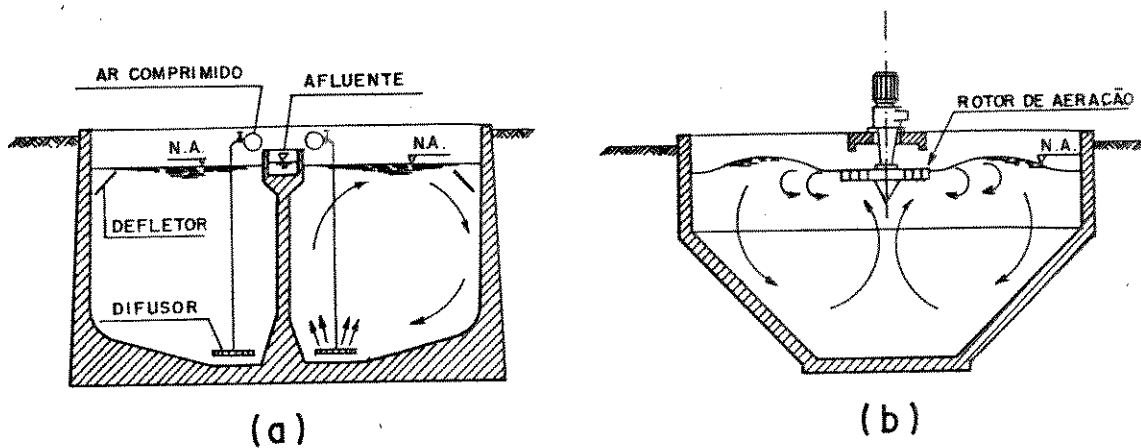


Figura 5. Lagoa aeróbia: modelos de tanques de aerção a) com ar difuso e b) com aerção superficial. (Branco e Hess, 1975).

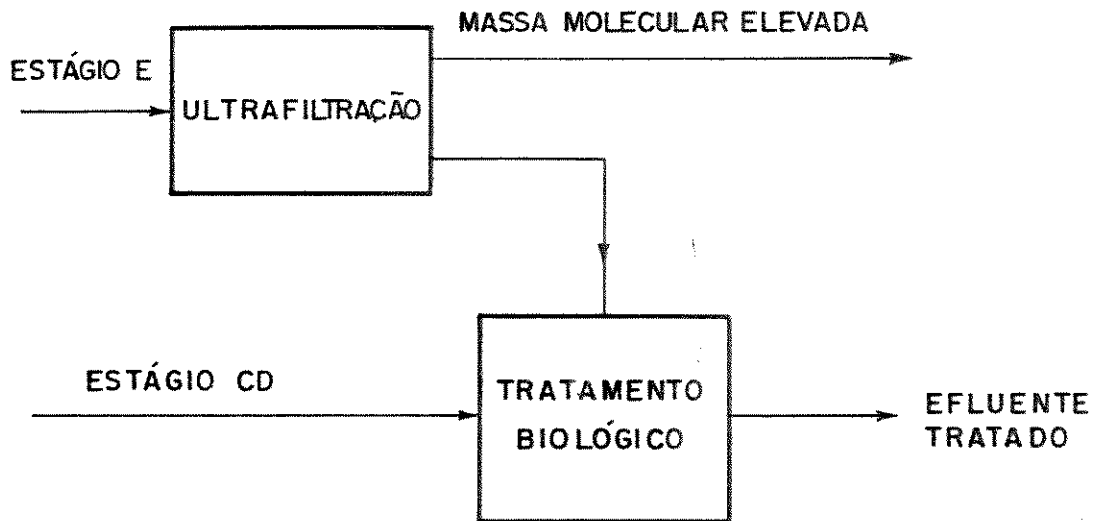


Figura 7. Tratamento combinado Ultrafiltração/Tratamento biológico (Eriksson, 1992).

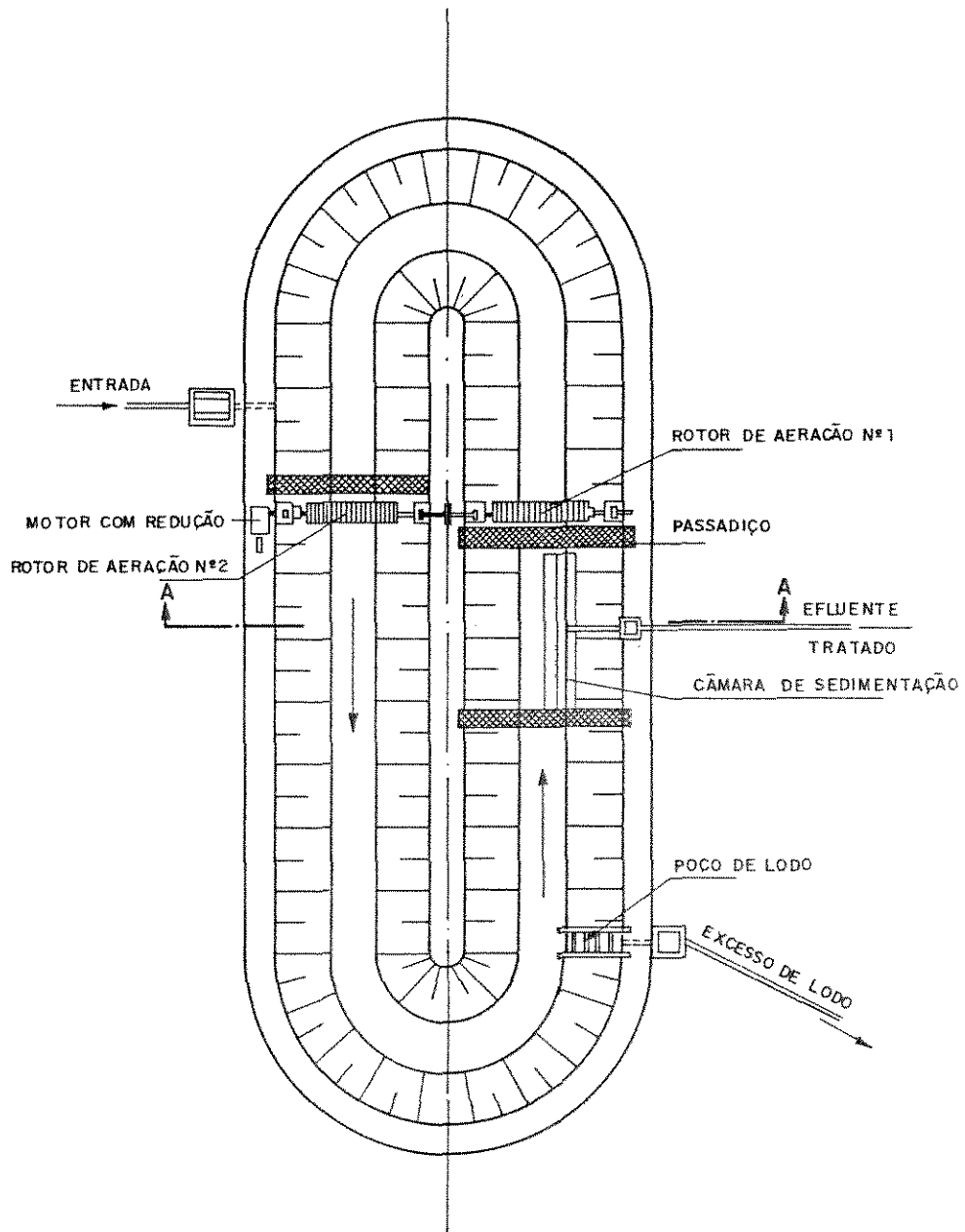


Figura 6. Esquema geral de uma planta de lodo ativado
(Branco e Hess, 1975)

(Roman e col. 1988). Entretanto, após a ultrafiltração, o efluente permanece agudamente tóxico, fazendo-se imprescindível um tratamento biológico como complemento do processo de ultrafiltração (Figura 7).

O tratamento anaeróbio alternado ao aeróbio é a atual tendência, pois incrementa consideravelmente a eficiência do tratamento, reduzindo o tamanho das estações e o tempo de residência (Fairbanks, 1992; Eriksson, 1992 e Ek e Eriksson, 1989). Na Finlândia já está sendo aplicado o tratamento combinado anaeróbio-aeróbio, chamado Enso-Fenox. A redução dos halogênios orgânicos adsorvíveis (AOX) é semelhante ao de lagoas aeradas, porém ao invés de 7 dias, o mesmo resultado é obtido após 7 horas. Nestes tratamentos mencionados a porção de massa molecular elevada dos halogênios orgânicos adsorvíveis, não são degradadas (Ek e Eriksson, 1989).

Uma alternativa que está sendo analisada é a utilização de biorreatores. Em um estudo realizado por Fahmy e col. (1991), eles compararam um reator aeróbio de leito fluizado (AFB) com reatores anaeróbio-aeróbio em série (AAS) e anaeróbio-aeróbio com recirculação (AAR). Maiores detalhes serão discutidos no tópico "biorreatores". Haggblom e Salkinoja-Salonen (1991) estudaram um tratamento sequencial de reator anaeróbio de leito fluizado e reator aeróbio de leito recheado.

Outros tipos de tratamento não biológicos como absorção em carbono ativado ou resinas sintéticas, osmose reversa, oxidação química ou fotoquímica, precipitação por poliaminas, precipitação com sais de alumínio e carbonatos, irradiação ultravioleta e troca iônica, são processos que apresentam limitações tanto a nível econômico como técnico, impossibilitando a aplicação industrial.

Sendo assim tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos é um campo bastante promissor.

1.9) TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES

A capacidade de fungos de decomposição branca descolorar efluentes Kraft e degradar cloroligninas é discutida há mais de 10 anos (Lankinen e col. 1991 e referências citadas). O processo MyCoR (Chang e col. 1987), já referido anteriormente, utiliza o fungo *P. chrysosporium* imobilizado. Neste tratamento há uma redução marcada do cloro orgânico total (TOCl) em 70 % e da cor em 80 %, porém existem alguns problemas como alto consumo de oxigênio, tempo de residência restrito e perda de biomassa fungica, que tornam este processo inviável economicamente (Fitzsimons, 1990; Cammarota e Sant'Anna, 1992). Vários estudos mostraram a habilidade de *P. chrysosporium* em degradar muitos tipos de compostos aromáticos clorados e outros organopoluentes (Hammel, 1989). Recentemente, Bergbauer e col (1992) reportaram sobre um fungo coleomycete, *Stagonospora gigaspora* capaz de mineralizar e solubilizar, sob certas condições, compostos derivados de lignina, removendo 90 % da cor de efluentes de branqueamento CEH. Os efluentes da sequência de tratamento EOP revelaram serem mais persistentes ao ataque fúngico, mesmo assim a toxicidade aguda diminuiu consideravelmente nos dois casos (44 e 88 % respectivamente). O fungo *Trametes versicolor*, estudado por Paice e col. (1989) e Reid e col. (1990) e Roy-Arcand e Archibald (1991) entre outros, demonstrou ter um potencial enzimático interessante, sendo estudado sob este aspecto também no branqueamento da pol-

pa Kraft (Bourbonnais e Paice, 1992). Fenoloxidasas tipo-lacase são as principais enzimas oxidativas secretadas por este fungo de decomposição branca. Foi observada uma redução considerável do ADX de efluentes de cloração e uma completa mineralização de organoclorados tóxicos.

Hatakka e col. (1990) estudaram fungos ligninolíticos com potencial no tratamento de efluentes. Além de *P. chrysosporium*, *Phlebia radiata* demonstrou uma grande perspectiva, especialmente por apresentar um "pool" de enzimas ligninolíticas em meio contendo efluente. A cor foi quase integralmente reduzida e observou-se 50-60 % de redução de ADX.

Apesar dos fungos representarem o grupo de microrganismos mais aptos na mineralização de compostos xenobióticos, existem estudos realizados com bactérias e leveduras capazes de metabolizar compostos derivados de lignina. Duas patentes foram publicadas em 1980 e 1984 por Blair e Davis sobre a utilização da bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa* na descoloração de efluente, porém a mesma não apresentou eficiência considerável (26 % redução de cor e 22 % de redução de DQO) se comparada aos fungos já mencionados. Outras como *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus subtilis* e a levedura, *Candida albicans* estudadas por Vasudevan e Mahadevan (1990) apresentaram potencial na degradação de lignina. O actinomicete *Rhodococcus rhodochrous* é capaz de metabolizar compostos modelo de lignina (Andreoni e col. 1991) utilizando este polímero como única fonte de carbono. Esta é uma propriedade intrinsecamente importante na escolha de microrganismos para tratamento de efluentes, pois um dos problemas é justamente a utilização de fontes adicionais de carbono e/ou nitrogênio, que transforma um tratamento eficiente, como os já mencionados acima em inviáveis economicamente.

mente.

1.10) FUNGOS IMOBILIZADOS

Nos últimos anos intensificaram-se as pesquisas sobre células imobilizadas no tratamento de resíduos industriais (Ancelmo e Novais, 1992 e referências citadas). É notório o crescente interesse na utilização de fungos filamentosos para tais propósitos. Foi estudado por Ancelmo e Novais (1992 a,b) o tratamento de resíduos fenólicos por *Fusarium flocciferum* imobilizado em poliuretano. Os resultados comprovaram o potencial de aplicação do micélio deste fungo imobilizado para remoção de compostos tóxicos.

Foi estudado recentemente por Cammarota e Sant'Anna (1992), *P. chrysosporium* imobilizado em nylon em um biorreator de leite recheado para o tratamento de efluentes. Os resultados obtidos foram comparados com o processo MyCoR RBC (Chang e col., 1987). O fungo imobilizado em um bioreator de leite recheado foi tão eficiente quanto o processo MyCoR, com a vantagem de operar com um tempo de residência maior e utilizar ar ao invés de oxigênio. Messner e col. (1989) estudaram *P. chrysosporium* imobilizado em um biorreator do tipo leite recheado. O processo foi denominado MYCOPOR.

Além de *P. chrysosporium* e *F. floccuciferum* também foram testados para imobilização, outros fungos com resultados bastante interessantes como *Coriolus versicolor*. Este fungo imobilizado em alginato de cálcio remove 80 % da cor do efluente em três dias, com a utilização de sacarose como fonte de carbono (Livernoche e col. 1983).

Em um sistema semelhante ao RBC, *Trichoderma* sp. demonstrou ser eficiente, reduzindo 85 % da cor e 25 % da demanda química de oxigênio, após três dias de cultivo, em condições ótimas de crescimento (Prasad e Joyce, 1991).

Segundo Cheetham e Bucke (1984) e Nicol e col. (1988), sob certas condições, a imobilização confere maior estabilidade e eficiência ao processo.

1.11) FUNGOS: UM CONCEITO

Neste trabalho utilizamos duas classes de fungos: Ascomycetes e Basidiomycetes.

Foram reconhecidas até 1983, 28.650 espécies de ascomycetes. Estes juntamente com os basidiomycetes, são denominados fungos superiores, devido a complexidade de sua estrutura. O micélio frequentemente forma pletênquima (tecidos de fungo), especialmente em frutificações. A fusão sexual dos núcleos dos ascomycetes ocorre dentro de uma célula saculiforme, o asco, principal característica deste grupo. Ocorrem em uma ampla variedade de substratos, solo, esterco, madeira, além de se apresentarem no ambiente aquático. É conhecida a aplicação de muitos destes fungos na produção de enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, na indústria alimentícia, na produção de proteína unicelular e controle biológico de pragas (Webster, 1980; Hawksworth, 1983; Seifert, 1991; Reyes e col. 1992).

Os basidiomycetes, considerados como os mais evoluídos dentre outras classes de fungos por apresentarem um sistema ligninolítico bas-

tante desenvolvido, contam com 16.000 espécies cosmopolitas. Distinto das demais classes caracteristicamente pela produção de esporos sexuais, os basidiósporos, os quais estão conectados externamente ao basídio. Podem ser saprófitos, parasitas, simbióticos e micorrizicos. São aplicados na indústria alimentícia, na produção de enzimas, na biopolpação, no biobranqueamento de efluentes, na formação de ectomicorrizas, etc (Hawksworth, 1983; Seifert, 1990).

Os fungos são classificados conforme o tipo de degradação que causam em: a) Fungos de descomposição branca ("white-rot"), os quais atacam indistintamente os três componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) com velocidades similares (Kirk e Farrell, 1987); b) Fungos de descomposição marrom ("brown-rot"), os quais degradam a porção polissacarídica da madeira, causando limitadas modificações na lignina, sem alteração do anel aromático e sendo os principais formadores de humus; c) Fungos de podridão macia ("soft-rot"), os quais degradam lignina mais lentamente do que os polissacarídeos, produzindo um amolecimento característico na superfície da madeira (Rodriguez, 1990).

Outros fungos associados a deterioração não degradativa da madeira são os chamados de tingimento azul ("blue staining fungi") (Fengel e Wegener, 1984).

O basidiomiceto, de descomposição branca, *P. chrysosporium*, isolado no início da década de 70, é o mais extensivamente estudado e considerado o mais eficaz. Na Figura 8 podemos observar um esquema hipotético da degradação da lignina por um fungo de descomposição branca.

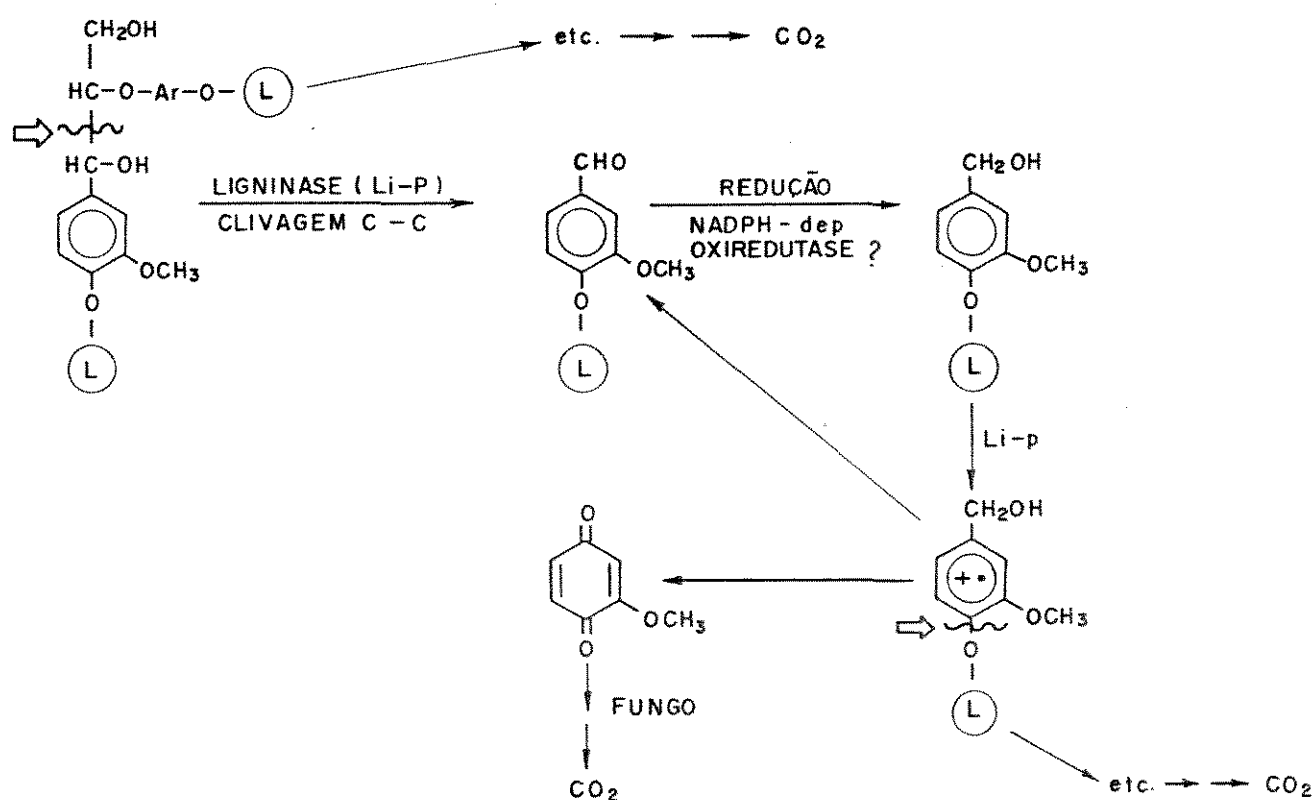


Figura 8. Esquema hipotético da degradação de lignina causada por um fungo de decomposição branca.

1.12) ENZIMAS

O interesse crescente na aplicação de microrganismos produtores de enzimas capazes de despolimerizar lignina, é notório dado o número de publicações na área de tratamento de efluentes. Até 1990 foram registradas acima de 2.000 além de 250 trabalhos e documentos não publicados (Eysenbach e col. 1990). São várias as enzimas envolvidas na degradação de lignina. A seguir discutir-se-á aquelas consideradas as mais importantes para aplicação na bioremediação de efluentes.

A) FENOLOXIDASE (LACASE E PEROXIDASE)

Estudos sobre lacase e outras enzimas oxidantes de fenóis, demonstraram que em adição a capacidade de polimerizar fenóis, também degradam lignina e compostos modelo, sob certas condições (Ferrara, 1988).

LACASE

São proteínas ligadas ao cobre bivalente, o qual é reduzido durante a oxidação de fenóis (Figura 9) e subsequentemente oxidado novamente ao estágio bivalente pelo oxigênio (Forss e col 1989). As lacases catalizam a polimerização oxidativa de compostos fenólicos, os quais são facilmente removidos por filtração. Sob certas condições, clivam uma ampla gama de compostos fenólicos sintéticos e biológicos (Roy-Arcand e Archibald, 1991).

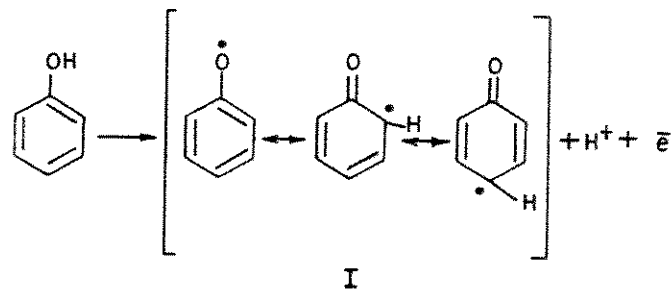
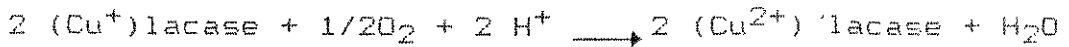
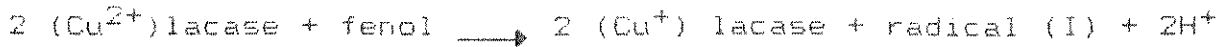


Figura 9. Esquema do mecanismo de ação das lacases.

