

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA-PPGQB**

**Microrganismos Promissores para a Degradação de
Compostos Fenólicos Presentes em Bagaço-de-Cana,
Lodo e Águas Residuárias de Agroindústria
Sucro-Alcooleira**

EUNICE SOARES DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências – área de concentração: Biotecnologia.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ana Maria Q. López

**MACEIÓ, ESTADO DE ALAGOAS
FEVEREIRO DE 2007**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

S237m Santos, Eunice Soares dos.
Microorganismos promissores para a degradação de compostos
fenólicos presentes em bagaço-de-cana, lodo e águas residuárias de agroindústria
sucro-alcooleira / Eunice Soares dos Santos. – Maceió, 2007.
vii, 112 f. : il., graf.

Orientador: Profª Drª Ana Maria Queijeiro López.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2007.

Bibliografia: f. 96 - 112.

1. Microorganismos. 2. Águas residuais. 3. Bagaço-da-cana. I. Título.

CDU: 579.22

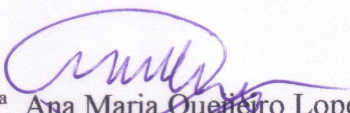


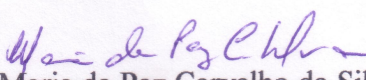
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

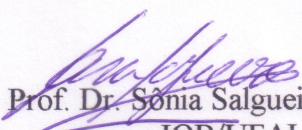
Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Eunice dos Santos Soares, intitulada: **“MICRORGANISMOS PROMISSORES PARA A DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM BAGAÇO-DE-CANA, LODO E ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE AGROINDÚSTRIA SUCRO-ALCOOLEIRA”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 16 de fevereiro de 2007, às 14:30 horas na sala de Multimeios do bloco 14.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.ª Dr.ª Ana Maria Quejido Lopez
Orientadora – IQB/UFAL


Prof.ª Dr.ª Maria da Paz Carvalho da Silva
Depto. de Bioquímica e LIKA/UFPE


Prof. Dr.ª Sônia Salgueiro Machado
IQB/UFAL

*Dedico este trabalho
aos meus pais, Valdecir e Eulália, pelo exemplo de uma
vida de trabalho honesto e pelo incentivo irrestrito du-
rante estes anos todos de apoio à minha formação.*

Agradecimentos

A DEUS, que na sua infinita misericórdia, colocou diante de mim pessoas que permitiram-me buscar o meu propósito profissionalmente, mostrando-me que orgulho sem objetivo é vazio, e que mesmo que nem sempre tenha aprendido com a velocidade e a serenidade esperadas, ainda posso ser sensível aos SEUS ensinamentos;

Por isso, agradeço imensamente à Prof^a Ana Maria Queijeiro López, pela paciência, sacerdotismo, orientação, incentivo, amizade... e por tudo que tentou me ensinar durante os 4,5 anos de convívio - de Ciência e, especialmente, de coragem, dignidade, ética e cidadania;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, por ter me acolhido como aluna e me oferecido a oportunidade de aprimorar minha formação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, e à Usina Coruripe Açúcar e Álcool, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento de meu projeto;

À Sra. Ângela Queijeiro Ramos López, por interceder por mim profissionalmente, mais do que qualquer outro faria nesses poucos anos e momentos de convivência;

Aos amigos de Iniciação Científica (2004-2006) Darliton Bento Faustino e Glycia Guimarães Souza, por terem superado dificuldades com maturidade e me ensinado que isso independe da idade, compartilhando comigo metodologias de seus trabalhos e discussões que me ajudaram imensamente durante a realização desta dissertação;

A todos os companheiros destes 4,5 anos no Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental (LBPVMA), incluindo a ex-técnica de laboratório, sra. Rejane Montenegro, pela amizade, paciência, exemplos, cooperação, sugestões e momentos que passamos juntos;

Em especial, à colega Danielle dos Santos Tavares Pereira (Lika-UFPE), por me permitir aprender uma última lição durante o Mestrado, ao se oferecer para escrever minha dissertação com minha orientadora quando tentei desistir;

Aos meus queridos pais e familiares, pelo irrestrito amor e esforços durante todos esses anos de vida.

O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria e armazena a suavidade para o amanhã.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	Xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS	xiV
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	04
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1. A Versatilidade Microbiana	05
3.2. Resíduos Agroindustriais	08
3.3. Biodegradação de Polissacarídeos e Compostos Fenólicos	11
3.4. Classificação dos Compostos Tânicos	16
3.4.1. Taninos Hidrolisáveis	17
3.4.2. Taninos Condensados	18
3.5. Utilização e Efeitos dos Taninos	20
3.6. Degradação Enzimática de Substâncias Fenólicas	22
3.6.1. Lacase (EC. 1. 10. 3. 2)	22
3.6.2. Lignina Peroxidase (EC 1. 11. 1. 14)	24
3.6.3. Manganês Peroxidase (MnP)	25
3.6.4. Tanase (EC. 3. 1. 1. 20)	26
3.7. Determinação do teor de taninos	32
4. METODOLOGIA	34
4.1. Coletas das amostras	34
4.2. Isolamento dos Microrganismos	35
4.3. Meio para Isolamento, Manutenção e Crescimento	35
4.3.1. Ágar Nutriente (AN)/Caldo Nutriente (CN)	35
4.3.2. Ágar Caldo de Cana (ACC)	36
4.3.3. Ágar Sabouraud (A.S)	36
4.3.4. Ágar Dextrose Batata (BDA)	36
4.4. Caracterização Morfo - Bioquímica e Fisiológica dos Microrganismos	37
4.4.1. Soluções Diferenciais para Caracterização dos Microrganismos	37

4.4.2. Análise das Características Morfológicas	39
4.4.3. Características Bioquímicas dos Isolados	41
4.5. Cinética de Crescimento em Caldo Nutriente	53
4.6. Cinética de Degradação de Ácido Tânico	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Isolamento e Identificação dos microrganismos	55
5.2. Detecção de enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos	81
5.3. Crescimento de <i>Proteus</i> sp e <i>Achromobacter</i> sp em AN e meio sólido contendo ácido tânico (ATS)	85
5.4. Cinética de Crescimento de <i>Proteus</i> sp e <i>Achromobacter</i> sp em CN e meio ácido tânico (ATL)	86
6. CONCLUSÕES	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Esquema das funções das enzimas extracelulares no metabolismo celular. (Fonte: GIANFREDA & RAO, 2004).	06
Figura 2. Unidades monoméricas de β -(1,4)-D-glicopiranosose do polímero de celulose.	12
Figura 3. Unidades monoméricas de β -(1,4)-D-xilanopiranosose componente da hemicelulose, destacando a especificidade da enzima xilanase. (Fonte: http://www.sigmaaldrich.com . Acessado janeiro de 2007).	12
Figura 4. Estrutura geral da lignina. (Fonte: http://academic.scranton.edu/ . Acessado em janeiro de 2007).	14
Figura 5. Estrutura do ácido tânico (Fonte: LEKHA & LONSANE, 1994).	17
Figura 6. Estrutura de taninos hidrolisáveis: (A) ácido gálico; (B) ácido elágico; (C) ácido hexaidroxidifenílico; (D) galotanino; e (E) elagitanino (Fonte: BHAT <i>et al.</i> , 1998).	18
Figura 7. Estrutura de taninos condensados: (A) um flavonóide genérico; (B) flavan-3-ol; (C) procianidina (constituída por três unidades de flavan-3-ol) (Fonte: BHAT <i>et al.</i> , 1998).	19
Figura 8. Modelo estrutural das enzimas: a) Lacase; b) Lignina-Peroxidase (LiP); c) Manganês-Peroxidase (MnP). (Fonte: http://lignin.cib.csic.es/pelas/pelas.html . Acessado em janeiro de 2007).	22
Figura 9. Hidrólise do ácido tânico pela enzima tanino acil hidrolase (E.C. 3.1.1.20) gerando 9 moléculas de ácido gálico e uma de glucose: Radicais substituintes; R ₁ = ácido gálico e R ₂ = ácido digálico. (Fonte: AGUILAR <i>et al.</i> , 1999).	27
Figura 10. Vias metabólicas de degradação de ácido gálico por bactérias presentes na flora natural de animais ruminantes. (Fonte: BHAT <i>et al.</i> , 1998).	31
Figura 11. Esquema das lagoas de tratamento do efluente gerado na matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool.	34
Figura 12. Esquema da técnica de coloração de Gram utilizada para análise microscópica dos isolados.	39
Figura 13. Meios de cultura utilizados na identificação das bactérias isoladas.	44

A - SIM (Sulfato/Indo/Motilidade); **B** – Ágar-uréia; **C** - Ágar Citrato-Simmons; **D** –TSI (Triplo açúcar ferro); **E** – Detalhe dos meios após incubação (motilidade +; urease +; citrato +; lactose, sacarose e glicose +).

Figura 14. Caixa de incubação do sistema API 20E para identificação de microrganismos G- , com 5 mL de água destilada esterilizada. 49

Figura 15. Inoculação da suspensão de microrganismos nas galerias do sistema API 20E para sua identificação. 50

Figura 16. Adição de óleo de parafina em algumas das galerias inoculadas do sistema API 20E, para geração de anaerobiose. 51

Figura 17. a) Sistema API 20E inoculado e incubado por 24 h a 37°C. **b)** Reveladores do kit API, para utilização nas culturas em galerias do sistema API 20E. 52

Figura 18. Cultura das bactérias A1-A8, isoladas de efluente da lagoa "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05) em meio Columbia ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro, 48 h). 58

Figura 19. Aspecto cultural de alguns microrganismos isolados de bagaço de cana (BC) e de efluente (A) de lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, 5 dias após a inoculação em diferentes meios de culturas. **a)** fungo filamentos BC10 em Meio Sabouraud; **b)** bactéria A8 em Meio EMB; **c)** bactéria BC1 em Meio AN; **d)** fungo filamentos BC8 em Meio BDA; **e)** fungo leveduriforme BC9 em Meio Sabouraud; **f)** bactéria BC1 em Meio Columbia. 58

Figura 20. Aspecto das células bacterianas A1-A8, isoladas de efluente da lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (A4 e A7) ou pelo método de Gram (A1-A8). Fotos de microscopia foram registradas com aumento de 640 X, exceto para o isolado A5, cujo aumento foi de 1600 X. 59

Figura 21. Aspecto das células bacterianas B1, B2, B3, B6 e B11, isoladas de bagaço de cana acumulado na safra 2005/06 da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, após coloração pelo método de Gram. Fotos de microscopia foram registradas com aumento de 640 X, exceto para o isolado B11, cujo aumento foi de 1600 X. Setas ilustram endósporos refratários. 60

Figura 22. Degradação de glicose em meio OF, em ambiente anaeróbio 64

[com cobertura de vaselina, para G+ (a) e G- (b)] e aeróbio [sem cobertura de vaselina, para G- (c)], por bactérias isoladas de bagaço de cana e águas lançadas na lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). a) positivo "A5" (esquerda); b) positivo para "BC6" (esquerda); c) positivo para "A1" e para "A8".

Figura 23. Aspecto cultural dos microrganismos A1-A8 isolados de águas da lagoa "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06) em meio em EMB ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro, 48 h). 64

Figura 24. Testes positivos de atividades enzimáticas (culturas na parte superior para os isolados obtidos de bagaço de cana e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). a) proteolítica positiva (BC3); b) celulolítica (BC1); c) amilolítica (A2); d) pectinolítica (Pectato-liase) (BC2). Controles situados na parte inferior da figura. 65

Figura 25. Testes positivos de atividades enzimáticas (culturas na parte inferior) para os isolados de bagaço de cana e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). a) lipolítica (BC8); b) Fenoloxidase (A1); c) Poligalacturonolítica (BC10); d) Lignina Peroxidase (BC10). Controles situados na parte superior da figura. 65

Figura 26. Testes de atividades enzimáticas para bactérias isoladas de bagaço de cana e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). a) ureolítica positiva para A1 (esquerda); b) degradadora de 3 glicídeos e peptona para A4 (esquerda); c) degradadora de acetato para BC2 (esquerda); d) produtora de ácidos estáveis (VM) para A7 (esquerda) e negativa para A3 (esquerda). 66

Figura 27. Aspecto do crescimento das bactérias L1-L8 isoladas de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05) em meio Ágar-TSI (72 h). 66

Figura 28. Aspectos bioquímicos do crescimento da bactéria L3 (*Proteus* sp), isolada de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Crescimento em Ágar-TSI (72h); **b)** Degradação de glicose em meio OF aeróbio (sem cobertura de vaselina) e anaeróbio (com cobertura de vaselina)- 48h; **c)** Prova positiva de urease; **d)** Prova positiva de citrato-oxidase. 67

- Figura 29.** Aspectos bioquímicos do crescimento da bactéria L1, isolada de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Crescimento em Ágar-TSI após 96 h (lactose, glicose e sacarose + e peptona +); **b)** Prova da citrato-oxidase positiva. 67
- Figura 30.** Aspectos bioquímicos dos isolados obtidos do bagaço de cana e das águas lançadas na lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), respectivamente nos meios SIM, Caldo-Vermelho de Fenol/Manitol, Gelatina e Agar-Vermelho de Fenol/Manitol. a) motilidade negativa para A1 (centro) e positiva para BC2 (esquerda); b) produção de sulfito positiva para A1 (esquerda) e de indol para BC1 (direita); c) manitol positivo para BC5 e A5; d) gelatinase negativa para A5 (centro) e positiva para BC2 (superior); e) Nitrato redutase - positivo para BC3, negativo para BC6 (após adição de pó de zinco). 68
- Figura 31.** Atividade carboximetil-celulolítica positiva para as bactérias A4, A7 e A8, respectivamente, isoladas das águas lançadas na lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). 68
- Figura 32.** Aspecto dos resultados dos testes bioquímicos no sistema rápido API 20E (Biomerieux), inoculado com os microrganismos BC1 e A1, A2, A3, A4, A7 e A8, respectivamente do bagaço de cana (BC) e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), 24 h após incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro. 69
- Figura 33.** Distribuição em % de bactérias isoladas de bagaço de cana, lodo e águas residuárias da lagoa de decantação "A", da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safras 2004/05 e 2005/06), por faixa de atividades enzimáticas extracelulares detectadas. 81
- Figura 34.** Crescimento de *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio sólido com ácido tânico (0,8 %), acrescido de 0,1 % de glicose, 0,1 % de peptona e 0,1 % de NaCl. 85
- Figura 35.** Crescimento de *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em caldo nutriente (anaerobiose, $30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro). 87
- Figura 36.** Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Proteus* sp, isolado 87

de lodo da lagoa de decantação “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), inoculado em CN e, posteriormente, em ágar nutriente ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro).

Figura 37. Crescimento de *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio líquido com ácido tânico (0,8 %) contendo também 0,1 % de glicose; 0,1 % de peptona e 0,1 % de NaCl. Culturas incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro. a) sem aeração; b) com aeração. 88

Figura 38. Cinética de liberação de ácido gálico a partir da degradação de ácido tânico (0,8 %) por *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa de decantação A da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio líquido contendo também 0,1 % de glicose; 0,1 % de peptona e 0,1 % de NaCl. As culturas foram incubadas ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro) e a concentração de ácido gálico foi avaliada após reação com vanilina-HCl concentrado. a) sem aeração; b) com aeração. 89

Figura 39. Crescimento ($\text{Log } n^\circ$ de células/mL) em caldo nutriente, de *Achromobacter* sp, solado de lodo da lagoa de decantação “A” da ETE da S.A.Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), incubado a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, sem aeração. 91

Figura 40. Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Achromobacter* sp isolado de lodo da lagoa de decantação “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), inoculado previamente em CN e, posteriormente, em ágar nutriente ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro). 91

Figura 41. Crescimento de *Achromobacter* sp isolado de lodo da lagoa de decantação “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio líquido contendo 0,8%, de ácido tânico; 0,1% de glucose e 0,1% de peptona, 0,1% de NaCl a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro. a) anaerobiose; b) aerobiose 92

Figura 42. Cinética da liberação de ácido gálico a partir da degradação do ácido tânico (0,8 %) por *Achromobacter* sp, isolado de lodo da lagoa de decantação “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio contendo 0,1 % de glucose; 0,1 % de peptona e 0,1 % de NaCl ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro), observada após reação com vanilina - HCl . a) 93

sem aeração; b) com aeração

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
Tabela 1. Uso aproximado de água na fabricação de álcool. (Fonte: ZÁRAT F°, 1999).	10
Tabela 2. Aspectos morfo-culturais das unidades formadoras de colônias dos microrganismos isolados de amostras de lodo da lagoa de decantação "A" da estação de tratamento de efluentes (ETE) da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio ágar-nutriente após 48h de incubação.	56
Tabela 3. Aspectos morfo-culturais das unidades formadoras de colônias dos microrganismos isolados de amostras do efluente proveniente da lagoa "A", da ETE da S. A Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005), em meio ágar nutriente após 48 h de incubação.	57
Tabela 4. Aspectos morfo-culturais das colônias e células das bactérias isoladas de amostras do bagaço de cana-de-açúcar (safra 2005/06), da S. A Usina Coruripe Açúcar e Álcool, em meio ágar nutriente após 48 h de incubação.	60
Tabela 5. Aspectos bioquímicos dos microrganismos isolados de lodo da lagoa de decantação "A" da estação de tratamento de efluentes (ETE) da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, na safra 2004/05, em diferentes soluções e meios seletivos inoculados e interpretados conforme critérios validados.	61
Tabela 6. Aspectos bioquímicos dos microrganismos isolados de amostras do efluente proveniente da lagoa "A" da ETE da S. A Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), em diferentes soluções e meios seletivos inoculados e interpretados conforme critérios validados.	62
Tabela 7. Aspectos bioquímicos dos microrganismos isolados de amostras do bagaço de cana-de-açúcar da S. A Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), em diferentes soluções e meios seletivos inoculados e interpretados conforme critérios validados.	63
Tabela 8. Resultados dos testes bioquímicos do sistema API 20E (Biomerieux), quando inoculou-se os microrganismos BC1 e A1, A2, A3, A4, A7 e A8, respectivamente do bagaço de cana e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), e incubou-se por 24 h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro.	70

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

ABTS	Radical cátion do ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico)
APHB.....	Ácido poli-4-hidroxibutírico
AN	Ágar Nutriente
ATL	Ácido tânico líquido
ATS	Ácido tânico sólido
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CN	Caldo Nutriente
CuSO ₄	Sulfato cúprico
Da	Dalton
DBF	Dibenzofurano
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de tratamento de efluentes
EMB	Eosina azul de metileno
Fe ₂ SO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato ferroso
FN.....	Fluoreno
ha.....	hectare
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
HHDP.....	Hexaidroxidifenol
HPA	Hidrocarboneto Poliaromático
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IQB.....	Instituto de Química e Biotecnologia
KDa	Quilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KIO ₃	Iodato de potássio
LBPVMA-	Laboratório de Bioquímica do Paratismo Vegetal e Microbiologia Ambiental
Li-P	Lignina peroxidase
ME	Matrix extracelular
Mn-P	Manganês peroxidase
MnSO ₄	Sulfato de manganês

MoO ₃	Óxido de molibdênio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Monoácido de sódio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
OF	Oxidação-Fermentação da glicose
O ₂	Oxigênio molecular
PCB.....	bifenil policlorado
P (3HB-co-3HV)	Poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato
P (3HA)	Poli-3-hidroxi-butirato
SDS	Duodecil sulfato de sódio
TAH.....	Tanino-acil-hidrolase
Ton	tonelada
TSI.....	Meio Tríplice Glicídeos-Ferro
UFAL	Universidade Federal de Alagoas

RESUMO

Foram isoladas 8 linhagens bacterianas (L1-L8) de lodo da lagoa de decantação A da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, na safra de 2004/05, sendo 3 deles anaeróbios facultativos com metabolismo fermentativo (L3, L7 e L8). Os isolados foram identificados como espécies de *Achromobacter* (L1 e L5), *Acinetobacter* (L2 e L6), *Proteus* (L3), *Flavobacterium* (L4), e *Serratia* (L7 e L8), apresentando diversas atividades enzimáticas de interesse ambiental. Quanto às amostras do efluente da mesma lagoa de decantação da ETE estudada, e do bagaço de cana-de-açúcar acumulado na empresa, foram isolados 19 microrganismos (8 do efluente e 11 do bagaço), sendo que 14 são bactérias G+ e G- (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, BC1, BC2, BC3, BC6, BC7 e BC11) e 5 são fungos, isto é, 3 leveduriformes (BC4, BC5 e BC9) e 2 filamentosos (BC8 e BC10). Todos os microrganismos obtidos são mesofílicos. As bactérias dos efluentes da ETE estudada foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Klebsiella* (A1), *Corynebacterium* (A2 e A7), *Arthrobacter* (A3), *Streptomyces* (A4); *Staphylococcus* (A5), *Acinetobacter* (A6); *Serratia* (A8). Os isolados de bagaço-de-cana pertencem ao gêneros: *Bacillus* sp (BC1), *Clostridium*. Sp (BC2), *Acinetobacter* (BC3 e BC6); *Corynebacterium* (BC7) e *Lactobacillus* (BC11). Por terem apresentado um alto potencial em degradar polissacarídeos, lipídeos, proteínas e compostos fenólicos (tanino), os isolados de lodo L1 (*Achromobacter* sp) e L3 (*Proteus* sp) foram selecionados para testes de cinética de crescimento/degradação de ácido tânico. Embora concentrações de 0,8 % de ácido tânico ainda favoreçam o crescimento de *Proteus* sp, a concentração de 1 % desse substrato em meio sólido inibiu seu crescimento, sugerindo que o microrganismo não tolera altas concentrações desse composto. Apesar de não ter sido observado o crescimento do isolado de lodo *Achromobacter* sp. em meio sólido contendo 0,8-1,0% de ácido tânico, o mesmo foi capaz de degradar fenóis pelo seu desenvolvimento em meio contendo ácido gálico, ou por ter hidrolisado as ligações éster da molécula de ácido tânico em meio líquido, liberando ácido gálico. As espécies de *Proteus* sp e *Achromobacter* sp, isoladas de lodo da lagoa de decantação da ETE da indústria sucroalcooleira estudada (safra 2004/05), são promissoras para estudos de cometabolismo de microrganismos e bioaugmentação de águas residuárias contendo compostos fenólicos e outras substâncias.

ABSTRACT

Eight strains of bacteria (L1-L8) were isolated from the mud of a decantation lake (A) from the Station of Effluent Treatment (SET) of the "S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool", in the harvest season of 2004/05. Three of these bacteria were considered facultative anaerobes (L3, L7 and L8). The isolates were identified as species of the genus *Achromobacter* (L1 and L5), *Acinetobacter* (L2 and L6), *Proteus* (L3), *Flavobacterium* (L4), and *Serratia* (L7 and L8), with different enzymatic activities that are of environmental interest. On the other hand, 19 microorganisms were isolated from the wastewater samples of the same lake and of the sugarcane bagasse stored in that company, it means, 8 from the effluent and 11 from the bagasse, being 14 bacteria G+ and G- (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, BC1, BC2, BC3, BC6, BC7 and BC11), and 5 were fungi - 3 yeast (BC4, BC5 and BC9) and 2 moulds (BC8 and BC10). All the isolates were mesophylic. The bacteria from the studied effluent were identified as *Klebsiella* sp (A1), *Corynebacterium* sp (A2 and A7), *Arthrobacter* sp (A3), *Streptomyces* sp (A4); *Staphylococcus* sp (A5), *Acinetobacter* sp (A6); *Serratia* sp (A8). The isolates from the sugarcane bagasse were species from the genus *Bacillus* (BC1), *Clostridium*. (BC2), *Acinetobacter* (BC3 and BC6); *Corynebacterium* (BC7) and *Lactobacillus* (BC11). Because of their high potential in degrading polysaccharides, lipids, proteins, and phenolic compounds such as tannin, the mud bacteria L1 (*Achromobacter* sp) and L3 (*Proteus* sp) were screened according to their kinetic of growth and degradation of tannic acid. Although the concentration of tannic acid at 0,8 % still allows the growth of *Proteus* sp, the concentration of the same substrate at 1% in solid medium inhibited its growth, suggesting that the microorganism do not tolerate high concentrations of this compound. Furthermore, even if *Achromobacter* sp from the mud had not grown in solid medium containing 0.8-1.0% of tannic acid, it was able to developed very well in medium with gallic acid, and also hydrolysed ester linkages of the tannic acid molecule in liquid medium, releasing gallic acid. The species of *Proteus* and *Achromobacter* sp, isolated from the mud from the decantation lake of the studied sugar-alcohol industry (harvest season 2004/05) appear promising for studies of co-metabolism and bioaugmentation for treatment of this type of wastewater containing phenolic compounds and other substances.

1. INTRODUÇÃO

As questões ambientais têm provocado cada vez mais interesse e preocupação a todos que se envolvem com a atividade industrial e agrícola, uma vez que os resíduos gerados nas mesmas são potenciais geradores de danos à vida do planeta tal qual se concebe atualmente (MALHEIROS, 1996). O desafio para a agricultura, portanto, é a produção estável em bases sustentáveis, o que exige tecnologias e práticas de gestão que assegurem um ambiente sadio, eficiência econômica e repartição justa dos benefícios.

Os impactos ambientais ocorrem quando a taxa de geração dos resíduos é maior do que sua taxa de degradação, sendo cada vez mais premente a necessidade de reduzir, reciclar ou reaproveitar esses subprodutos, com o objetivo de recuperar matéria e energia, preservando os recursos naturais (STRAUS & MENEZES, 1993; *apud* MALHEIROS 1996).

A cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) cultivada é a cultura agrícola milenar mais importante da história da humanidade, visto ter provocado o maior fenômeno de dispersão do homem e de interferência na economia e na ecologia (BERGAMASCO, 2003).