A reação, normalmente envolve um mecanismo de remoção de um elétron e um próton do fenol com a formação de um radical mesomérico (I).

PEROXIDASES

Em um ciclo catalítico normal, a forma férrica da enzima é oxidada por peróxido de hidrogênio para oxi-ferril, estado conhecido como Composto I. O composto I é então reduzido por duas transferências consecutivas de um elétron, para o Composto II (Figura 10). Fenóis ou aminas aromáticas são os típicos doadores de elétrons para peroxidases, transformando-se em radicais livres, os quais subsequentemente derivam produtos estáveis. As peroxidases são sensíveis a excessivas

concentrações de H_2O_2 , podendo, sob certas condições, converter a enzima em um composto menos ativo, denominado Composto III (Figura 11).

Lacases e Peroxidases oxidam compostos fenólicos. Os produtos resultantes da oxidação polimerizam-se espontaneamente formando complexos insolúveis; podendo ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação (Davis e Burns, 1990).

B) LIGNINA-PEROXIDASE OU LIGNINASE

Em 1983 foi descoberta simultaneamente por Kirk e Tien e Gold e col., uma enzima extracelular em culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium*. Esta enzima estaria relacionada a oxidação de compostos monoméricos e diméricos derivados da lignina e despolimerização parcial da mesma em presença de peróxido de hidrogênio.

As ligninases, uma classe de isoenzimas, são hemo-proteínas de peso molecular 42.000 Da e ponto isoelétrico 3,5 (Tien e Kirk 1984; Gold e col. 1984), que requerem H_2O_2 para sua atividade. Possuem um potencial de oxidação superior as peroxidases típicas como a peroxidase de rabanete (HRP). Apresentam uma ampla especificidade para uma série de compostos aromáticos, sendo capazes de oxidar fenóis a quinonas, sugerindo um acoplamento oxidativo, permitindo a polimerização (Camarota, 1991). Na Figura 12 está representada a quebra hipotética da lignina por ação de lignina-peroxidase.

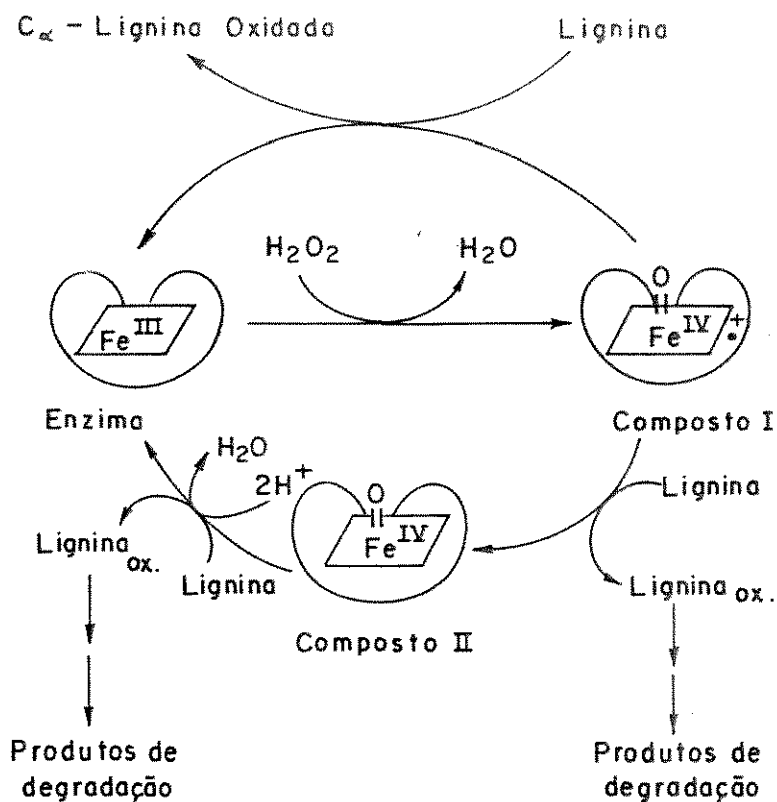


Figura 10. Peroxidase: ciclo catalítico normal (Kirk, 1987).

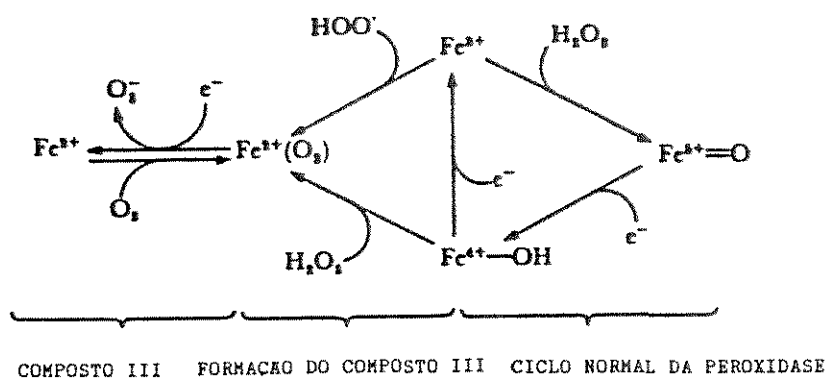


Figura 11. Interrelação entre estados de redução de uma peroxidase típica (HRP) (Palmer e col., 1987).

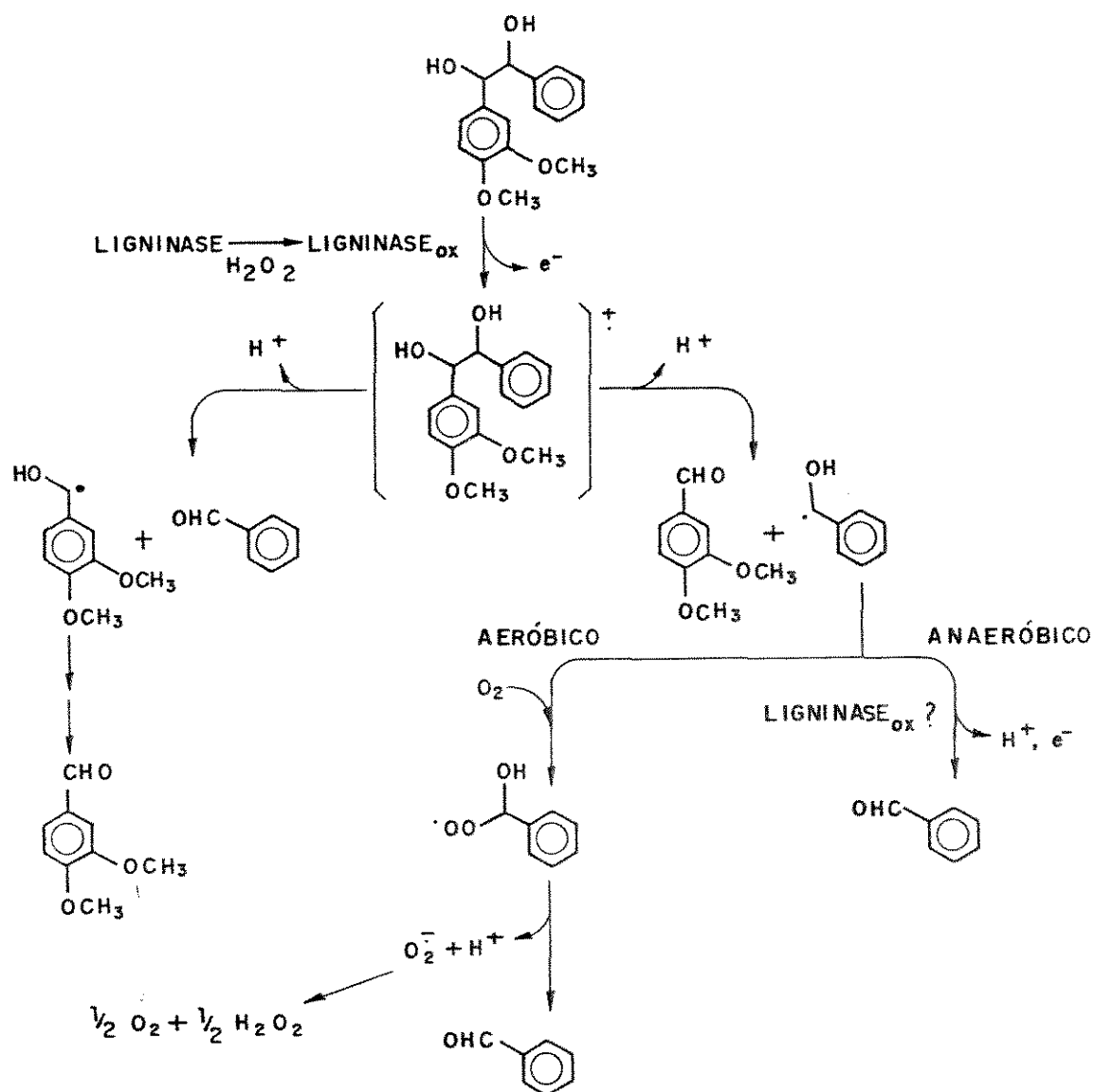


Figura 12. Esquema hipotético da ação das ligninases sobre a lignina (Kirk, 1987).

C) MANGANES-FEROXIDASE (Mn-P)

Em 1984, Kuwahara e col. identificaram em culturas de *P. chrysosporium* uma outra peroxidase extracelular, dependente de Manganês e de H_2O_2 para a sua atividade. Manganês-peroxidase é uma classe de isoenzimas com peso molecular de aproximadamente 46.000 Da e ponto isoeletrico entre 4,2 e 4,9, contendo um mol de ferro porfirínico IX/mol de enzima (Glenn e Gold, 1985). A enzima oxida Mn II a Mn III conforme o esquema abaixo (Figura 13), com subsequente oxidação de uma grande variedade de fenóis e corantes.



Figura 13. Mn (II) é oxidada a Mn (III) por uma peroxidase dependente de Mn.

Tanto Lignina-peroxidase como Manganês-peroxidase, são importantes na descoloração do efluente Kraft. O papel destas duas enzimas no tratamento de efluentes foi discutido por Michel e col., (1991).

D) BETA-GLICOSIDASE

β -D-glicosidase (celobiase, β -D-glicose glicohidrolase) catalisa a hidrólise de celobiose e oligossacarídeos solúveis a D-glicose, porém não degrada celulose. Sugere-se o envolvimento do ânion carboxilato na atividade catalítica. A glicose é um potente inibidor da atividade de

β -D-glicosidase. β -D-glicosidase possui atividade transferásica (Wood, 1985). Essa propriedade torna esta enzima essencial no tratamento de efluentes, pois permite que o escasso açúcar disponível no efluente seja transferido para a lignina (Figura 14), tornando este um substrato adequado para o ataque fúngico. Foi demonstrado por Kondo e col. (1989), que a degradação depende da atividade de transglicosilação de glicosidases secretadas pela maior parte dos fungos de decomposição branca.

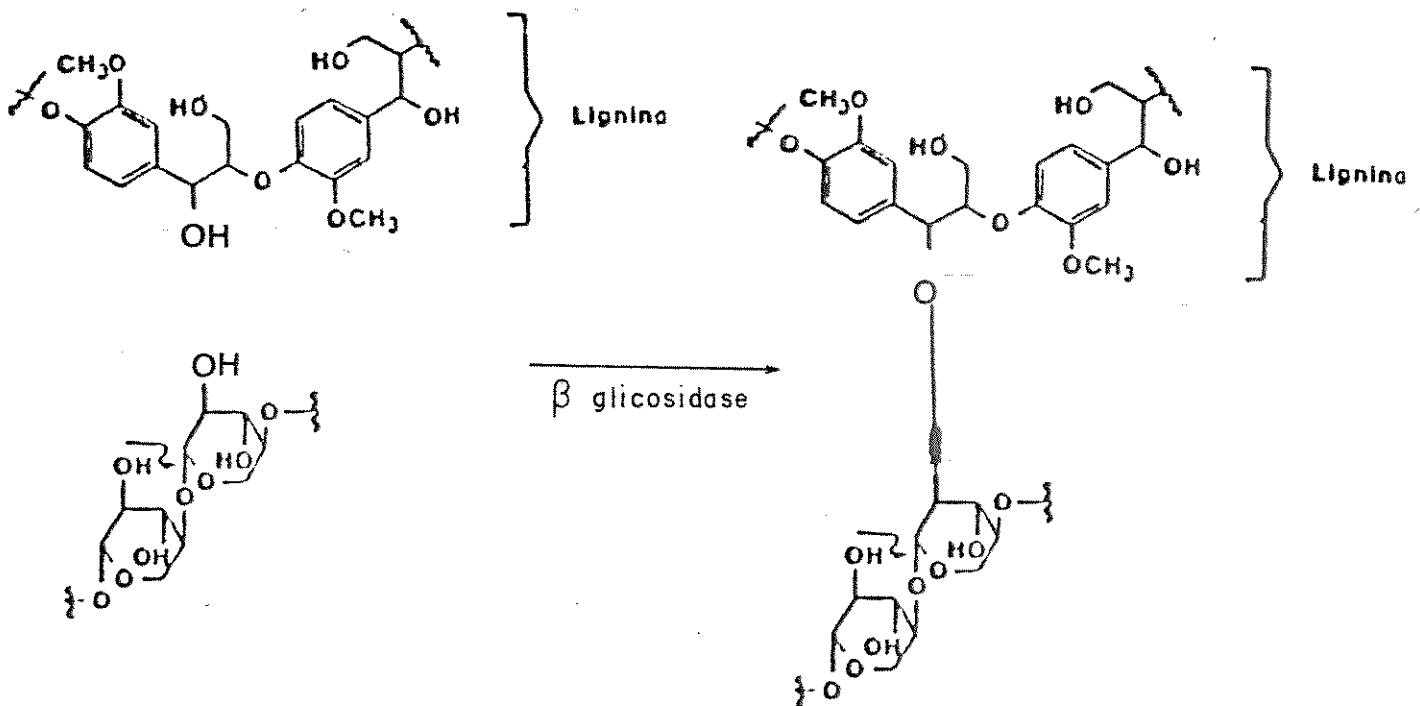


Figura 14. Reação de transglicosilação.

1.13) BIORREATORES

O uso de biorreatores na área de tratamento de efluentes parece ser uma opção interessante na qualidade de tornar o processo mais eficiente. A seguir serão descritos alguns dos modelos mais empregados para este fim.

Contactor Biológico Rotatório (RBC): Foi testado com o fungo *P. chrysosporium* imobilizado por adsorção nos discos, os quais estão parcialmente submersos no efluente (Figura 15). Este processo permite a redução eficiente do conteúdo de cloro ligado a moléculas orgânicas e da cor produzida pelas cloroligninas (Chang e col., 1987 e Frouty, 1990), como já comentado anteriormente.

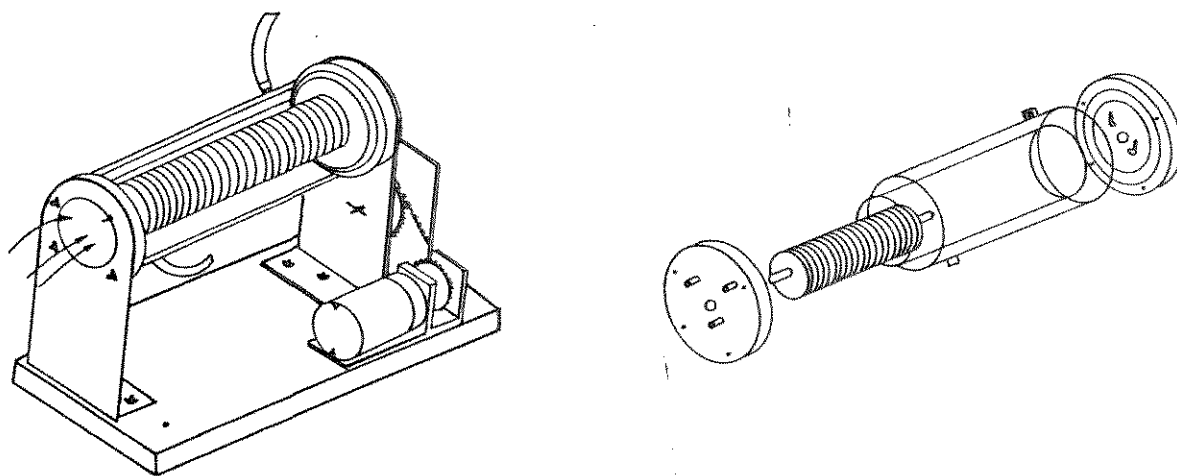


Fig. 15 Esquema de Contactor Biológico Rotatório.

Lewandowski e col. (1990) testaram a degradação de 2-clorofenol por *P. chrysosporium* em duas configurações de reatores: Reator de leito recheado, com madeira balsa para imobilização do fungo (Figura 16)

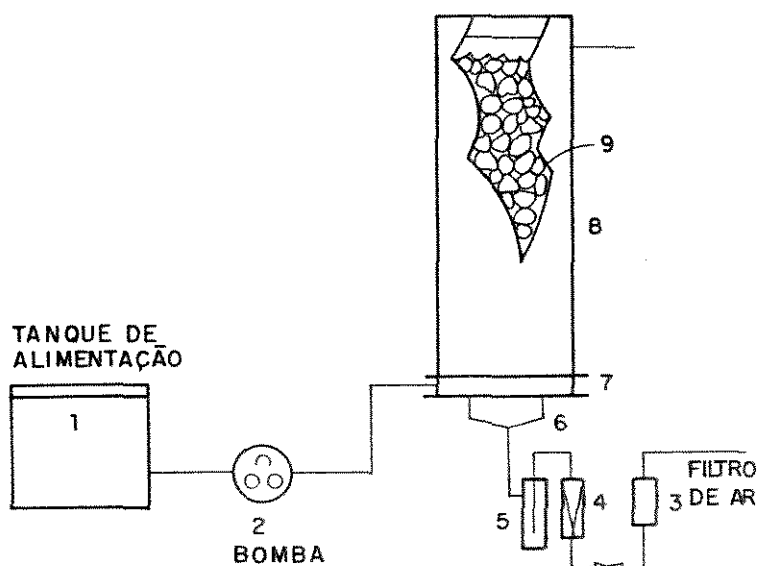


Figura 16. Esquema de um reator de leito recheado. (1) tanque de armazenamento; (2) bomba; (3) filtro de ar; (4) fluxo de ar; (5) tubo para passagem do ar; (6) difusor poroso de ar; (7) leito recheado; (8) reator e (9) empacotamento (Reis e Sant'Anna, 1985).

e um reator de mistura perfeita ("well-mixed") que utiliza esferas de alginato para imobilização. Os dois sistemas mostraram-se eficientes e aparentemente descreveram uma cinética michaeliana.

Outros experimentos com biorreator, utilizaram *Phlebia radiata* imobilizada em um suporte plástico para decréscimo de AOX. O bioreator consistiu em uma garrafa de vidro de 2 L de volume e foi operado em sistema semi-contínuo. Durante o primeiro dia, a remoção da cor foi de 33 %, mais rápida que a degradação de AOX (10 %), demonstrando aparentemente cinéticas diferentes (Lankinen e col. 1991).

Hagblom e Salkinoja-Salonen (1991), testaram um tratamento sequencial de um reator anaeróbico de leite fluizado e um reator aeróbico de leite fixo (Figura 17) com bons resultados na degradação de compostos clorados de alto e baixo peso molecular. O tratamento combinado reduz significativamente a DQO (30-65 %), a DBO (60-80 %) e AOX (70 %).

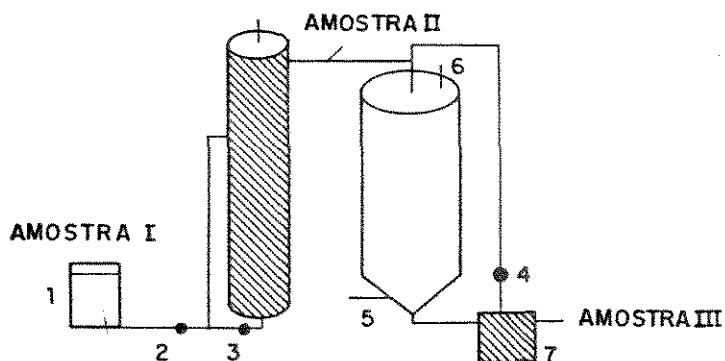


Figura 17. Esquema de um tratamento sequencial: reator anaeróbico de leite fluizado/reator aeróbico de leite fixo. 1. tanque de alimentação, 2. bomba de alimentação, 3. bomba de reciclo (filtro anaeróbico) 4. bomba de reciclo, 5. tanque, 6 e 7. entrada e saída de ar. As amostras foram colocadas nos pontos I (efluente de entrada), II (após tratamento anaeróbico) e III (após tratamento aeróbico).

A remoção de AOX (50 %) foi mais significativa no reator anaeróbio do que no aeróbio (20-30 %), entretanto as taxas de DQO e DBO foram muito baixas ou negativas no sistema anaeróbio. Esses resultados sugerem que a combinação dos dois sistemas anaeróbio/aeróbio é uma via atrativa e adequada no tratamento de efluentes.

A combinação de um método físico (ultrafiltração) com o tratamento biológico, foi estudado por Roman e col. (1991). Primeiramente o efluente E1 foi filtrado através da membrana e sucessivamente tratado em três sistemas biológicos, lagoa aerada (Figura 18), reator fungico (Figura 19) e filtro anaeróbio (Figura 20). A combinação dos tratamentos (físico e biológico) demonstrou ser uma ótima alternativa já que reduziu os valores de DQO (72 %), DBO (95 %) e AOX (66 %).

Em 1987, no 4^o Simpósio Internacional de Polpação Química da Madeira, em Paris, Ek e Eriksson (4th Int. Symp. Wood Pulping Chem., Paris) já haviam apresentado um trabalho com a combinação destes dois métodos (ultrafiltração e biológico). O mesmo processo segue vigorando nos estudos de Eriksson até o presente momento (Eriksson, 1992)

A biodegradação de compostos orgânicos clorados de um efluente (C e E) em um biofilme adaptado a um biorreator de leito fluizado foi estudado sob condições aeróbia/anaeróbia. Dois reatores combinados em série foram comparados com um digestor aeróbico simples (Figura 21).

Em geral o sistema anaeróbio, reduz a DQO e AOX. Com um tempo de residência de 18 horas em cada reator, a DQO e AOX decresceram normalmente de 15-32 % em cada reator aeróbio, enquanto que no anaeróbio houve somente o decréscimo típico é de 4-15 % (Fahmy e col. 1991).

Recentemente foi publicado por Cammarota e Sant'Anna (1992), o modelo, também empregado em nossos estudos, do reator de leito recheado

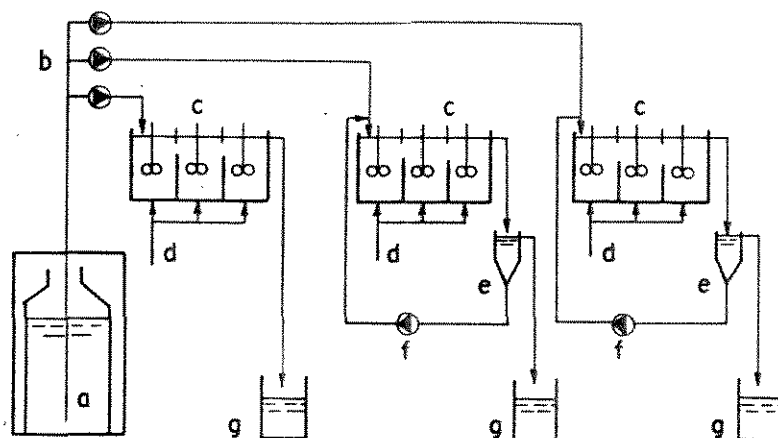


Figura 18. Sistema de lagoas aeróbias, a) efluente armazenado no refrigerador a 4°C , b) bomba de influente, c) três estágios, equivalente ao volume de uma lagoa aeróbia mantida a temperatura ambiente ($20\text{--}22^{\circ}\text{C}$), d) aeração, e) unidade de sedimentação, f) reciclagem de sólidos, g) coleta do efluente (Boman e col. 1991).

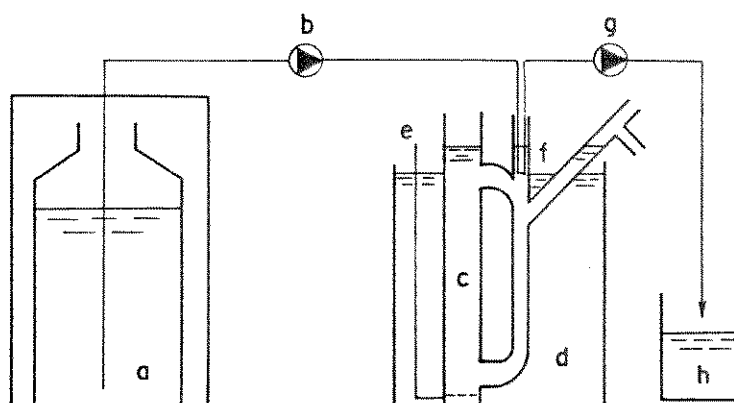


Figura 19. Reator fungal. a) efluente armazenado no refrigerador a 4°C , b) bomba de influente, c) fermentador "airlift" d) banho termostaticado a 37°C , e) suplemento de ar, f) efluente, g) bomba sincronizada para o efluente com uma bomba para o influente (Boman e col. 1991).

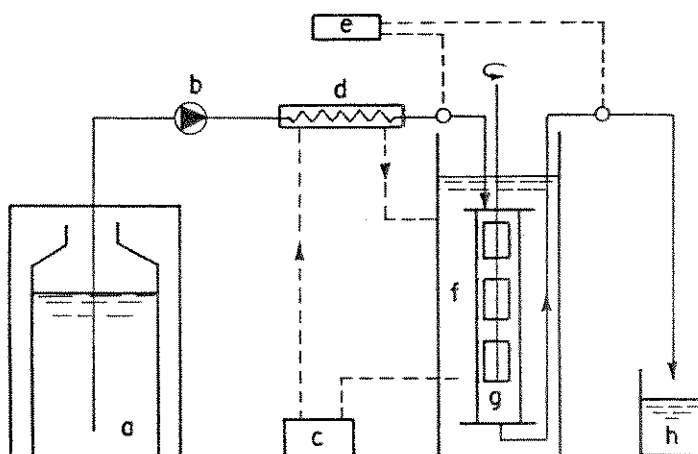


Figura 20. Desenho esquemático mostrando um sistema de filtro anaeróbico. a) efluente armazenado no refrigerador a 4°C, b) bomba de influente, c) aquecimento termostatzado, d) trocador de calor, e) medida do sistema de redução, f) banho termostatzado a 30°C, g) filtro anaeróbico (0,5 L) com um sistema de movimento lento e h) coleta do efluente.

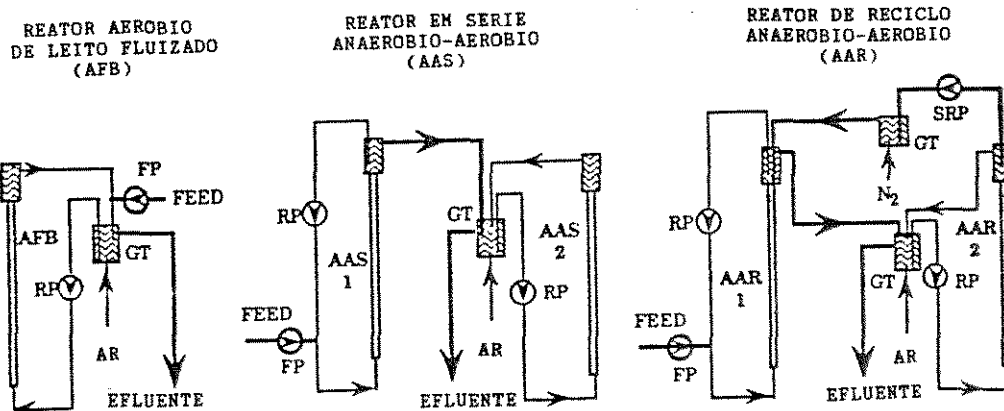


Figura 21. Sistema de reator de leito fluizado (FB) . FB-reator de leito fluizado de duas fases, AFB-aeróbico simples, AAS1-primeiro estágio anaeróbico FB no AAS, AAS2-segundo estágio aeróbico em FB no AAS, AAR1-anaeróbico FB no AAR, AAR2-aeróbico FB no AAR, RP-bomba de recirculação para fluidização, SRP-bomba de recirculação no reator (AAR) de reciclo anaeróbico-anaeróbico, FP-bomba de retorno, GT-tanque de gás (aeração ou oxigênio liberado por N_2) , As linhas finas indicam circulação interna do FB, as linhas grossas indicam o sistema de fluxo (alimentação, efluente, sistema de recirculação) (Fahmy e col. 1991).

("packed-bed bioreactor"). Os dois sistemas, a) biorreator de leito recheado com *P. chrysosporium* imobilizado e b) MyCoR RBC foram comparados na descoloração do efluente Kraft E1.

Problemas como perda de biomassa, altas concentrações de oxigênio e tempo de residência não foram encontrados no sistema (a). O fato deste operar com ar ao invés de oxigênio é uma das grandes vantagens observadas além do tempo de residência. O biorreator de leito recheado pode operar, sem perda de eficiência por um período de aproximadamente 70 dias. Os resultados obtidos foram 70 % de descoloração, 64 % de remoção de fenóis, 50 % de DQO e 7 % do cloro orgânico.

O balanço de substrato padrão para um biorreator de leito recheado pode ser matematicamente tratado como:

$$V \frac{[ds]}{[dt]_{s=se}} = QS_s - QS_o$$

Se o modelo de Monod é assumido, tem-se que:

$$\begin{aligned} \frac{[ds]}{[dt]} &= \frac{-1}{Y_{x/s}} \mu_x X \\ q_s &= \frac{-1}{Y_{x/s}} \\ q_s &= \frac{-1}{X} \frac{[ds]}{[dt]} \\ \frac{[ds]}{[dt]_{s=se}} &= -q_s X \end{aligned}$$

Onde: q_s é a velocidade específica de consumo de substrato.

Q é a fluxo de entrada do efluente ($m^3 \text{ dia}^{-1}$)

S é o substrato

V é o volume do líquido no reator (L ou m³)

X é a concentração de biomassa (mg L⁻¹ VS)

Y_{X/S} é o coeficiente de redução

ux é a taxa de crescimento

E segundo o modelo de Monod:

$$q_s = q_{s\max} \frac{[S_e]}{K_s + [S_e]}$$

$$\frac{[ds]}{[dt]_{s=s_e}} = - q_{s\max} \frac{[S_e] X}{K_s + [S_e]}$$

$$\frac{[ds]}{[dt]_{s=s_e}} = \frac{- K X [S_e]}{K_s + [S_e]}$$

A equação final resulta em:

$$\frac{\tau}{(S_0 - S_e)} = \frac{K_s}{K X S_e} + \frac{1}{K X}$$

Onde τ é o tempo de residência da fase líquida ($\tau = V/Q$) (h ou dia)

Para maiores detalhes vide apêndice III.

2. OBJETIVOS

Os objetivos propostos para a realização deste trabalho foram:

- Selecionar fungos xilófagos para bioremediação de efluentes Kraft, sem adição de fontes de carbono ou nitrogênio, durante o processo de tratamento;
- Desenvolver estudos cinéticos da descoloração, pH, DQO, fenóis totais com a cepa selecionada na primeira etapa;
- Definir quais os principais fatores envolvidos no mecanismo de descoloração e destoxicação do efluente;
- Avaliação de uma possível correlação entre atividade enzimática e descoloração;
- Aplicação do sistema a um biorreator de leito recheado;
- Imobilização do fungo em diferentes suportes (madeira e nylon) aplicados a um biorreator de leito recheado. Avaliação da eficiência em ambos os sistemas.

3. EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPAMENTOS

Autoclave vertical AV 75 Phoenix

Bioreator de Leito Recheado

Espectrofotômetro UV/Visível Intralab mod. DMS-100

Espectrofotômetro Micronal mod. B-382

Espectrofotômetro UV/Visível Beckmann DU-70

Estufa de cultivo Fabbe mod. 116

Fluxo laminar Veco mod. VLFS 12

Incubador rotatório série 25 New Brunswick Scientific

Sistema cromatográfico LKB 2137

3.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo que alguns deles, considerados mais específicos são listados a seguir.

Albumina bovina. Sigma

Alcool veratrílico. Aldrich

Coomassie Brilliant Blue G-250. Fluka AG

DEAE Sephadex G-50. Pharmacia

Nylon. 3M Scotch Brite^{MR}

Cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis*: O conteúdo de lignina (24,8 %), celulose (44,3 %), hemiceluloses (28,6 %) e extrativos (5,8 %) foi determinado por Baeza e col., (1991)

3.3 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas 51 cepas de fungos xilófagos, listados a seguir:

1. *Xylaria* sp.ICN-207 (Ascomycete)
2. Basidiomycete não identificado UEC-2001
3. *Coriolus* sp.UEC-2002
4. *Pleurotus ostreatus* UEC-2003
5. *Cordiopsis rigida* UEC-2004
6. Corticiaceae UEC-2005
7. *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767
8. *Trametes* sp.UEC-2006
9. *Cordiopsis rigida* UEC-2007
10. *Trametes rigida* UEC-2008
11. *Coriolellus sepium* UEC-2009
12. *Cordiopsis rigida* UEC-2010
13. Basidiomycete não identificado UEC-2011
14. *Xylaria* sp.UEC-1002 (Ascomycete)
13. *Pycnoporus sanguineus* UEC-2012
14. *Phaeocorolellus trabeus* UEC-2013
15. *Phanerochaete chrysosporium* 446-ME

16. *Xylaria* sp. ICN-155 (Ascomycete)
17. *Pycnoporus sanguineus* UEC-2015
18. *Cyathus pallidus* UEC-2016
19. *Cyathus striatus* UEC-2017
20. *Lentinus edodes* UEC-2019
21. *Cyathus stercoreus* UEC-2020
22. *Lentinus edodes* UEC-2021
23. *Polyporus* sp. UEC-2022
24. *Phaeocoriolellus trabeus* UEC-2023
25. *Chrysonilia sitophila* TFB 27441 (Ascomycete)
26. *Stereum* sp. UEC-2024
27. Polyporaceae UEC-2025
28. Basidiomycete não identificado UEC-2026
29. Polyporaceae UEC-2027
30. *Fibroporia gossypia* UEC-2027
31. *Pycnoporus sanguineus* UEC-2028
32. Polyporaceae UEC-2029
33. *Panus aida* UEC-2030
34. *Rigidoporus lineatus* UEC-2031
35. *Pleurotus florida* UEC-2032
36. *Pleurotus sajor-caju* UEC-2033
37. *Hohenbuehlia grisea* UEC-2034
38. *Phaeocoriolellus trabeus* UEC-2035
39. *Trametes* sp. UEC-2036
40. Basidiomycete não identificado UEC-2037
41. Polyporaceae UEC-2038

42. *Panus crinitus* UEC-2039
43. Ganodermataceae UEC-2040
44. *Cyathus striatus* UEC-2041
45. Basidiomycete não identificado UEC-2042
46. *Stereum sanguinolentum* UEC-2043
47. *Trametes villosus* UEC-2044
48. *Phaeocoriolellus trabeus* UEC-2045
49. *Panus rudis* UEC-2046
50. *Coriolus versicolor* UEC-2047
51. Basidiomycete não identificado UEC-2048

3.4 MEIO DE CULTURA E INOCULO:

As cepas foram mantidas em tubos contendo agar extrato de malte 1,25 % (composição especificada no apêndice I) a 5 °C. O meio agar extrato de malte é amplamente utilizado, especialmente para fungos basidiomicetos xilófagos (Seifert, 1990).

Os fungos foram cultivados em placas, contendo o meio agar extrato de malte 1,25 % (aproximadamente 20 mL de meio/placa) no pH do meio (5,0), durante 5 dias a 25 °C, na ausência de luz. Após este período os fungos foram repicados para o meio líquido (25 mL), extrato de malte 1,25 % em Erlenmeyers de 125 mL, e cultivados por 5 dias a 25 °C, a pH inicial 5,0, sob agitação a 150 rpm para a formação de "pellets", na ausência de luz.

O repique do pré-inóculo (meio sólido) para o inóculo (meio líquido) foi realizado com um pequeno tubo de vidro de 0,5 mm de diâmetro. O micélio foi recortado na zona de crescimento, em círculos. Utilizamos em média 8 círculos para cada 25 mL de meio.

Os "pellets" ou a massa micelial formada durante o período de incubação, foi filtrada para a separação do líquido, pesada e inoculada no efluente Kraft sem fonte adicional de carbono ou nitrogênio, em Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de efluente e mantidos a 25 °C, sob agitação a 150 rpm, na ausência de luz durante 5 dias. O pH inicial foi ajustado para 5.

3.5 METODO DE SELEÇÃO

A seleção consistiu em testar vários fungos em condições padrões, citadas no item 2.4, na descoloração do efluente Kraft E1. Os fungos foram cultivados em meio sólido agar extrato de malte 1,25 %. Após 5 dias foram repicados para o meio líquido extrato de malte 1,25 % e finalmente foram inoculados no efluente E1, sem fonte extra de carbono e/ou nitrogênio, pH inicial 5,0, temperatura de 25 °C e sob agitação a 150 rpm. No final de um período de 120 horas, o pH do efluente tratado foi ajustado para 7,6 (com NaOH ou H₂SO₄) e filtrado em membrana millipore 0,47 um para determinação da absorção a 465 nm. Foi então definida a porcentagem de descoloração em relação ao efluente não tratado. A eficiência foi calculada com base na porcentagem de descoloração dividida pela massa micelial seca (mg) do

fungo em questão.

3.6 EFLUENTE:

Utilizamos para este estudo dois tipos de efluentes, provenientes de duas empresas papeleiras (RIGUESA S.A Papel e Celulose, S. C., e RIPASA S.A. Celulose e Papel, Limeira, S.P.) respectivamente. Ambas empresas utilizam o processo Kraft de polpação. As respectivas seqüências de estágios de branqueamento da polpa Kraft são CDED e CEQHH. No primeiro caso trabalhou-se unicamente com o primeiro estágio de extração alcalina (E1), pH original entre 8 e 13 e no segundo foram testadas além do estágio E1 (100 %) pH entre 9 e 13, combinações de C1 + E1 a diferentes proporções: a) C1 (30 %) + E1 (70 %), pH 7,0 e b) C1 (44,7 %) + E1 (55,3 %), pH 5,0.

O pH foi ajustado para 5,0 com H_2SO_4 . Após ajuste do pH o efluente E1 RIGUESA foi diluído aproximadamente 100 vezes e filtrado com membrana millipore 0,47 μm para dar uma leitura inicial de absorvância entre 0,33 e 0,40. Os efluentes E1 e E1 + C1 da RIPASA foram ajustados, quando necessário, para pH 5,0 e utilizados diretamente, sem necessidade de diluir ou filtrar. As absorvâncias variaram de 0,44 para a), 0,60 para b) e 0,58 para E1. Em nenhum dos casos, o efluente foi esterilizado.

3.7 INDUÇÃO ENZIMÁTICA

Os fungos selecionados foram cultivados em agar-extrato de malte, utilizando-se efluente E1 (100 %) ao invés de água destilada como meio de diluição. As condições de cultivo foram as mesmas citadas no item 3.4.

3.8 METODOS ANALITICOS

A) DETERMINAÇÃO DA COR

A cor foi avaliada de acordo com o método padrão CPPA conforme descrito por Livernoche e col. (1983). O pH do efluente, após ser determinado, foi ajustado para 7,6 com NaOH 1N ou HCl 1N. Após o ajuste do pH o efluente foi filtrado em membrana millipore 0,47 um para remover os sólidos em suspensão. Foi determinada a absorbância a 465 nm do líquido filtrado contra água destilada.

As densidades óticas podem ser transformadas em unidades de cor (CU) de acordo com a equação :

$$CU = \frac{500 A_2}{A_1}$$

Onde: A_1 é a absorbância de uma solução padrão de platina-cobalto de 500 CU ($A_{465} = 0,132$).

A_2 é a absorbância do efluente.

B) DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

A determinação de fenóis totais foi estimada colorimetricamente segundo o método padrão APHA (1989) de Folin-Ciocalteu.

O princípio do método é a reação entre o reagente Folin-Ciocalteu, uma mistura dos heteropoliácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco e fenóis, com subsequente oxidação dos fenóis e formação de um complexo azul de molibdênio e tungstênio, a uma taxa proporcional à concentração de fenóis. A mistura de reação continha 4,0 mL de amostra, 1,0 mL de carbonato de sódio e 0,1 mL de folim. A leitura foi feita após 30 minutos, a temperatura ambiente. Para o branco utilizou-se água ao invés da amostra.

A formação do complexo foi monitorada pela leitura da absorbância a 760 nm.

Foi utilizado fenol como padrão e os resultados expressos em mg/L de fenol (a curva de calibração e cálculos respectivos utilizados para determinar fenóis totais encontram-se no apêndice II).

C) DETERMINAÇÃO DAS DEMANDAS QUÍMICA (DQO) E BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO (DBO)

A DQO foi determinada pelo método padrão APHA (1975) do dicromato de potássio. O método tem por base a oxidação da matéria orgânica por uma mistura em ebulição de ácido crômico e ácido sulfúrico (dicromato de potássio em meio ácido). O excesso de dicromato, é ti-

tulado com sulfato ferroso amoniacal, usando-se como indicador o complexo ferroso de orto-fenantrolina (ferroína).

A utilização de sulfato de mercúrio, proporcionalmente à concentração de cloreto na amostra minimiza os erros causados por este interferente. Os resultados são expressos em mg/L de oxigênio.

A determinação da DBO também foi realizada segundo o método padrão APHA (1975). Um volume determinado de amostra (volume total do frasco, sem formação de bolhas) foi colocado em frascos de 300 mL (em média, pois a capacidade volumétrica exata, estava pré-fixada em cada frasco) com tampa esmerilhada e completado com água de diluição, rica em nutrientes inorgânicos. Os frascos foram fechados e selados, a fim de evitar a entrada de ar, e incubados a 20 °C, durante 5 dias, na ausência de luz. O oxigênio dissolvido foi determinado antes e após o período de incubação por titulação no próprio frasco de DBO com 2 mL de $MnSO_4$ e 2 mL de (NaOH + NaI + NaN_3). Os resultados são expressos em mg/L de oxigênio.

D) DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMATICAS

1. FENOLOXIDASES (LACASE E PEROXIDASE).

Para atividade fenoloxidase foram utilizadas duas metodologias: a) Método modificado de Ander e Eriksson, (1976): este método baseia-se na oxidação do substrato enzimático siringaldazine até sua forma quinona, que apresenta uma absorção a 525 nm ($E = 65.000$

$M^{-1}cm^{-1}$). A determinação da atividade de lacase, foi feita adicionando-se a 0,5 mL de caldo filtrado, 0,44 mL de tampão tartarato a pH 4,2, 25 μ L de siringaldazine (solução estoque 5 mg/10 mL de etanol) elevou-se o volume final a 1,5 mL com água destilada. Para a determinação da atividade peroxidase utilizou-se o mesmo procedimento, porém ao invés de água adicionou-se 0,5 mL de H_2O_2 (0,015 M, concentração final).

b) Método de Szklarz (1989): A atividade lacase foi determinada espectrofotometricamente, pela oxidação de o-dianisidina a 460 nm ($E = 29.400 M^{-1} cm^{-1}$). A mistura de reação continha em um volume final de 1 mL, 600 μ L de caldo filtrado, 200 μ L de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,0, 100 μ L de o-dianisidina 1,0 mM e 100 μ L de água destilada. Para determinação da atividade peroxidase utilizou-se o mesmo procedimento, porém a água foi substituída por H_2O_2 1,0 mM

Uma unidade de atividade de lacase ou peroxidase corresponde a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto.

2) LIGNINASE (Li-P)

A atividade ligninase foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico segundo metodologia de Tien e Kirk (1984). Foram adicionados 550 μ L de caldo de cultivo filtrado e 200 μ L de H_2O_2 2,0 mM a 250 μ L de uma solução de álcool veratrílico 8,0 mM, em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH 3,0). O aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorvância a 310

nm ($E = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de ligninase corresponde a quantidade de enzima que oxida 1,0 μmol de álcool veratrílico por minuto.

3) MANGANES-PEROXIDASE (Mn-P)

A atividade Mn-P foi determinada segundo metodologia modificada de Kuwahara e col. (1984). A 0,5 mL de caldo de cultivo filtrado foi adicionado 0,1 mL (concentração final 0,01 %) de uma solução estoque de vermelho de fenol (0,1 %), 0,1 mL de lactato de sódio (concentração final de 25 mM) (solução estoque 250 mM), 0,2 mL de albumina bovina (concentração final 0,1 %) (solução estoque 0,5 %), 50 μM de sulfato de manganês (concentração final 100 μM) (solução estoque 2 mM) e 50 μL de H_2O_2 (solução estoque 2mM) a 100 μM de concentração final em 1 mL de tampão succinato de sódio pH 4,5 20 mM. A mistura de reação foi incubada por 5 minutos a 30 °C e a reação foi interrompida pela adição de 40 μL de NaOH 2 N. A absorção foi medida a 610 nm. Uma unidade de Mn-P foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1,0 μmol de vermelho de fenol por litro por minuto, usando um coeficiente de extinção de $4.460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinado por Michel e col. (1991).