A área colhida de cana-de-açúcar no Brasil cresceu de $4,56 \times 10^6$ ha em 1995 para $5,34 \times 10^6$ ha em 2003, o que correspondeu a 17,2% de incremento em 8 anos (NEVES *et al.*, 2004).

A Zona da Mata do Nordeste é ocupada pela atividade canavieira e seu processamento industrial desde o início da colonização do país, sendo que ao longo de sua história, este setor tem sido marcado por períodos de prosperidade entremeados por fases de dificuldades freqüentemente longas. Em termos mais gerais, a produtividade agrícola em Alagoas é um tanto superior à dos demais estados nordesti-

nos, ou seja, cerca de 60 ton/ha enquanto, em Pernambuco esta média tem girado em torno de 50 ton/há (LIMA & SICSÚ, 2001).

De acordo com MONTEIRO *et al.* (1998), a indústria da cana-de-açúcar produz uma grande quantidade de resíduos líquidos e sólidos que, se não tratados adequadamente, têm um efeito danoso sobre o ambiente. Há também a poluição atmosférica devido à fumaça, fuligem e cinzas geradas pela queima durante a colheita tradicional. Esta prática causa um processo contínuo de acidificação e impermeabilização do solo.

De acordo com MEUNCHANG *et al.* (2005) a produção de açúcar libera torta de filtro e bagaço como subprodutos, na taxa de 3,4% e 25-30% de cana fresca, respectivamente. O bagaço é o material fibroso resultante da extração do caldo. A torta de filtro consiste na parte superior e nas folhas que são queimadas no campo, durante a colheita tradicional da cana-de-açúcar. Com a crescente consciência da responsabilidade ambiental, esta técnica tem sido substituída pela colheita verde, que consiste na separação mecânica da parte superior e das folhas e, portanto, tem aumentado os resíduos de biomassa da cana-de-açúcar (ERLICH *et al.*, 2005).

O calor necessário para a concentração do caldo no processamento industrial da cana é, geralmente, produzido na combustão de seus resíduos sólidos (ERLICH *et al.*, 2005). Em decorrência da produção do álcool etílico e do açúcar cristal, avalia-se que haja um excedente da quantidade de bagaço processado e utilizado para alimentar caldeiras, correspondente a 8% nas destilarias anexas e 12% nas autônomas (CAMARGO, 1990; *apud* AGUIAR & MENEZES, 2002).

Além disso, nos plantios de cana, especialmente do Nordeste do Brasil, a irrigação é uma atividade que consome muita água, e não é de hoje que o setor sucro-alcooleiro brasileiro busca tecnologias para reduzir sua captação e melhorar a qualidade dos efluentes gerados no processamento da cana, visando a reutilização e/ou descarte dos mesmos em corpos de água. O mesmo pode ser dito a respeito da qualidade dos solos agriculturáveis, que pode ser imensamente recuperada através de técnicas de adubação, e do destino final de resíduos orgânicos agrícolas. O aproveitamento agrícola dos resíduos da agroindústria sucro-alcooleira no Brasil se constitui numa prática bastante generalizada, tanto no caso dos efluentes líquidos, principalmente a vinhaça, como no dos sólidos, como a torta de filtro (RAMALHO & SOBRINHO, 2001).

A carga orgânica dos efluentes originados na produção diária de açúcar e álcool é extremamente elevada, face às altas demandas química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO, respectivamente). Contribuem para isso os constituintes de colmos e folhas residuais de cana (tanino, lignina, etc.), além de agroquímicos adsorvidos e carregados durante a lavagem diária de 10.000-18.000 ton da mesma.

Sabe-se que inúmeros microrganismos produzem um ou mais tipos de amilases, celulases, ligninases e tanases para degradar os polissacarídeos e polifenóis presentes nos diversos tipos de nichos, e que aqueles produzidos por mesofílicos e termofílicos são de grande interesse para as mais diversas indústrias, para a biorremediação de efluentes, ou para a produção de fertilizantes.

O propósito deste trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos capazes de produzir enzimas mesofílicas e termofílicas degradadoras de polissacarídeos, proteínas e fenóis em amostras de bagaço de cana-de-açúcar, de lodo e de resíduos líquidos de agroindústria sucroalcooleira, visando trabalhos posteriores de caracterização das enzimas secretadas pelas linhagens que se destacarem.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Diante do exposto, os objetivos específicos da presente dissertação foram:

- 2.1.** Isolar e identificar microrganismos capazes de degradar polissacarídeos, proteínas e fenóis de resíduos líquidos (efluente de Estação de Tratamento – ETE) e sólidos (lodo de lagoa de decantação da mesma ETE e bagaço de cana-de-açúcar) de indústria sucroalcooleira;
- 2.2.** Caracterizar morfológicamente os microrganismos isolados, submetendo-os a vários meios de culturas seletivos e testes diferenciais;
- 2.3.** Avaliar *in vitro* o perfil enzimático dos microrganismos isolados na degradação de amido, xilanas, proteínas (colágeno), lipídeos, pectina e compostos fenólicos (como ácido gálico e ácido tânico);
- 2.4.** Selecionar entre os microrganismos cujos resultados apresentaram melhor atividade enzimática, alguns para posterior estudo relacionado à produção de fenol-oxidases (tanase);
- 2.5.** Realizar ensaios de cinética de degradação do ácido tânico em meio líquido (ATL), com microrganismos selecionados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A Versatilidade Microbiana

A capacidade que os microrganismos têm de mineralizar uma variedade de compostos tóxicos ou recalcitrantes, se dá pelo fato da diversidade metabólica natural dos mesmos, além dos vários fatores ambientais que permitem um ótimo desenvolvimento para que haja essa eficiência na degradação. ESPÓSITO & AZEVEDO (2004) afirmam que a estimativa de espécies fúngicas no mundo é de 1,5 milhão, e que a maioria é capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono, inclusive polímeros complexos, para obter energia atuando assim na degradação de poluentes.

As transformações microbianas dos compostos orgânicos por enzimas são descritas pelos termos: degradação, ativação, detoxicação e mineralização, sendo que este último refere-se à completa conversão da estrutura orgânica para as formas inorgânicas tais como CO_2 , H_2O , e Cl^- . A detoxicação é a transformação do composto para algumas formas intermediárias que pode ser não tóxica ou pouco tóxica, o processo que resulta em formas tóxicas e produtos intermediários tóxicos é conhecido como ativação. Os microrganismos são capazes de catalisar uma variedade de reações como: dechlorinação, hidrólises, clivagem, oxidação, redução, dehidrogenação, dehidroalogenação e substituição (SUTHERSAN, 1999).

Vários são os fatores que estão envolvidos na biodegradação dos poluentes, como: a natureza do poluente; a não degradação do poluente pela microflora e microfauna indígena; os fatores abióticos e o tipo de solo são essenciais para um bom desempenho da atividade bacteriana (PIEPER & REINEKE, 2000). FASS *et al.* (1999) verificaram que para que ocorra a biodegradação do contaminante é necessário um período de adaptação denominado de aclimatização que ocorre devido a

três fatores: multiplicação dos microrganismos; período de síntese de enzima específica requerida e ocorrência de mutações e processos seletivos.

A primeira etapa para a biotransformação celular de compostos recalcitrantes é catalisada por enzimas pertencentes ao grupo das oxiredutases e hidrolases. De acordo com GIANFREDA & RAO (2004), as oxiredutases microbianas são enzimas periplasmáticas associadas à superfície celular, e podem ser de origem fúngica (Basidiomicetos e Ectometarrízios) ou Actinomicéticas, sendo requerido em alguns casos à presença das células de origem, para que a rota metabólica seja completa (**Figura 1**).

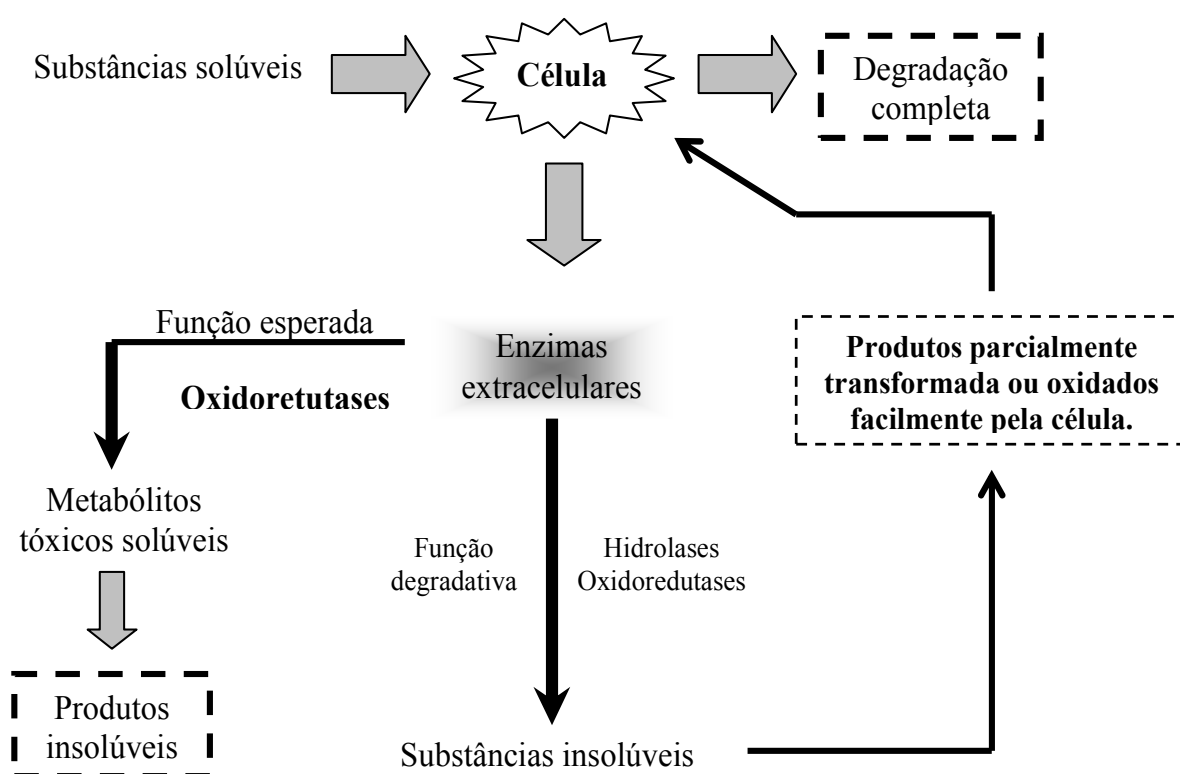


Figura 1. Esquema das funções das enzimas extracelulares no metabolismo celular. (Fonte: GIANFREDA & RAO, 2004).

As enzimas requeridas no processo de biodegradação não são completamente específicas aos substratos, e agem sobre compostos recém sintetizados liberados pela atividade humana na biosfera. Alguns substratos de baixo peso molecular são transportados através da membrana celular para serem então metabolizados. Por outro lado, as moléculas de alto peso molecular sofrem ação de enzimas extracelulares podendo ser transformadas e/ou catabolisadas em substâncias simples (MARTIN, 1999).

De acordo com SUTHERSAN (1999) a transformação de poluentes pode ou não resultar em redução da toxicidade, já que todas as propriedades tóxicas de um contaminante são removidas via biotransformação. Em contra partida, a detoxificação não implica na mineralização e podem envolver vários processos, tal como: hidrólise, hidroxilação, dechlorinação e demetilação.

WATANABE (2001) observaram que alguns poluentes podem ser degradados por organismos indígenas, porém devido ao fato dessas substâncias não existirem naturalmente no ambiente, faz com que esses microrganismos utilizem outras rotas metabólicas para degradá-los.

Conforme SILVA E ESPÓSITO (2004) a extensa gama de microrganismos utilizados na descontaminação de solos e sedimentos, do ar e de águas deve ser acompanhado por métodos bioquímicos e microbiológicos que assegurem as atividades metabólicas. Para entender esse mecanismo, faz-se necessário conhecer a fisiologia das populações microbianas, as rotas metabólicas de degradação de cada contaminante, bem como, a seleção de habilidades específicas, como remoção de metais, compostos radioativos, degradação de compostos orgânicos e recalcitrantes (TIMMIS & PIEPER, 1999).

Sabe-se que diversos microrganismos (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Norcadia*, *Arthrobacter*) têm mostrado habilidade em degradar vários compostos de diferentes classes químicas como os aromáticos (haloaromáticos, nitroaromáticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), polifenóis, policloratos dentre outros. A espécie *Pseudomonas pickettii* têm demonstrado extraordinária habilidade na degradação de compostos específicos como: clorofenol, hidrocarbonetos aromáticos, nitroaromáticos, propanil (3,4-dicloroproprianalidina), como também alguns fungos (*Aspergillus versicolor*, *Cephalosporium acremonium*, *Penicillium sp.* e *Cunninghamella elegans*) possuem a habilidade de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo, viabilizando o tratamento desses poluentes (DUA *et al.*, 2003; ESPÓSITO E AZEVEDO, 2004; KARIGAR, 2006).

3.2. Resíduos agroindustriais

A agropecuária é fonte de grande quantidade de resíduos, como dejetos de animais, restos de culturas, palhas e resíduos agroindustriais, e que muitas vezes, os mesmos são dificilmente degradados ou reciclados na forma que se encontram ficando por muito mais tempo no ambiente causando danos (PANDEY *et al.*, 2000).

O processamento industrial da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e álcool gera um grande volume de efluentes com complexa e elevada carga orgânica, contribuindo com uma parcela considerável na poluição ambiental. Devido a este fato e com a preocupação de manter os níveis admissíveis desses poluentes evitando impactos ambientais, é que várias pesquisas estão sendo realizadas buscando a recuperação, transformação e biocorreção desses poluentes no meio, através de tecnologias capazes de minimizar o volume e a toxicidade dos efluentes industriais (FREIRE, 2000).

No Estado de Alagoas, a cana-de-açúcar começou a ser plantada no litoral norte, nas proximidades das cidades de Porto Calvo e Matriz de Camaragibe, posteriormente ocupando áreas antes de Mata Atlântica, passando pelas várzeas dos rios Manguaba, Santo Antônio, Mundaú, Paraíba, São Miguel e Coruripe (ANDRADE, 1997; CARVALHO, 1997).

Atualmente há uma centralização da produção alagoana de cana-de-açúcar, a qual pertence a 7 grandes grupos. Cada um desses grupos administra várias usinas e destilarias. Estes grupos são: Carlos Lyra (usinas e destilarias Cachoeira, Caeté e Marituba); Corrêa Maranhão; (usina Camaragibe e usina e destilaria Santo Antônio), João Lyra (usinas e destilarias Guaxuma e Laginha e usina Uruba), Toledo (usina Capricho, destilaria autônoma Penedo e usina e destilaria Sumaúma), Tércio Wanderley (destilaria autônoma Camaçari e usina e destilaria Coruripe), Olival Tenório destilaria autônoma "Porto Alegre" e destilaria e usina "Porto Rico") e Andrade Bezerra (usina e destilaria "Serra Grande"). Alguns desses grupos também administram usinas e destilarias em outros pontos do país, especialmente Minas Gerais, Pernambuco, Espírito Santo e São Paulo (CARVALHO, 1997).

Cerca de 90% das águas empregadas nas unidades industriais das usinas deve-se a quatro operações: lavagem de cana (25 %), condensadores barométricos ou multijatos da fabricação do açúcar (29 %), resfriamento de dornas da fermentação (14 %) e condensadores de álcool (19 %). De uma forma geral, utiliza-se cerca de 21 m³ de água / tonelada de cana (TC) a ser processada. Com o fechamento destes circuitos principais, pode-se reduzir a captação para 1 m³/TC,

mas isso nem sempre ocorre, gerando altos volumes de efluente com grandes quantidades de sólidos em suspensão, matéria orgânica (bagaço de cana, óleos lubrificantes e combustíveis, detergentes, etc) e temperatura elevada. Esses fatores deterioram a qualidade da água necessária à vida dos organismos em geral, e para que seu lançamento em corpos d'água ou sua reutilização sejam possíveis, é necessário um sistema de controle e tratamento específico.

O tratamento biológico de efluentes faz uso da ação conjunta de espécies diferentes de microrganismos (bactérias e fungos) em bioreatores. Estes são operados sob condições (temperatura, pressão, umidade) controladas, assim estabilizando a matéria orgânica poluente (VAZOLLER, 1995). Portanto, embora complexos, os processos de biorremediação são relevantes num momento em que se discutem temas como empresas e cidades melhor planejadas e mais eficientes ecologicamente, especialmente quando a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de um efluente é maior do que a sua demanda química de oxigênio (DQO).

Entre os processos industriais de agroindústrias, destacam-se a lavagem e a moagem de cana-de-açúcar, o tratamento do fermento, a geração de vapor, a limpeza de caldeiras, dornas e evaporadores, e o saneamento em geral, inclusive o de máquinas agrícolas. A **Tabela 1** mostra valores aproximados do consumo de água na fabricação de álcool. Os resíduos produzidos por essas atividades, ainda que separadas, apresentam sólidos em suspensão, altos teores de matéria orgânica e temperatura elevada. Esses fatores causam desequilíbrio ecológico, e para que seu lançamento em corpos d'água ou sua reutilização sejam possíveis, é necessário um sistema de controle e tratamento específicos.

Na lavagem de cana, a mesma recebe água de forma contínua, para o arraste de impurezas trazidas da lavoura. A quantidade de água a ser utilizada na lavagem de cana é de aproximadamente 6m^3 água/t de cana moída, isto é, aproximadamente 72.000m^3 água/ 12.000 t cana moída/dia (MACÊDO, 2002).

Geralmente, as águas de lavagem de cana contêm resíduos de fibras de folhas e colmo de cana, constituídos por lignina e celulose que sofrem oxidação e levam à formação de outros compostos, como ácidos fenólicos, melanoidinas e ácidos fúlvico e húmico, entre outros. Além disso, contêm sacarose, resíduos de agroquímicos e cinzas, sendo descartadas em lagoas artificiais, levando a uma proliferação de insetos e a uma biodegradação muito lenta devido ao seu volume não ser suficiente para reter o efluente por muito tempo.

Tabela 1. Uso aproximado de água na fabricação de álcool. (Fonte: ZÁRAT Fº, 1999).

SEÇÃO	FINALIDADE	VOLUME (L/t de cana)
Descarga e estocagem	Lavagem de cana	5000-10000
Moendas	Embebição	250
	Resfriamento de mancais	150
Caldeiras	Produção de vapor	250-350
Tratamento de água de lavagem	Preparo de leite cal	15
Pré-fermentação	Preparo de levedura	100
Fermentação	Resfriamento de dornas	5000
Destilação	Resfriamento de condensador	6000
Laboratório	Usos gerais	10
Diversos	Limpezas gerais	15

Segundo PANDEY (2000) o bagaço de cana tem despertado um grande interesse econômico devido a sua utilização como matéria bruta na geração de eletricidade, produção de papel e bioprodutos baseados em processos de fermentação.

O bagaço de cana é composto por 45 % de fibras lignocelulósicas, 50 % de umidade, 2 a 3 % de sólidos solúveis em água. Sendo a constituição química por grama de peso seco composta por 45 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 20 % de lignina (TEIXEIRA *et al.*, 1997).

Conforme AGUIAR & MENEZES (2000) os resíduos agrícolas servem como fonte de nutrientes, principalmente de carbono em fermentação submersa simplesmente pelo fato de produzirem uma elevada atividade enzimática. O mesmo relata que o cultivo de *Aspergillus niger* contendo bagaço de cana como fonte de carbono apresentou atividade celulolítica superior quando comparado com outras fontes a exemplo da carboximetil-celulose e do papel de filtro.

Visando a redução de compostos tóxicos no ambiente bem como o reaproveitamento dos subprodutos obtidos no processamento da cana, o setor sucro-

alcooleiro investe em vários projetos de pesquisa que envolve a preservação e manutenção do ambiente buscando tecnologias para redução da captação de água e melhoria da qualidade de seus efluentes, bem como na melhoria da qualidade dos solos através de técnicas de adubação, e do destino final de resíduos orgânicos agrícolas.

3.3. Biodegradação de Polissacarídeos e Compostos Fenólicos

A lignocelulose é um polissarídeo fenílico muito abundante encontrado em resíduos de cereais, bagaço de cana-de-açúcar e florestas, seus principais componentes são a celulose, a hemicelulose e a lignina. A lignocelulose tanto serve para produzir uma variedade de combustíveis, entre os quais se destacam alternativas para gasolina e óleo diesel, como para a produção de uma gama de substâncias químicas que sustentam a vida moderna (OASHI, 1999).

De acordo com LÓPEZ *et al.* (2004) a degradação de substâncias lignocelulósicas libera furano e compostos fenólicos tóxicos aos microrganismos de metabolismo fermentativo. Esses autores isolaram microrganismos de solo com capacidade de detoxificação de compostos lignocelulósicos, em meio mineral que continha uma mistura de ácido ferúlico, 5- hidroximetilfurfural e furfural com fontes de carbono e de energia, seguido pela transferência para um meio de cultura contendo hidrolisado de milho. As cepas de microrganismos apresentaram crescimento estável nestes substratos, obtendo-se seis isolados identificados como pertencentes aos gêneros *Methylobacterium*, *Pseudomonas* sp, *Flavobacterium* sp, *Artrobacter* sp, *Acinetobacter* sp e *Ligninaria* sp Todos os isolados degradaram os compostos adicionados ao meio de cultura descrito acima. Entretanto, apenas *Ligninaria* sp foi eficiente na metabolização do furfural em virtude de seu grande potencial enzimático, especialmente na produção de enzimas celulolíticas e na degradação eficaz de substâncias recalcitrantes.

A celulose é um polissacarídeo composto por unidades de β -D-glicose (**Figura 2**), enquanto que a hemicelulose (**Figura 3**) é composta predominantemente por unidades de β -D-xilose ligada a resíduos de manose, arabinose e manana, que podem ser fermentados por microrganismos para a produção de etanol.

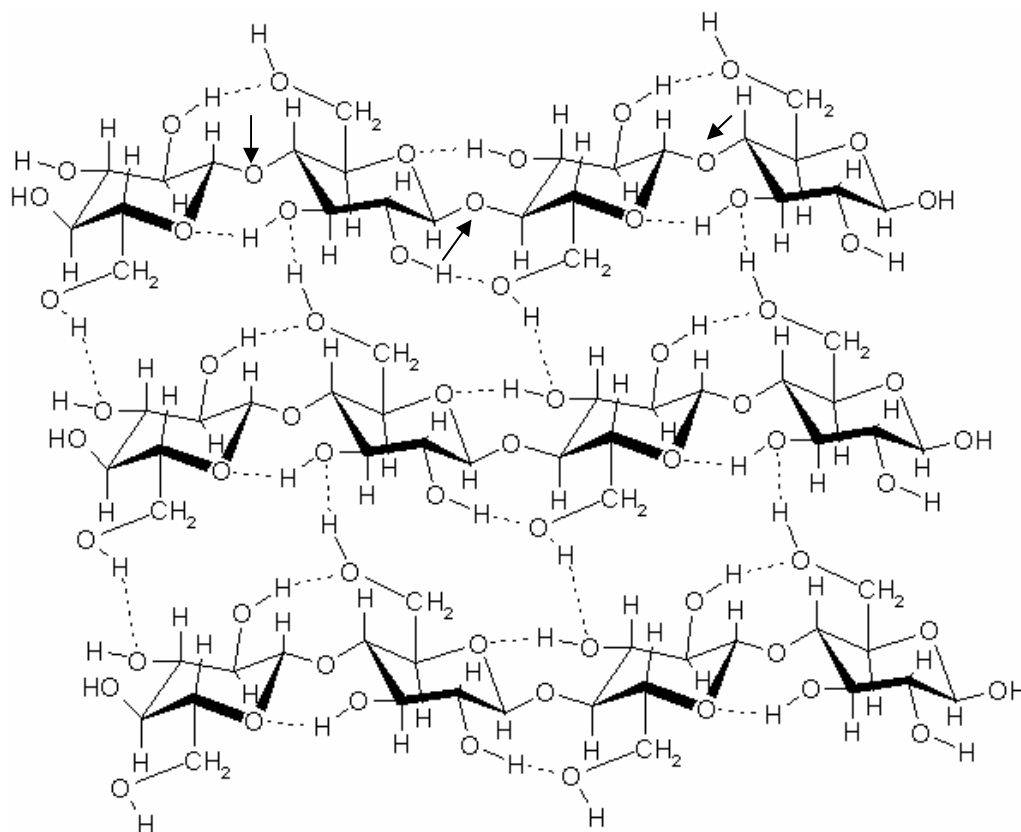


Figura 2. Unidades monoméricas de β -(1,4)-D-glicopiranosose do polímero de celulose.

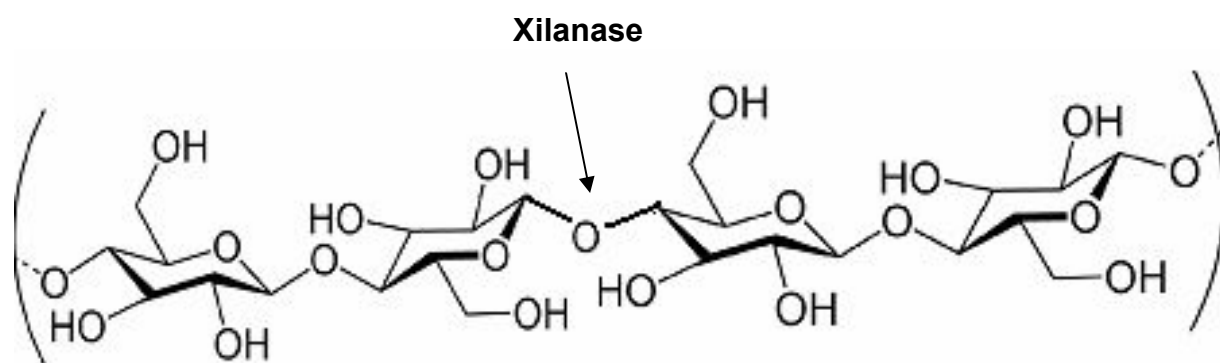


Figura 3. Unidades monoméricas de β -(1,4)-D-xilanopiranosose, componente da hemicelulose, destacando a especificidade da enzima xilanase. (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>. Acessado janeiro de 2007).