4) BETA-GLICOSIDASE

A atividade beta-glicosidase foi determinada segundo metodologia de Tan e col. (1987). O p-nitrofenil-beta-D-glicosideo (pNPG) foi utilizado como substrato. A mistura de reação continha 0,1 mL de caldo filtrado e 0,4 mL de uma solução de 0,2 % (p/v) de pNPG em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8). A incubação foi a 50 °C, durante 30 minutos. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de uma solução 10 % (p/v) de bicarbonato de sódio. O p-nitrofenil liberado foi medido por absorvância a 410 nm. Uma unidade de atividade beta-glicosidase corresponde a quantidade de enzima que libera 1 umol de p-nitrofenol por minuto por mL, usando um coeficiente de extinção de $18,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5) DESCOLORAÇÃO DE "REMAZOL BRILLIANT BLUE" PARA DETERMINAÇÃO DE PEROXIDASES.

A metodologia seguida foi a de Ulmer e col. (1984). Este método baseia-se na degradação do corante Remazol brilliant blue (RBB-R) com concomitante perda de cor. A 100 uL de uma solução de RBB 2,0 %, adiciona-se 10 mL de cultura. Após 1 hora a temperatura ambiente, a cultura foi filtrada e 100 uL do filtrado foram diluídos com água destilada para 1,0 mL. Em seguida foram medidas as absorvâncias a 585 e 500 nm. O resultado foi expresso segundo a fórmula definida a seguir:

Razão de absorvância = ABS 585/500 (branco) - ABS 585/500 (amostra)

A razão da absorvância do branco foi obtida utilizando-se meio de cultivo não inoculado.

E) DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

METODO DO DNS (Miller, 1959). Para a determinação de açúcares redutores foram adicionados a 3 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1,5 mL de amostra. A mistura foi incubada num banho térmico a 100 °C por 5 minutos. Resfriou-se a amostra até atingir a temperatura ambiente e a absorvância medida a 550 nm foi comparada com uma curva padrão de glicose.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se em 1,4 L de água os seguintes compostos:

Acido 3,5-dinitrosalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
KNaC ₄ H ₄ O ₆	300,0 g
Fenol	7,5 mL
Bissulfito de sódio	8,3 g

F) DETERMINAÇÃO DE PROTEINA SOLÚVEL

O teor de proteína solúvel no caldo de cultivo ou no efluente tratado biologicamente foi determinado pelo método Bradford (1976). Adicionou-se 5,0 mL de reagente Azul de Coomassie brilhante G-250 a 1,0 mL de caldo. A absorvância da mistura foi medida a 595 nm. A concentração de proteína foi determinada com uma curva de calibração

com albumina bovina.

O reagente Azul de Coomassie brilhante foi preparado dissolvendo 100 mg do reagente em 50 mL de etanol 95 %. Foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85 % p/v e a solução resultante foi diluída para 1 L.

G) DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

A uma coluna de Sephadex G-50 (53 x 1,5 cm), preenchida até uma altura média de 23 cm, adicionou-se 0,5 mL de amostra (efluente tratado e sem tratamento). O eluente utilizado foi LiCl 0,1 N e NaOH 0,1 N, a um fluxo de 2,13 mL/min. A filtração em gel separa as moléculas por tamanho. As moléculas pequenas difundem e são retidas no gel mais facilmente do que as maiores, logo estas (moléculas de maior tamanho) ficam nos espaços entre as esferas do gel e eluem primeiro do que as de menor tamanho.

H) DETERMINAÇÃO DA ADSORÇÃO DO MICÉLIO NO EFLUENTE

Para determinar a capacidade de adsorção do fungo é necessário testar o micélio inativo (morto). Durante um período de 5 dias determinamos a porcentagem de descoloração causada pelo fungo morto. No final do processo definimos quanto de descoloração era devida a adsorção. Para obtenção do micélio inativo utilizou-se o seguinte

procedimento: após o período de crescimento em meio de cultivo líquido, a massa micelial obtida no período de 5 dias, a temperatura de 25 °C, sob agitação (150 rpm) em meio contendo extrato de malte 1,25 % foi filtrada para separar o micélio do líquido. Em seguida lavou-se com água destilada, pesou-se e autoclavou-se por 30 minutos a 120 °C, segundo método de Durán e col. (1991).

I) TESTE DE TOXICIDADE

O teste de toxicidade aguda foi realizado com a bactéria *Spirillum volutans*. O método consistiu em testar a mobilidade e sobrevivência desta bactéria em diferentes diluições da amostra de efluente com diferentes tempos 5, 15 e 30 minutos. O procedimento seguido foi o de Goatcher e col. (1988).

J) CARACTERISTICA DA COR ANTES E APÓS TRATAMENTO BIOLÓGICO

Para determinação da natureza da cor antes e após a descoloração, seguiu-se o método de Momohara e col. (1989). Para 3 mL de E1 (absorbância inicial a 465 nm de 0,74, a pH 7,6), 85 mg de ditionito de sódio foram adicionados, o pH utilizado foi de 5,5. Após 24 horas o pH foi ajustado para 7,6 e a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm, por 5 minutos. Em seguida leu-se a absorção do sobrenadante a 465 nm (cor referente a porção quinona). Para 3 mL de E1 (absorbância inicial a 465 nm de 0,74, a pH 7,6) foram adicionados 100 mg de borohidreto de sódio e o pH foi elevado a 10,5. Após 24 horas, o pH foi ajustado para 7,6, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm, por 5 minutos. A absorção do sobrenadante foi medida em 465 nm (cor referente a porção total de quinona e carbonila).

3.9) BIORREATOR

1) DESENHO DO BIORREATOR

O reator utilizado neste estudo foi um tipo modificado de leite recheado, com uma capacidade volumétrica de 330 mL. A modificação consistiu na introdução de um tubo interno de 3,6 cm de diâmetro e 12,5 cm de altura suspenso dentro de um tubo externo de vidro com 6 cm de diâmetro interno e 17,0 cm de altura (Figura 22). Esta modificação foi baseada em dados experimentais realizados pelo grupo de pesquisa do professor Lippel Sant'Anna da Universidade Fede-

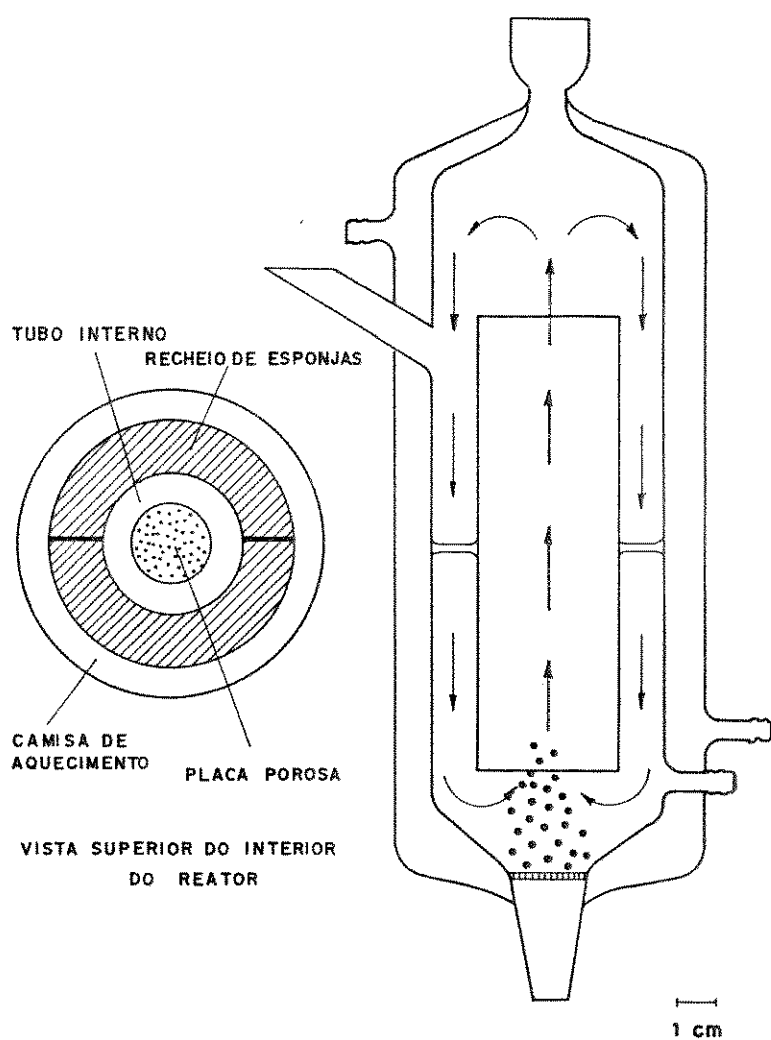


Figura 22. Biorreator de leito recheado (modelo modificado) utilizado em cultivo estacionário com *L. edodes* imobilizado.

ral do Rio de Janeiro e testado por Cammarota e Sant'Anna, (1991, 1992). A nova configuração permite uma melhor circulação do líquido e do oxigênio, não havendo a formação de bolhas de ar e favorecendo o contato com o micélio.

2) CONDIÇÕES DE USO

O biorreator foi esterilizado por 30 minutos a 120 °C antes de sua utilização. As borrachas utilizadas para canalização do ar de entrada e saída e do meio de descoloração foram lavadas com álcool .

Não foi empregada a jaqueta de aquecimento do reator, para manter a temperatura, pois os testes foram realizados a temperatura ambiente, que esteve em torno de 28 °C. A aeração foi realizada pelo fundo do reator através de uma placa de vidro porosa. O fluxo de ar, proveniente de um compressor geral que supre o encanamento do laboratório, foi controlado por uma válvula. O ar passava por uma solução saturada de permanganato de potássio para manter a esterilidade e era injetado no reator com uma vazão de aproximadamente 0,43 L/min.

O inóculo assim como o efluente foram introduzidos na parte superior do reator, por um funil de vidro previamente esterilizado próximo a chama de um bico de Bunsen, para evitar a contaminação com eventuais microrganismos presentes no ar.

3) SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DO FUNGO

A) Nylon. Cubos de nylon (3M Scotch Brite^{MR}) de aproximadamente 1,0 x 0,5 cm.

B) Cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis*.

4) CARREGAMENTO E INOCULAÇÃO DO REATOR

Quando nylon foi utilizado como suporte para imobilização, a massa de esponja (3,6 g) foi introduzida no reator, no espaço interno entre os dois tubos de vidro e esterilizada juntamente com o reator. Após o resfriamento a aparelhagem foi montada e o biorreator foi inoculado com 200 mL de meio extrato de malte. O fungo cresceu durante 5 dias imobilizado no nylon, quando então o meio foi integralmente retirado e 250 mL do efluente a ser tratado foi introduzido pela porção superior do biorreator, retirando-se a cada 24 horas duas amostras de 5 mL aproximadamente para determinação do pH, da cor, de fenóis totais e demanda química de oxigênio.

Para a imobilização do fungo na madeira o procedimento foi diferente. Em um frasco de aproximadamente 300 mL, contendo meio agar-extrato de malte 1,25 % foram colocados os cavacos de *E. grandis*, previamente umedecidos com água destilada e esterilizados, e 12 círculos de micélio. Após 20 dias de crescimento micelial, os cava-

cos immobilizados com o fungo foram transferidos para o biorreator, assepticamente, e em seguida 250 mL de efluente foram colocados pela porção superior de biorreator. A cada 24 horas foram retiradas duas amostras de 5 mL aproximadamente para determinação do pH, cor e fenóis totais.

O pH inicial do efluente foi ajustado em 5,0 com H_2SO_4 . Para evitar a formação de espuma colocamos uma gota de silicone através de um capilar no interior do biorreator.

5) CALCULO DE EFICIENCIA PARA COR, FENÓIS E DQO

O cálculo de eficiência dos parâmetros determinados para o bioreator é descrito abaixo como:

$$\text{Eficiência} = \frac{\text{valor da corrente de entrada} - \text{valor da corrente de saída}}{\text{valor da corrente de entrada}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 SELEÇÃO DE FUNGOS LIGNINOLITICOS PARA DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTE KRAFT.

Foi realizada uma seleção entre 51 cepas de fungos xilófagos para descoloração de efluente Kraft, sem fonte adicional de carbono ou nitrogênio (Tabelas I e II). Dois destes foram tomados como controles: *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 e *Chrysonilia sitophila* TFB 27441, pertencentes as classes Basidiomycete e Ascomycete, respectivamente. O efluente utilizado, na primeira fase deste trabalho foi o da 1ª etapa de extração alcalina (E1) RIGUESA, onde estão presentes compostos de elevada e reduzida massa molecular e de conhecida toxicidade (Huynh e col. 1985; Eriksson, 1990). Nas figuras 23 e 24 estão ilustradas os fungos utilizados na seleção e a eficiência dos mesmos no tratamento do efluente Kraft, após um periodo de 120 horas.

Desta seleção destacou-se *Lentinus edodes* UEC-2019 com 73 % de descoloração e 0,97 de eficiência. Comparado a *P. chrysosporium* BKM-F-1767, que apresentou com 52 % de descoloração e 0,94 % de eficiência, sob as mesmas condições, *L. edodes* mostrou-se mais apto a manter-se ativo no efluente sem fonte extra de carbono ou nitrogênio. Não utilizou-se oxigênio puro durante os cultivos, porém os Erlenmeyers foram submetidos a agitação continua, favorecendo assim a circulação de ar.

P. chrysosporium possui exigências fisiológicas mais apuradas que *L. edodes*, o que dificulta, em termos econômicos, sua aplicação em grande escala.

Tabela I. Seleção de fungos ligninolíticos para descoloração do efluente: atividade enzimática em caldo (120 h) e descoloração (120 h).

Cepas	Legend	Lac	Perox.	Li-P	%Descol.
<i>Xylaria</i> sp. ICN-207 (Ascomycete)	1	32.00	0.00	8.5	0.0
Basidiomycete unknown UEC-2001	2	2.00	0.00	0.0	1.0
<i>Coriolus</i> sp. UEC-2002	3	0.10	0.00	37.0	2.0
<i>Pleurotus ostreatus</i> UEC-2003	4	6.00	2.50	0.0	3.0
<i>Cardiopsis rigida</i> UEC-2004	5	8.20	3.00	3.0	3.0
Corticaceae UEC-2005	6	3.30	0.00	0.0	10.0
<i>P. chrysosporium</i> BKM-F-1767	7	0.00	0.00	49.0	51.0
<i>Trametes</i> sp. UEC-2008	8	9.30	0.00	1.0	30.0
<i>Cardiopsis rigida</i> UEC-2007	9	3.00	0.00	0.0	30.0
<i>Trametes rigida</i> UEC-2008	10	4.20	0.50	0.0	25.0
<i>Coriolllellus sepium</i> UEC-2009	11	3.00	1.00	38.0	41.0
<i>Cardiopsis rigida</i> UEC-2010	12	0.00	0.00	6.0	26.0
Basidiomycete unknow UEC-2011	13	2.00	3.00	0.0	45.0
<i>Xylaria</i> sp. UEC-1002 (Ascomycete)	14	0.80	1.20	8.0	45.0
<i>Pycnoporus sanguineus</i> UEC-2012	15	8.00	0.00	23.0	48.0
<i>Phaeocoriolllellus trabeus</i> UEC-2013	16	0.00	0.00	19.0	18.0
<i>P. chrysosporium</i> 446-ME	17	0.02	2.00	50.0	50.0
<i>Xylaria</i> sp. ICN-155 (Ascomycete)	18	0.80	1.20	8.0	50.0
<i>Pycnoporus sanguineus</i> UEC-2015	19	3.00	2.00	15.2	50.0
<i>Cyathus pallidus</i> UEC-2016	20	0.40	1.60	0.0	34.0
<i>Cyathus striatus</i> UEC-2017	21	0.70	0.50	0.0	30.0
<i>Lentinus edodes</i> UEC-2019	22	0.00	0.00	12.7	73.0
<i>Cyathus stercoreus</i> UEC-2020	23	0.50	0.88	7.0	15.0
<i>Lentinus edodes</i> UEC-2021	24	0.13	0.05	16.0	42.0
<i>Polyporus</i> sp. UEC-2022	25	23.70	6.00	15.0	25.0
<i>Phaeocoriolllellus trabeus</i> UEC-2023	26	0.00	0.00	273.0	24.0
<i>C. sitophila</i> TFB 27441 (Ascomycete)	27	0.00	0.00	13.0	41.0

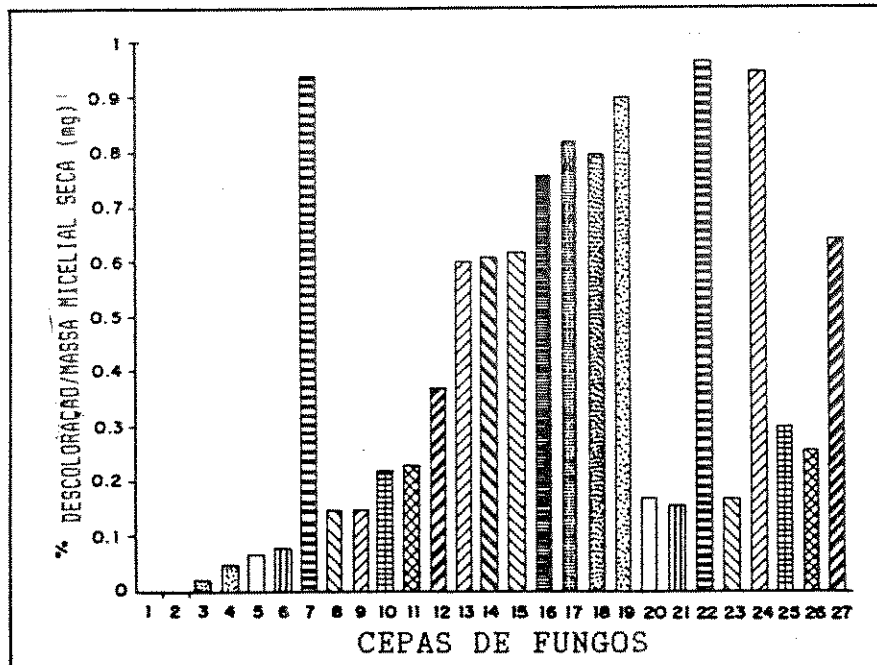


Figura 23. Medida da eficiência para um período de 120 h (cepas referentes a Tabela I)

Tabela II. Seleção de fungos ligninolíticos para descoloração de efluente: atividade enzimática em caldo (120 h).

Cepas	Legend	Lac.	Perox.	Li-P
<i>Stereum sp.</i> UEC-2024	1	7.0	1.0	42.0
Polyporaceae UEC-2025	2	13.0	5.0	17.0
Basidiomycete unknown UEC-2026	3	20.0	0.0	11.0
Polyporaceae UEC-2027	4	6.4	0.0	0.0
<i>Fibroporia gossypia</i> UEC-2027	5	0.0	0.0	13.0
<i>Pycnoporus sanguineus</i> UEC-2028	6	7.2	2.0	0.0
Polyporaceae UEC-2029	7	1.0	0.0	0.0
<i>Panus aida</i> UEC-2030	8	5.0	2.0	45.0
<i>Rigidoporus lineatus</i> UEC-2031	9	33.0	2.0	0.2
<i>Pleurotus florida</i> UEC-2032	10	4.0	9.0	0.0
<i>Pleurotus sejour-caju</i> UEC-2033	11	7.0	2.0	26.0
<i>Hohenbuehlia grisea</i> UEC-2034	12	12.0	0.0	35.0
<i>Phaeocoriolellus trabeus</i> UEC-2035	13	0.0	0.0	26.0
<i>Trametes sp.</i> UEC-2036	14	0.6	0.0	0.0
Basidiomycete unknown UEC-2037	15	48.0	0.0	30.0
Polyporaceae UEC-2038	16	48.0	0.0	11.0
<i>Panus crinitus</i> UEC-2039	17	4.0	0.0	30.0
Ganodermataceae UEC-2040	18	0.3	0.0	0.0
<i>Cyathus striatus</i> UEC-2041	19	3.0	1.0	0.0
Basidiomycete unknown UEC-2042	20	5.0	0.4	0.0
<i>Stereum sanguinolentum</i> UEC-2043	21	6.0	2.0	34.0
<i>Trametes villosus</i> UEC-2044	22	4.0	1.0	10.0
<i>Phaeocoriolellus trabeus</i> UEC-2045	23	0.0	0.0	20.0
<i>Panus rudis</i> UEC-2046	24	4.0	2.0	47.0
<i>Coriollus versicolor</i> UEC-2047	25	10.0	2.0	40.0
Basidiomycete unknown UEC-2048	26	3.0	0.0	5.0

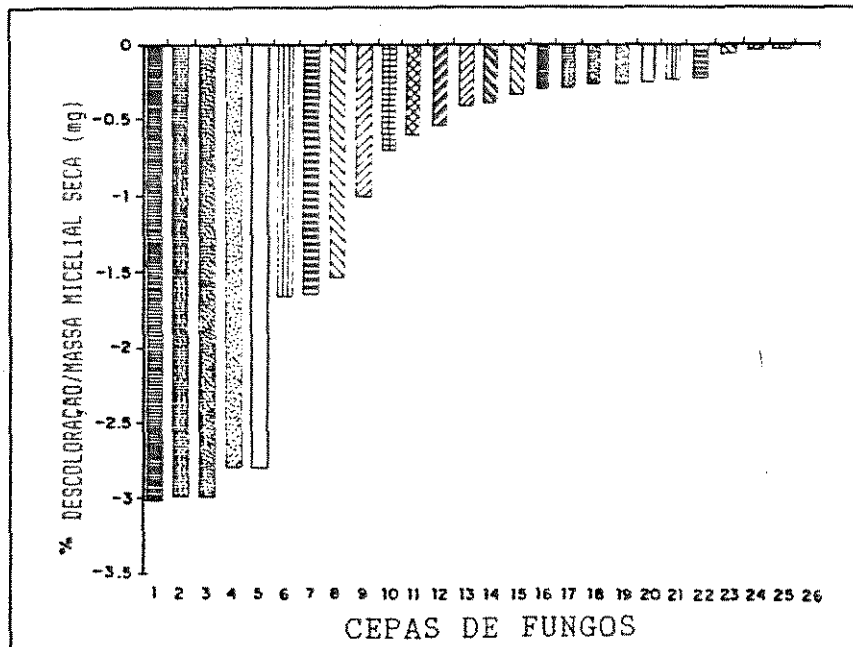


Figura 24 Medida da eficiência para um período de 120 h (cepas referentes a Tabela II)

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Antes da inoculação no efluente, foram determinadas as atividades no caldo de cultivo (120 horas) de lacase, peroxidase e ligninase (Li-P) com a finalidade de estudar a influência de algumas destas enzimas no processo de descoloração. Não foram obtidas correlações muito claras com estes primeiros resultados, pois nem sempre uma alta atividade enzimática correspondia a uma descoloração eficiente (Tabelas I e II, Figuras 23 e 24). Resultado bem evidenciado no caso de *Phaeocoriolellus trabeus* UEC-2023, que apesar de apresentar 273 U/L de Li-P, a redução foi de apenas 24 % ao final de um período de 120 horas. Para comprovar a atividade ligninolítica desta cepa, foi determinada a atividade com "Remazol Brilliant Blue". A razão de absorbância obtida foi de 8,4. A descoloração de corantes parece ser um processo metabólico secundário bem como a atividade ligninolítica (Glenn e Gold, 1983).

Com relação a fenoloxidasas podemos citar a cepa UEC-2037 basidiomiceto não identificado, com 48 U/L de lacase e 30 U/L de Li-P, apresentando ao final do período de 120 horas um aumento na cor do efluente tratado (Figura 24).

Muitas das cepas testadas incrementaram a cor inicial do efluente (Figura 24). Segundo Larrea e col.(1989), o mecanismo de obtenção de cor poderia ser um indicio da oxidação de catecol a estruturas quinoiídicas, as quais são altamente coloridas, devido principalmente à conjugação de duplas ligações. A possibilidade de que haja formação de grupos cromóforos por microrganismos durante o tratamento de efluentes foi discutida por vários autores (Davis e col. 1978; Gane-

zarczyk, 1972). O aumento da cor poderia estar relacionado com a atividade de lacases, que oxidam fenóis a quinonas (Lankinen e col. 1991). Além do mais, deve-se considerar o fato de que alguns fungos possam liberar pigmento durante seu desenvolvimento.

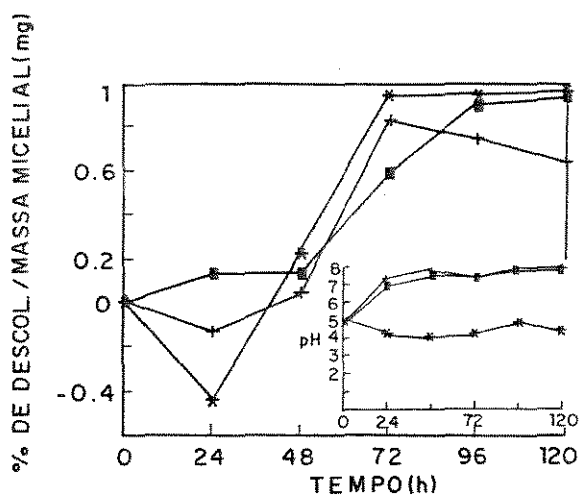
Lankinen e col. (1991) compararam a atividade de vários fungos de decomposição branca na descoloração do efluente. *Phlebia radiata*, produz lacase, oxidase, Li-P e manganês peroxidase (Mn-P); *Merulius tremellosus* produz lacase, oxidase e Mn-P, porém não produz Li-P e *P. chrysosporium* produz Li-P e Mn-P, mas não lacase ou oxidase. Li-P, determinada pela oxidação do álcool veratrílico, não foi detectada em nenhuma das culturas durante o processo de descoloração. Entretanto, nestes casos, a enzima poderia estar na sua forma inativa. Dos fungos produtores de lacase, *M. tremellosus*, é o menos ativo na descoloração do meio quando comparado a *P. radiata*, que produz Li-P. Momohara e col. (1989) sugerem que a descoloração do efluente E1 por *P. chrysosporium* não é catalisada por Li-P. Entretanto, Cammarota (1991) considera que a remoção da cor do efluente E1 (diluído) por *P. chrysosporium*, depende parcialmente da atividade de Li-P presente no meio. Na ausência de atividade a cor era reduzida em 14,5 %, após 24 horas de incubação, enquanto que nos cultivos com atividades 20 e 69 U/l a cor era reduzida em 37 e 42 % respectivamente. Neste trabalho não foi determinada a atividade de Mn-P, o que seria de grande relevância na elucidação do mecanismo enzimático envolvido na descoloração do efluente bem como outras enzimas envolvidas no processo. Michel e col. (1991), realizaram um estudo comparativo das atividades de Li-P e Mn-P em *P. chrysosporium*. Na ausência de Mn (II) nas culturas e altas proporções de Li-P, foi evidenciada uma reduzida descoloração do efluen-

te. Estas e outras observações correlatas levaram este grupo a concluir sobre a predominância de Mn-P com relação a Li-P na descoloração do efluente Kraft, apesar da reconhecida importância de ambas no processo, pois lacase e Mn-P aparentemente podem atacar e despolimerizar somente porções fenólicas da lignina, enquanto que Li-P parece ser capaz de oxidar também subestruturas de lignina não fenólicas (Perez e Jeffries, 1990).

4.3 CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO E pH

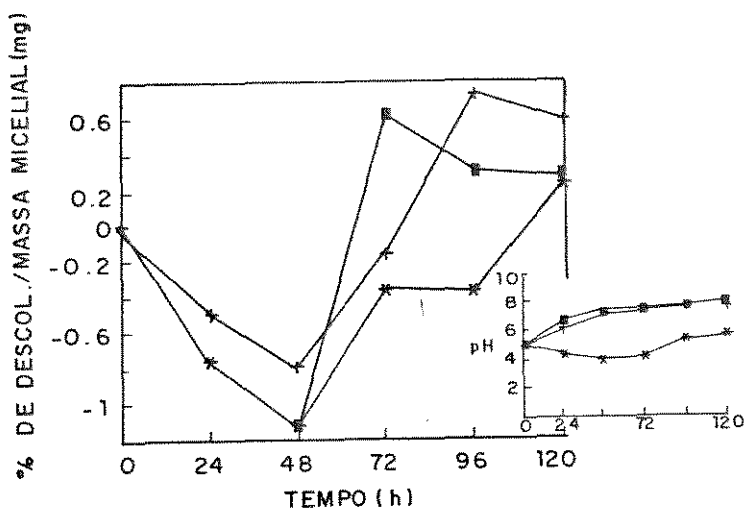
Quatro cepas foram selecionadas para a realização de um estudo cinético: *L. edodes* UEC-2019, *L. edodes* UEC-2021, *Polyporus* sp. UEC-2022 e *P. trabeus* UEC-2023. Ambas cepas de *L. edodes*, devido às eficiências demonstradas na descoloração de efluente (Tab.I). Não obstante, à baixa eficiência observada para *Polyporus* sp, este apresentou atividades enzimáticas razoavelmente significativas, especialmente para lacase. *P. trabeus*, assim como *Polyporus* sp. apesar da restrita descoloração observada destacou-se, em relação aos demais, quanto à alta produção de ligninase. Essas características analisadas isoladamente, através destes fungos, auxiliaram na elucidação do possível mecanismo envolvido na descoloração do efluente Kraft. A Figura 25 ilustra o estudo cinético em termos de eficiência de descoloração e pH.

O pH inicial foi ajustado para 5,0 com o objetivo de fornecer um meio mais adequado para a manutenção dos fungos. Observou-se que no caso de *L. edodes*, o pH sofreu um decréscimo que coincide com um pico de descoloração no período de 72 horas. O pH em torno de 3,5 poderia



Legenda

P. chrysosporium BKM-F-1767 (-■-), *C. sitophila* TFB-27441 (-+-)
e *L. edodes* UEC-2019 (-*-).



Legenda

Polyporus sp. UEC-2022 (-■-), *P. trabeus* UEC-2023 (-*-)
e *L. edodes* UEC-2021 (-+-).

Figura 25. Estudo cinético das cepas selecionadas: controle de eficiência e pH.

estar favorecendo a atuação de certas enzimas oxidativas ativas durante a cinética de descoloração. Poderia estar ocorrendo também precipitação de materias cromóforos, os quais seriam facilmente eliminados durante a filtração em membrana millipore. Entretanto o pH foi ajustado a 7,6 com NaOH, antes da filtração, ressuspensando os grupos cromóforos eliminando assim o artifício da precipitação.

Após o período de tratamento biológico, determinou-se as seguintes atividades enzimáticas no efluente: lacase, peroxidase, Li-P, Mn-P e beta-glicosidase com o propósito de avaliar uma possível indução ou inativação destas atividades com a biodegradação do efluente, descoloração, demanda química de oxigênio (DQO) e eficiência de descoloração, definida como % de descoloração/massa micelial seca. Na Tabela III podemos acompanhar estes resultados. Aparentemente o efluente ativou o sistema enzimático, provocando a aparição ou indução de algumas enzimas, como lacase que não havia sido detectada em caldo de cultivo de *P. trabeus*, ou houve um acréscimo das atividades lacase, peroxidase e Li-P, observado em *L. edodes* e *P. chrysosporium*. Apenas *Polyporus* sp. fugiu à regra, com o total desaparecimento de lacase e peroxidase. Comparando as atividades de beta-glicosidase, podemos sugerir que esta enzima é de considerável importância, estando diretamente envolvida no mecanismo de descoloração e descontaminação do efluente, pois justamente nas duas cepas menos eficientes, a mesma não foi detectada.

A maior parte da glicose presente no efluente não é metabolizada (Yin e col. 1989). A presença de beta-glicosidase se justifica pela reação de transglicosilação, facilitando o ataque do fungo às cloro-ligninas ou derivados, permitindo uma redução da cor e uma transformação do efluente a CO₂ e H₂O. Este tópico foi discutido em publicações

anteriores (Esposito e col. 1991).

4.4 DEMANDA QUIMICA DE OXIGENIO

No final do estudo sobre cinética de descoloração e pH, determinamos a DQO. Os resultados podem ser observados na Tabela III. Parece haver uma correlação entre descoloração, DQO e massa molecular, porém seria necessário a inclusão de um acompanhamento cinético para confirmar esta posição.

4.5 MICELIO INATIVADO

Para *L. edodes* UEC-2019, foi determinada a adsorção, por determinação da porcentagem de descoloração obtida com micélio inativado ou morto. Observou-se uma redução média de 13 % na cor do efluente tratado após 5 dias. Poderíamos atribuir o restante 60 % a atividade enzimática. Foi determinado para *C. sitophila* 30 % da descoloração devido a adsorção micelial (Durán e col. 1991) e nessas condições, consideradas ideais, ocorre uma descoloração de 75 % em 4 horas. Sendo 45 % atribuído a atividade enzimática.

TABELA III. Efluente Tratado Biologicamente, Após 120 h.

Cepas	Atividade Enzimática (U/L)					Efic. ^c	DQO (%)	Descol (%)
	Lac.	Perox.	Li-P.	Mn-F ^a	Gluc. ^b			
<i>P.chrysosporium</i> BKM-F-1767	0,04	0,005	7,8	44,8*	12,0	0,94	26	52
<i>C.sitophila</i> TFB-27441	0,00	0,000	7,8	22,4	7,0	0,64	41	41
<i>Polyporus</i> sp. UEC-2022	0,00	0,000	5,2	-	-	0,30	48	25
<i>L. edodes</i> UEC-2019	11,00	0,500	19,3	11,2	14,0	0,97	60	73
<i>L. edodes</i> UEC-2021	2,10	3,200	23,0	11,2	5,0	0,60	61	42
<i>P. trabeus</i> UEC-2023	0,80	0,400	260	89,7*	0,0	0,26	31	24

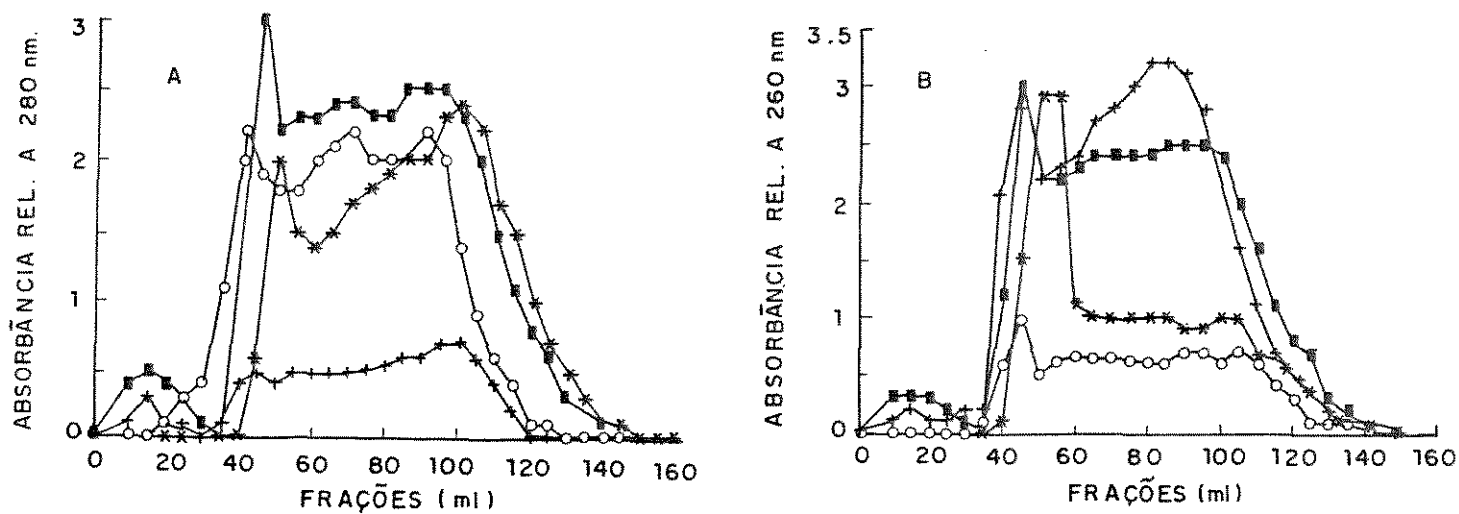
^a,^b U/L. ^c percentagem de descoloração/massa micelial seca (mg).

* U/mL. A DQO do efluente não tratado foi considerada 100 %.

4.6 MINERALIZAÇÃO

Na Figura 26 está ilustrada a determinação da massa molecular. Se pode evidenciar, através do decréscimo da massa, que há realmente mineralização e não somente uma transformação dos grupos cromóforos. *P. chrysosporium* perde 26 % da massa molecular, *Chrysonilia sitophila*, 20 %, *L. edodes* 2021, 65 %, *Polyporus* sp. 52 %, exceto *P. trabeus*, para o qual ocorre uma redistribuição da massa molecular sem redução da mesma.

L. edodes UEC-2019 foi o mais eficiente, não só na descoloração (73 %) mas também na redução da DQO (60 %) e massa molecular. Ocorre uma nítida mineralização, com a diminuição de 70 % da massa, reduzindo compostos de alta e baixa massa molecular. Recentemente Bergbauer e col. (1992), reportaram sobre o biotratamento de efluentes com um novo fungo *Stagonospora gigaspora*. Os autores discutiram a determinação da massa molecular após 5 dias de incubação em efluente CEH. Considerando



Legenda A

Controle (efluente E1 não tratado) (-■-), *P. chrysosporium* BKM-F-1767 (-*-), *C. sitophila* TFB-27441 (-o-) e *L. edodes* UEC-2019 (-+-).

Legenda B

Controle (efluente E1 não tratado) (-■-), *Polyporus* sp. UEC-2022 (-*-), *P. trabeus* UEC-2023 (-+-) e *L. edodes* UEC-2021 (-o-).

Figura 26. Determinação da massa molecular do efluente após 120 horas de tratamento biológico.

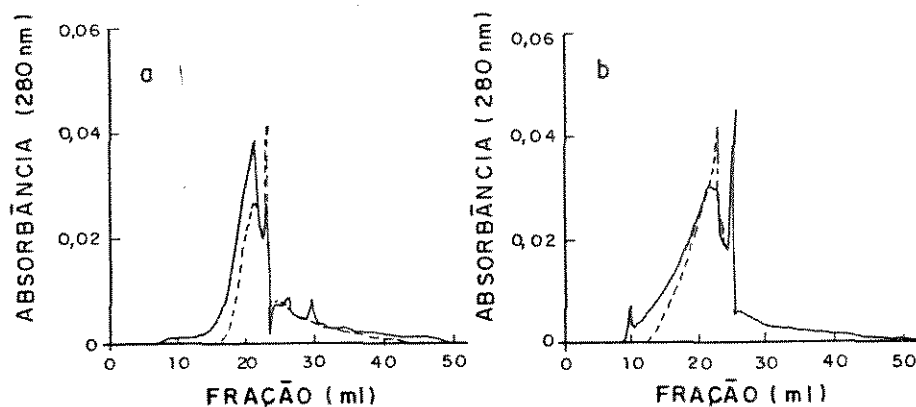


Figura 27. Determinação da massa molecular, após 5 dias de incubação com *S. gigaspora* (---), sem *S. gigaspora* (—) a) efluente CEH; b) efluente EOP. (Bergbauer e col. 1992)

o comentário de que *S. gigaspora* causa uma clara despolimerização das frações de massa molecular mais alta, degradando uma porção considerável das ligninas presentes no efluente, e comparando com nossos resultados, poderíamos concordar sobre a despolimerização, porém em termos de degradação, não demonstra ser esta uma cepa muito adequada (Figura 27) apesar de reduzir até 90 % da cor. Um tratamento eficiente de efluentes de branqueamento necessariamente deve incluir a eliminação de compostos clorados de alta e baixa massa molecular. Durán e col. (1991) reportaram 56 % de perda de biomassa para *C. sitophila* após 40 horas, permanecendo somente uma pequena porção de massa molecular mais alta. Porém dentro das condições estabelecidas neste trabalho *C. sitophila* mostrou-se menos eficiente que *L. edodes*. Cabe ressaltar que não trabalhou-se em condições ideais de nenhuma das cepas.

4.7. MECANISMO DE DESCOLORAÇÃO DO EFLUENTE KRAFT POR *Lentinus edodes*

A cor pode ser dividida em três tipos conforme a reatividade do efluente (com ou sem tratamento) com ditionito (cor referente a quinona) e boroidreto (cor referente a quinonas totais e carbonila). Logo, a diferença entre os valores obtidos com boroidreto e ditionito determinam a cor referente a porção carbonila. A coloração restante observada é denominada como "outros" por Momohara e col. (1989).

Na Figura 28 observa-se a distribuição da cor no efluente biotratado com *L. edodes* em relação ao controle, efluente não tratado.

A cor referente a quinonas e carbonila foi removida mais eficientemente do que a porção restante (outros). Entretanto, não foi observado nenhuma especificidade quanto aos grupos cromóforos, após um período de 120 horas. Conclui-se, a partir destas observações, que *L. edodes* degrada indistintamente quinonas e carbonilas.

4.8 UTILIZAÇÃO DE EFLUENTE E1 COMBINADO COM C1 EM DISTINTAS PROPORÇÕES: EFLUENTE RIPASA.

Para este estudo utilizamos o mesmo fungo selecionado na fase anterior, *L. edodes* UEC-2019, com o efluente RIGUESA. Os controles foram mantidos, sendo *P. chrysosporium* e *C. sitophila*. Deve-

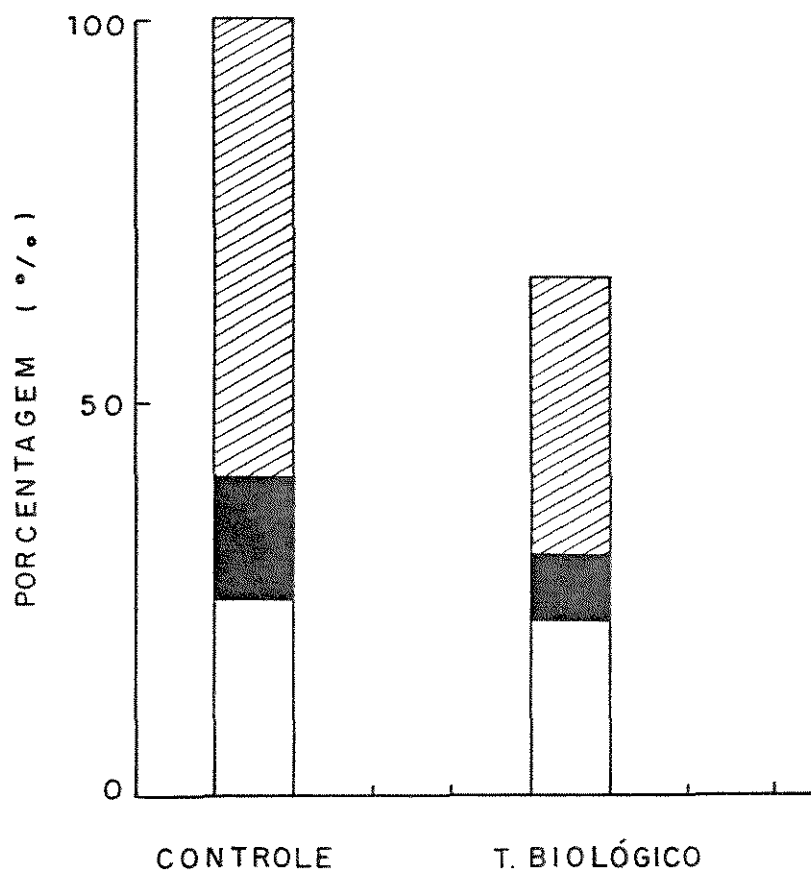


Figura 28. Distribuição da cor: Porção quinoidídica (-▨-), porção carbonila (-■-) e Outros tipos de cor (-□-).

se salientar que as características diferiram muito entre um efluente e outro, apesar de serem ambos provenientes do processo Kraft, a sequência empregada durante o branqueamento não era a mesma. No caso do efluente RIPASA não houve necessidade de diluição, pois a absorvância inicial não ultrapassou 0,80.

4.8.1) Mistura de efluentes: E1 (70 %) + C1 (30 %)

Como primeira tentativa de se utilizar efluente combinado, determinamos unicamente porcentagem de descoloração, pH e eficiência (Tabela IV) e distribuição de massa molecular (Figura 29). As condições de pré-inóculo e inóculo foram mantidas.