WINKELMANN (1992) relata que para metabolizar oligossacarídeos e polissacarídeos as enzimas extracelulares são secretadas com diferentes especificidades. A ação das enzimas para degradação de polissacarídeos pode ser classificada em dois grupos: as enzimas endoativas ou exoativas (são secretadas e atuam sobre

o substrato resultando em pequenos produtos, por exemplo, amilase, glucoamilase e α -glucosidase).

Segundo FERRAZ (2001) a biodegradação de celulose é promovida por três grupos de enzimas que atuam sinergisticamente permitindo a hidrólise total da celulose até glicose, e compreendem às β -1,4-endo e exo glucanases e às β -1,4-glicosidases. Inicialmente, as endoglucanases rompem a moléculas de celulose liberando fragmentos menores servindo de substrato para as exoglucanases. As exoglucanases hidrolisam os fragmentos de menores massas moleculares pelas extremidades, enquanto que as β -glicosidases hidrolisam a celobiose à glicose.

Algumas celulases fúngicas têm sido exploradas industrialmente, e a espécie que mais se destaca neste ponto é o fungo *Trichoderma reesei*. No entanto, outros microrganismos têm apresentado um bom potencial para a produção de enzimas celulolíticas, como *Neurospora crassa*, espécies do gênero *Curvularia* e a espécie *Trichoderma koningi*. Este último, por possuir o sistema celulolítico completo, apresentou maior rendimento enzimático (103 %) na hidrólise da celulose de algodão em relação às espécies citadas anteriormente (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

BHAT & BAHT (1997), relatam que os fungos aeróbios mais estudados que apresentam sistema celulolítico completo são *Phanerochaeta chrysosporium*, *P. funiculosum/pinophilum*, *Talaromyces emersonii*, *Trichoderma koningii* e *T. reesei*). No caso de bactérias, elas produzem principalmente endoglucanases, tendo sido destaque na pesquisa às espécies *Clostridium thermocellum*, *C. cellulovorans* e *Acetivibrio cellulolyticus* por terem uma atividade elevada degradando a celulose cristalina.

Apesar de amplamente distribuídos na natureza os compostos fenólicos fazem parte dos principais poluentes tóxicos residuais descartados pela indústria petroquímica, têxtil, sucro-alcooleira, entre outras, assim, os compostos fenólicos se dividem em taninos, ligninas, polifenóis simples e álcoois fenólicos (SAUVE *et al.*, 1997).

A lignina é um polímero aromático heterogêneo, opticamente inativo e estável, e que consiste de interunidades de fenilpropanóides ligadas covalentemente (ligações aril-éter, aril-aril e carbono-carbono) (**Figura 4**). Devido ao tipo de ligações entre as unidades e à heterogeneidade dessa, a lignina não pode ser clivada por enzimas hidrolíticas como os outros polímeros naturais (WINKELMANN, 1992; FREIRE, 2000).

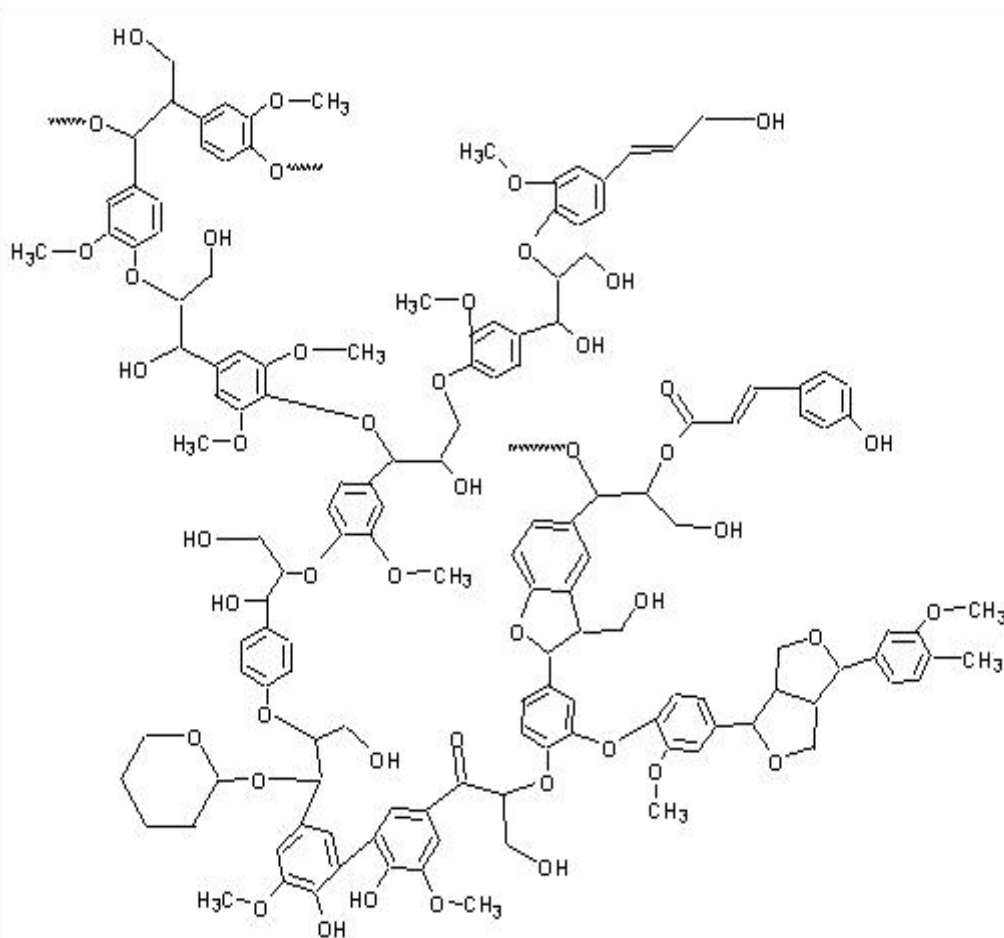


Figura 4. Estrutura geral da lignina. (Fonte: <http://academic.scranton.edu/>. Acessado em janeiro de 2007).

Os fungos pertencentes ao grupo dos Basidiomicetos são conhecidos como o maior degradador de lignina até sua mineralização. Estes fungos que habitam madeiras e solos causam a chamada podridão branca ou marron, conforme a coloração do material residual no estágio avançado de colonização da madeira. Esses fungos da podridão branca degradam todos os componentes da madeira simultaneamente ou apenas a lignina e possuem um sistema enzimático extracelular e intracelular ca-

paz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos (TRJANOWSKI, 2001; HOFRICHTER, 2002).

DURAN & ESPÓSITO (1997) relatam que a atividade de fenoloxidasas extracelulares está relacionada à presença de enzimas ligninolíticas, sendo usada como critério para identificar fungos de degradação branca. Já os fungos da decomposição marron despolimerizam somente os polissacarídeos da parede celular (BRITO, 2004).

A degradação da lignina envolve várias reações bioquímicas como clivagem das ligações intermonoméricas, demetilação, hidroxilação, modificação na cadeia lateral e fissão do anel aromático formado pela desassimilação dos produtos metabólicos alifáticos. Os fungos apresentam uma família de isoenzimas extracelulares chamada de lignases (peroxidases) que agem em mecanismos envolvendo a formação de radicais livres (VICUÑA, 1988).

ESPOSITO & AZEVEDO (2004) afirmam que existem três modos principais na degradação da lignina: ruptura oxidativa de cadeias laterais envolvendo o C α e o C β levando a formação de ácidos carboxílicos; ruptura de ligações β -aril-éter com conseqüente modificação das cadeias laterais, e degradação de núcleos aromáticos a partir da abertura oxidativa dos anéis.

VICUÑA (1988) afirma que a degradação de lignina por bactérias parece estar limitada apenas pela cadeia lateral. Nos fungos, o limite é a separação de monômeros da lignina. Não se sabe ainda como alguns gêneros de Bactérias (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Streptomyces*) degradam os anéis aromáticos que compõem a lignina. Isto se deve ao fato, de que muitos estudos sobre a degradação da lignina estão concentrados em fungos.

Segundo PÉREZ *et al.* (2002) as enzimas do sistema lignolítico têm um importante papel nas industriais e na descontaminação de efluentes, contudo também no branqueamento químico de polpa e papel, na biorremediação *in situ* de solos contaminados, de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, clorofenóis, nitrotoluenos, policlorinados e bifenis, sendo atualmente utilizadas em biossensores na detecção de fenóis em ambientes contaminados.

Depois das ligninas, os taninos são o segundo grupo de compostos fenólicos mais abundantes nas plantas, que apresentam em sua composição moléculas de carboidratos simples, gomas hidroxicoloidais, fenóis e aminoácidos. São amplamente distribuídos nos vegetais superiores, ocorrendo em aproximadamente 30 % das

famílias. Sua extração comercial é feita através da casca e/ou cerne da madeira, onde são encontrados em maiores concentrações e também onde se verificam os principais problemas com injúrias e ataques de agentes xilófagos da madeira (TRUGILHO *et al.*, 2003).

O ácido tânico, também denominado de ácido galotânico, galotanino ou glicerita, trata-se de uma substância facilmente solúvel em água ou álcool, obtida a partir do tanino vegetal de acácia-negra (*Acacia mearnsii*). (**Figura 5**). É ligeiramente combustível com ponto de fusão igual ou superior a 218 °C, sendo os riscos de incêndio e explosivos baixos. Porém, se misturado acidentalmente a agentes oxidantes podem ocorrer explosões durante o incêndio. Altas temperaturas podem levar à decomposição do ácido tânico com emissão de gases tóxicos. É incompatível com o ar, luz, íons ferro, base e agentes oxidantes fortes. A inalação, o contato com a pele e os olhos causa leves irritações, ocasionando danos irreversíveis mediante ingestão (FAENQUIL, 2003).

3.4. Classificação dos Compostos Tânicos

Os taninos, além de serem polihidroxifenóis ativos, também, são constituídos por glicídeos e gomas de alto peso molecular (SILVA, 1999). Podem ser classificados segundo sua estrutura química em: a) hidrolisáveis, com a formação de dímeros e trímeros, através de ligações entre C–O; b) condensados, de estrutura flavonídica, originando proantocianidinas através de sua condensação; c) complexos, constituídos tanto por taninos hidrolisáveis, como pelos condensados; d) florotaninos, formados por unidades floroglucinol ligadas por C–C ou C–O, e encontrados em vegetais de pequeno porte (SILVA, *et al.*, 1999). Um composto que ocupa uma posição intermediária na hierarquia dos taninos é a catequina, que combina elementos de taninos condensados e hidrolisáveis.

Os taninos hidrolisáveis, conforme ZUCKER (1983), são responsáveis pela defesa das plantas contra os animais herbívoros, ao passo que os taninos condensados asseguram a defesa contra microrganismos patogênicos.

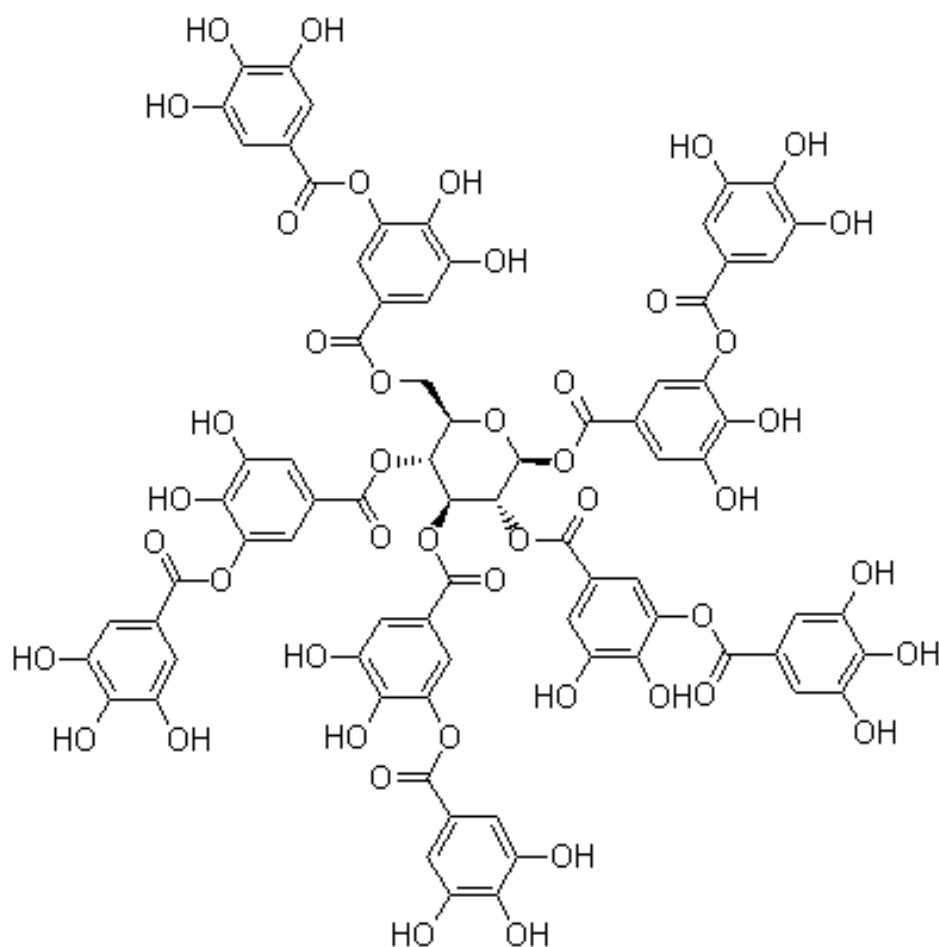


Figura 5. Estrutura do ácido tânico (Fonte: LEKHA & LONSANE, 1994).

3.4.1. Taninos Hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são compostos caracterizados pela hidrólise ácida ou enzimática gerando produtos monoméricos. Consistem de ésteres glicolisados de ácido gálico ou ácido elágico, formados a partir do chiquimato. Os grupos hidroxila do glicídio são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são mais freqüentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexahidroxidifênico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos. Os principais taninos comerciais hidrolisáveis são extraídos de *Rhus semialata*, *R. coriara*, *Quercus infectoria*, *Caesalpinia spinosa*, *Terminalia chebula* e *Castanea sativa* (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Para ZUCKER (1983), os taninos hidrolisáveis podem ser considerados como poliésteres da glicose, podendo ser classificados em duas categorias: (a) os galota-

ninos, que por hidrólise ácida liberam o ácido gálico e seus derivados; (b) os elagitaninos, que por hidrólise liberam os ácidos valônico e elágico, sendo este último o mais importante (**Figura 6**).

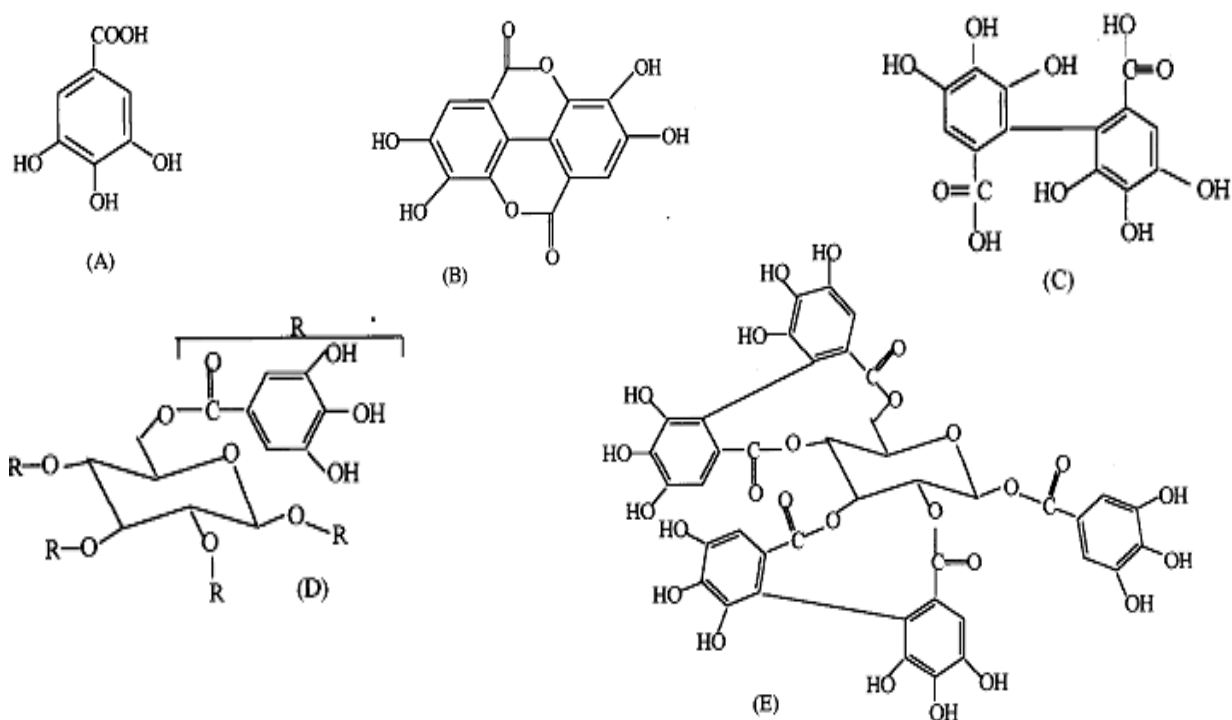


Figura 6. Estrutura de taninos hidrolisáveis: (A) ácido gálico; (B) ácido elágico; (C) ácido hexaidroxidifenílico; (D) galotanino; e (E) elagitanino (Fonte: BHAT *et al.*, 1998).

3.4.2. Taninos Condensados

PIZZI (1993) relata que os taninos condensados ou proantocianidinas consistem de unidades de flavonóides, possuindo diferentes graus de condensação, e estão invariavelmente associados com seus precursores diretos, denominados de flavan-3-ol (catequina) e flavan-3,4-diol (leucoantocianidinas), que são produtos do metabolismo do fenilpropanol. As proantocianidinas apresentam pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como por exemplo, as cianidinas e a delphinidina. Em meio ácido aquecido e alcoólico, as proantocianidinas caracterizam-se por liberarem antocianidinas e catequinas, devido à ruptura das ligações de hidrogênio estabelecidas entre as unidades monoméricas. As antocianidinas liberadas por este

processo poderão ser do tipo: pelargonidina, cianidina ou delphinidina, de forma que suas moléculas precursoras sejam a propelargonidina, a procianidina ou a prodelfinidina, respectivamente (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Para AGOSTINI-COSTA *et al.* (2003), em termos de estrutura química, os taninos condensados são compostos cujas unidades fundamentais são estruturas monoméricas de 2-fenilbenzopiranos. A estrutura dos taninos condensados é formada pela ligação de uma série de monômeros de unidades flavan-3-ol, ou por um derivado desta. Esta ligação ocorre normalmente entre os carbonos 4 de uma estrutura e 8 da outra (Figura 7). Variações podem ocorrer por diferentes números de monômeros ligados, pela posição de ocorrência das ligações, pelo padrão de oxigenação nos anéis A e B da unidade flavan-3-ol e pela estereoquímica dos substituintes do anel C.

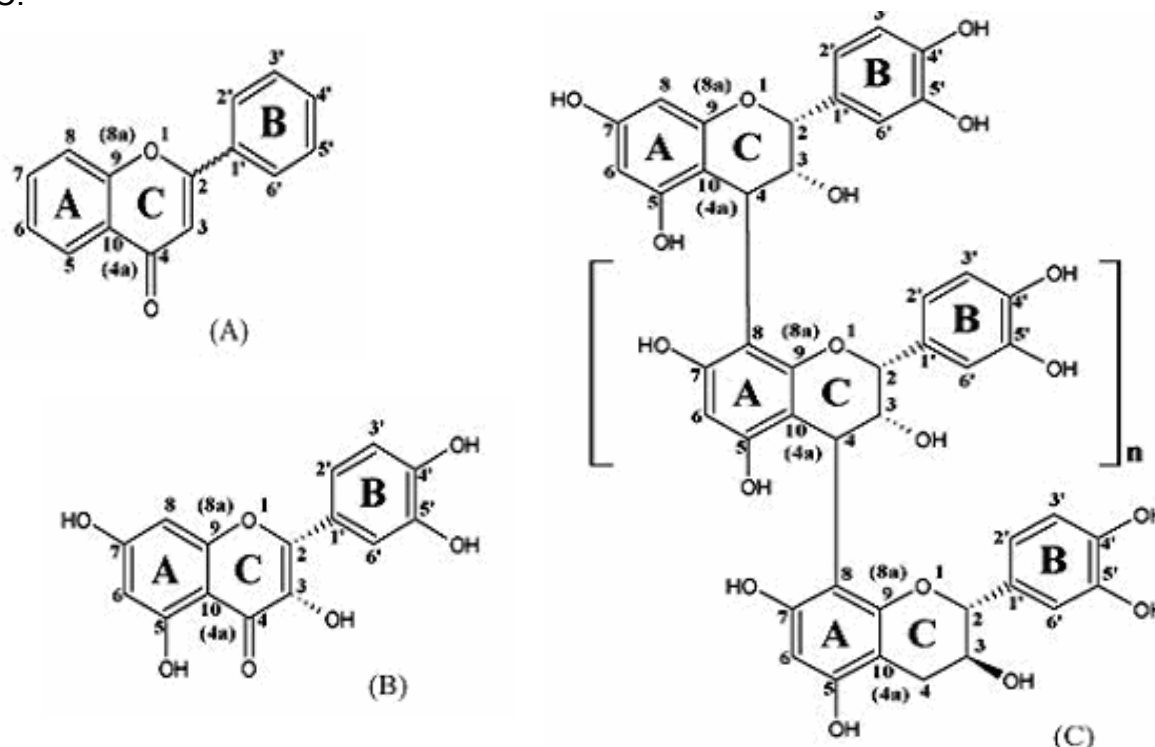


Figura 7. Estrutura de taninos condensados: (A) um flavonóide genérico; (B) flavan-3-ol; (C) procianidina (constituída por três unidades de flavan-3-ol) (Fonte: BHAT *et al.*, 1998).

Tais compostos são comuns em angiospermas e gimnospermas lenhosas, sendo mais abundantes em cascas de árvores. Estão largamente distribuídos em espécies como: *Lotus corniculatus*, *L. pedunculatus*, *Onobrychis viciifolia*, *Acacia mollissima*, *A. mearnsii*, *Schinopsis lorentzii*, *S. balansae*, e em outras espécies de

plantas. No contexto dos compostos fenólicos, os flavonóides e especialmente as proantocianidinas, são os principais responsáveis pelas sensações gustativas dos vinhos, nomeadamente ao nível da adstringência, assumindo ainda um importante papel no envelhecimento do vinho (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Além de serem um dos principais constituintes fenólicos das uvas (*Vitis vinifera*) e mais resistentes ao ataque microbiano do que os taninos hidrolisáveis, as proantocianidinas são tóxicas para uma grande variedade de microrganismos. Por esta razão, os taninos geralmente retardam a taxa de decomposição da matéria orgânica do solo, por meio da inibição de enzimas biodegradativas produzidas por microrganismos (AGOSTINI-COSTA, *et al.*, 2003).

As proantocianidinas refletem grande importância em termos nutricionais e farmacológicos, pois têm ação vasoprotetora e antiagregante plaquetária, ação antioxidante, anti-hepatotóxico, atividade anti-tumoral, anti-viral, ação de captor de radicais livres de oxigênio e proteção em relação à aterosclerose (OTUK & DESCHAMPS, 1983).

3.5. Utilização e Efeitos dos Taninos

Os taninos são substâncias que apresentam a propriedade de se associar com proteínas, polissacarídeos e outros compostos fenólicos. Altas concentrações de taninos em frutos, folhas, sementes, combinadas a algumas proteínas tornam esses tecidos resistentes ao apodrecimento, e impalatáveis aos fitófagos. Estas propriedades únicas dos taninos permitem transformar a “pele” dos animais em “couro” capazes de suportar tratamentos rigorosos, além de conferir resistência à putrefação (KUMAR & VAITHIYANATHAN, 1990). Também são responsáveis pela coloração das flores e pelo sabor adstringente de muitas frutas, chás, vinhos, forrageiras, entre outros.

Para ZAMAN & KHAN (1961), os taninos em combinação com a soda cáustica, podem controlar a viscosidade de líquidos no interior de tubulações, impedindo a obstrução das mesmas. Podem ser utilizados na fabricação de adesivos (taninos-formaldeídos) para madeira e derivados, como floculantes de certos minerais, como um produto de purificadores da gasolina, face à sua ação comprovada na eliminação das mercaptanas, e podem, ainda, ser utilizados na adsorção de metais pesados

dissolvidos em água, em indústrias de curtimento, anticorrosivos, bebidas, plásticos e no tratamento de água de abastecimento e esgoto, de acordo com os parâmetros seguidos pela FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente) (SILVA *et al.*, 1999).

Apresentam propriedades anticarcinogênicas, antitumorais e antimicrobianas, como reguladores de crescimento e germinação de microrganismos. Podem ainda atuar como agente indutor na mudança de morfologia em bactérias de ruminantes, a saber, das células de *Prevotella ruminicola* e *Fibrobacter succinogenes* S85 (O' DONOVANT & BROOKER, 2001). Inibem enzimas digestivas e afetam a utilização de vitaminas e sais minerais. Vários tipos de taninos atuam como seqüestradores de radicais livres, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis, inibindo a peroxidação de lipídios e outras substâncias. Podem agir como antiinflamatórios, cicatrizantes, e como inibidores da transcriptase reversa em vírus da imunodeficiência humana (HIV). Todavia, quando absorvidos em altas doses, desenvolvem processos cancerígenos na bochecha e no esôfago (MUELLER-HARVEY & McALLAN, 1992).