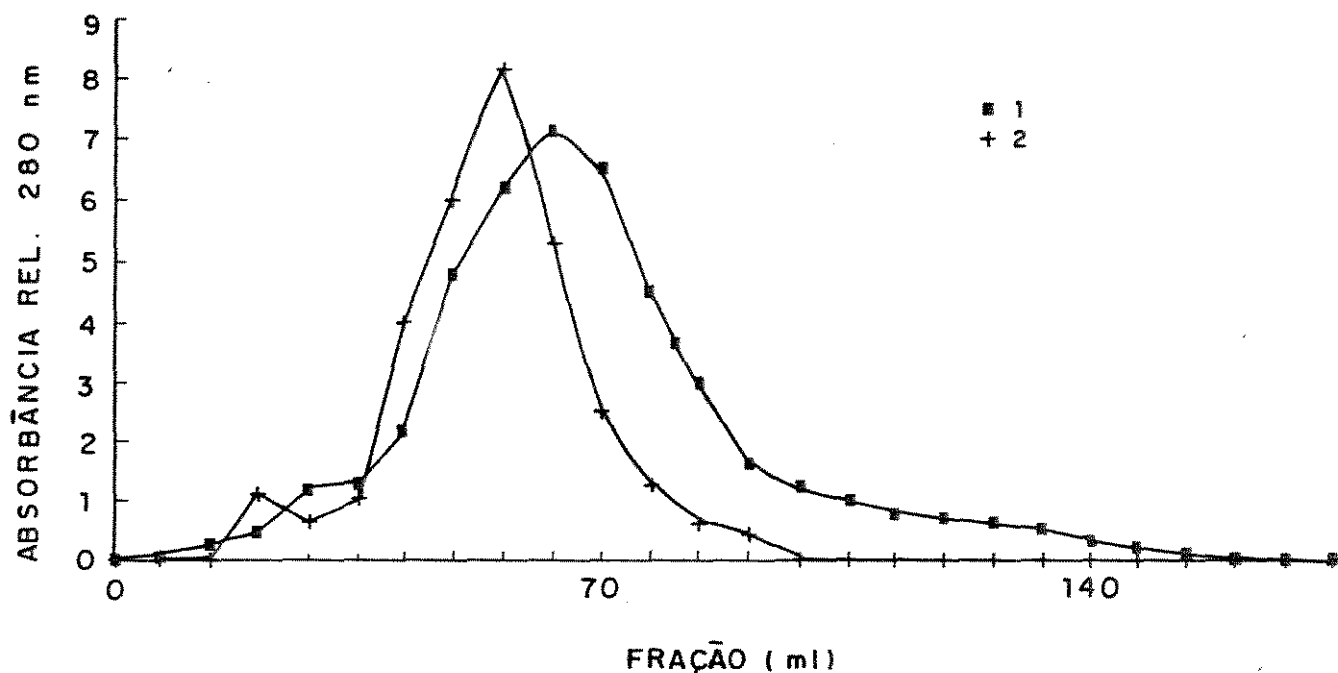
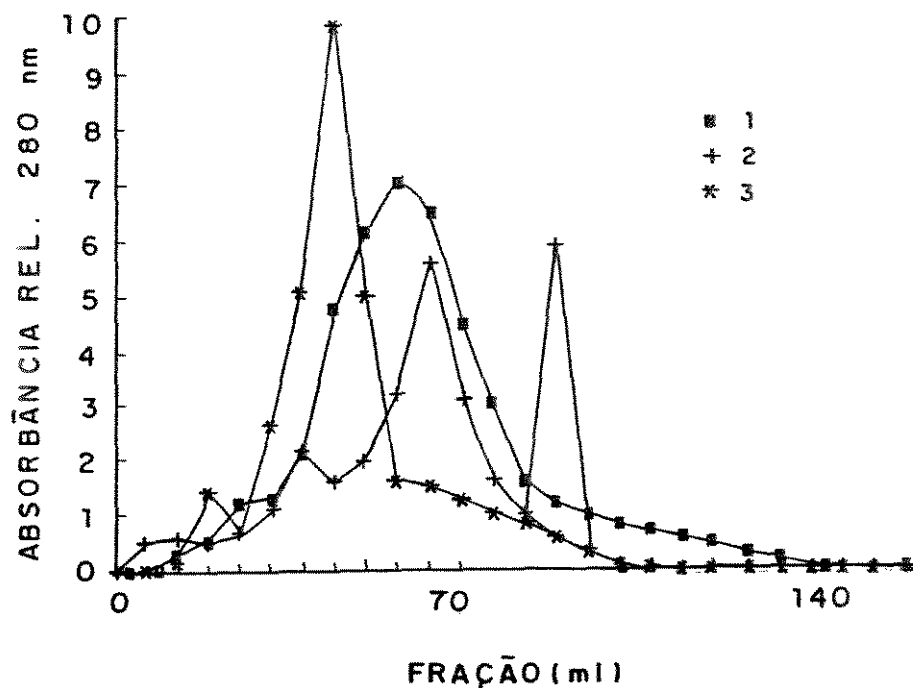
O comportamento das cepas neste efluente foi totalmente diferente ao observado com o efluente RIGUESA. Neste caso, ocorreu uma cinética veloz, porém não houve degradação satisfatória das cloroligninas.

Tabela IV. Efluente E1 (70 %) + C1 (30 %) biotratado até 120 horas, sem fonte adicional de carbono e/ou nitrogênio.

Cepas	Descol. (%)			pH			E ^a 120 h
	24	72	120 (h)	24	72	120 (h)	
<i>P.chrysosporium</i> BKM-E-1767	44	60	40	6,9	7,7	7,7	0,6
<i>C.sitophila</i> TFB 27441	52	71	27	7,5	8,1	8,3	0,4
<i>L.edodes</i> UEC 2019	42	67	68	4,5	3,7	3,5	1,1
Controle Efluente s/ tratamento (pH inicial 5,0)	-	-	-	7,4	7,8	8,0	-

Figura 29. Distribuição da massa molecular: Efluente

(E1 70 % + C1 30 %), após 120 h de tratamento biológico.

(1) Controle (efluente não tratado) e (2) *P. chrysosporium* BKM-F-1767(1) Controle (efluente não tratado); (2) *C. sitophila* TFB 27441 e(3) *L. edodes* UEC-2019

Os resultados foram, a princípio muito animadores demonstrando uma cinética de descoloração muito mais rápida, do que a observada com o efluente RIGUESA.

A partir destes dados decidiu-se utilizar uma porcentagem de mistura que fornecesse diretamente um pH inicial de 5,0 (E1 55,3 % + C1 44,7 %), sem necessidade de ajuste com H₂SO₄. Os resultados estão expressos na Tabela V abaixo.

4.8.2) Mistura de efluentes: E1 (55,3 %) + C1 (44,7 %)

TABELA V. Efluente (Extração (55,3 %) + Cloração (44,3 %)) Com Tratamento Biológico Após 120 h de Incubação.

Cepas	Descol. D ₀₀ (%)	D ₀₀ mg/L	Tox. ^b	LC	p ^d	Li-Fe	Mn-P ^f	b-Glu ^g
<i>P.chrysosporium</i> BKM-F-1767	69,1	1478	0 (-)	1,3	0,0	0,0	3,1	3,0
<i>C.sitophila</i> TFB 27441	50,2	1427	3 (+)	0,0	0,0	0,0	2,2	7,2
<i>L.edodes</i> UEC 2019	59,3	1281	13 (+)	0,5	0,0	0,0	2,5	32,8
Controle Efluente s/ tratamento	-	1478	- (+)	-	-	-	-	-

^a Eficiência (% de descoloração/massa micelial seca (mg)), ^b Toxicidade, teste realizado com *Spirillum volutans*, (+) tóxico, (+) pouco tóxico, (-) não tóxico; ^c Lacase (U/L), ^d Peroxidase (U/L), e Ligninase (U/L), ^f beta-Glicosidase (U/L).

Características do efluente: Absorbância inicial: 0,6033, pH 5 (ajustado com a mistura Cloração + Extração), Fósforo total: 0,035 mg/L; Nitrogênio: 0, Carboidratos: 0,02 %.

Tabela VI. E1 (55,3 %) + C1 (44,7 %): Cinética de Descoloração e pH.

Cepas	Descol. (%)			pH			E _a
	24	72	120 (h)	24	72	120 (h)	
P.chrysosporium BKM-F-1767	51	59	69	6,7	5,5	6,9	0,8
C.sitophila TFB 27441	51	68	50	7,0	7,5	7,6	0,6
L.edodes UEC 2019	62	66	60	4,4	3,6	4,4	0,7
Controle Efluente s/ tratamento (pH inicial 5,0)	-	-	-	5,0	5,0	6,5	-

E_a = % de descoloração/massa micelial seca (mg).

A cinética de descoloração foi mais rápida do que na primeira mistura (Tabela IV). Com a determinação da distribuição das massas moleculares, chegou-se a duas considerações importantes:

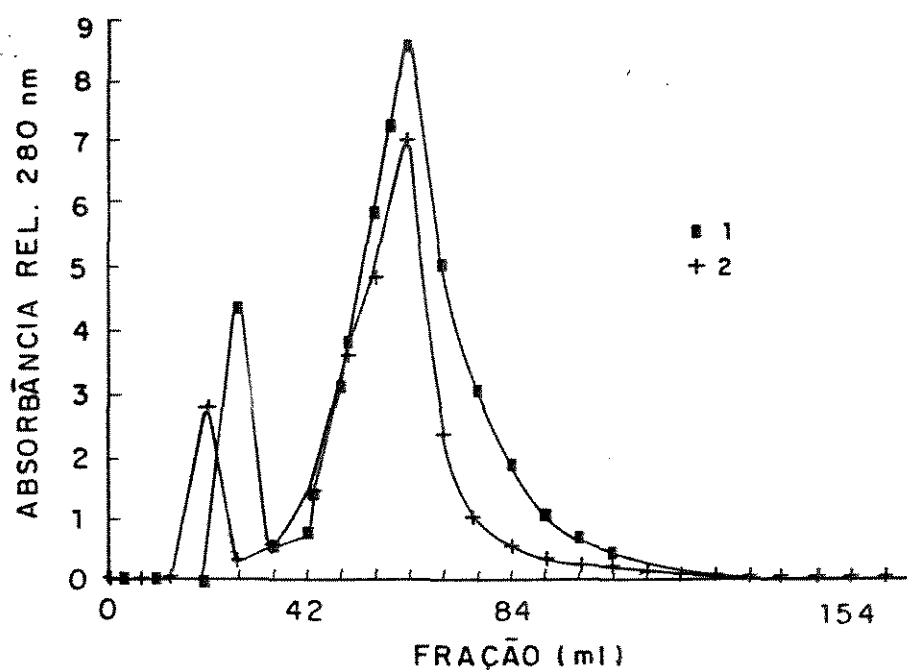
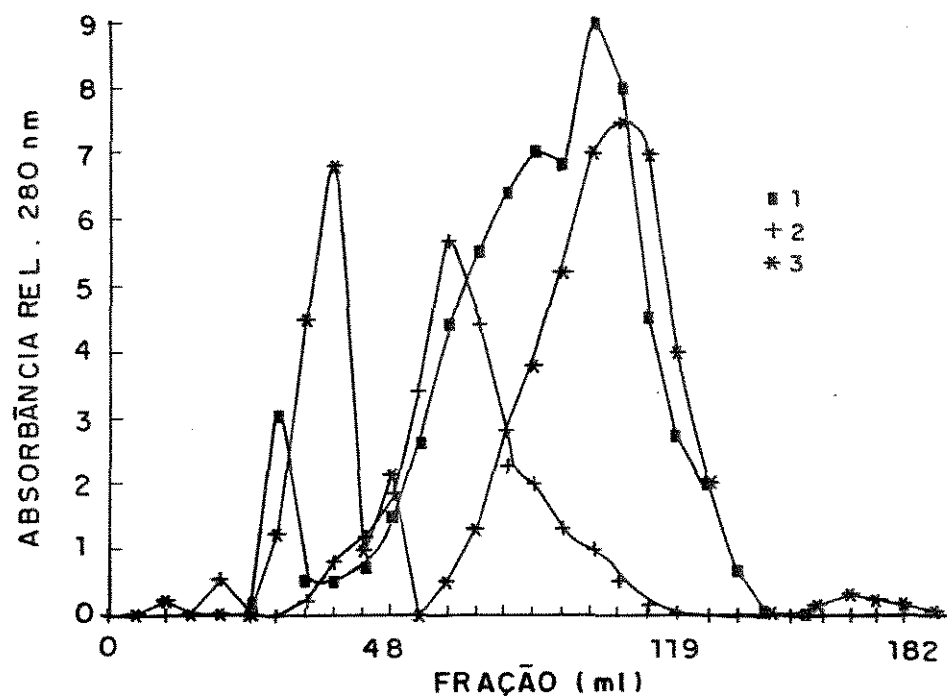
a) O método de seleção deve ser exclusivo para um tipo de substrato, especialmente tratando-se de efluentes, pois a presença e as proporções de determinados compostos são alteradas;

b) A presença do cloro parece afetar bruscamente o sistema enzimático dos fungos. Algumas enzimas, como Li-P, ficaram totalmente inibidas. A descoloração nestes casos poderia estar associada a transformação dos grupos cromóforos, há uma nova distribuição de massa e despolimerização, sem levar ao final à mineralização. (Figura 30).

A partir destes resultados, decidimos tratar o efluente proveniente do estágio de extração alcalina (E1).

Figura 30. Distribuição da massa molecular: Efluente

(E1 55,3 % + C1 44,7 %) após 120 h de tratamento biológico.

(1) Controle (efluente não tratado) e (2) *P. chrysosporium* BKM-F-1767(1) Controle (efluente não tratado); (2) *L. edodes* UEC-2019(3) *C. sitophila* TFB 27441.

4.8.3) Efluente E1 (100 %)

TABELA VII . Efluente (Extração) Com Tratamento Biológico, após 120 h de incubação.

Cepas	Descol. DQO (%)	DQO mg/L	Tox. ^b (%)	LC	Pd	Li-Fe	Mn-Pf	b-Glu9
<i>P.chrysosporium</i> BKM-F-1767	22,0	1200	17 (+)	0,01	0,12	0,0	29,1	3,8
<i>C.sitophila</i> TFB 27441	48,0	640	55 (+)	0,0	0,0	0,0	40,3	2,8
<i>L.edodes</i> UEC 2019	47,0	720	50 (+)	0,23	0,0	0,0	4,5	8,4
Controle Efluente s/ tratamento	-	1560	(+)	-	-	-	-	-

^a Eficiência (% de descoloração/massa micelial seca (mg)), ^b Toxicidade, teste realizado com *Spirillum volutans*, (+) tóxico, (+) pouco tóxico, (-) não tóxico, ^c Lacase (U/L), ^d Peroxidase (U/L), ^e Ligninase (U/L), ^f beta-Glicosidase (U/L).

Características do efluente: Absorbância inicial: 0,5792, pH 5 (ajustado com H₂SO₄), Fósforo: 0,36 mg/L, Nitrogênio: 5,6 mg/L, Carboidratos: 0,005 %.

Os valores de DBD foram 429 mgO₂/L para o efluente controle (E1) sem tratamento, 162 mgO₂/L para *P. chrysosporium*, 276 mgO₂/L para *C. sitophila* e 304 mgO₂/L para *L. edodes*.

Tabela VIII. Efluente E1 (100 %): Cinética de Descoloração e pH.

Cepas	Descol. (%)			pH			E ^a 120 h
	24	72	120 (h)	24	72	120 (h)	
<i>P.chryso sporium</i> BKM-F-1767	23	48	22	6,6	7,6	7,8	0,3
<i>C.sitophila</i> TFB 27441	19	50	48	7,3	7,6	8,0	0,5
<i>L.edodes</i> UEC 2019	39	40	47	4,9	4,6	4,7	0,5
Controle Efluente s/ tratamento (pH inicial 5,0)	-	-	-	5,0	5,4	8,2	-

Ea = % de descoloração/massa micelial seca (mg)

Apesar dos resultados não apresentarem valores muito significativos de descoloração, pôde-se observar um aumento nas atividades enzimáticas ao final do processo de 120 horas. Considerando os resultados anteriores (Tabelas XI e XII), este fato propõe que o cloro afeta consideravelmente a atividade enzimática.

4.9 APLICAÇÃO DO SISTEMA EM BIORREATOR

Visando otimizar as condições estudadas em menor escala, passamos o processo a um biorreator. Utilizamos um modelo de leite recheado modificado e testado pelo grupo do Dr. Sant'Anna da Escola de Engenharia Química da UFRJ.

O reator foi operado em estado estacionário onde *L. edodes* foi utilizado imobilizado. O emprego de fungos filamentosos para este propósito é fonte crescente de interesse, devido às características metabólicas e propriedades de aderência superficial (Ancelmo e Novais, 1992 e referências citadas).

Para este modelo de biorreator pode-se supor que a fase líquida é perfeitamente agitada. Embora não se tenha feito uma caracterização hidrodinâmica, estudos realizados com reatores similares (Guadalupe, 1985 ; Costa Reis e Sant'Anna, 1985) confirmam que a fase líquida é praticamente homogeneamente agitada. Dentro deste contexto, o reator testado, operado em batelada, pode ser considerado um reator em batelada de mistura perfeita, em inglês "BSTR" (batch stirred tank reactor).

O balanço de massa para o microrganismo é dado pela equação abaixo:

$$(dX)_C V = QX dt + dX V$$

Onde:

$(dX)_C$ é o aumento da concentração de microrganismos que ocorre no intervalo de tempo dt .

dX é a variação da concentração observada no mesmo intervalo, já que não atingiu-se o regime estacionário.

Assim a equação poderia ser escrita como:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{-Q}{V} X + \frac{(dX)}{(dt)c}$$

$$\frac{Q}{V} \quad \text{vazão específica} = D$$

$$\frac{dX}{dt} = -DX + \frac{(dX)}{(dt)c}$$

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = -D + \frac{1}{X} \frac{(dX)}{(dt)c}$$

Por definição, a velocidade específica de crescimento é dada por:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{(dX)}{(dt)_c} \quad X \text{ é a concentração no instante } t.$$

Logo:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_X - D$$

No regime estacionário tem-se:

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

Logo:

$$\mu_X = D$$

$$\mu_X = \frac{Q}{V}$$

Quando se trabalha com um único tanque, sem microrganismos no líquido de alimentação, a velocidade específica de crescimento é, no regime estacionário, igual a vazão específica de alimentação.

O balanço de massa para o substrato é calculado pela seguinte equação:

$$QS_0 dt - (-dS)_c V = QS dt + dSV$$

Sendo: $(-dS)_c$ a massa do substrato consumida no intervalo de tempo dt ;

dS a variação de massa observada neste intervalo de tempo, quando não atingido o regime estacionário.

Portanto:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{Q}{V} (S_0 - S) + \frac{(dS)}{(dt)_c}$$

S_0 é a concentração limitante de substrato no tanque de cultivo;

S é a concentração limitante de substrato no tanque de alimentação.

4.10 FUNGO IMOBILIZADO

Foram testados dois suportes para imobilização do fungo, nylon e cavacos de *Eucalyptus grandis*. A idéia de utilizar a madeira como suporte foi uma tentativa para que a mesma servisse como substrato e suporte ao mesmo tempo. Economicamente seria uma alternativa viável, já que no Brasil as indústrias papeleiras utilizam, geralmente, madeira de *Eucalyptus* para produção de polpa e papel (Araújo e col. 1991).

Por um período de 5 dias foi determinado cor, pH, fenóis totais e DQO. O cálculo de eficiência foi definido no item 5, da parte experimental.

4.10.1) IMOBILIZAÇÃO EM NYLON

A eficiência deste processo em 120 horas foi de 70 % na redução da cor, 36 % na redução de fenóis e 67 % na redução de DQO.

$$\text{Eficiência (Cor, Abs.465 nm)} = \frac{0,8103 - 0,2430}{0,8103} = 0,70$$

$$\text{Eficiência (Fenóis Totais)} = \frac{49,0 \text{ mg/L} - 31,5 \text{ mg/L}}{49,0 \text{ mg/L}} = 0,36$$

$$\text{Eficiência (DQO)} = \frac{1.320 \text{ mg/L O}_2 - 436 \text{ mg/L O}_2}{1.320 \text{ mg/L O}_2} = 0,67$$

A maior vantagem foi a obtenção de uma cinética mais rápida e também uma redução maior da DQO, embora não sendo tão significativa em relação à obtida com micélio livre, é significativa quando comparada à obtida com *P. chrysosporium* em condições ótimas de

cultivo (Cammarota, 1991). Na Tabela IX, comparamos *L. edodes* com *P. chrysosporium*. Neste caso deve-se ressaltar que as condições de cultivo foram diferentes. Não trabalhou-se em condições ótimas com *L. edodes*, já que o objetivo era a obtenção de um processo economicamente viável.

Vários trabalhos sobre imobilização concordam com o aumento na eficiência do processo. *C. sitophila* imobilizada em nylon aumenta 40 % a descoloração de efluente (Durán e col. 1991). Ancelmo e Novais (1992) demonstraram um notável aumento na biodegradação de compostos fenólicos por *Fusarium flocciferum* imobilizado em relação ao micélio livre.

Tabela IX. Tratamento Biológico de Efluente E1 Após 120 h em Bio reator de Leito Recheado (300 mL). Micélio Imobilizado em Nylon.

Fungo	<i>L. edodes</i> (UEC-2019)	<i>P. chrysosporium</i> (BKM-F-1767)
Período (h)	120	120
pH	4,1 (inicial 5,0)	4,0 (inicial 4,5)
Descoloração (%)	70	67
Redução de Fenóis Totais (%)	36	42
Redução de DQO (%)	67	50

Tabela X. L. edodes imobilizado em nylon em biorreator de leite recheado.

Tempo (h)	Descoloração (%)	Fenóis totais (%)	DQO (%)
24	18	12	39,4
48	38	15	-
72	55	29	39,4
96	62	31	54,0
120	70	36	67,0

Podemos concluir a partir destes primeiros resultados que a imobilização do micélio fúngico em nylon em biorreator é um método rápido e eficiente, permitindo um escalamento de processo, a longo prazo.

4.10.2) IMOBILIZAÇÃO EM MADEIRA

Os resultados obtidos da imobilização em madeira não foram muito promissores. A cor inicial do efluente sofreu um aumento significativo a partir do terceiro dia. inicialmente inoculamos o fungo na madeira e após uma semana inoculamos o efluente com esta madeira. O processo mostrou-se eficiente até 72 horas, seguindo-se um incremento na cor, nos fenóis e também na massa molecular. Os cálculos de eficiência são definidos a seguir:

$$\text{Eficiência (Cor, Abs. 465 nm)} = \frac{0,7124 - 0,4170}{0,7124} = 0,42$$

$$\text{Eficiência (Fenóis totais)} = \frac{75,5 \text{ mg/L} - 56,0 \text{ mg/L}}{75,5 \text{ mg/L}} = 0,25$$

A Figura 31 ilustra a permeação em gel sephadex 6-50 do efluente biotratado. Observamos claramente um aumento da área, possivelmente devido a liberação de fenóis da madeira durante o tratamento com o fungo. Nas Tabelas X e XI estão apresentados os resultados relativos ao estudo cinético dos dois processos testados em biorreator e as Figuras 32 e 33 interpretam graficamente os valores das cinéticas de descoloração e fenóis totais. Há uma tendência da redução de fenóis acompanhar a perda de cor, tanto na imobilização em madeira como na imobilização em nylon. Entretanto, a velocidade de redução de fenóis é 7,5 vezes mais rápida na imobilização em madeira ($k = 13 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) do que na imobilização em nylon ($k = 1,7 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), provavelmente devido ao estímulo provocado pela madeira na produção enzimática e consequentemente na degradação de fenóis. Em termos de descoloração as velocidades praticamente não diferem, $k = 6,9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para imobilização em madeira e $k = 7,8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para imobilização em nylon.

Concluimos que a madeira de Eucaliptus é um suporte que pode ser adequado para imobilização, se utilizado por um período menor

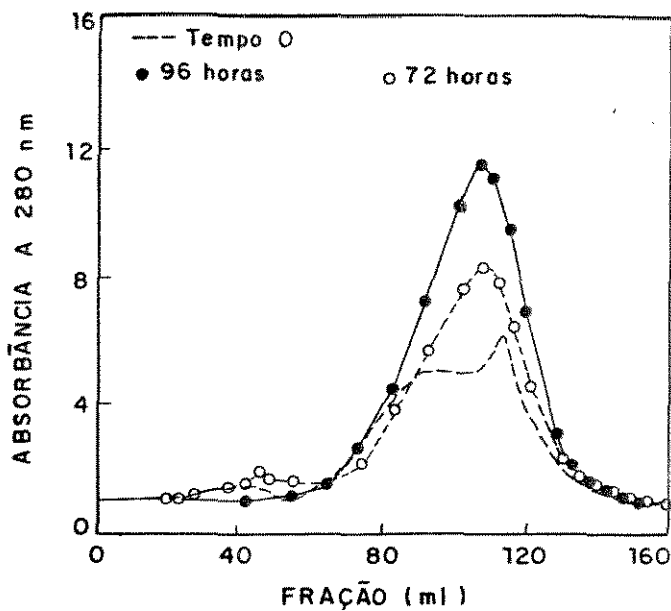


Fig. 31 Permeação em gel (GPC) sephadex G-50 do efluente biotratado.

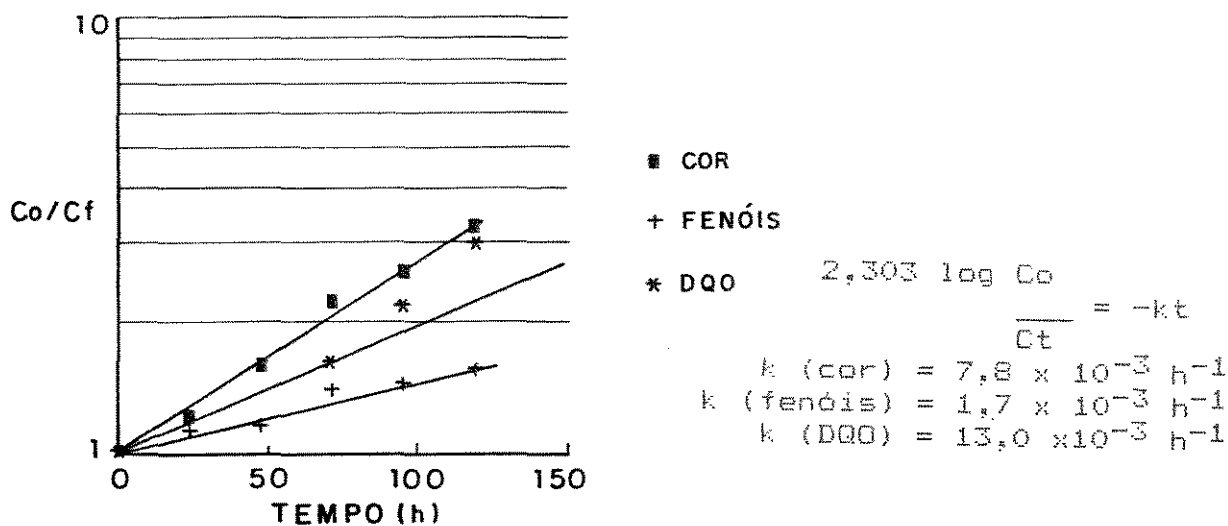
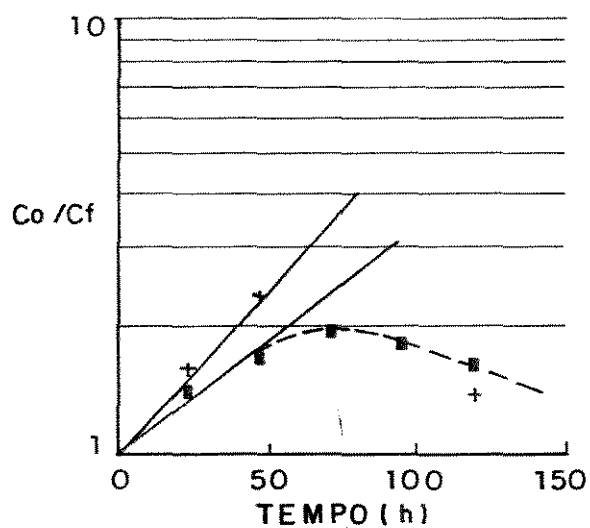


Fig. 32 Imobilização em nylon: Cinética de descoloração, Fenóis e DQO.



$$2,303 \log \frac{C_0}{C_t} = -kt$$

$$k (\text{cor}) = 6,9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$$

$$k (\text{fenóis}) = 13,0 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$$

Fig. 33 Imobilização em madeira: Cinética de descoloração, Fenóis e DGD.

de tempo (72 h) e em um processo contínuo, ou seja, transferindo-se o efluente já tratado para um biorreator com novo inóculo (fungo imobilizado na madeira). Apesar dos resultados serem menos significativos do que na imobilização em nylon, há uma velocidade consideravelmente maior na degradação de fenóis até 72 horas, como se pode verificar nas Tabelas X e XI.

Tabela XI. *L. edodes* imobilizado em madeira em biorreator de leito recheado.

Tempo (h)	Descoloração (%)	Fenóis totais (%)
24	29	37,5
48	42	43,4
72	49	41,0
96	-	-
120	42	25,8

4.11 INDUÇÃO ENZIMÁTICA

Para a indução enzimática utilizamos o próprio efluente como meio de diluição no cultivo do microrganismo, neste caso *L. edodes*.

Como podemos observar na Tabela XII houve, um incremento das atividades quando comparadas às determinações iniciais. Na primeira etapa da seleção foram determinadas as atividades fenoloxidasas e ligninase em caldo. Após o período de indução, percebe-se que algumas enzimas que não haviam sido detectadas anteriormente como as lacases, que nesta fase puderam ser quantificadas.

Tabela XII. Atividade enzimática de *L. edodes* em caldo.

Tempo (horas)	24	72	120	120i
Lacase (U/L)	3,5	8,0	11,0	0,0
Peroxidase (U/L)	1,0	0,2	0,3	0,0
Ligninase (U/L)	0,0	12,8	4,2	12,7
Mn-Peroxidase (U/L)	0,5	0,0	0,0	-
Beta-Glicosidase (U/L)	9,0	3,0	8,0	-

(i) atividades iniciais, medidas no caldo (dados referentes a Tabela I)

Segundo Oki e col. (1981) e Leatham (1986) a atividade ligninolítica de *L. edodes* aumenta durante o período de crescimento vegetativo, onde as fontes de carbono e nitrogênio são abundantes. Bonnarne e Jeffries (1990) mostraram a participação de Mn (II) na regulação das atividades de ligninase e Mn-peroxidase.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A partir de 51 cepas de fungos testados quanto a habilidade em descolorir e descontaminar efluentes Kraft provenientes de indústrias de polpa e papel, selecionamos *Lentinus edodes* como a cepa de maior potencial, dentro das condições propostas neste estudo.

L. edodes foi capaz de descolorir eficientemente, reduzir a massa molecular através do processo de mineralização, reduzir as demandas química e bioquímica de oxigênio, reduzir os fenóis totais (cloroligninas) e a toxicidade aguda dos efluentes testados.

A condição primordial foi a não utilização de fontes adicionais de carbono e/ou nitrogênio após a inoculação do fungo no efluente. O efluente possui um conteúdo mínimo de glicose, em torno de 0,06 %, sendo em alguns casos, o suficiente para manter o microrganismo ativo.

Após o período de indução com efluente, a cepa mostrou-se cineticamente mais eficiente na descoloração do efluente.

Este processo levado a escala de um biorreator, com o fungo imobilizado em diferentes suportes demonstrou um bom potencial de aplicação, especialmente quando nylon foi utilizado como suporte.

O principal obstáculo encontrado é a lentidão no período de crescimento deste fungo em especial.

A seleção deve ser específica para cada substrato. Os resultados podem variar enormemente com a mudança de um parâmetro, haja visto os resultados obtidos com o efluente misto (E1 + C1).

No caso de *L. edodes*, que apesar de não possuir atividades enzimáticas relevantes, foi um dos mais eficazes, pode-se conjectu-

rar que a mudança de pH causada pelo fungo é um fator preponderante no favorecimento da ação das enzimas ligninolíticas. Quando se compara *L. edodes* com *P. trabeus*, existem duas diferenças básicas a serem ressaltadas, pH e atividade beta-glicosidase. *P. trabeus* leva a um aumento de pH em torno de 8, sendo desfavorável para qualquer das enzimas testadas, e a não detecção de beta-glicosidase, que realmente demonstrou ser imprescindível para o ataque enzimático.

Os objetivos propostos para este estudo foram atingidos. Como perspectiva futura pode-se pensar à nível de modelamento matemático do biorreator utilizado durante este trabalho, para otimização do processo de biotratamento de efluentes. Entretanto, pode-se extrapolar à partir destes resultados uma associação de dois tipos de tratamentos, como uma alternativa bastante promissora à nível de aplicação industrial. Por exemplo a ultrafiltração ou tratamento anaeróbio seguido de tratamento aeróbio com *L. edodes* imobilizado em um suporte adequado, possivelmente seria um processo altamente eficiente.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ammar, E.; Deschamps, A.; Lebeault, J.M.e Vijayalakshmi, M. (1986).
Characterization of Bacterial Lignin Degraded Intermediates by Gel
Chromatography, *Biotechnol. Pulp Paper Ind.*, 3th Inter. Conf.,
Stockholm, pp: 143..
- Andreoni, V.; Bernasconi, S.; Bestetti, P. e Villa, M. (1991).
Metabolism of Lignin-Related Compounds by *Rhodococcus rhodochrous*:
Bioconversion of Anisoin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 410.
- Anselmo, A. M. e Novais, J. M. (1992)a. Degradation of Phenol by
Immobilized Mycelium of *Fusarium flocciferum* in Continuous
Culture. *Wat. Sci. Tech.*, 25: 161.
- Anselmo, A. M. e Novais, J. M. (1992)b. Biological Treatment of
Phenolic Wastes: Comparison Between Free and Immobilized Cell
Systems. *Biotechnol. Lett.*, 14: 239.
- APHA AWWA WPCF (1975). *Standard Methods for the Examination of Water
and Wastewater*, 14th Ed., American Public Health Association,
Washington, D. C.
- APHA AWWA WPCF (1989). *Standard Methods for the Examination of Water
and Wastewater*, 17th Ed., American Public Health Association,
Washington, D. C.
- Araújo, R. P. A.; Bertolotti, E.; Ramos, M. L. L. C.; Gherardi-Golds
tein, E. e Martins, M. H. R. B. (1991). Pulp and Paper Industrial
Effluents: Toxicity Abatement for Aquatic Life Protection. *Ciência
e Cultura*, 43: 299.
- Archibald, F.; Paice, M. G. e Jurasek, L. (1990). Decolorization of
Kraft Bleachery Effluent Chromophores by *Coriolus (Trametes)*

- versicolor. *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 846.
- Baeza, J.; Urizar, S.; Erismann, N. M.; Freer, J.; Schmidt, E. e Durán, N. (1991). Organosolv Pulping - V: Formic Acid Delignification of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis*. *Biores. Technol.*, 37: 1.
- Bergbauer, M.; Eggert, C. e Kalnowski, G. (1992). Biotreatment of Pulp Mill Bleachery Effluents With the Coelomycetous Fungus *Stagonospora gigaspora*. *Biotechnol. Lett.*, 14: 317.
- Blair, J. E. e Davis, L. T. (1980). Process for Decolorizing Pulp and Paper Mill Wastewater. US Patent, Apr. 22. 4, 199, 444.
- Blair, J. E. e Davis, L. T. (1984). Microorganism for Decolorizing Pulp and Paper Mill Wastewater. US Patent, Apr. 24. 4, 444, 888.
- Branco, S. M. e Hess, M. L. (1975). Tratamento de Resíduos, cap. 3: 47 in Tópicos de microbiologia Industrial, vol. 2, Edgard Blucher, Ed. Universidade de São Paulo.
- Bryant, C. W. e Barkley, W. A. (1991). Biological Dehalogenation of Kraft Mill Wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, 24: 287.
- Boman, B.; Ek, M.; Eriksson, K.-E. e Frostell, B. (1988). Some Aspects on Biological Treatment of Bleach Pulp Effluents. *Nordic Pulp and Paper Res. J.*, 3: 13.
- Boman, B.; Ek, M.; Heyman, W. e Frostell, B. (1991). Membrane Filtration Combined With Biological Treatment for Purification of Bleach Plant Effluents. *Wat. Sci. Tech.*, 24: 219.
- Bonnarme, F. e Jeffries, T. W. (1990). Mn (II) Regulation of Lignin Peroxidases from Lignin-Degrading White Rot Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 210.

- Bourbonnais, R. e Paice, M. (1992). Demethylation and Delignification of Kraft Pulp by *Trametes versicolor* Laccase in the Presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36:823.
- Cammarota, M.C. (1991). Avaliação de um Bio-Reator Fungico Para Remoção de Cor do Efluente do Branqueamento de Polpa Kraft. Tese de Mestrado, Escola de Engenharia Química, UFRJ, R.J.
- Cammarota, M.C. e Sant'Anna, G.L. (1992). Decolorization of Kraft Bleach Plant E1 Stage Effluent in a Fungal Bioreactor. *Environ. Technol.*, 13:65.
- Chetham, P. S. J. e Bucke, C. (1984). Immobilization of Microbial Cells and their Use in Waste Water Treatment. In Microbial Methods for Environmental Biotechnology, Technical Series Nº 19, Grainger, J. M. e Lynch, J. M. Eds., Academic Press, London, N. Y., pp: 219.
- Chang, H.M.; Joyce, T.W. e Kirk, T.K. (1987). Process of Treating Effluent from a Pulp and Paper Making Operation. US Patent, 655: 926.
- Chang, H.M.; Joyce, T.W.; Vasudevan, B. e Kirk, T.K. (1987). 4th. Intern. Symp. Wood Pulping Chem. Paris, 159.
- CPPA Technical Section Standard Method HSP, "Colour of Pulp Mill Effluents" (1974).
- Davis, S. e Burns, R. G. (1978). Decolorization of Phenolic Effluents by Soluble and Immobilized Phenol Oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 721.
- Durán, N; Dezotti, M. e Rodriguez, J. (1991). Biomass Photochemistry. XV: Photobleaching and Biobleaching of Kraft Effluent. J.

- Photohem. Photobiol. A: Chem., 62: 269.
- Ek, M. e Eriksson, K-E. (1987). External Treatment of Bleach Plant Effluent. 4th Int. Symp. Wood Pulping Chem., Paris, pp:175.
- Ek, M. e Eriksson, K.-E. (1989). External Reduction of AOX in Bleached Pulp Effluents. VTT Symp. 102, Non-Waste Technol., Korhonen, M. Ed. vol. I: 435, Technic. Res. Centre Finland, Espoo.
- Ek, M. e Kolar, M-C. (1990). Reduction of AOX in Bleach Plant Effluents by a Combination of Ultrafiltration and Biological Methods, in Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture Applications and Fundamental Investigations, Proc. 4th Intern. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Ind., Kirk, T.K e Chang, H-M. Eds, Butterworth-Heinemann, cap. 25: 271.
- Eysenbach, E. J.; Neal, L. W. e Owens, J. W. (1990). Pulping Effluents in the Aquatic Environment. Tappi J., 73: 104.
- Eriksson, K.-E. e Kolar, M. C. (1985). Microbial Degradation of Chlorolignins. Environ. Sci. Technol., 19: 1086.
- Eriksson, K.-E. (1990). Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Wood Sci. Technol. 24:79.
- Eriksson, K-E. L. (1992). Development of New Techniques to Reduce Environmental Impact of Pulp Bleaching. Proc. 2nd Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Comp., (Durán, N. e Esposito, E. Eds)., FAPESP, Campinas, Brasil, vol. III: 274.
- Esposito, E.; Canhos, V. e Durán, N. (1991). Screening of Lignin-Degrading Fungi For Removal of Color From Kraft Mill Wastewater With no Additional Extra Carbon-Source. Biotechnol. Lett., 13: 571.
- Fahmy, M.; Heinzle, E. e Kut, D. M. (1991). Treatment of Bleaching Effluents in Aerobic/Anaerobic Fluidized Biofilm Systems. Wat. Sci.

- Tech., 24: 179.
- Fairbanks, M. (1992). Plano de Tratamento Vai Limpar o Tietê. Quim. Derivados, ano XXVI (291): 16.
- Fengel, T. e Wegener, G. (1984). Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- Ferrara, M. A. (1988). Produção de Ligninases por *Phanerochaete chrysosporium* em Diferentes Fontes de Carbono. Tese de mestrado, Escola de Química, R. J.
- Fitzsimons, R.; Ek, M. e Eriksson, K.E. (1990). Anaerobic Degradation of Chlorinated Organic Compounds of Different Molecular Masses in Bleach Plant Effluents. Environm. Sci. Technol., 24: 1744.
- Folke, J. (1991). Regulatory Requeriments for Pulp and Paper Mill Effluent Control: Scientific Basis and Consequences. Wat. Sci. Tech., 24: 19.
- Forss, K.; Jokinen, K.; Savolainen, M. e Willianson, H. (1989). Utilization of Enzymes for Effluent Treatment in the Pulp and Paper Industry. Paperi ja Puu, 10: 1108.
- Ganezarczyk, J. (1972). Fate of Lignin in Activated Sludge Treatment of Kraft Effluents. 27th Fardue Indust. Waste Conf., pp: 256.
- Glenn, J. K. e Gold, M. H. (1985). Purification and Characterization of an Extracellular Mn (II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., 242: 329.
- Goatcher, L. J.; Qureshi, A. A. e Gaudet, I. D. (1988). Evaluation and Refinement of the *Spirillum volutans* Test for Use in Toxicity Screening. In Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems Liu, D. e Dutka, B. Eds., Marcel Debber Inc., pp: 89.

- Gold, M. H.; Kuwahara, M.; Chiui, A. A. e Glenn, J. K. (1984). Purification and Characterization of an Extracellular H₂O₂-Requiring Diarylpropane Oxygenase from the White rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 234: 353.
- Guadalupe, M. F. (1985). Tratamento Sequencial de Vinhoto em Reatores de Leito Submerso Anaeróbico e Aeróbico. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Coppe/UFRJ, R.J.
- Hammel, K. E. (1989). Organopollutant Degradation by Ligninolytic Fungi. *Enzyme Microb. Technol.*, 11: 776.
- Hagglom, M. e Salkinoja-Salonen, M. (1991). Biodegradability of Chlorinated Organic Compounds in Pulp Bleaching Effluents. *Wat. Sci. Tech.*, 24: 161.
- Hatakka, A. I.; Lankinen, V. P.; Lundell, T. K.; Hietanen, P.; Fabricius, B. -O. e Pellinen, J. (1990). The Ligninolytic System of White-Rot Fungi and Potential Applications in the Treatment of Bleach Plant Effluents. In: *Proc. Cellucon 89 conf*, Wrexham, U. K., Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- Hatakka, A. I.; Lundell, T.; Kilpelainen, I. e Brunow, G. (1991). Use of Novel Polystyrene-Bound Lignin Models as Substrates for Lignin Peroxidases from *Phlebia radiata*. *Proc. of 6th Inter. Symp. Wood Pulping Chem.*, Melbourne, Australia, vol. I: 165.
- Hawksworth, D. L.; Sutton, B. C. e Ainsworth, G. C. (1983). *Dictionary of the Fungi*, 7th Ed., Commonwealth Mycol. Inst., Kew Surrey, U. K.
- Heinburger, S. A.; Blevins, D. S.; Bostwick, J. H. e Donnini, G. P. (1988). Kraft Mill Bleach Plant Effluents: Recent Developments Aimed at Decreasing their Environmental Impact. Part 2. *Tappi J.* 70:69.

- Huynh, V.B; Chang, H.M. e Joyce, T.W. (1985). Dechlorination of Chloro-Organics by a White-Rot Fungus. Tappi J., 68: 98.
- Kirk, T. K. (1987). Lignin-Degrading Enzymes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 321: 461.
- Kirk, T. K. e Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. Ann. Rev. Microbiol., 41: 465.
- Kirkpatrick, N. (1991). Biological Bleaching of Wood Pulps - A Viable Chlorine-Free Bleaching Technology ?. Wat. Sci. Tech. 24: 75.
- Kondo, R, e Imamura, H. (1989). Formation of Lignin Model Xyloside in Polysaccharides Media by Wood-Rotting Fungi. Mokuzai Gakkaishi, 35: 1001.
- Kringstad, K. P. e Lindstrom, K. (1984). Spent Liquors From Pulp Bleaching. Environ. Sci. Technol., 18: 236 A.
- Kawahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A. e Gold, M. H. (1984). Separation and Characterization of Two Extracellular H₂O₂-Dependent Oxidases from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS, 169: 247.
- Larrea, L.; Forster, C. F. e Melé, D. (1989). Changes in Lignin During Diffused Air Activated Sludge Treatment of Kraft Effluent. Wat. Res., 23: 1073
- Lankinen, V.P.; Inkeroinen, M.M.; Pellinen, J. e Hatakka, A.I. (1991). The Onset of Lignin-Modifying Enzymes, Decrease of AOX and Color Removal by White-Rot Fungi Grown on Bleach Plant Effluents. Wat. Sci. Tech. 24: 189.
- Leatham, G. F. (1986). The Ligninolytic Activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24: 51.