Os taninos exercem efeito antidiarréico e anti-séptico, além de impermeabilizar as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo as camadas subjacentes. São hemostáticos, e podem ser utilizados em casos de intoxicações (SILVA *et al.*, 1999). Também formam uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou tanino-polissacarídeo) em feridas, inflamações ou queimaduras. Esta capacidade de ligar-se a macromoléculas como proteínas e polissacarídeos conferem aos taninos propriedades tóxicas (YAN & BENNICK, 1995).

Sabe-se que, os dímeros de elagitaninos são mais adstringentes que seus monômeros, e é essa adstringência que confere toxicidade aos taninos. De um modo geral, o grau de toxidez está associado ao peso da molécula. Entretanto, em alguns casos, isto nem sempre ocorre. A catequina, por exemplo, apresenta baixa afinidade por proteínas apesar de sua alta toxicidade. A toxicidade também pode estar relacionada com associações entre taninos e íons metálicos (MONTEIRO *et al.*, 2005).

3. 6. Degradação Enzimática de Substâncias Fenólicas

3.6.1. Lacase (EC. 1. 10. 3. 2)

As lacases são fenol-oxidases que catalizam a oxidação de várias substâncias aromáticas ligninolíticas (particularmente mono, di e polifenóis), de orto-benzenodióis, aminas aromáticas, além de compostos inorgânicos, pela retirada de um elétron com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar a despolimerização (**Figura 8a**).

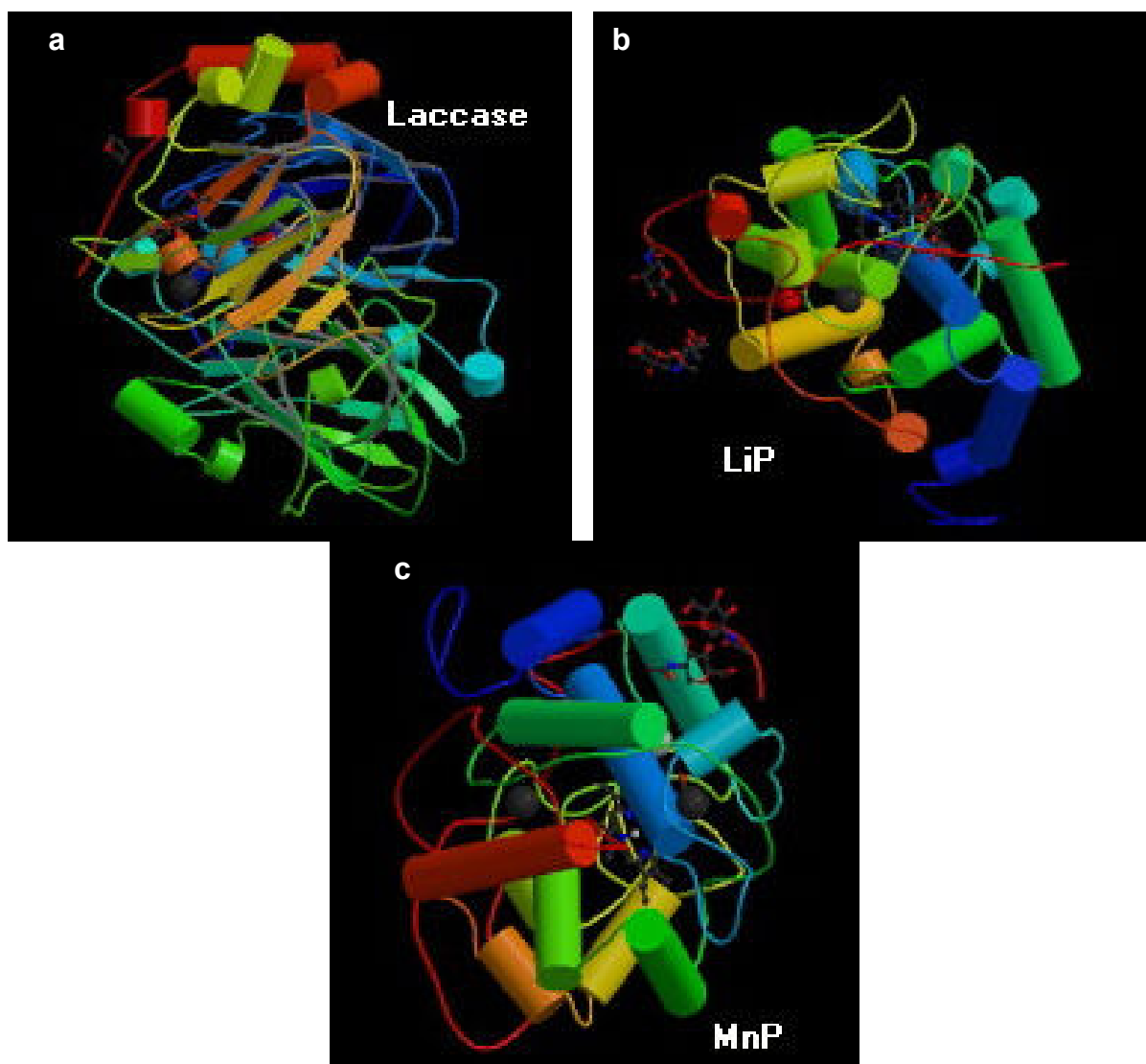


Figura 8. Modelo estrutural das enzimas: a) Lacase; b) Lignina-Peroxidase (LiP); c) Manganês-Peroxidase (MnP). (Fonte: <http://lignin.cib.csic.es/pelas/pelas.html>. Acessado em janeiro de 2007).

Os fenóis clorados e os catecóis são parcialmente desclorados. Estas enzimas tanto podem atuar na destoxificação de compostos do substrato como oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. Alguns microrganismos apresentam os dois tipos de exoenzimas (peroxidases e lacases) ou apenas uma delas (GIESE *et al.*, 2004).

Também são classificadas como cupro-proteínas do pequeno grupo de enzimas chamadas cuproproteínas azuis, cuprooxidases azuis ou ainda apenas oxidases azuis. Os outros membros deste grupo são a ascorbato oxidase, a ceruloplasmína e a fenoxazinona sintetase. A molécula de lacase é uma glicoproteína dimérica ou tetramérica, que contém quatro átomos de cobre por monômero, ligados a três sítios redox, os átomos de cobre diferem entre si por seus estados de oxidação (tipo 1, 2 e 3). Este tipo de enzima encontra-se amplamente distribuída na natureza, mais de 60 tipos de lacases foram isoladas a partir de plantas, insetos, bactérias e fungos. Embora os centros de cobre sejam similares para todas as lacases de fungos, diferenças significantes nas propriedades termodinâmicas e cinéticas são observadas em função do microrganismo de origem (SILVA, 2004).

Para LI *et al.* (1999), as lacases diferem das peroxidases por não necessitarem do peróxido de hidrogênio para oxidar compostos fenólicos. Em vez disso, os elétrons são transferidos ao oxigênio molecular, produzindo água. Ademais, contém quatro elétrons, que são cedidos para a redução do O₂. O potencial redox desta enzima é 0,8 - 1,0 V. Um aumento do potencial da lacase pode ser obtido através do uso de mediadores apropriados. Na presença de alguns de seus substratos primários, como o ABTS (radical cátion do ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico)), a lacase pode catalizar a oxidação de compostos não-fenólicos, incluindo o álcool veratrílico. O mecanismo de reações acopladas lacase/ABTS envolve a abstração de um átomo de hidrogênio.

Em geral, as lacases apresentam baixa especificidade para os substratos redutores, quando comparada com sua alta preferência pelo O₂ como substrato oxidante. A oxidação dos substratos redutores envolve a formação de radicais livres, após a transferência de um elétron para a lacase. O radical pode sofrer uma oxidação catalisada pela lacase - ou seja, originar quinonas a partir de fenóis - ou reagir por rotas não enzimáticas (por exemplo, polimerização) (ACUNZO, F. D' *et al.*, 2002).

Segundo LI *et al.* (1999) uma unidade da molécula de lacase produz uma absorvância de 0,001 por minuto em pH 5,5 a 25 °C, usando a seringaldazina como substrato. A enzima é ativa em uma escala de pH de 4 a 7, com um ótimo em pH 6, e sendo inativa em pH acima de 7,5. Observa-se a melhor atividade enzimática, em temperaturas entre 25-60 °C, com temperatura ótima de 50 °C e perda da atividade enzimática a temperaturas acima de 60 °C.

ROSATTO *et al.* (2001), demonstraram que a resposta amperométrica para compostos fenólicos, utilizando biosensores a base de lacase, é muito estável, permitindo a utilização de análises em fluxo com uma frequência superior a 40 amostras/h sem nenhuma queda na atividade. Esta também foi utilizada para se determinar uma série de aminofenóis e catecolaminas.

XU *et al.* (2000), fazendo uso da alta termo-estabilidade da lacase, desenvolveram um biosensor capaz de operar na faixa de 35-55 °C. Este sensor também pôde ser operado em uma ampla faixa de pH (4 - 8) e apresentou reprodutibilidade durante quatro meses.

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp foi selecionado como ligninolítico, apesar de não produzir LiP e MnP, porém esse microrganismo é produtor constitutivo de lacases. A produção de lacases também pode ser estimulada pela adição de detergentes e surfactantes não-iônicos como o Tween-20 e o Tween 80 (GIESE *et al.*, 2004).

As lacases têm sido amplamente utilizadas nas indústrias de papel, em processos de remoção de xenobióticos, na oxidação de compostos fenólicos do vinho, no uso de eletrodos de enzimas imobilizadas, visando medir o conteúdo fenólico de soluções aquosas (sucos de frutas, chás), entre outras aplicações (CHO *et al.*, 2004).

3.6.2. Lignina Peroxidase (EC 1. 11. 1. 14)

As ligninas peroxidases são isoenzimas produzidas por fungos que degradam madeira. Essas hemoproteínas, de aproximadamente 37 kDa, são semelhantes às peroxidases vegetais em estrutura e mecanismo, e utilizam peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para oxidar uma variedade de substratos (**Figura 8b**). Algumas das características que distinguem essas enzimas de outras oxidoreduções devem-

se ao seu alto potencial redox e a sua atividade ótima em pH ácido (CHO *et al.*, 2004).

Ainda, segundo CHO *et al.* (2004), os substratos alvo de sua degradação incluem compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos. Os compostos fenólicos são oxidados, originando produtos semelhantes aos produzidos pelas peroxidases clássicas. Já os metoxibenzenos não fenólicos são exclusivamente catalisados pela lignina peroxidase. A oxidação desses substratos para produzir radicais arila pode resultar em dimetoxilação e hidroxilação de anéis aromáticos e cadeias laterais.

A lignina peroxidase cataliza a oxidação de substratos utilizando um potencial de redução maior do que 1,3 V. A enzima tem sido usada para oxidar monômeros, dímeros e trímeros de lignina, assim como compostos aromáticos policíclicos como o benzopireno (LI *et al.*, 1999).

A atividade da lignina peroxidase é medida por meio da oxidação do álcool veratrílico, que corresponde a um aldeído, usando espectrofotômetro a uma absorvância de 310 nm. Uma unidade forma 1 μmol de veratraldeído por minuto, em pH de 2,5 e 25 °C. A máxima atividade enzimática é medida em pH 2,5, embora a enzima seja relativamente instável nesse pH. A atividade decresce com a diminuição de íons H^+ , sendo o pH de 6,5 inibidor, e o de 3,5 aquele em que a enzima apresenta-se estável. A enzima também suporta elevadas temperaturas, com um limite de 60 °C, e atividade máxima ocorrendo por volta de 45-50 °C. A lignina peroxidase de *Phanerochaeta chrysosporium*, por exemplo, contém pelo menos seis diferentes isoenzimas. A enzima é armazenada em solução de acetona a 15 %, sendo altamente estável a temperatura ambiente. A atividade específica do produto extraído e purificado é superior a 25 unidades/mg (LI *et al.*, 1999).

3.6.3. Manganês Peroxidase (MnP)

A MnP atua como fenoxidase exclusivamente em substratos fenólicos, utilizando $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ como par redox intermediário (**Figura 8c**). Foi descoberta a partir de cultivo de *P. chrysosporium* e é uma glicoproteína de massa molar de 45-47 KDa que possui um grupo prostético heme, sendo também, dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{+2} . Apresenta formas múltiplas e na presença do peróxido de hidrogênio, catalisa a clivagem $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$, oxidações $\text{C}\alpha$ e clivagens de ligações arilal-

quílicas de fenóis siringílicos diméricos β -1 e β -O-4 (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

CAZAU *et al.* (1992), sugerem que a degradação da lignina pode também ser conduzida por mecanismos enzimáticos relacionados à produção de manganês peroxidase. Para tanto, células de *Corynebacterium*, foram cultivadas em meio contendo uma solução aquosa de 50 mg/L de 4-nitrocatecol (4-NC) em pH entre 6 e 7, onde foi possível identificar o produto da biotransformação do 4-nitrofenol (4-NF) que consistiu do 4-NC.

3.6.4. Tanase (EC. 3. 1. 1. 20)

A tanino-acil-hidrolase (TAH), ou simplesmente tanase, é uma enzima extracelular induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras. Enzimas extracelulares são de grande importância, pois são facilmente extraídas e dispensam métodos de extração mais dispendiosos. Foi primeiramente estudada por KNUDSON (1913) em cepas de *Aspergillus niger*. Este identificou seu papel na degradação de galotaninos, observando que sua síntese é induzida por metil galato e ácido tânico, e não por outros fenóis simples, como ácido gálico, ácido salicílico, ou metil salicilato.

A tanase de fonte animal pode ser extraída do intestino bovino e das mucosas dos ruminantes. Está presente em muitas plantas ricas em taninos como *Terminalia chebula*, *Caesalpinia coriaria*, *Anogeissus latifolia*, *Cassia fistula*, *Acacia arabica*, principalmente em suas frutas, folhas, galhos e cascas. Porém, o meio microbiológico é a fonte mais importante de obtenção da tanase, uma vez que as enzimas produzidas desta forma são mais estáveis do que aquelas obtidas por outros meios. Além disso, os microrganismos podem produzir tanase em altas quantidades e de maneira contínua, com conseqüente aumento de rendimento (MACEDO *et al.*, 2005).

De acordo com estudos de BANERJEE *et al.* (2001) e HELBIG (2000), a tanase é uma enzima que catalisa a hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, produzindo glicose e ácido gálico (**Figura 9**).

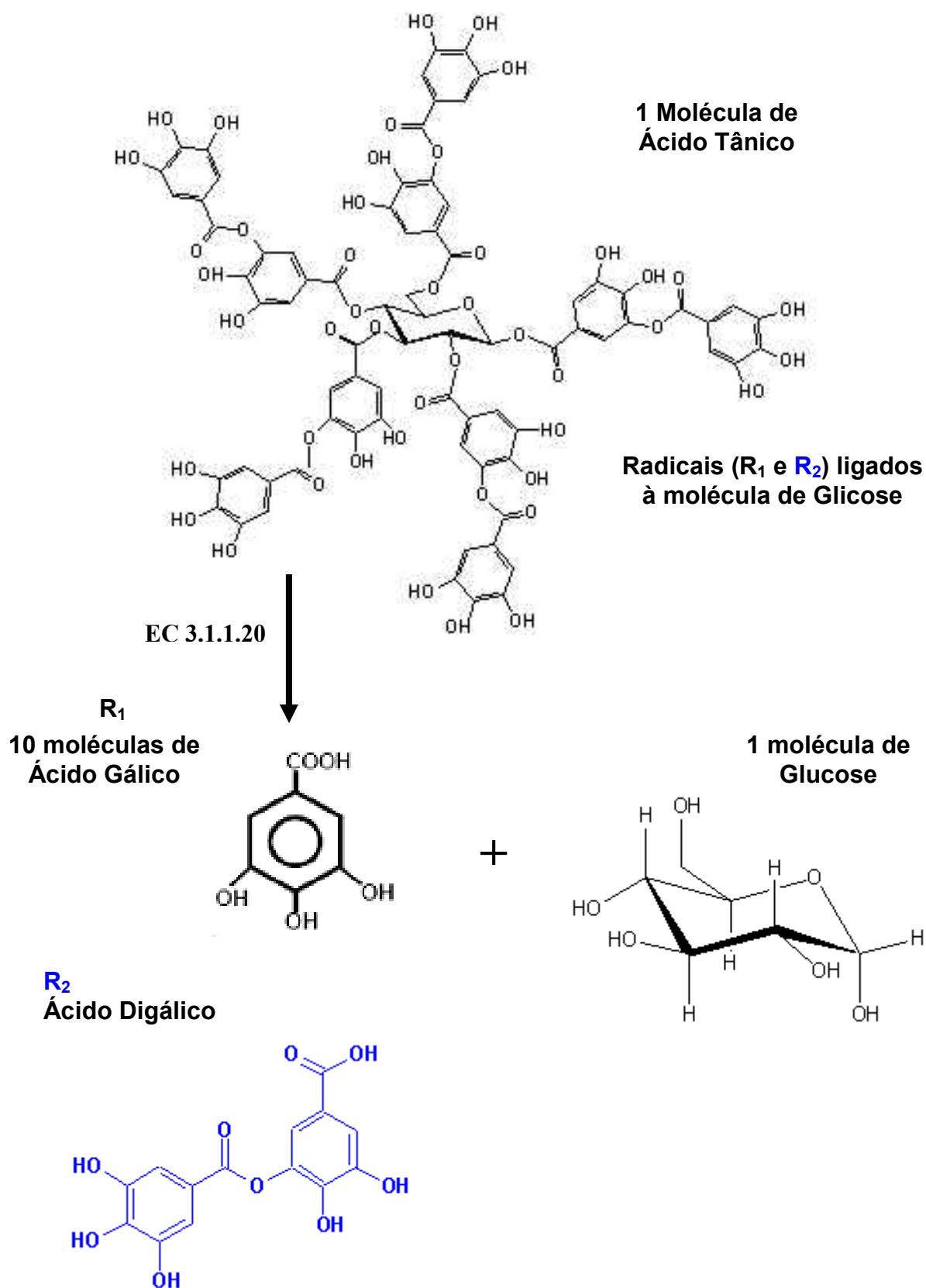


Figura 9. Hidrólise do ácido tânico pela enzima tanino acil hidrolase (E.C. 3.1.1.20) gerando 9 moléculas de ácido gálico e uma de glucose: Radicais substituintes; R_1 = ácido gálico e R_2 = ácido digálico. (Fonte: AGUILAR *et. al.*, 1999).

A Tanase tem grande potencial de aplicação nas indústrias de alimentos e bebidas (como cervejas, chás instantâneos, vinhos e refrigerantes a base de café), cosméticos, farmacêutica e indústria química, assim como nos processos de tratamentos de couro e de seus efluentes.

BARTHOMIEUF *et al.* (1994), trabalhando com *Aspergillus niger*, observaram que a tanase é uma glicoproteína com peso molecular de 186 kDa, consistindo de 43 % de carboidratos. Além disso, verificou-se que esta enzima é específica em resíduos galoi de ésteres galoi, hexahidroxidifenoi e outros resíduos de elagitaninos. Entre estes, os resíduos galoi são os mais facilmente hidrolisáveis por esta enzima a uma temperatura de 35 °C (SCALBERT, 1991). O pH ótimo varia de 5-6, sendo a enzima instável em pH acima de 6 (IIBUCHI *et al.*, 1972).

LEKHA & LONSANE (1997) avaliaram a cinética de imobilização da tanase, observando sua estabilidade e propriedades. Para tanto, esta enzima foi imobilizada em alginato em concentrações variando de 1 % a 3 %. A reação foi realizada incubando-se as esferas de tanase-alginato em ácido tânico (0,02 %). A concentração de ácido gálico produzido foi mensurada pela formação de um complexo róseo entre rodamina e ácido gálico. Para a enzima livre o melhor rendimento foi obtido empregando-se 50 µL de tanase/100 mL de ácido tânico. A concentração de 2 % de alginato foi a que promoveu uma melhor atividade da enzima. Embora não tenha havido crescimento de microrganismos, observou-se o inchaço das esferas quando estas foram estocadas em água e submetidas à hidrólise do ácido tânico.

Biodegradação de Ácido Gálico

O ácido gálico é um ácido carboxílico aromático que se apresenta na forma de cristal branco com ponto de fusão entre 235-240 °C. Possui ampla aplicação, principalmente, na indústria química. O mercado internacional de galatos (ácido gálico e seus derivados) está estimado em 900 ton / ano, sendo que os Estados Unidos consomem quantidades cada vez mais elevadas desse produto. Inicialmente, o ácido gálico era extraído diretamente de folhas, raízes, frutos e sementes de vegetais como: *Quercus aegiiops*, *Carpinus betulua*, *Prunus virginiana*, *Caesalpinia coriaria*, *C. prunifolia*, *Mangifera thymifolia*, entre outros (BHAT, 1998).

Devido ao caráter glicosídico e de fácil decomposição da molécula de ácido gálico, este, atualmente, pode ser obtido por processos sintéticos e extrativos. Os processos sintéticos utilizam compostos alifáticos ou aromáticos, tais como: glicerol,

ácido di-hidroxi-nalônico e ácido propano-1,2,3 tricarboxílico e ácido di-iodo-salicílico, entre outros. Por outro lado, os processos extrativos requerem a hidrólise de taninos obtidos de fontes vegetais. Esta hidrólise pode ser realizada por via fermentativa, hidrólise enzimática e por tratamento químico, com ácidos e álcoois. Todavia, o ácido gálico pode ser nocivo, se inalado, ingerido ou absorvido pela pele, causando irritação nos olhos, pele, membranas mucosas e aparelho respiratório.

Dentre os derivados mais comuns de ácido gálico podemos citar o pirogalol, um poli-hidroxibenzeno, cujas principais aplicações comerciais estão na indústria farmacêutica, de pesticidas e de corantes; o propil galato, éster propílico do ácido gálico, bastante utilizado como antioxidante em alimentos e cosméticos, atuando, particularmente, na prevenção de deterioração e rancidez de gorduras e óleos em concentrações iguais a 0,001 a 0,02 %. Outros ésteres de ácido gálico como o dodecil - etil - e octil - galato, também tem sido utilizados com a mesma finalidade (MAKKAR *et al.*, 2000).

Monômeros de ácido gálico são facilmente utilizados como substratos em reações oxidativas de ácidos alifáticos simples que, em seguida, participam do ciclo do ácido cítrico. Antes da clivagem do anel, o ácido gálico é convertido em pirogalol pela galato descarboxilase. A reação aeróbica dos compostos flavonóides, derivados dos taninos condensados, ocorre através de duas vias metabólicas. Na primeira, a degradação é marcada por uma clivagem de anéis heterocíclicos de catequina, um flavan-3-ol, ácido carboxílico floroglucinol e ácido protocatecólico. O ácido carboxílico floroglucinol, por descarboxilação de anéis aromáticos e várias oxigenases, finalmente forma β -cetoadipato, um ácido alifático, através de intermediários como floroglucinol, resorcinol, hidroxihidroquinona e maleil acetato. Na segunda via, o ácido protocatecólico também é convertido em β -cetoadipato através de cis β -carboxi, cis-muconato e das vias metabólicas do catecol. Quercetina e flavanol são quebrados em floroglucinol e 3,4-dihidroxifenil acetato por meio da via de degradação secundária dos flavonóides. A forma final, β -cetoadipato não é mais degradada (O' DONOVAN & BROOKER, 2001).

A decomposição anaeróbica de ácido gálico, monômero dos taninos hidrolisáveis, ocorre por diferentes mecanismos. O primeiro passo, é a descarboxilação do ácido gálico para formar pirogalol que, em seguida, é isomerizado em floroglucinol por meio da pirogalol-floroglucinol isomerase, e em dihidrofloroglucinol pela floroglu-

cinol reductase. O dihidrofloroglucinol é, então, convertido em 3-hidroxi-5-oxohexanoato (HOHN) pela dihidrofloroglucinol hidrolase. A seguir, o HOHN é degradado por diferentes vias metabólicas anaeróbias em sistemas de rumimantes. Em condições anaeróbias, este é convertido em 3,5-dioxohexanoato (triacetato) por HOHN-desidrogenase, e finalmente em três moléculas de acetil-CoA via triacetil-CoA, através de uma seqüência enzimática de triacetil-CoA transferase, triacetato β -cetotiolase, acetoacetil-CoA β -cetotiolase, fosfotransacetilase e acetato quinase (BHAT *et al.*, 1998).

Em sistemas ruminantes, contudo, algumas bactérias podem degradar ácido gálico, pirogalol, floroglucinol e quercetina em acetato e butirato (**Figura 10**). Já o HOHN, um derivado enzimático da HOHN-CoA transferase, é transformado em acetato e butirato através de uma seqüência de reações enzimáticas catalizadas pela β -hidroxibutiril-CoA desidrogenase, butiril-CoA desidrogenase, acetil-CoA acetil transferase, enoil-CoA hidrase, fosfato acetiltransferase e acetato quinase. O resorcinol, que é metabolizado anaerobicamente em acetil-CoA, primeiro por redução e em seguida por hidrólise a um ceto-ácido de seis carbonos, é então excretado como um conjugado fenólico urinário dos ruminantes (O' DONOVAN & BROOKER, 2001).

Linhagens microbianas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Klebsiella* cresceram em meio contendo ácido tânico e ácido gálico, sendo capazes ainda de degradar compostos fenólicos naturais como catecol ou catequina. Outras bactérias descritas como degradadoras de taninos são: *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*, *Cellulomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* e *Pseudomonas* (BHAT *et al.*, 1998).

Em *Aspergillus niger*, o ácido gálico, monômero fenólico dos taninos hidrolisáveis, é oxidado e clivado por uma oxigenase para formar um ácido tricarbóxico instável. Este, por sua vez, é descarboxilado por uma descarboxilase oxidativa originando o ácido cis-aconítico que, em seguida entra no ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Em *A. niger*, o pirogalol, derivado descarboxilado do ácido gálico, é também oxidado e clivado em ácido cis-aconítico pelo mesmo mecanismo observado para o ácido gálico. Todavia, em *A. flavus*, observou-se que a degradação do ácido gálico é mais eficiente, pois gera ácido oxaloacético e, posteriormente, ácido pirúvico através de intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (BHAT *et al.*, 1998).

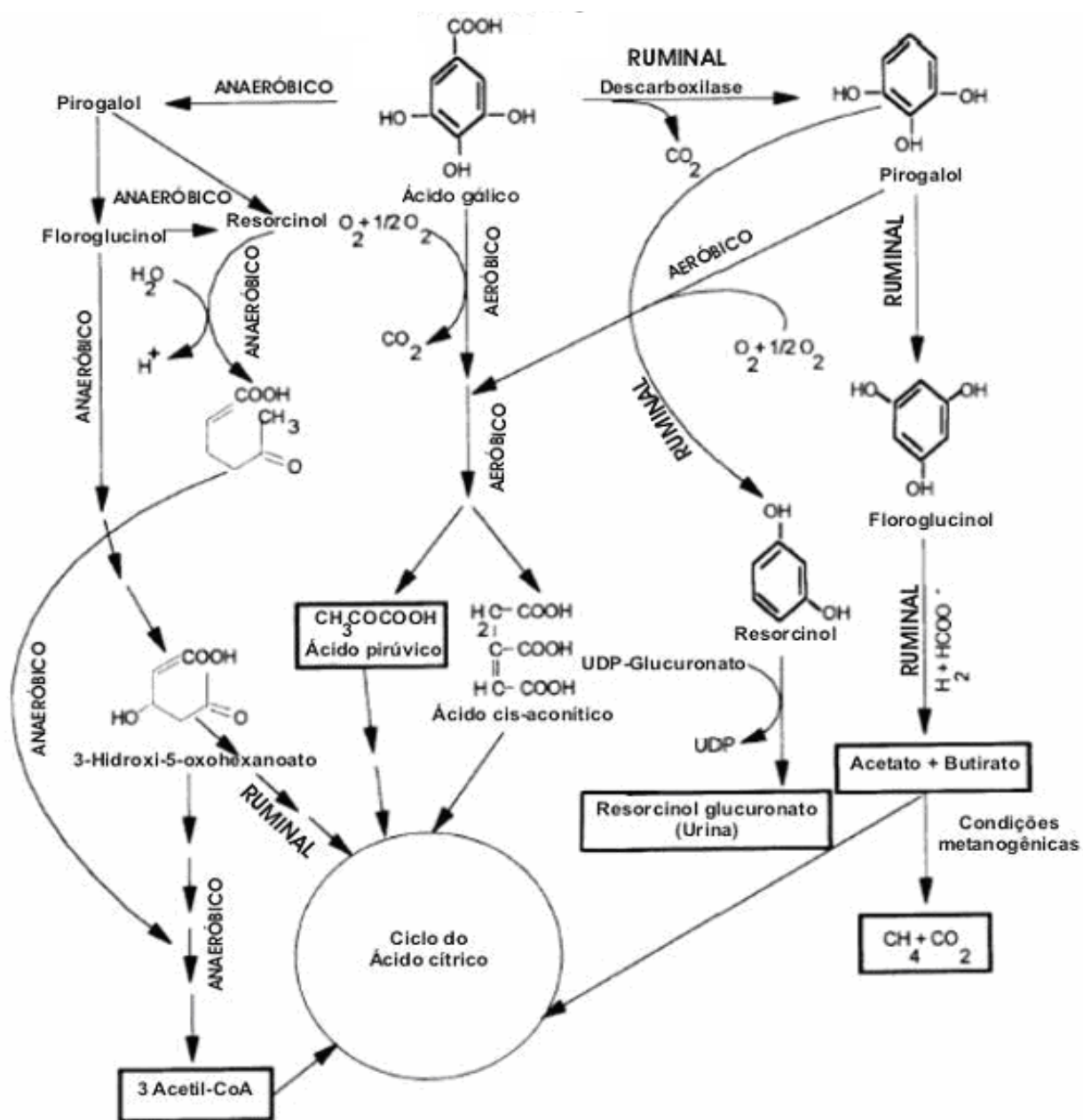


Figura 10. Vias metabólicas de degradação de ácido gálico por bactérias presentes na flora natural de animais ruminantes. (Fonte: BHAT *et al.*, 1998).

Dentre os derivados mais comuns de ácido gálico podemos citar o pirogalol, um poli-hidroxibenzeno, cujas principais aplicações comerciais estão na indústria farmacêutica, de pesticidas e de corantes; o propil galato, éster propílico do ácido gálico, bastante utilizado como antioxidante em alimentos e cosméticos, atuando,

particularmente, na prevenção de deterioração e rancidez de gorduras e óleos em concentrações iguais a 0,001 a 0,02 %. Outros ésteres de ácido gálico como o dodecil - etil - e octil - galato, também tem sido utilizados com a mesma finalidade (MAKKAR *et al.*, 2000).

3.7. Determinação do teor de taninos

Os taninos têm sido quantificados por diversos tipos de ensaios, como precipitação de proteínas ou metais e por métodos colorimétricos, sendo esses últimos mais comuns. Alguns ensaios colorimétricos são usados para quantificar grupos de taninos específicos, como no caso de taninos hidrolisáveis, onde se detecta somente os grupos galoil e hexaidroxidifenóis (HHDP), muito embora estes métodos sejam amplamente usados para analisar taninos de uma maneira geral (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Entre os métodos colorimétricos, o método de Folin-Denis não faz distinção entre compostos fenólicos e outros materiais redutores ou antioxidantes, podendo reagir, por exemplo, com o ácido ascórbico, formando precipitados que interferem na leitura espectrofotométrica. Este método foi posteriormente aperfeiçoado e modificado para o Folin-Ciocalteu. Estudos realizados para avaliação de métodos quantitativos nas folhas de coníferas, usando Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu, revelaram que este último apresenta maior sensibilidade para polifenóis, usando como solvente acetona a 50 %. Os autores mostraram, ainda, que o método Azul da Prússia apresenta elevada dependência do tempo de reação, comparado ao Folin-Ciocalteu (OSAWA & NISHITANI, 2003).

Outras metodologias utilizadas na determinação de taninos são o ensaio com butanol - HCl, específico para taninos condensados, apresentando uma cor que varia com a estrutura química do composto e, o ensaio vanilina que na presença de HCl, reage como os compostos tânicos, originando um complexo avermelhado. O sucesso deste método depende do tipo de solvente usado na extração do tanino, da concentração e natureza do ácido, do tempo da reação, temperatura e concentração da vanilina. A limitação deste método deve-se a reatividade de subunidades de polímeros de taninos, o que caracteriza a falta de especificidade, para taninos condensados (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003).

Outro método empregado na identificação de taninos hidrolisáveis é o ensaio com KIO_3 que reage com galotaninos e elagitaninos, produzindo um complexo de coloração rosa. Quando usado para misturas complexas de taninos este ensaio não é viável por formar uma reação marrom antes da rosa além de ser extremamente dependente da temperatura e do tempo de reação. Tem-se, também o reagente de NaNO_3 enzimático que é específico para elagitaninos, sendo indicado para avaliações biológicas entre estes (MONDAL *et al.*, 2001).

4. METODOLOGIA

4.1. Coletas das amostras

Em recipiente asséptico, foram coletadas dez amostras do lodo (cerca de 50 g) às margens da lagoa de decantação A (**Figura 11**), da estação de tratamento de efluentes (ETE) da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, situada no município de Coruripe–AL (na segunda semana de moagem da safra 2004/05). Já na segunda semana da moagem da safra 2005/2006, foram coletadas 10 amostras das águas residuárias (lavagem de cana, pisos, gases e cinzas) dessa lagoa, a uma profundidade de 30 cm da superfície.

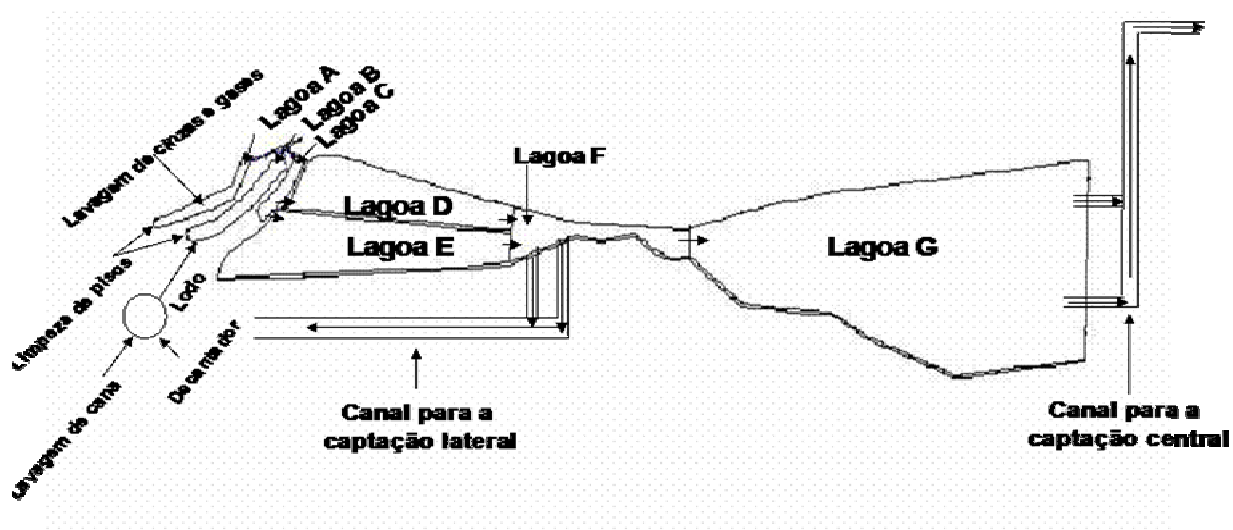


Figura 11. Esquema das lagoas de tratamento do efluente gerado na matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool.

Na mesma data, dez amostras (cerca de 50 g) do bagaço de cana armazenado em área ao lado da unidade industrial dessa empresa (a cerca de 1,5 m da base da pirâmide acumulada, em diferentes pontos), também foram coletadas.

Após a coleta, as amostras foram transportadas em caixa de isopor contendo gelo, para o “Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental” (LBPVMA), do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (AL), onde foram combinadas em um único recipiente para o mesmo tipo de material e armazenadas temporariamente em refrigerador.

4.2. Isolamento dos Microrganismos

Para o isolamento de microrganismos, num delineamento totalmente casualizado, com 3 réplicas por amostra e 3 repetições por tratamento, foram usadas placas de Petri contendo meio Ágar-caldo de cana 25 % (ACC), preparado conforme item 4.3.1.2.

Para isto, suspendeu-se, separadamente, 5 g da amostra combinada de lodo das margens das lagoas de decantação da ETE, 5 g de bagaço de cana e 5 mL da amostra de águas da lagoa A, em 50 mL em meio caldo nutriente (item 4.3.1.1). Esse material foi homogeneizado em agitador orbital Banho-Maria a 120 rpm por 2 h a 40 °C.

Em seguida, realizaram-se diluições em água destilada estéril (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), e alíquotas de 100 µL de cada diluição das suspensões de amostras foram inoculadas em ACC contido em placas de Petri e tubos de ensaio e incubadas a 30 ± 1 °C no escuro. Após 18, 24 e 48 h de crescimento, as colônias originadas do isolamento foram individualmente transferidas para placas de Petri contendo meio AN, para posterior caracterização bioquímica e microscópica.

4.3. Meio para Isolamento, Manutenção e Crescimento

4.3.1. Ágar Nutriente (AN)/Caldo Nutriente (CN)

Preparou-se o meio ágar nutriente, descrito por NEDER (1992), cuja composição consistiu em: 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g de cloreto de sódio, 15 g de ágar em 1 L de água destilada. A seguir, a solução foi autoclavada (120°C, 1 atm por 20 min) e vertida em placas de Petri e tubos de ensaio. Realizou-se, então, a inoculação dos microrganismos em estrias, com o auxílio da alça de platina, e incubação das culturas por um período de 24-48 h a 30 ± 1 °C (escuro),

quando para uso imediato nos ensaios, ou por até 120 h nas mesmas condições e transferência seguinte para refrigerador ($4 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro), visando sua manutenção por até 3 meses.

4.3.2. Ágar Caldo de Cana (ACC)

A 20 g de ágar adicionou-se 1 L de caldo de cana diluído (25%) em água destilada. O meio foi esterilizado, vertido em placas de Petri e tubos de ensaios, inoculado e incubado conforme o item 4.3.1.

4.3.3. Ágar Sabouraud (A.S)

Este meio foi usado para manter culturas fúngicas. Para o crescimento dos microrganismos foram preparados 500 mL do meio (sintético). O meio foi autoclavado (120°C , 1 atm, 20 min). Em seguida o meio foi vertido em placas e tubos e após a solidificação do meio, as placas e tubos foram inoculados incubados a temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 7 dias, as culturas foram armazenadas em refrigerador para utilização em experimentos futuros do laboratório ou repicadas para nova incubação e re-cultivo semanal de todos os fungos da micoteca do LBPVMA.

4.3.4. Ágar Dextrose Batata (BDA)

Para a preparação do meio utilizou-se 100 g de batata picada, 10 g de dextrose e 10 g de ágar para 500 mL de água destilada. Primeiramente aqueceu-se a água destilada com a batata picada, deixando-a por 15 minutos após a fervura. Em seguida filtrou-se o caldo com uma peneira de aço e verificou-se a quantidade obtida para completar os 500 mL e só então adicionou-se os outros reagentes. O meio foi autoclavado (120°C , 1 atm, 20 min). Após a esterelização o mesmo foi vertido em placas de Petri e solidificado. Só então, inoculado com os isolados fúngicos e incubados a 30 ± 1 , no escuro. Após 7 dias, as culturas foram armazenadas em refrigerador para utilização em experimentos futuros do laboratório ou repicadas para nova incubação e re-cultivo semanal de todos os fungos da micoteca do LBPVMA.

4.4. Caracterização Morfo - Bioquímica e Fisiológica dos Microrganismos

4.4.1. Soluções Diferenciais para Caracterização dos Microrganismos

1. Solução de Cristal de Violeta – Gram

Misturou-se uma solução A (4 g de cristal de violeta em 20 mL de etanol 95%) a uma solução B (0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL água destilada), em partes iguais. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenou-se a temperatura ambiente (NEDER, 1992).

2. Solução de Safranina – Gram

Dissolveu-se 0,5 g de safranina a 100 mL de álcool a 50 %. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenou-se a temperatura ambiente (NEDER, 1992).

3. Solução de Verde de Malaquita

Dissolveu-se 1 g de verde de malaquita em 20 mL de água destilada. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenou-se a temperatura ambiente (NEDER, 1992).

4. Álcool Acidulado

Dissolveu-se 3 g de ácido clorídrico em 100 mL de álcool (95⁰) a 95 %. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenou-se a temperatura ambiente (NEDER, 1992).

5. Fucsina de Ziehl-Neelsen

Misturou-se na proporção de 1:1 as soluções A (3 g de fucsina básica a 10 mL de álcool 95^o) e B (5 g de fenol fundido a 95 mL de água destilada). Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenou-se a temperatura ambiente (BIER, 1976).

6. Solução Vermelho de Fenol

Diluiu-se 0,2 g de vermelho de fenol em 100 mL de água destilada. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenada a temperatura ambiente (SILVA, 1996).

7. Solução Vermelho Congo

Dissolveu-se 0,1 g de vermelho congo em 100 mL de água destilada. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenada a temperatura ambiente.

8. Solução de Lugol

Dissolveu-se 1 g de iodo, 2 g de iodeto de potássio em 300 mL de água destilada. Os reagentes foram homogeneizados em almofariz com auxílio do pistilo, adicionando-se água destilada na nas proporções de 1, 5 e 10 mL. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenada a temperatura ambiente (SILVA, 1996).

9. Solução Vermelho de Metila

Solubilizou-se 0,2 g de vermelho de metila em 95 % de etanol (60 mL) e completou-se o volume para 100 mL com água destilada. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenada a temperatura ambiente (SILVA, 1996).

10. Reagente de Kovacs para o Teste de Indol

Dissolveu-se 5 g de *p*-dimetilaminobenzaldeido em 75 mL de álcool butílico e 25 mL de ácido clorídrico. Em seguida transferiu-se a solução para frasco âmbar e armazenou-se a 4 °C durante 5 dias (SILVA, 1996).

11. Revelador para o Teste de Redução de Nitrato

Preparou-se separadamente as soluções A (0,6 % de N,N,-dimetil- α -naftilamina para 200 mL de ácido acético 5 N) e B (1 g de ácido sulfanílico para 125 mL de ácido acético 5 N). Em seguida, transferiu-se as soluções para frascos âmbar e armazenou-se as mesmas a 4 °C (SILVA, 1996).

4.4.2. Análise das Características Morfológicas

1. Características das Culturas em AN

Em cada cultura sólida em meio de AN em triplicata foram avaliadas características como: tamanho (5 mm = grande, 2-5 mm = média, 2 mm = pequena), forma

(circular, irregular, rizóide, filamentosa, puntiforme, filiforme, espalhada, arborescente, equinulada ou difusa), elevação (côncava, convexa, elevada, ondulada, protuberante ou achatada), presença de bordas (lisas, laceradas, lobadas, filamentosas ou onduladas), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa ou rugosa), brilho (transparente, translúcida, opaca), coloração (incolor ou pigmentada de que cor), aspecto, (viscosa, úmida, membranosa ou leitosa), quantidade (abundante, moderada ou escassa) e mobilidade das colônias de acordo com NEDER, 1992.

2. Características Estruturais - Coloração de Gram

Empregou-se a técnica de coloração de Gram descrita por NEDER (1992) e esquematizada na **Figura 12**, para a identificação das formas e da constituição da parede celular das bactérias e leveduras.

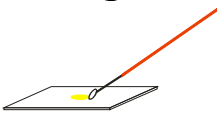
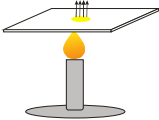
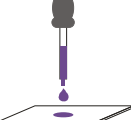
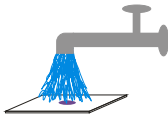
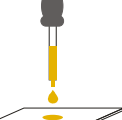

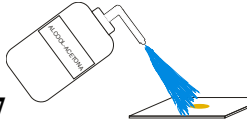
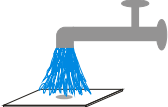
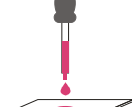
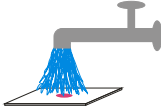
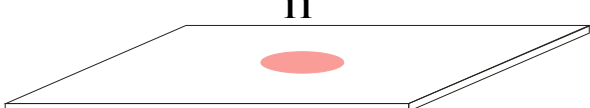
				
Preparo do esfregaço a partir de colônia jovem (24 h)	Fixação da Lâmina utilizando calor.	Cristal violeta Corante. 1 minuto.	Lavagem Remover excesso de corante com água	Lugol (Mordente) Forma complexo com o Cristal violeta 30 segundos.
				
Lavagem Remove excesso de Lugol.	Álcool 95% Descoloração.	Lavagem Remove excesso do solvente.	Safranina Corante secundário 30 segundos.	Lavagem Remove excesso de corante.
		Microscopia Exame da lâmina ao microscópio óptico (Aumento de 640X, ou 1000 X com imersão).		

Figura 12. Esquema da técnica de coloração de Gram utilizada para análise microscópica dos isolados.

Assim, sobre uma lâmina de vidro previamente asséptica e deslipidizada, preparou-se o esfregaço, a partir de colônias jovens (24 h) de cada cultura isolada. Procedeu-se, então, a coloração, utilizando a solução de cristal de violeta (item 4.4.1.1) por 1 min, seguida pela remoção de seu excesso em água corrente e a coloração com a solução de lugol (item 4.4.1.8) por 30 s. Em seguida, descoloriu-se o esfregaço

ço com álcool a 95 % e, posteriormente, aplicou-se nele o contra-corante safranina (item 4.4.1.2) por 30 s, lavando-se o esfregaço em água corrente novamente. A secagem de cada lâmina foi feita com papel de filtro, para posterior observação em microscópio óptico com o aumento de 640 X (ou 1000 X com óleo de imersão). As células coradas em violeta escuro foram consideradas Gram-positivas (G+), enquanto as coradas em vermelho foram consideradas Gram-negativas (G-). Para cada microrganismos efetuou-se o preparo de 3 lâminas com esfregaços (VERMELHO *et al.*, 2006).

3. Confirmação da Coloração de Gram

Depositou-se 10 µL de uma solução de KOH a 3 % (p/v) sobre lâmina de vidro asséptica, e com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada e resfriada, homogeneizou-se parte de uma cultura jovem (24 h de crescimento) durante 15 segundos, observando a ocorrência da formação de um fio viscoso da emulsão microbiana (Gram negativa). A cultura é considerada Gram-positiva se a emulsão ficar aquosa e não aderir à alça, conforme descrito por SUSLOW, SCHROTH & ISAKA, 1982.

4. Coloração de Endosporos

Utilizou-se o esfregaço de células corado com solução de verde de malaquita (item 4.4.1.3) fixado aquecendo-se a lâmina até o desprendimento de vapores sem deixar ferver ou secar. Posteriormente, lavou-se a lâmina com água corrente e tratou-se a mesma com uma solução de safranina (item 4.4.1.2) durante 20-30 s. Após lavagem e secagem, a lâmina foi examinada ao microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão (NEDER, 1992).

5. Bactérias Alcool-Ácidos Resistentes

Preparou-se o esfregaço conforme item 4.4.4.1 seguindo-se a coloração com fucsina de Ziehl (item 4.4.1.5.) e fixação até emissão de vapores. O corante foi esgotado e o esfregaço descolorido com álcool acidulado (4.4.1.4). Após 30 s, lavou-se o mesmo em água corrente e corou-se, novamente com solução de azul de metileno de Loeffler. Efetuou-se a secagem de cada lâmina assim tratada, com papel de filtro, para posteriormente observação em microscópio óptico com o aumento de 640 X.

As culturas de células consideradas álcool-ácidos resistentes apresentam coloração em vermelho (BIER, 1976).

4.4.3. Características Bioquímicas dos Isolados

Todos os testes foram em triplicada para cada microrganismo.

1. Meio Eosina Azul de Metileno (EMB)

Adicionou-se 36 g de meio EMB comercial (Biolab: pH= 7,2-7,6; 25 °C) em 1 L de água destilada. Esse meio contém a seguinte composição por litro de água: 10 g de peptona, 10 g de lactose, 2 g de K₂HPO₄, 0,4 g de eosina amarela, 0,065 g de azul de metileno, 15 g de agar (VERMELHO *et al.*, 2006).

Após a autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min) e resfriamento (45 - 50 °C), o meio foi vertido em placas de Petri ou tubos, solidificado e inoculado com células jovens (24 h de crescimento), sendo as culturas incubadas a 30 ± 1 °C, no escuro.

2. Meio Columbia

Acrescentou-se 42,5 g do meio Columbia comercial desidratado (Biolab-pH = 7,1-7,5; 25 °C) em 1 L de água destilada. Em seguida, aqueceu-se (1 min), agitando com frequência até a completa dissolução. Após autoclavagem (120 °C / 20 min, 1 atm), o meio foi vertido em placas de Petri, solidificado, inoculado em estrias com auxílio de alça de platina e incubado por 24 h (30 ± 2 °C, escuro). Este meio é utilizado para identificação de bactérias Gram-positivas fastidiosas, conforme TORTORA (2002).

3. Meio “Triple Sugar Iron”-Ágar (T.S.I.)

Suspendeu-se 59,4 g do meio TSI comercial desidratado (Biolab – pH = 7,1-7,5; 25 °C) em 1 L de água destilada. Após autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min) e resfriamento a 45-50 °C, distribuiu-se assepticamente o meio de cultura em tubos de ensaio estéreis. Após a inoculação dos microrganismos em estrias com o auxílio da alça de platina, e incubação (30 ± 1 °C, escuro) observou-se a acidificação, indicando a utilização de carboidratos, ou alcalinização, consumo de proteína do meio, através da viragem do indicador vermelho de fenol presente nesse meio (**Figura 13**).

4. Meio Citrato-Simons

Acrescentou-se 0,75 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de glucose, 0,1 g de cloridrato de cisteína, 0,125 g de extrato de levedura, 0,25 g de KH_2PO_4 , 1,25 g de NaCl, 0,003 g de vermelho de fenol e 3 g de agar a 250 mL de água destilada, conforme VERMELHO *et al.* (2006).

Em seguida, aqueceu-se (1 min), agitando com frequência até a completa dissolução. Após autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min), o meio foi vertido em tubos, solidificado de forma inclinada, inoculado em estrias com auxílio de alça de platina e incubado por 24 h (30 ± 1 °C, escuro). A utilização do citrato como fonte de energia gera grande quantidade de gás carbônico, que reage com o sódio e a água do meio, produzindo compostos alcalinos, elevando o pH do meio e mudando sua cor de verde para azul (**Figura 13**).

5. Meio SIM (Sulfito–Indol–Motilidade)

Suspendeu-se 30 g do meio comercial desidratado (Merk KGaA – pH = $7,3 \pm 2$; 25 °C) em 1 L de água destilada. Após autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min), verteu-se o meio em tubos e após solidificação, os mesmos foram inoculados com auxílio de alça de platina perfurando o ágar. Após 24 h de incubação a 30 ± 1 °C, no escuro, o crescimento dispersos das colônias, a partir do ponto de inoculação em direção às paredes do tubo de ensaio, indicou motilidade (**Figura 13**), conforme VERMELHO *et al.* (2006).