- Leisola, M. S. A.; Haemmerli, S. D.; Smit, J. D. G.; Troller, J.; Waldner, R.; Schoemaker, H. E. e Schmidt, H. (1987). *Phanerochaete chrysosporium*: Characterization of Ligninolytic Enzymes and Metabolism of Veratryl Alcohol. Lignin Enzymic and Microbial Degradation, INRA Ed., Les Colloques de l'INRA, Paris, 40: 81
- Lewandowski, G.A.; Armenante, P.M. e Fak, D. (1990). Reactor Design for Hazardous Waste Treatment Using a White Rot Fungus, *Water Res.*, 24: 75.
- Livernoche, D.; Jurasek, L.; Desrochers, M. e Dorica, J. (1983) Removal of Color from Kraft Mill Wastewater with Cultures of White-Rot Fungi and with Immobilized Mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Bioeng.*, XXV: 2055.
- Messner, K.; Ertler, G. e Jaklin-Farcher, S. (1989). Treatment of Bleach Plant Effluents by the MYCOPOR system. In Fourth Int. Conf. of Biotechnol. in the Pulp and Paper Ind., Raleigh, N. C., USA, pp: 67.
- Michel Jr., F. R.; Dass, B.; Grulke, E. A. e Reddy, C. A. (1991). Role of Manganese Peroxidases and Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2368.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Reagent salicylic Reagent for the Determination of Reducing Sugars. *Anal. Chem.*, 31: 426.
- Milstein, O.; Haars, A.; Krause, F. e Huttermann, A. (1991). Decrease of Pollutant Level of Bleaching Effluents and Winning Valuable Products by Successive Flocculation and Microbial Growth. *Wat. Sci. Tech.*, 24: 199.

- Mittar, D.; Khanna, P.K.; Marwana, S.S e Kennedy, J.F. (1992).
Biobleaching of Pulp and Paper Mill Effluents by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Chem. Tech. Biotechnol. 53:81.
- Momohara, I.; Matsumoto, Y.; Ishizu, A. e Chang, H-M. (1989).
Decolorization Mechanism of Kraft Pulp Bleaching Mill Effluent by *Phanerochaete chrysosporium*: Characterist of Color and It's Change During Decolorization. Mokuzaï Gakkaishi, 35: 1110.
- Momohara, I.; Matsumoto, Y.; Ishizu, A. (1990). Degradation of Quinone Type Model Compound by *Phanerochaete chrysosporium* and Lignin Peroxidase. Mokuzaï Gakkaishi, 36: 588.
- Neilson, A. H.; Allard, A-S.; Hynning, F-A.; Remberger, M. e Viktor, T. (1990). The Environmental Fate of Chlorophenolic Constituents of Bleachery Effluents. Tappi, J., 73: 239.
- Nicol, J-P.; Benefield, L. D.; Wetzel, E. D.; Heidman, J. A. (1988).
Activated Sludge Systems with Biomass Particle Support Structures. Biotechnol. Bioeng., 31: 682.
- Oki, T.; Watanabe, H. e Ishikawa, H. (1981). The Biodegradation of Lignin by *Shiitake Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Mokuzaï Gakkaishi, 27: 696.
- Paice, M. G.; Jurasek, L.; Ho, C.; Bourbonnais, R. e Archibald, F. S. (1989). Direct Biological Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with the Fungus *Coriolus versicolor*. Tappi J., 72: 217.
- Palmer, J. M.; Harvey, P. J. e Schoemaker, H. E. (1987). The role of Peroxidases, Radical Cations and Oxigen in the Degradation of Lignin. Phil. Trans. R. Soc. Londo. A 321, 495.
- Perez, J. e Jeffries, T. W. (1990). Mineralization of ¹⁴C-Ring-Labeled Synthetic Lignin Correlates with the Production of Lignin

- Peroxidase, not of Manganese Peroxidase or Laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1806.
- Frasad, D.Y. e Joyce, T.W. (1991). Color Removal from Kraft Bleach Plant Effluent by *Trichoderma* sp. *Tappi J.*, 74: 165.
- Prouty, A.L. (1990). Bench Scale Development and Evaluation of a Fungal Bioreactor for Color Removal from Bleach Effluents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32:490.
- Reid, I. D.; Faice, M. G.; Ho, C. e Jurasek, L. (1990). Biological Bleaching of Softwood Kraft Pulp with the Fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Tappi J.*, 73: 150.
- Reis, L.G.C. e Sant'Anna, G.L. (1985). Aerobic Treatment of Concentrated Wastewater in a Submerged Bed Reactor. *Water Res.*, 19: 1341.
- Reyes, J.; Amaya-Farfán, J. e Durán, N. (1992). Utilization of Lignocellulosic Material: Orange Waste as Carbon Source for Single-Cell Protein. *Proc. 2nd Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Comp.*, (Durán, N. e Esposito, E. Eds.), FAPESP, Campinas, Brasil, vol. III: 410..
- Ribó, J. M. (1992). Evaluación de la Contaminación Química del Medio Acuático: El Ensayo de Bacterias Luminiscentes. *Afinidad IL*, 437:7.
- Rodriguez, J. (1990). Estudo do Sistema Ligninolítico do Ascomiceto *Chrysonilia sitophila*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Brasil.
- Roy-Arcand, L. and Archibald, F.S. (1991). Direct Dechlorination of Chlorophenolic Compounds by Laccasee From *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.*, 13: 194.

- Sant'Anna, G.L. (1992). Biological Treatment of Pulp and Paper Industrial Wastewater: Processes and Bioreactors. Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Comp., (Durán, N. e Esposito, E. Eds.), FAPESP Campinas, Brasil, vol. III: 297.
- Seifert, K. A. (1990). Isolation of Filamentous Fungi, cap. 2: 21, in Isolation of Biotechnological Organisms from Nature, Labeda, D.P., Mc Graw-Hill Publish. Comp. New York.
- Sprague, J. B. (1991). Environmentally Desirable Approaches For Regulating Effluents From Pulp Mills. Wat. Sci. Tech., 24: 361.
- Szklarz, G. D.; Antibus, R. K., Sinsabaugh, R. L. e Linkins, A. (1989). Purification of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-rotting Fungi. Mycol. 81: 234.
- Tan, L. U. L.; Mayers, P. e Saddler, J. N. (1987). Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from a Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. Can. J. Microbiol., 33: 689.
- Tien, M. e Kirk, T. K. (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenochaete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Sci., 221: 661.
- Tien, M. e Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-requering Oxygenase. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 81: 2280.
- Ulmer, D. C., Leisola, M. e Fiechter, A. (1984). Possible Induction the Ligninolytic System of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotechnol., 1: 13.
- Vasudevan, N. e Mahadevan, A. (1990). Degradation of Black Liquor Lignin by Microorganisms. Holzforschung, 44: 325.

- Voss, R. H. (1983). Chlorinated Neutral Organics in Biologically Treated Bleach Kraft Mill Effluents. *Environ. Sci. Technol.*, 17: 530.
- Yin, C.-F.; Joyce, T.W. e Chang, H.M. (1989). Role of Glucose in Fungal Decolorization of Wood Pulp Bleaching Effluents. *J. Biotechnol.* 10: 67.
- Webster, J. (1980). Introduction to Fungi 2nd Ed. Cambridge Univ. Press, Australia.
- Wood, T. M. (1985). Properties of Cellulolytic Enzymes Systems. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 407.
- Woodward, J. e Wiseman, A. (1982). Fungal and Other B-D-Glucosidases Their Properties and Applications. *Enzyme Microb. Technol.*, 4: 73.

7 GLOSSARIO

Actinomicetes: bactérias filamentosas as quais, algumas vezes, são classificadas como Fungos Imperfeitos. São tipicamente saprofitas, entretanto são conhecidas algumas poucas patogênicas para o homem, plantas e animais. Outras são importantes fontes de antibióticos (ex.: cicloheximida, estreptomicina) (Hawksworth e col., 1983).

Ascomycetes: Um grande grupo de fungos, os quais possuem como principal característica uma estrutura denominada asco, onde localizam-se os esporos ou, neste caso, ascosporos (Hawksworth e col., 1983).

Ascosporos: célula propagativa dos ascomycetes, encontram-se dentro do asco (Hawksworth e col. 1983).

Basidiomycetes: Um grande grupo de fungos que possuem como principal característica uma estrutura denominada basídio, que comporta os basidiósporos (Hawksworth e col. 1983).

Basidiósporos: célula propagativa dos basidiomycetes. São produzidas externamente nos basídios, o que facilita a dispersão e a variabilidade genética deste grupo, considerado como os mais evoluídos dentre os fungos (Hawksworth e col. 1983).

Micélio: estado vegetativo do fungo. Corpo frutífero de um fungo; um agregado de muitos filamentos (hifas) (Hawksworth e col., 1983)

Micorrizas: fungos associados simbioticamente a raízes da plantas
(Hawksworth e col., 1983)

Parasita: organismo que vive ou obtém os nutrientes necessários
para seu desenvolvimento através de um outro organismo
vivo (hospedeiro) (Hawksworth e col., 1983).

Patógeno: um parasita capaz de causar enfermidades principalmente
a seu hospedeiro (Hawksworth e col., 1983)

Saprófita: microrganismo que se alimenta de matéria orgânica
morta, comumente causam descomposição (Hawksworth e
col., 1983)

Xilófago: microrganismos degradadores de madeira.

APENDICE I.

1. Meio de Cultura (sólido)

Extrato de malte	12,5 g
Agar	20,0 g
Água destilada	1000 mL

2. Meio de Cultura (líquido)

Extrato de malte	12,5 g
Água destilada	1000 mL

3. Meio de Indução (sólido)

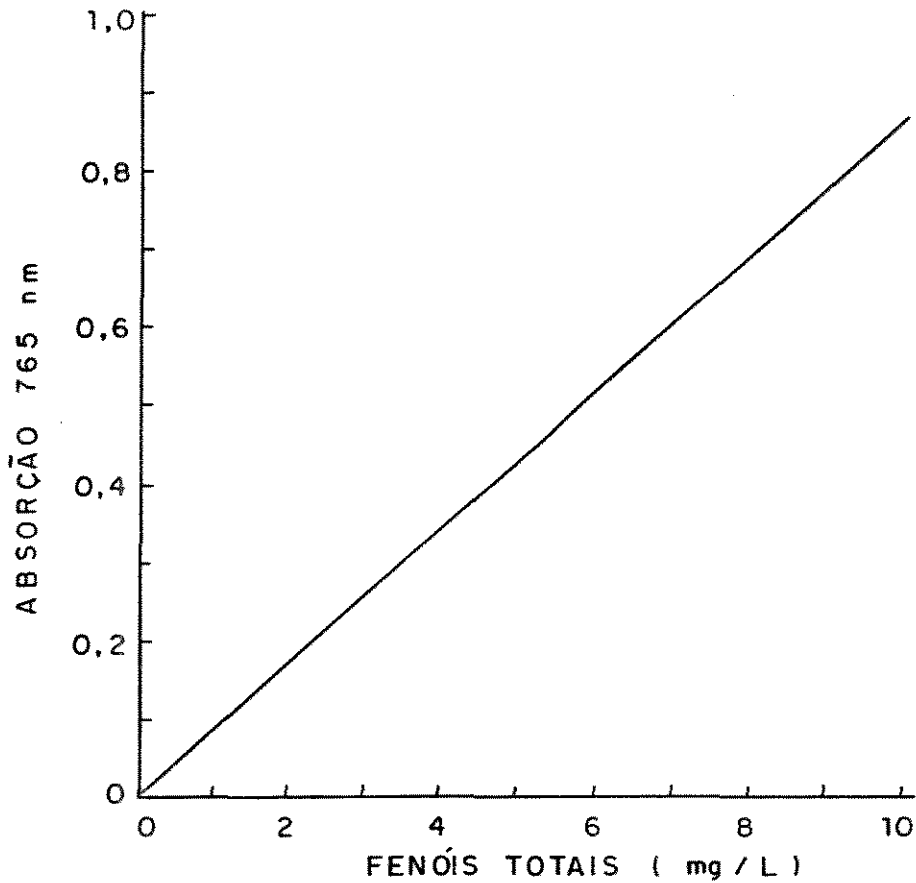
Extrato de malte	12,5 g
Agar	20,0 g
Efluente E1 (100 %)	1000 mL

4. Meio de Indução (líquido)

Extrato de malte	12,5 g
Efluente E1 (20 %)	1000 mL

APENDICE II.

Curva de Calibração para Determinação de Fenóis Totais



$$\text{Slope} = \frac{0,4}{4,5} = 0,089$$

$$\frac{A}{\text{slope}} = M_2 \text{ (mg/L)}$$

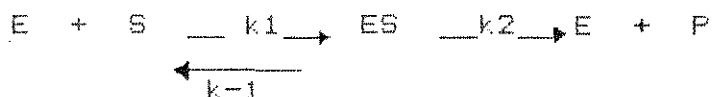
$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$0,5 \cdot M_1 = 5,1 \cdot M_2$$

$$\text{Fenóis Totais} = M_1$$

APENDICE III.

Cálculos de Balanço energético.



$$V_o = k_2 [ES]$$

$$V_{\text{máx.}} = k_2 [E]_t = k_2 ([E] - [ES])$$

Formação de ES:

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 [E] \cdot [S]$$

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 [E]_t - (ES) \cdot [S]$$

Desaparecimento de ES

$$-\frac{d(ES)}{dt} = k_2 [ES] + k-1 [ES]$$

Estacionário:

$$\frac{d(ES)}{dt} = \frac{d(ES)}{dt}$$

$$\text{Logo, } k_1 ([E]_t - [ES]) \cdot [S] = k_2 [ES] + k-1 [ES] = [ES] \cdot (k_2 + k-1)$$

$$\frac{(E_t - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k-1}{k_1} = K_m$$

$$E_t [S] - [ES] \cdot [S] = K_m [ES]$$

$$E_t [S] = K_m [ES] + [ES] \cdot [S] = [ES] \cdot (K_m + [S])$$

$$[ES] = \frac{E_t \cdot [S]}{K_m + S}$$

$$V_o = k_2 [ES]$$

$$\frac{V_o}{k_2} = \frac{E_t [S]}{K_m + S}$$

$$\frac{V_o}{k_2 \cdot E_t} = \frac{[S]}{K_m + S}$$

$$\frac{V_o}{V_{m\acute{a}x.}} = \frac{[S]}{K_m + S} \quad \text{====} \quad \frac{V_o}{V_{m\acute{a}x.}} = \frac{[S]}{K_m + S}$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

$$k_{-1} \gg k_2$$

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \sim K_s$$

$V_o = V_{m\acute{a}x.} \frac{[S]}{K_m + S}$
--

Equação de Michaelis - Menten:

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x.} [S]}{K_m + [S]}$$

A partir da equação anterior, tendo Monod estudado o crescimento bacteriano em cultivo contínuo, onde a velocidade de crescimento é limitada por um único substrato, observa-se que seus dados experimentais seguiam o tipo de curva michaeliana.

A equação típica de Michaelis-Menten, descrita acima, é reescrita como:

$$u_x = u_{m\acute{a}x.} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Onde $u_{m\acute{a}x.}$ é a velocidade máxima específica de crescimento e K_s , a constante de saturação que é igual a concentração de substrato correspondente a velocidade específica de crescimento, igual a metade da velocidade específica máxima.

A dupla recíproca da equação é:

$$\frac{1}{u_x} = \frac{K_s}{u_{\max.}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{u_{\max.}}$$

Esta equação conduz a seguinte expressão para o crescimento de microrganismos:

$$\frac{dx}{dt} = u_{\max.} \frac{[S]}{K_s + [S]} X \quad \text{ou} \quad \frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{x/s}} u_x \cdot X$$

O balanço de material do microrganismo é:

$$(dX)_c V = Q X dt + dX V$$

Onde: $(dX)_c$ é o aumento da concentração de microrganismos ocorrido no intervalo de tempo dt ;

e dX é a variação da concentração no mesmo intervalo, pelo fato de não ter-se atingido o regime estacionário.

A equação anterior pode ser escrita como:

$$\frac{dX}{dt} = - \frac{Q}{V} X + \frac{(dX)}{(dt)_c}$$

$\frac{Q}{V}$ (vazão específica) = D

$$\frac{dX}{dt} = - D X + \frac{(dX)}{(dt)_c}$$

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = -D + \frac{1}{X} \cdot \frac{(dX)}{(dt)c}$$

Por definição, a velocidade específica de crescimento:

$$u_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{(dX)}{(dt)c}$$

Onde X é a concentração no instante t.

Logo, $\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = u_x - D$

No regime estacionário: $\frac{dX}{dt} = 0$ $u_x = D$
 $u_x = \frac{Q}{V}$

Logo, quando se trabalha com um só tanque, sem microrganismo no líquido de alimentação, a velocidade específica de crescimento no regime estacionário é igual a vazão de alimentação específica.

Balanco de material do Substrato:

$$Q S_0 dt - (-dS)c V = Q S dt + dS V$$

Sendo $(-dS)c$ a massa do substrato consumida no intervalo de tempo dt;

dS a variação da massa observada nesse intervalo de tempo, pelo fato de não ser atingido o regime estacionário. Portanto:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{Q}{V} (S_0 - S) + \frac{(dS)}{(dt)c}$$

De acordo a:

$$Y_{x/s} = - \frac{dX}{dS}$$

S_0 = concentração do substrato limitante no tanque de cultivo.

S = concentração de substrato limitante no tanque de alimentação.

A relação entre a massa do microrganismo produzida e a massa do substrato consumida para tal produção (fator de conversão substrato-microrganismo).

$$e \quad u_x = \frac{1}{X} \frac{(dX)}{(dt)_c}$$

$$\frac{(dX)}{(dt)_c} = u_x X$$

$$\text{Portanto:} \quad \frac{(dS)}{(dt)_c} = - \frac{1}{Y_{x/s}} u_x X$$

X = a concentração celular no tanque de cultivo.

Logo, na equação de dS

$$\text{Temos:} \quad \frac{dS}{dt} = D (S_0 - S) - \frac{1}{Y_{x/s}} u_x X$$

$$S = S_0 - \frac{X}{Y_{x/s}}$$

$$\text{No estado estacionário:} \quad \frac{dS}{dt} = 0$$

$$u_x = D$$

Reator de Leito Recheado:

O balanço de substrato ao redor do reator em estado estacionário:

$$Q S_0 dt - (-dS)_c V = Q S dt + dS V / dt$$

$$Q S_0 - (-dS)_c V = Q S + \frac{dS}{dt} V$$

$$Q S_0 - Q S = \frac{V dS}{dt} - \frac{(dS)_c V}{(dt)_c}$$

Em estado estacionário: $\frac{(dS)}{(dt)} = 0$

$$Q S_0 - Q S = \frac{-V (dS)}{(dt)_c}$$

Logo,

$$V \frac{(dS)}{(dt)_{s=se}} = Q S_e - Q S_0$$

Se o modelo de Monod é considerado:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{x/s}} \mu_x X$$

q_s = é velocidade específica de consumo de substrato.

$$q_s = - \frac{1}{Y_{x/s}} \mu_x X$$

$$q_s = - \frac{1}{X} \frac{dS}{dt}$$

Logo, $\frac{(dS)}{(dt)_{s=se}} = - q_s X$

Onde, segundo o modelo de Monod:

$$q_s = q_{s\text{máx.}} \frac{[S_e]}{K_s + [S_e]}$$

$$\frac{(dS)}{(dt)_{s=se}} = - q_{s\text{máx.}} \frac{[S_e] X}{K_s + [S_e]}$$

$$\frac{(dS)}{(dt)_{s=se}} = - \frac{K X [S_e]}{K_s + [S_e]}$$

Substituindo em :

$$V \frac{(dS)}{(dt)_{s=se}} = Q (S_e - S_0)$$

$$V \frac{(-KX [Se])}{(KS + [Se])} = Q (S_e - S_0) \quad . (1)$$

$$V \frac{(KX [Se])}{(KS + [Se])} = Q (S_0 - S_e) \quad . (1)$$

$$\frac{V}{Q} = \tau = \text{tempo de residência}$$

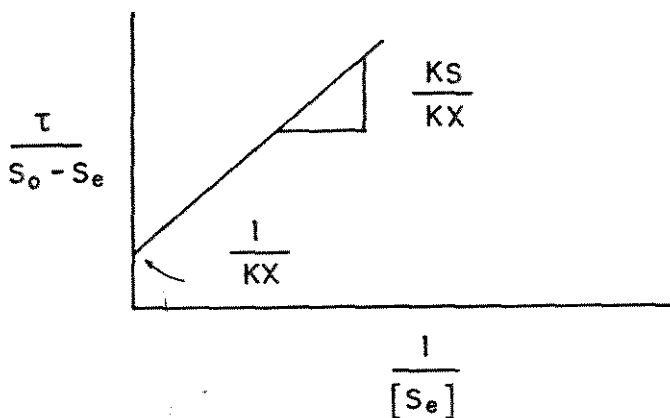
então,

$$\frac{V}{Q} \frac{(KX [Se])}{(KS + [Se])} = S_0 - S_e$$

Logo, a equação

$$\frac{\tau}{(S_0 - S_e)} = \frac{KS + [Se]}{KX [Se]} = \frac{KS}{KX [Se]} + \frac{1}{KX}$$

$$\frac{\tau}{(S_0 - S_e)} = \frac{KS + [Se]}{KX [Se]} = \frac{KS}{KX [Se]} + \frac{1}{KX}$$



Logo, um gráfico de $\tau / (S_0 - S_e)$ VS $1/S_e$, teria como intercepto $1/KX$ e a tangente seria KS/KX .

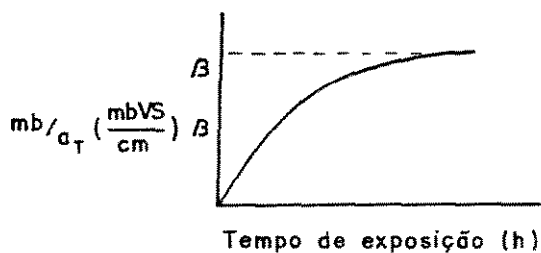
Para um reator de leito recheado Costa-Reis e Sant'Anna (1985) encontraram um valor de $303 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ de KX e de 410 mg L^{-1} .

Para o cálculo de X e K deve-se considerar que a massa fixada de microrganismos é proporcional a área superficial do material de empacotamento, ou seja $mb = \beta a_t$

Onde: mb é a massa fixada da biomassa;

a_t a área total da superfície de empacotamento.

Graficando



Para este reator o volume de beta foi de $3,3 \text{ mg.cm}^{-2}$.

A equação anterior pode ser reescrita como:

$$X = \beta a^*$$

Onde $X = \frac{mb}{V}$ é a concentração da biomassa fixada.

$a^* = \frac{a_t}{V}$ é a área específica do material de empacotamento.

Para a^* foi considerado um valor de $1,74 \text{ cm}^{-1}$

Logo, $X = 3,3 \text{ mg.cm}^{-2} \cdot 1,74 \text{ cm}^{-1}$

$$X = 5740 \text{ mg L}^{-1}$$

Para escalamento de processo, a equação poderia ser escrita como:

$$V = \frac{Q (S_0 - S_e) (K_s + S_e)}{K \beta a^* S_e}$$