6. Meio Motilidade, Manitol, Redução de Nitrato

Para determinação da fermentação de manitol foi utilizado o meio sintético Caldo Vermelho de Fenol-Manitol que contem 1 g de extrato de carne, 10 g de peptona, 5 g de cloreto de sódio e 0,018 g de vermelho de fenol acrescido de 3,5 g de ágar e 1 g de nitrato de potássio para 1 L de água destilada. O meio foi autoclavado (120°C, 1 atm, 15 min), vertido em tubos esterilizados, resfriado e inoculado com uma picada até o fundo, com alça de platina. Em seguida, as culturas foram incubadas (12-24 h a 30 ± 2 °C no escuro) e o microrganismo foi considerado móvel quando o meio tornou-se turvo, e imóvel quando cresceu apenas na linha de inoculação. Da mesma forma, a degradação de manitol foi considerada positiva quando houve alteração da cor do meio de vermelho para amarelo. Para revelação da redução de nitrato foram depositadas 3 gotas do Reagente de Griess-Ilosvay's sobre as culturas

[composto pela solução A (solução acética de ácido sulfanílico) e pela solução B (solução acética de α -naftillamina)]. Mantendo-se a cor da superfície do meio inalterada, o resultado foi considerado como negativo, enquanto que a cor roxa indicou um resultado positivo.

7. Meio Acetato

Foi utilizado meio Acetato sintético (Merck) composto por: 5 g cloreto de sódio; 0,2 g sulfato de magnésio; 1 g sulfato de amônio; 1 g sulfato de potássio; 2 g acetato de sódio; 0,08 g azul de bromotimol e 12 g de ágar para cada 1 L de água destilada. O meio foi autoclavado (120 °C, 1 atm, 20 min) e vertido em tubos, sendo solidificado de forma inclinada e, em seguida, inoculado fazendo-se uma estria da colônia jovem (24 h) dos microrganismos estudados na rampa, com o auxílio de uma alça de platina. Os tubos contendo culturas foram incubados a 30 ± 1 °C por 24-48 h. A viragem do indicador azul de bromotimol de verde (pH 6,9) para azul intenso (pH > 7,6) indicou resultado positivo (SILVA, 1996). Os tubos considerados negativos foram re-incubados por 6 ou mais dias.

8. Caldo e Agar- Vermelho de Metila (VM)

Dissolveu-se 7 g de peptona, 5 g de glicose, 5 g de K_2HPO_4 em 1 L de água destilada. Após autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min), o meio foi vertido em tubos, resfriado e inoculado utilizando uma porção de colônias jovens (24 h), com auxílio de alça de platina. Após 24-48 h de incubação (30 ± 1 °C, escuro), adicionou-se 5 gotas do indicador vermelho de metila (item 4.4.1.9) ao caldo, evidenciando resultado positivo pela cor vermelha permanente nos tubos (SILVA *et al.*, 1997). O meio sólido foi preparado acrescentando-se ao caldo acima descrito 15 g de ágar e 0,02 g de vermelho de metila.

Este teste revela a capacidade de alguns microrganismos produzirem ácidos estáveis como produtos finais da fermentação da glicose, reduzindo drasticamente o pH do meio (abaixo de 4,2).

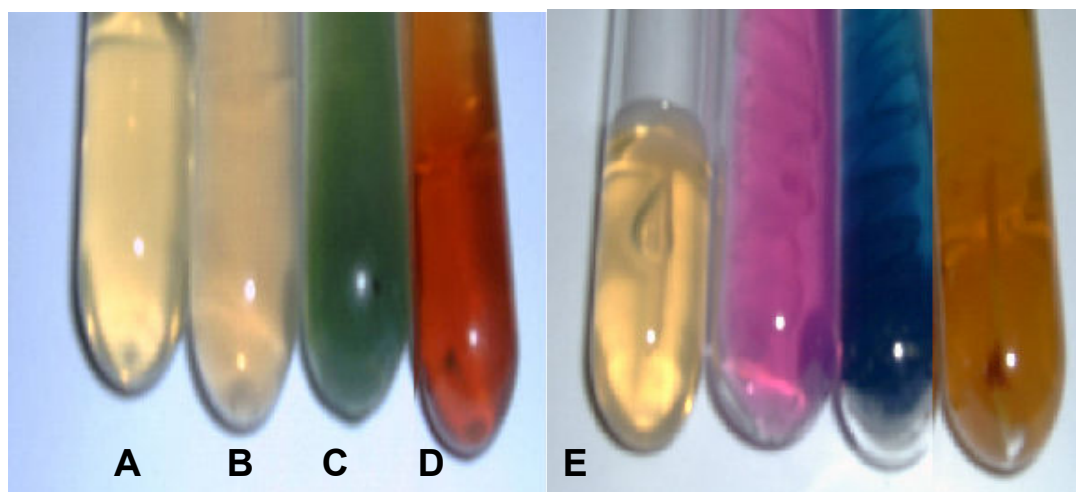


Figura 13. Meios de cultura utilizados na identificação das bactérias isoladas. **A** - SIM (Sulfato/Indo/Motilidade); **B** – Ágar-uréia; **C** - Ágar Citrato-Simmons; **D** –TSI (Triplo açúcar ferro); **E** – Detalhe dos meios após incubação (motilidade +; urease +; citrato +; lactose, sacarose e glicose +).

9. Meio para Atividade Ureásica

Utilizou-se o meio ágar uréia de Christensen composto por: 1 g de peptona; 1 g de dextrose; 5 g de NaCl; 2 g de KH_2PO_4 ; 20 g de uréia; 0,12 g de vermelho de fenol (6 mL de solução 0,2 %) para 1 L água destilada. O meio foi autoclavado, vertido e inoculado conforme item anterior. O crescimento foi observado após 6 e 24 h de incubação a 30 ± 1 °C, no escuro. A mudança da coloração do meio de amarelo alaranjado para rosa escuro, indica resultado positivo. Os tubos considerados negativos foram reincubados por 6 ou mais dias. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (SILVA, 1996)

10. Meio para Redução de Nitrato

Adicionou-se 5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 1 g de KNO_3 e 4 g de ágar a 1 L de água destilada. Após a esterilização do meio (120 °C, 1 atm, 20 min), o mesmo foi vertido em tubos de ensaio e mantido em posição vertical até a sua solidificação. Em seguida, foi inoculado por estriamento de colônias jovens (24 h) dos microrganismos estudados, e incubado por 5 dias no escuro, a temperatura de 30 ± 2 °C. Na ausência de “bolhas” de gás, adicionou-se às culturas 5 gotas das soluções A e B descritas no item 4.4.1.11. O resultado foi positivo para presença de nitrito

quando ocorreu a mudança da cor do meio para vermelho após 2 min, conforme VERMELHO *et al.* (2006).

11. Meio para testar Fermentação/Oxidação de Glicose (OF) por BG-

Adicionou-se 2 g de triptona, 5 g de NaCl, 0,3 g de K₂HPO₄, 0,08 g de azul de bromotimol e 2 g de ágar a 1 L de água destilada. Após homogeneização dos reagentes (pH ajustado para 6,8), o meio foi esterilizado em autoclave (120°C, 1 atm, 15 min). Após resfriamento adicionou-se ao meio OF 100 mL da solução de glicose a 10 % (esterilizada por filtração em disco de Milipore com porosidade de 0,22 µm). Em seguida, o mesmo foi distribuído em tubos de ensaio e inoculados por picada utilizando-se culturas jovens (24 h de crescimento), sob condições anaeróbica (cobrindo-se a superfície do tubo com uma camada de vaselina líquida) e aeróbica (sem vaselina). O período de incubação foi de 14 dias no escuro, a temperatura de 30 ± 2 °C. O teste foi realizado em triplicada para cada microrganismo (SILVA, 1996).

12. Meio para testar Fermentação/Oxidação de Glicose (OF) por BG+

Adicionou-se 10 g de triptona, 1 g de extrato de levedura, 0,001 g de púrpura de bromocresol (0,1 mL da solução 1 %), 0,08 g azul de bromotimol e 2 g de ágar a 1 L de água destilada. Após homogeneização dos reagentes (pH ajustado para 7), o meio foi esterilizado em autoclave (120°C, 1 atm, 15 min), e acrescentado de solução de glicose (10%) estéril. O meio foi vertido em tubos esterilizados e inoculado e incubado conforme descrito no item 4.4.3.11. O teste foi realizado em triplicada para cada microrganismo (SILVA, 1996).

13. Meio para Atividade Amilolítica

Preparou-se 150 mL do meio ágar nutriente (item 4.3.1) contendo 0,2 % de amido solúvel (suspensão aquecida), em pH 6. Foram vertidos 3 mL do meio de cultura em placas plásticas de 55 mm e após a solidificação do meio as placas foram inoculadas com culturas jovens (24 h de crescimento) e incubadas a temperatura de 30 ± 2 °C por 5 dias. O crescimento da colônia foi observado e registrado. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução de Lugol para a verificação do halo de degradação do amido pelos microrganismos. As culturas que demonstraram resultado positivo

apresentavam uma zona amarelada ao redor do fundo roxo. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) modificada por FERREIRA *et al.*, 2002).

14. Meio para Atividade Xilanolítica

Homogeneizou-se 7,5 g de papel picotado e triturado e 1,5 g de ágar em 150 mL de água destilada. Após a autoclavagem (120 °C, 1 atm, durante 20 min.), o meio foi vertido em placas de Petri para solidificação e inoculação. A degradação do amido foi evidenciada após 48 h de inoculação pela adição de 5 mL de iodo a 2 %, revelando um halo de degradação em torno da colônia (PEROVANO F^o, 2003).

15. Meio para Atividade Celulolítica

Acrescentou-se 1 g de (NH₄)₂SO₄, 1 g de K₂HPO₄, 5 g de MgSO₄, 0,001 g de NaCl, 15 g ágar e 10 g de carboximetil-celulose em 1 L de água destilada. Após a homogeneização, o meio foi autoclavado (120 °C, 1 atm, 20 min.), vertido em placas de Petri, inoculado com culturas jovens (24 h) e incubado por 10 dias (30 ± 1 °C, no escuro). A atividade foi verificada pela presença de zonas alaranjadas ao redor da colônia após a aplicação da solução de vermelho Congo (item 4.4.1.7) colocado sob a superfície das placas por um período de 2 h. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (RYCKEBOER *et al.*, 2003).

16. Meio para Atividade Lipolítica

Adicionou-se 10,0 g de peptona, 5,0 g de NaCl, 0,1 g de CaCl₂ e 20,0 g de ágar a 1 L de água destilada, levando-se o meio à autoclavagem (120 °C, 1 atm, por 20 min.) após sua homogeneização. O Tween 20 esterilizado em autoclave (120 °C, 1 atm, 20 min) foi utilizado como substrato lipídico, sendo adicionado ao meio na proporção de 1:100. Após resfriamento (45 - 50 °C), o meio foi vertido em placas de Petri, inoculado com culturas jovens (24 h) e incubado por 5 dias no escuro. O aparecimento de halo claro ao redor da colônia resultou da formação de cristais de cálcio de ácido láurico, liberado pela reação da enzima e pela completa degradação dos sais lipídicos. Para melhor evidenciar a presença do halo de degradação, adicionou-se 2 mL da solução de vermelho de fenol (item 4.4.1.6). O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) modificado por FERREIRA *et al.*, 2002).

17. Meio para Atividade Pectinolítica

Utilizou-se 500 mL da solução salina (4 g, K_2HPO_4 ; 2 g, $(NH_4)SO_4$; 6 g, $NaPO_4$; 2 g, $FeSO_4 \cdot 7 \cdot H_2O$; 1 mg, $CaCl_2$; 10 μg , H_3Bo_3 ; 10 μg , $MgSO_4$; 70 μg , $ZnSO_4$; 50 μg , $CuSO_4$ e 10 μg , MoO_3 , medidas para 1 L de água destilada); 1 g de extrato de levedura, 15 g de ágar, 5 g de pectina e 500 mL de água destilada. Para detectar a produção de pectato-liase (pectato trans-eliminase) o pH do meio foi ajustado para 7,0. No caso, da atividade poligalacturonase (pectinase), este foi ajustado para pH 5. Após a homogeneização, o meio foi autoclavado (120 °C, 1 atm, por 20 min.), vertido em placas de Petri, inoculado com culturas jovens (24 h de crescimento) e incubado por 5 dias (30 ± 2 °C, no escuro). A atividade foi verificada pela adição de uma solução de 0,2 % de vermelho de metila (item 4.4.1.9) para visualização do halo de degradação ao redor da colônia. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) modificada por FERREIRA *et al.*, 2002).

18. Meio para Atividade Proteolítica em Placas

Adicionou-se 5 mL de uma solução de 0,4 % de gelatina a 100 mL do meio ágar nutriente (item 4.3.1.). Em seguida, o meio foi autoclavado (120 °C, 1 atm, 20 min), vertido em placas de Petri, inoculado com culturas jovens (24 h) e incubado a 30 ± 1 °C por 5 dias no escuro. A detecção da atividade foi verificada pela presença de zonas vermelhas ao redor da colônia após a aplicação de 2 mL de uma solução de vermelho de fenol (item 4.4.1.6). O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

19. Meio para Atividade Proteolítica - Gelatinase – em Tubos

Adicionou-se 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona e 120 g de gelatina a 1 L de água destilada. O meio foi autoclavado, vertido em tubos, e solidificado. Em seguida, o mesmo foi inoculado por picada utilizando-se culturas jovens (24 h). Após 24-48 h de incubação (30 ± 1 °C, no escuro), os tubos foram resfriados em geladeira. Considerou-se como resultado positivo os tubos de cultivo que sob refrigeração (4 °C) não voltaram ao seu estado solidificado. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (VERMELHO *et al.*, 2006).

20. Meio para Atividade de Fenoloxidasas - Lacase

Adicionou-se 20 g de ágar acrescido de 0,5 % (p/v) de ácido gálico, 15 g extrato de malte e 1 g de peptona em 1 L de água. O ácido gálico foi homogeneizado em 50 mL de água destilada e autoclavado a 120 °C, 1 atm, 10 min. Os demais reagentes foram solubilizados (pH 7) e autoclavados (120 °C, 1 atm, 20 min). Após resfriamento do meio (45 - 50 °C), o mesmo foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculado com culturas jovens (24 h), incubando-se a 30 ± 1 °C por 7 dias no escuro. O teste é considerado positivo para aquelas colônias que formaram ao seu redor um halo marrom escuro (Reação de Bavendamm), sendo realizado em triplicata com todos os microrganismos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005).

21. Meio para Atividade de Fenoloxidasas - Lignina Peroxidase (LiP)

Preparou-se o meio composto por: 2 g de glicose; 2 g de tartarato de amônio; 2 g de extrato de malte; 0.26 g de KH_2PO_4 ; 0.26 g de Na_2HPO_4 ; 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.01 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.0066 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.005 g de FeSO_4 , 0.0005 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.02 mg de Na_2MoO_4 , 0.09 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.07 mg de H_3BO_3 , 0.1 g de azul de metileno (cloreto 3,7-bis-dimetilaminofenazotônio) e 20 g de ágar para 1 L de água. O pH foi ajustado para 5.5, seguindo-se a esterelização em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 20 min. Após resfriamento do meio (45 - 50 °C), o mesmo foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculado com culturas jovens (24 h), incubando-se a 30 ± 1 °C por 10-30 dias no escuro. A detecção da atividade foi verificação pela descoloração do meio de cultivo ao redor da colônia. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (DHOUIB, 2005).

22. Teste de Catalase

Com o auxílio da alça de platina, retirou-se uma alçada de colônias das culturas e transferiu-se a mesma para uma lâmina de vidro de microscopia devidamente deslipidizada. Com uma pipeta Pasteur, adicionou-se uma gota de H_2O_2 (30 %) sobre o inóculo e observou-se a ocorrência de produção de gás (borbulhamento) imediatamente, o que indicou resultado positivo, isto é, que a bactéria foi capaz de produzir a enzima catalase, responsável pela decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelas células durante o metabolismo (SILVA, 1996).

23. Teste de Oxidase

Com o auxílio de uma pinça estéril depositou-se uma fita de papel de filtro no centro de uma placa de Petri e embebeu-se o papel com o reagente de Kovacs (item 4.4.1.10.). Com a alça de platina, removeu-se uma pequena porção da cultura jovem (24h de crescimento) homogeneizando-a sobre o reagente no papel. O resultado positivo é indicado pelo desenvolvimento de uma cor azul avermelhado no intervalo de 1 min, sendo desconsiderado qualquer alteração de cor a partir daí. O teste foi realizado em triplicada para cada microrganismo (SILVA, 1996).

24. Confirmação de Provas Enzimáticas e Fisiológicas pelo Sistema API (Biomerieux)

Para confirmação/comparação dos resultados para as diversas características fisiológicas/enzimáticas examinadas nos testes acima descritos, selecionou-se seter dos microrganismos isolados para inoculação no sistema comercial de identificação rápida API-20E (Biomerieux, França). Este contém 20 microtubos com substratos desidratados. Assim, na caixa de incubação previamente identificada, distribuiu-se cerca de 5 mL de água destilada esterilizada nos alvéolos, para criar uma atmosfera úmida. (Figura 14).

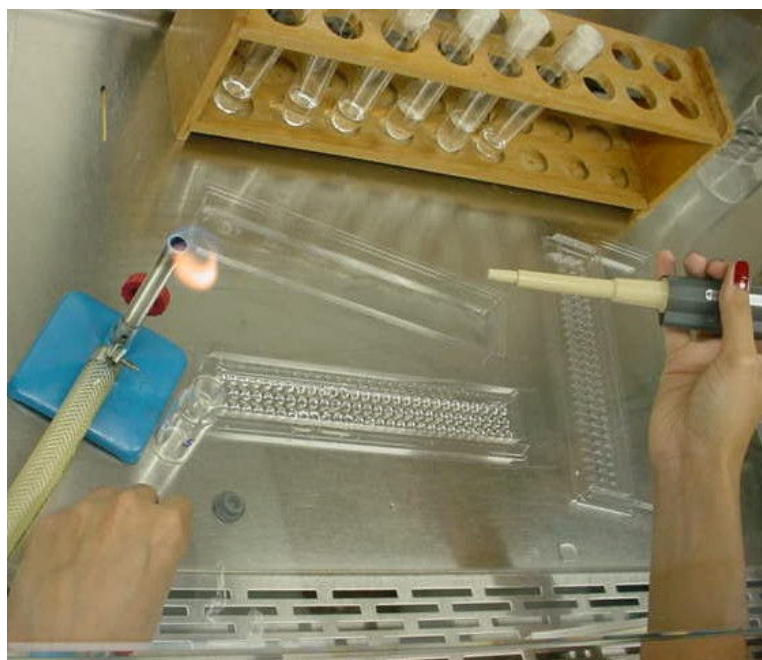


Figura 14. Caixa de incubação do sistema API 20E para identificação de microrganismos G⁻, com 5 mL de água destilada esterilizada.

Coletou-se, então, com o auxílio de uma alça de platina, uma colônia de cada isolado (24 h) em meio de manutenção. Esta foi depositada em 5 mL de água destilada esterilizada, agitando-se para a obtenção da suspensão de células. A galeria API-20E foi depositada na caixa de incubação e, com o auxílio de uma micropipeta Gibson, a suspensão dos microrganismos (200 µL) foi inoculada, até o nível recomendado, nos 20 microtubos (**Figura 15**). Para criar um ambiente de anaerobiose, algumas gotas de óleo de parafina foram depositadas nos microtubos relativos aos testes L-arginina (ADH), L-lisina (LDC), L-ornitina (ODC), Tiosulfato de sódio (H₂S), Urease (URE) (**Figura 16**).



Figura 15. Inoculação da suspensão de microrganismos nas galerias do sistema API 20E para sua identificação.



Figura 16. Adição de óleo de parafina em algumas das galerias inoculadas do sistema API 20E, para geração de anaerobiose.

Finalmente, o conjunto foi incubado aerobicamente a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 h (**Figura 17a**). As leituras foram traduzidas por alterações de cor ou reveladas pela adição de reagentes específicos do *kit* API (**Figura 17b**). Foi gerado um código numérico de 7 dígitos que corresponde à espécie identificada pelo programa de identificação do APILAB Plus (versão 3.3.3.@copyright 1990 biomérieux sa).

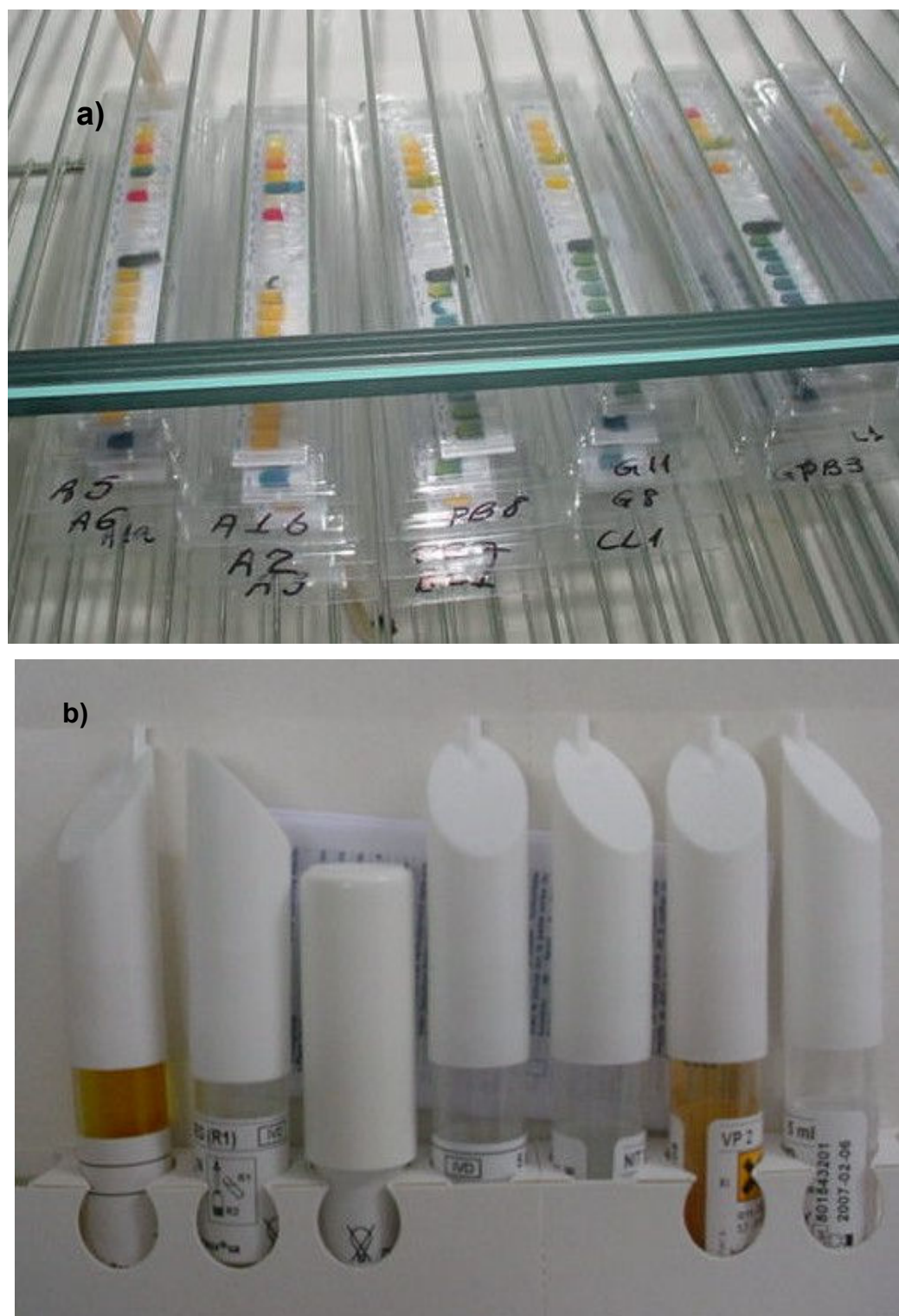


Figura 17. a) Sistema API 20E inoculado e incubado por 24 h a 37°C. **b)** Reveladores do kit API, para utilização nas culturas em galerias do sistema API 20E.

4.5. Cinética de Crescimento em Caldo Nutriente

Utilizou-se o meio caldo nutriente (CN) descrito no item 4.3.1. como referência para ensaios de cinética realizados com os microrganismos selecionados. Assim, nos diferentes intervalos de tempo (0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 h) após inoculação em CN, e incubação a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ (no escuro), partindo-se de uma suspensão de 10^4 células/mL (NEDER, 1992), quantificou-se o nº de células/mL com o auxílio de câmara de Neubauer em microscópio óptico binocular (640 X).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três réplicas por tratamento e três repetições. A absorvância das culturas a 540 nm também foi avaliada em espectrofotômetro (FENTO, mod. 800 XI), utilizando o meio CN sem inóculo como controle de referência.

Outra metodologia utilizada para avaliar o crescimento dos microrganismos foi a determinação do nº de unidades formadoras de colônias (UFC). Para tanto, pipetou-se 100 µL de uma diluição 1: 1000000 de cada cultura bacteriana (5 mL) em placas de AN. A cada 24 h, durante 5 dias, efetuou-se a contagem das UFC (NEDER, 1992).

4.6. Cinética de Degradação de Ácido Tânico

Preparou-se um meio de tanino sólido (ATS₁), contendo 0,8 % de ácido tânico acrescido de 0,1 % de glicose, 0,1 % de peptona, 0,1 % de cloreto de sódio e 1,5 % de ágar. Este meio também foi preparado sem ágar (ATL₁) para avaliação do crescimento dos microrganismos isolados em condições de aerobiose e anaerobiose.

Ainda, para determinação da produção de fenol-oxidases (tanase acil hidrolase e lacase), fez-se uso de outro meio de cultura líquido (ATL₂) contendo 1 % de ácido tânico, além de vários sais minerais (3 g de NaNO₃, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄ . 7H₂O, 0,5 g de KCl, 0,01 g de Fe₂SO₄ . 7H₂O e 0,5 g de CuSO₄), conforme descrito por PINTO *et al.* (2001). Os isolados também foram inoculados em meio de tanino sólido (ATS₂) a 1 % do substrato fenólico, acrescido de 30 g/L de ágar.

Assim, a diferentes intervalos de tempo (0, 1, 6, 8, 24, 48, 72, 96, 120 h), verificou-se o crescimento das culturas microbianas em ATL₁ (0,8 %) e ATL₂ (1 %), conforme descrito no item 4.5. As culturas líquidas foram filtradas em membrana acro-

disc (0,22 μm) e, posteriormente 0,25 mL das amostras foram acrescidas de 1,25 mL do reagente vanilina 10 % - HCL concentrado. Após 20 min, as misturas nativas foram submetidas à análise espectrofotométrica (FENTO, mod. 800 XI) a 525 nm (BROADHUST & JONES, 1978). Como controle referencial, utilizou-se o meio sem inóculo.

Paralelamente, para quantificar a degradação do referido substrato fenólico, também preparou-se uma curva padrão com diferentes concentrações de uma solução aquosa de ácido tânico (0,625; 6,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g/mL}$). Após obter a equação de regressão linear dessa curva, a mesma foi utilizada para se obter o perfil de degradação do ácido tânico das culturas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e Identificação dos microrganismos

Do isolamento realizado a partir das amostras de lodo da lagoa receptora "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe, 8 bactérias, inicialmente designadas L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 e L8 (**Tabela 2**), foram obtidas.

Quanto às amostras do efluente da mesma lagoa, foram isolados 8 microrganismos, Gram positivos (G+) e negativos (G-), enquanto do bagaço de cana-de-açúcar (BC) foram 11 os microrganismos obtidos (**Tabelas 3 e 4**). Entre esses 19 isolados (efluente e bagaço), 14 são bactérias G+ e G- (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, BC1, BC2, BC3, BC6, BC7 e BC11) e 5 são fungos (**Figura 19**), sendo 3 leveduriformes (BC4, BC5 e BC9) e 2 filamentosos (BC8 e BC10). Para os propósitos da presente dissertação, apenas foram utilizadas os isolados bacterianos, e os fúngicos foram armazenados na Micoteca do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental (LBPVMA) da UFAL para trabalhos subsequentes.

Todos os microrganismos obtidos comportaram-se como mesofílicos (crescimento relevante a temperaturas que variam de 25 - 40 °C) e apresentaram crescimento moderado a abundante em meio AN nas condições experimentais (30 ± 2 °C, escuro). Em meio Columbia, para crescimento de fastidiosos, todos apresentaram crescimento abundante (**Figura 18**).

Todas as bactérias obtidas do lodo (**Tabela 2**) da lagoa de decantação (L1-L8) são G-, álcool-ácido resistentes (BAAR) e não formadoras de endósporos.

Entre as bactérias isoladas de águas dessa lagoa (**Tabelas 3 e 7, Figura 20**), apenas A8 não é BAAR, sendo uma representante do gênero *Serratia* [G-, oxidase negativo e catalase positivo (**Tabela 7**)]. A2 e A7 são G+, não formadores de esporos, BARR, oxidase negativos e catalase e nitrato redutase positivos, pertencendo ao gênero *Corynebacterium*.

Com relação ao bagaço de cana, a bactéria BC1 é G+, móvel, apresenta endósporos, e é BARR, oxidase negativa, catalase e nitrato-redutase positivas (**Tab-**

las 4 e 8, Figura 21), representando o gênero *Bacillus*. O isolado BC2, por sua vez, apesar de também ser G⁺, móvel, BARR e formador de endosporos, não apresenta resposta para os testes de oxidase e catalase, e é positivo para nitrato redutase, gelatinase, lipase, e carboidratases, características do gênero *Clostridium*. BC7 (não BAAR) e BC11 (BARR), igualmente bastonetes G⁺ não produtores de endosporos, são espécies respectivamente de *Corynebacterium* e *Lactobacillus* sp.

Tabela 2. Aspectos morfo-culturais das unidades formadoras de colônias dos microrganismos isolados de amostras de lodo da lagoa de decantação “A” da estação de tratamento de efluentes (ETE) da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio ágar-nutriente após 48h de incubação.

Microrganismos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
Morfologia								
Forma da Colônia	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Rizóide	Circular
Tamanho da Colônia (48 h)	5 mm	5 mm	5 mm	5 mm	5 mm	5 mm	5 mm	5 mm
Elevação	Achatada	Achatada	Ondulada	Achatada	Elevada	Achatada	Achatada	Achatada
Borda	Lobado	Lobado	Lobado	Lobado	Filamentoso	Lobado	Filamentoso	Lobado
Estrutura	Lisa	Lisa	Lisa	Granulosa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Brilho	Translúcido	Translúcido	Translúcido	Translúcido	Opaco	Translúcido	Opaco	Opaco
Cor	Incolor	Incolor	Incolor	Pigmentada (Amaralada)	Incolor	Incolor	Pigmentada (Bege)	Incolor
Aspecto	Membranosa	Membranosa	Leitosa	Viscosa	Leitosa	Membranosa	Viscosa	Membranosa
Crescimento	Abundante	Abundante	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado	Abundante
Coloração de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Verde de Malaquita (endósporos)	-	-	-	-	-	-	-	-
Álcool - Ácido Resistente	+	+	+	+	+	+	+	+
Forma das Células	Coco-Bacilos	Coco-Bacilos	Coco-Bacilos	Coco-Bacilos	Coco-Bacilos	Coco-Bacilos	Coco-Bacilos	Coco-Bacilos

Tabela 3. Aspectos morfo-culturais das unidades formadoras de colônias dos microorganismos isolados de amostras de efluente proveniente da lagoa "A", da ETE da S. A Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005), em meio ágar nutriente após 48 h de incubação.

Microorganismos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Morfologia								
Forma da Colônia	Irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	Irregular	irregular
Elevação	Elevada	elevada	elevada	ondulada	convexa	elevada	Elevada	elevada
Borda	Lobados	ondulada	ondulada	ondulado	lobados	lobados	Ondulada	ondulada
Estrutura	Lisa	lisa	lisa	viscosa	lisa	lisa	Rugosa	lisa
Brilho	Opaco	translúcida	translúcida	translúcida	opaco	translúcida	translúcida	translúcida
Cor em agar nutriente	branca	branca	amarela	branca	branca	branca	branca	branca
Aspecto	viscosa	viscosa	membranosa	membranosa	viscosa	viscosa	membranosa	viscosa
Coloração de Gram	-	+/-	+	-/+	+	-	+/-	-
Verde de Malaquita (en-dósporos)	-	-	-	-	-	-	-	-
Álcool - Ácido Resistente	+	+	NR	+	+	+	+/-	-
Forma das Células	Bastonetes	Bastonetes pleomórficos	Bastonetes longos em cadeias	Coco-bastonetes Pequenos Hifa mono-verticilada	Estafilococos	Coco-bastonetes	Bastonetes pleomórficos	bastonetes

NR = Não realizado

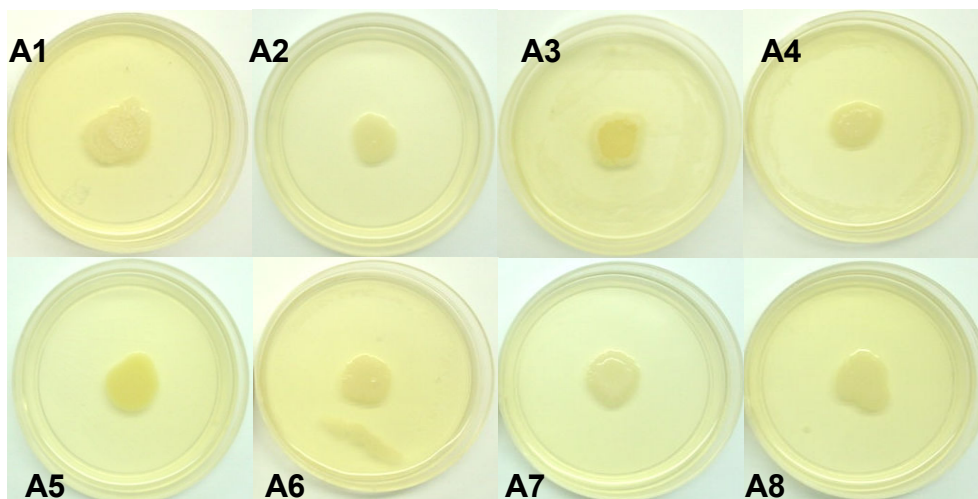


Figura 18. Cultura das bactérias A1-A8, isoladas de efluente da lagoa "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05) em meio Columbia ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro, 48 h).

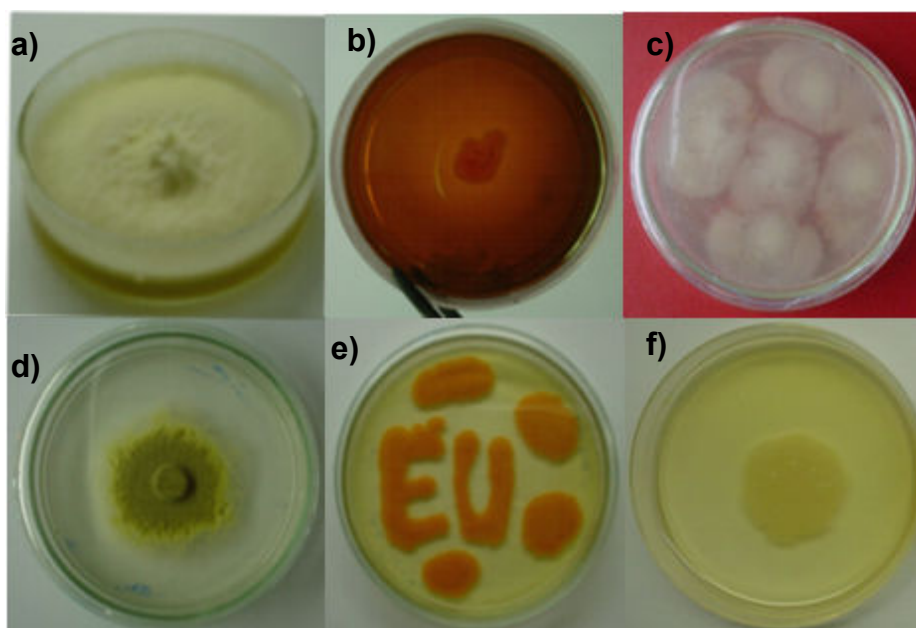


Figura 19. Aspecto cultural de alguns microrganismos isolados de bagaço de cana (BC) e de efluente (A) de lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, 5 dias após a inoculação em diferentes meios de culturas. **a)** fungo filamentosos BC10 em Meio Sabouraud; **b)** bactéria A8 em Meio EMB; **c)** bactéria BC1 em Meio AN; **d)** fungo filamentosos BC8 em Meio BDA; **e)** fungo leveduriforme BC9 em Meio Sabouraud; **f)** bactéria BC1 em Meio Columbia.

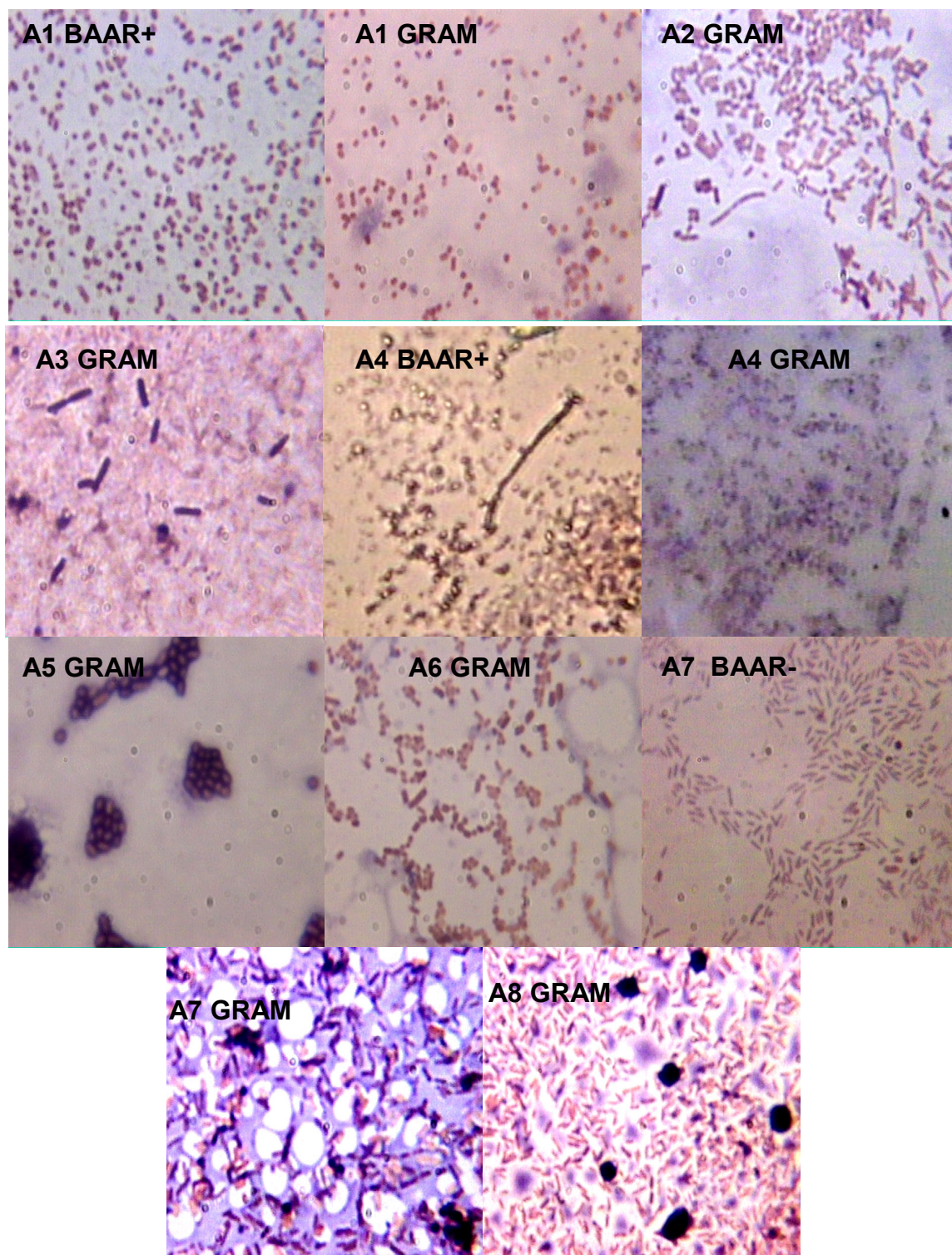


Figura 20. Aspecto das células bacterianas A1-A8, isoladas de efluente da lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (A4 e A7) ou pelo método de Gram (A1-A8). Fotos de microscopia foram registradas com aumento de 640 X, exceto para o isolado A5, cujo aumento foi de 1600 X.

Tabela 4. Aspectos morfo-culturais das colônias e células das bactérias isoladas de amostras do bagaço de cana-de-açúcar (safra 2005/06), da S. A Usina Coruripe Açúcar e Álcool, em meio ágar nutriente após 48 h de incubação.

Microrganismos	BC1	BC2	BC3	BC6	BC7	BC11
Morfologia						
Forma da Colônia	irregular	irregular	irregular	irregular	Irregular	irregular
Elevação	ondulada	elevada	elevada	ondulada	Elevada	elevada
Borda	lobados	ondulada	ondulada	ondulada	Ondulada	ondulada
Estrutura	lisa	lisa	rugosa	rugosa	Rugosa	Lisa
Brilho	opaco	opaco	opaco	opaco	Opaco	Translúcida
Cor em A. Nutriente	bege	branca	branca	branca	Amarela	branca
Aspecto	Viscosa	Viscosa	Membranosa	Membranosa	Viscosa	Viscosa
Coloração de Gram	+/-	+/-	+	-	+	+
Verde de Malaquita (endósporos)	-	-	-	-	-	-
Álcool - Ácido Resistente	+	+	NR	NR	+/-	+
Forma das Células	Bastonetes em cadeias	Bastonetes em cadeias	Coco-bastonetes	Coco-bastonetes	Bastonetes	Bastonetes largos em cadeias

NR = Não realizado

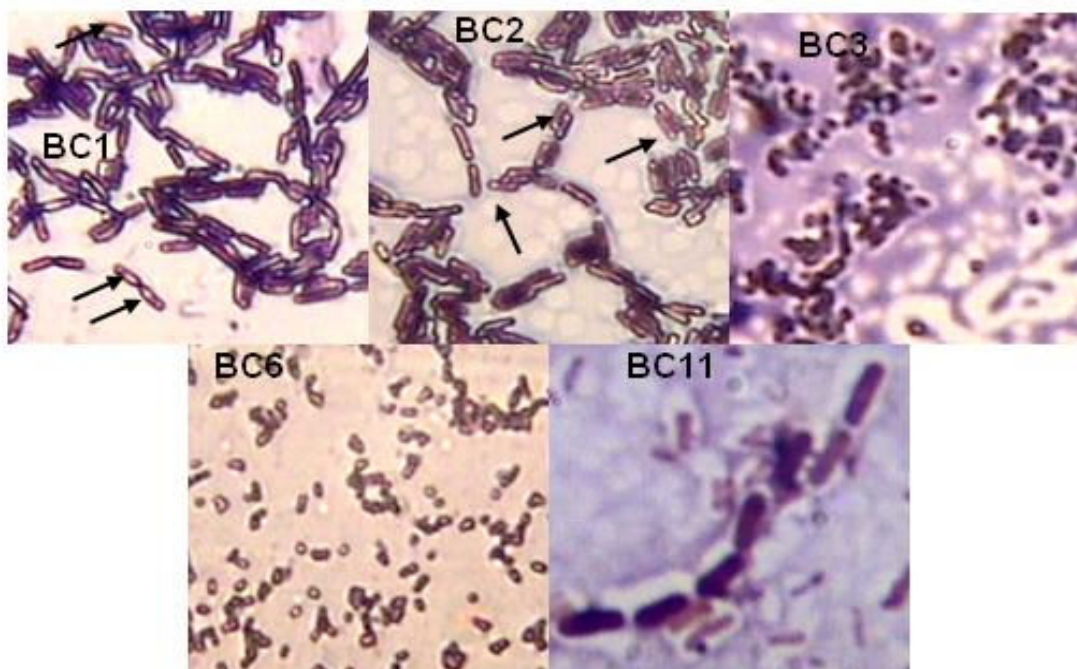


Figura 21. Aspecto das células bacterianas B1, B2, B3, B6 e B11, isoladas de bagaço de cana acumulado na safra 2005/06 da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, após coloração pelo método de Gram. Fotos de microscopia foram registradas com aumento de 640 X, exceto para o isolado B11, cujo aumento foi de 1600 X. Setas ilustram endósporos refratários.

Os aspectos bioquímicos das bactérias isoladas de amostras de lodo, efluente e bagaço de cana estão ilustrados nas **Tabelas 5-8**, e **Figuras 22-32**.

Tabela 5. Aspectos bioquímicos dos microrganismos isolados de lodo da lagoa de decantação "A" da estação de tratamento de efluentes (ETE) da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, na safra 2004/05, em diferentes soluções e meios seletivos inoculados e interpretados conforme critérios validados.

Microrganismos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
Testes								
Eosina Azul de Metileno (EMB)	-	-	*	*	-	-	-	-
Meio Columbia	+	+	+	+	+	+	+	+
Meio Agar Citrato	+	-	+	+	-	+	-	-
Meio TSI-ágar	Aeróbio estrito p/ peptona	+glicose	Aeróbio estrito p/ peptona , gás, H ₂ S	Aeróbio estrito p/ peptona	Aeróbio estrito p/ peptona	Aeróbio estrito p/ peptona	Aeróbio estrito p/ peptona, + glicose	Aeróbio estrito p/ peptona, + glicose
Meio OF	Aeróbio estrito	Anaer. estrito	Anaer. facultativo	Aeróbio estrito	Aeróbio estrito	Aeróbio estrito	Anaer. facultativo	Anaer. facultativo
Meio SIM	não móvel	não móvel	móvel, + gás	móvel	não móvel	não móvel	móvel	móvel
Urease	-	-	+	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	+	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato Redutase	+	+	+	-	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilase	+	+	+	+	+	+	+	+
carboximetilcelulase	+	+	+	+	+	+	+	-
Xilanase	+	+	-	-	+	+	+	+
Llipase	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectato-liase	+	+	+	-	+	+	+	+
Poligalacturonase	+	+	+	+	+	+	+	+
Protease	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenol-oxidase	+	+	+	-	+	+	+	+

* Crescimento translúcente (pigmentação não característica de fermentadores de lactose)

Tabela 6. Aspectos bioquímicos dos microrganismos isolados de amostras do efluente proveniente da lagoa "A" da ETE da S. A Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), em diferentes soluções e meios seletivos inoculados e interpretados conforme critérios validados.

Microrganismos Testes	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Eosina Azul de Metileno (EMB)	+	+	-	-	-	-	-	-
	(mucóide, centro escuro)	(centro preto, borda metálica)	(rosa)	(rosa)	(rosa)	(rosa)	(rosa)	(rosa)
Meio Columbia	+	+	+	+	+	+	+	+
Agar Acetato	+	-	+	+	+	+	+	+
Meio TSI-ágar	+ para 3 glicídeos, gás	+ para 3 glicídeos, gás	Aeróbio estrito p/ peptona, H ₂ S	+ para 3 glicídeos, gás	+ para 3 glicídeos	+ para 3 glicídeos	+ para 3 glicídeos	+ glicose, gás
Meio OF	Anaer. facultativo	Anaer. facultativo	Aeróbio estrito	Anaer. facultativo	Anaer. facultativo	Aeróbio estrito	Anaer. facultativo	Aeróbio estrito
Meio SIM	não móvel	móvel + indol	Móvel + indol	móvel	não móvel	não móvel, + H ₂ S	móvel + H ₂ S	não-móvel
Vermelho de Metila	+	+	-	-	-	-	+	-
Urease	+	+	-	+	+	+/-	+/-	+/-
Oxidase	-	-	+	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato Redutase	+	+	-	+	+	-	+	-
Gelatinase	-	-	+	-	-	-	+	+
Amilase	+	-	+	-	+	+	+	-
Carboximetilcelulase	-	-	-	+	-	-	+	+
Xilanase	-	-	+	+	+	+	+	-
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectato-liase	-	-	-	-	-	-	NR	-
Poligalacturonase	-	NR	NR	-	-	-	+	-
Protease	+	+	+	+	+	+	+	+
Lignina Peroxidase	+	+	NR	+	+	+	+	+
Fenol-oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+

NR = Não realizado

Tabela 7. Aspectos bioquímicos dos microrganismos isolados de amostras do bagaço de cana-de-açúcar da S. A Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), em diferentes soluções e meios seletivos inoculados e interpretados conforme critérios validados.

Microrganismos	BC1	BC2	BC3	BC6	BC7	BC11
Testes						
Eosina Azul de Metileno (EMB)	-	-	-	+	NR	NR
Meio Columbia	+	+	+	+	NR	NR
Agar Acetato	+	+	+	+	+	+
Meio TSI-ágar	+ para 3 glicídios, gás	+ para 3 glicídios	+ para 3 glicídios, gás	+ para 3 glicídios, gás	+ para 3 glicídios	+ para 3 glicídios
Meio OF	Anaer. facultativo	Aerotolerante	Anaer. facultativo	Anaer. facultativo	Anaer. facultativo	Anaer. facultativo
Meio SIM	Móvel, indol	móvel	móvel	móvel	móvel	móvel
Urease	+	+	+	+	+	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	-	+	+	+	+
Nitrato Redutase	+	+	+	-	NR	NR
Gelatinase	+	+	-	-	-	NR
Amilase	+	+	-	-	-	+
Carboximetilcelulase	+	+	-	-	-	-
Xilanase	-	-	-	-	+	-
Lipase	-	+	+	+	+	+
Pectato-liase	-	+	-	-	-	NR
Poligalacturonase	NR	NR	+	+	+	NR
Protease	+	+	+	+	+	+
Lignina Peroxidase	+	S/C	+	+	+	+
Fenol-oxidase	S/C	S/C	+	+	+	+

NR = Não realizado; S/C = Sem crescimento.

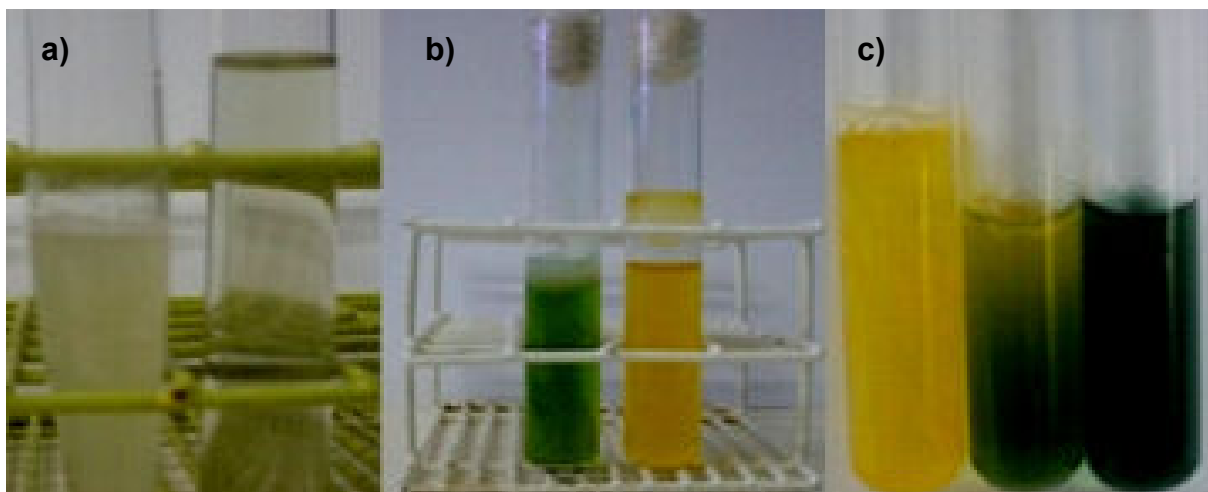


Figura 22. Degradação de glicose em meio OF, em ambiente anaeróbio [com cobertura de vaselina, para G+ (a) e G- (b)] e aeróbio [sem cobertura de vaselina, para G- (c)], por bactérias isoladas de bagaço de cana e águas lançadas na lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). a) positivo "A5" (esquerda); b) positivo para "BC6" (esquerda); c) positivo para "A1" e para "A8".

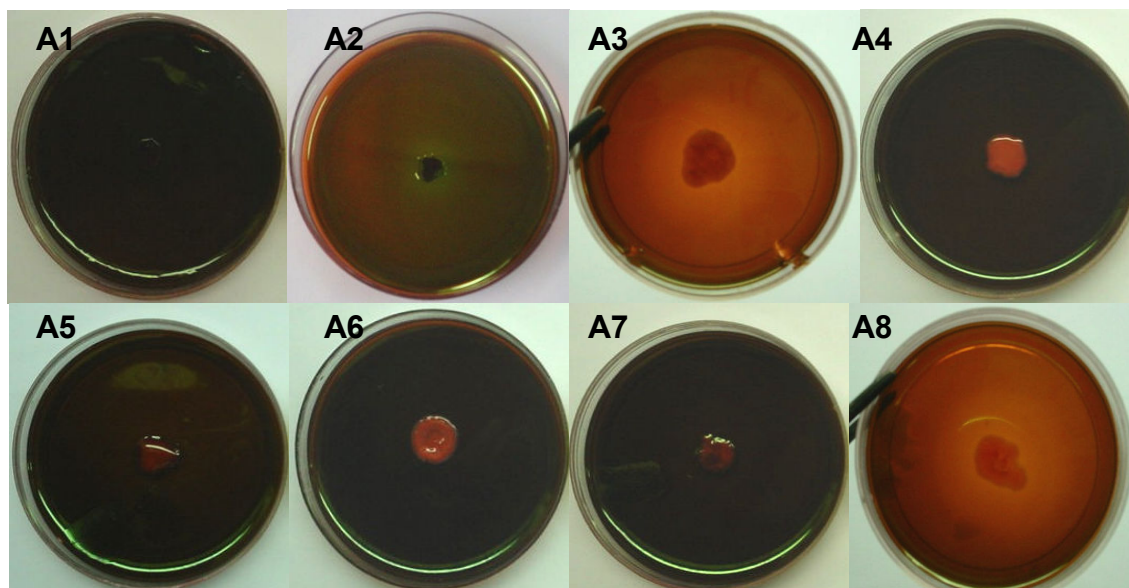


Figura 23. Aspecto cultural dos microrganismos A1-A8 isolados de águas da lagoa "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06) em meio em EMB (30 ± 1°C, escuro, 48 h).

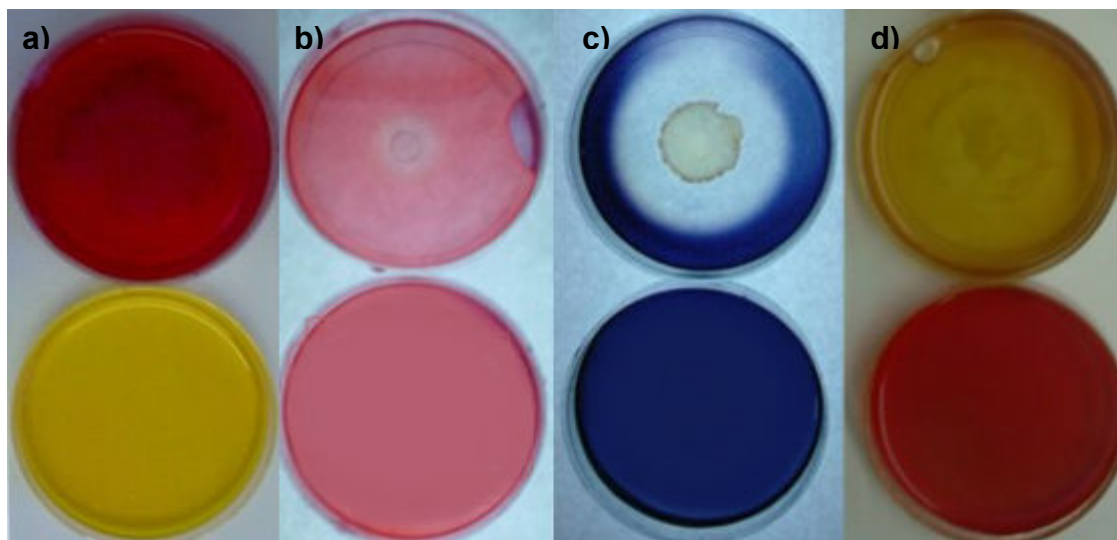


Figura 24. Testes positivos de atividades enzimáticas (culturas na parte superior para os isolados obtidos de bagaço de cana e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). a) proteolítica positiva (BC3); b) celulolítica (BC1); c) amilolítica (A2); d) pectinolítica (Pectato-liase) (BC2). Controles situados na parte inferior da figura.

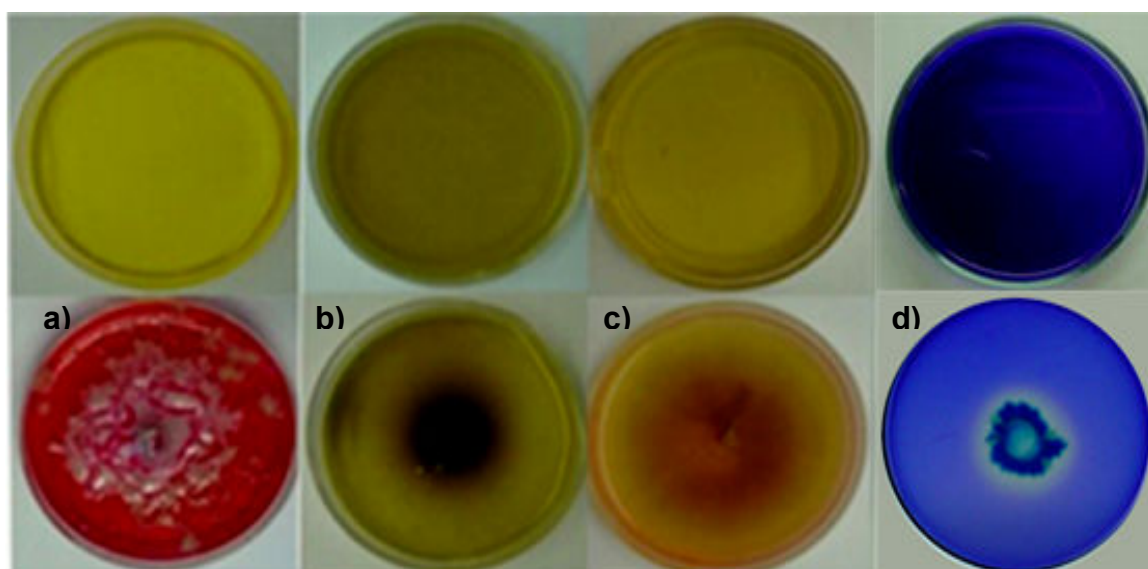


Figura 25. Testes positivos de atividades enzimáticas (culturas na parte inferior) para os isolados de bagaço de cana e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). a) lipolítica (BC8); b) Fenoloxi-dase (A1); c) Poligalacturonolítica (BC10); d) Lignina Peroxidase (BC10). Controles situados na parte superior da figura.

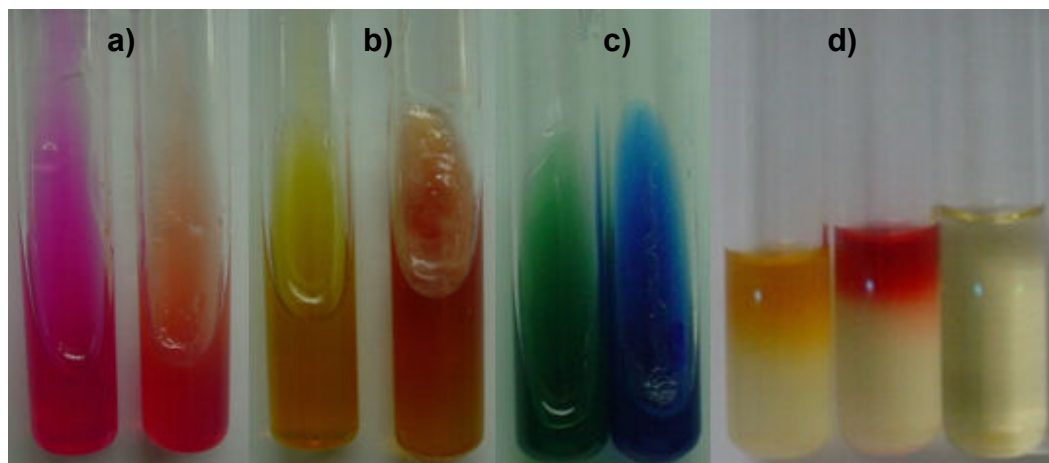


Figura 26. Testes de atividades enzimáticas para bactérias isoladas de bagaço de cana e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06). a) ureolítica positiva para A1 (esquerda); b) degradadora de 3 glicídeos e peptona para A4 (esquerda); c) degradadora de acetato para BC2 (esquerda); d) produtora de ácidos estáveis (VM) para A7 (esquerda) e negativa para A3 (esquerda).

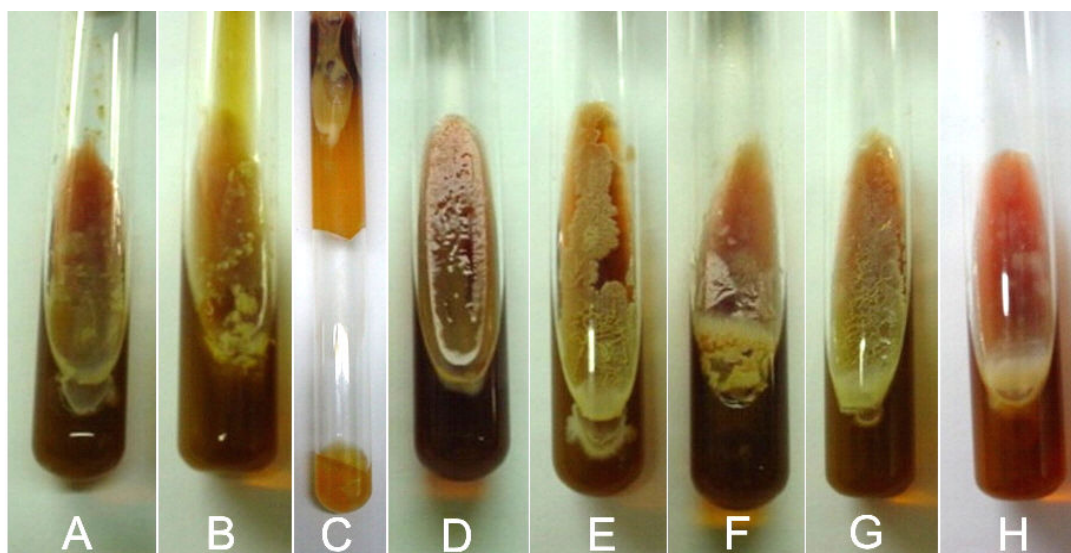


Figura 27. Aspecto do crescimento das bactérias L1-L8 isoladas de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05) em meio Ágar-TSI (72 h).

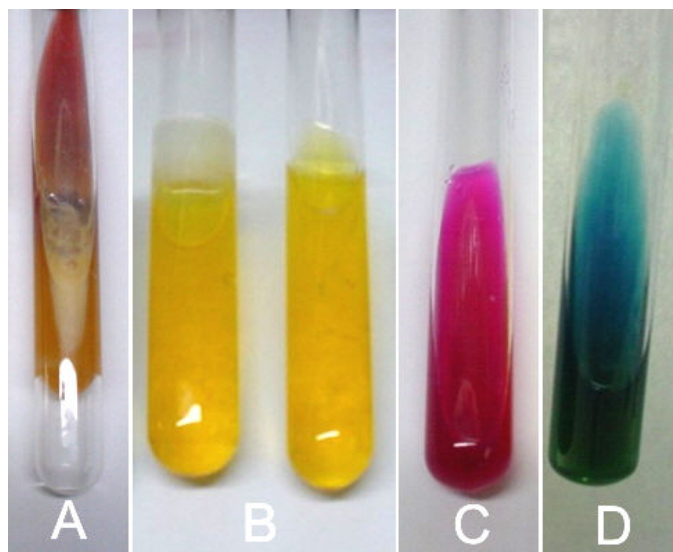


Figura 28. Aspectos bioquímicos do crescimento da bactéria L3 (*Proteus* sp), isolada de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Crescimento em Ágar-TSI (72h); **b)** Degradação de glicose em meio OF aeróbio (sem cobertura de vaselina) e anaeróbio (com cobertura de vaselina)- 48h; **c)** Prova positiva de urease; **d)** Prova positiva de citrato-oxidase.

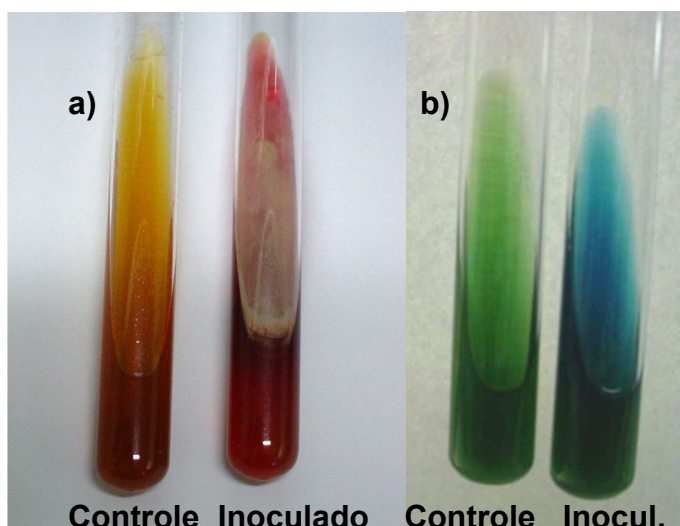


Figura 29. Aspectos bioquímicos do crescimento da bactéria L1, isolada de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Crescimento em Ágar-TSI após 96 h (lactose, glicose e sacarose + e peptona +); **b)** Prova da citrato-oxidase positiva.

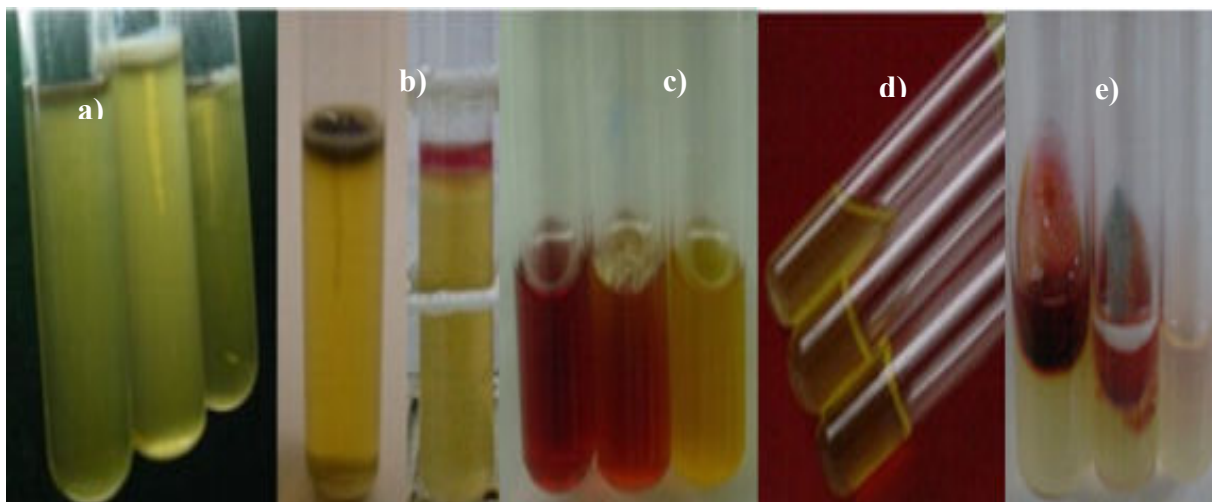


Figura 30. Aspectos bioquímicos dos isolados obtidos do bagaço de cana e das águas lançadas na lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), respectivamente nos meios SIM, Caldo-Vermelho de Fenol/Manitol, Gelatina e Agar-Vermelho de Fenol/Manitol. a) motilidade negativa para A1 (centro) e positiva para BC2 (esquerda); b) produção de sulfito positiva para A1 (esquerda) e de indol para BC1 (direita); c) manitol positivo para BC5 e A5; d) gelatinase negativa para A5 (centro) e positiva para BC2 (superior); e) Nitrato redutase - positivo para BC3, negativo para BC6 (após adição de pó de zinco).

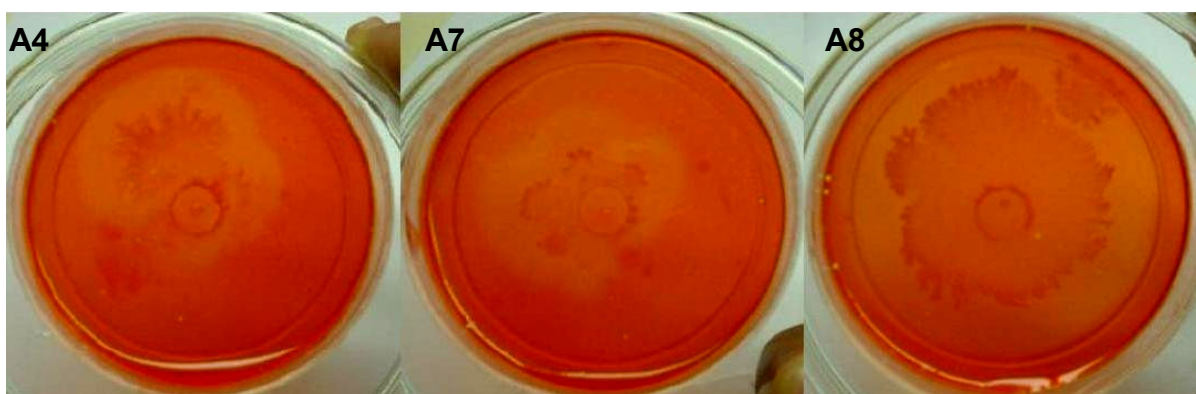


Figura 31. Atividade carboximetil-celulolítica positiva para as bactérias A4, A7 e A8, respectivamente, isoladas das águas lançadas na lagoa de decantação "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06).

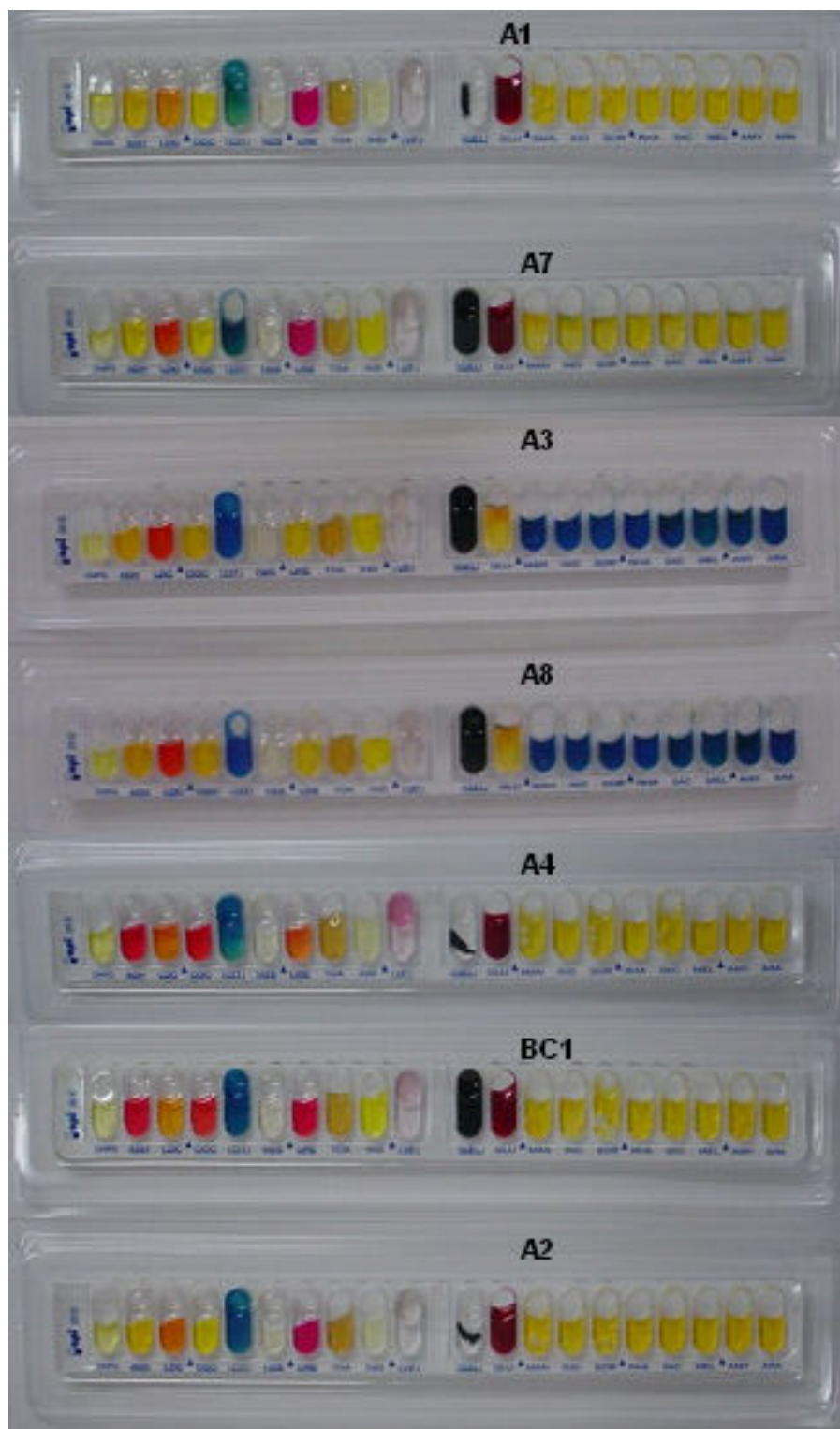


Figura 32. Aspecto dos resultados dos testes bioquímicos no sistema rápido API 20E (Biomerieux), inoculado com os microrganismos BC1 e A1, A2, A3, A4, A7 e A8, respectivamente do bagaço de cana (BC) e do efluente lançado na lagoa "A" da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), 24 h após incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro.

Tabela 8. Resultados dos testes bioquímicos do sistema API 20E (Biomerieux), quando inoculou-se os microrganismos BC1 e A1, A2, A3, A4, A7 e A8, respectivamente do bagaço de cana e do efluente lançado na lagoa A da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), e incubou-se por 24 h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro.

SUBSTRATOS		REAÇÃO	A1	A2	A3	A4	A7	A8	BC1
SIGLA	DESCRIÇÃO	TESTADA							
ONPG	2-nitrofenil-d-galactopiranosídeo	β -galactosidase	+	+	+	+	+	+	+
ADH	L-arginina	arginina desidrolase	-	-	-	+	-	-	+
LDC	L-lisina	lisina descarboxilase	+	++	+++	+	+++	+++	+
ODC	L-ornitina	Ornitina descarboxilase	-	-	-	+++	-	-	+++
CIT	Citrato de sódio	Utilização de citrato	+	++	++	+	+	++	++
H ₂ S	Tiosulfato de sódio	Produção de H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
URE	Uréia	Hidrólise de uréia	++	++	-	+	++	-	++
TDA	L-triptrofano	deaminase	-	-	-	-	-	-	-
IND	L-triptrofano	Produção de indol	-	-	-	-	-	-	-
VP	Piruvato de sódio	Produção de acetoina	-	-	-	+	-	-	-
GEL	Gelatina	gelatinase	-	-	+	-	+	+	+
GLU	D-glucose	Oxidação/Ferment.	-	-	+	-	-	+	-
MAN	manitol	Oxidação/Ferment.	+	+	-	+	+	-	+
INO	Inositol	Oxidação/Ferment.	+	+	-	+	+	-	+
SOR	D-sorbitol	Oxidação/Ferment.	+	+	-	+	+	-	+
RHA	L-ramnose	Oxidação/Ferment.	+	+	-	+	+	-	+
SAC	D-sacarose	Oxidação/Ferment.	+	+	-	+	+	-	+
MEL	D-melibiose	Oxidação/Ferment.	+	+	-	+	+	-	+
AMY	Amigdalina	Oxidação/Ferment.	+	+	-	+	+	-	+
ARA	L-arabinose	Oxidação/Ferment.	+	+	-	+	+	-	+
OX	Oxidase	Oxidase	+	-	+	-	-	-	-
NO ₂	Nitrato	Nitrato redutase	+	+	-	+	+	-	+
N ₂	Nitrogênio	Assimilação de N ₂	-	-	+	-	-	+	-

Reações : - = negativa; + = positiva; ++ = positiva intensa; +++ = positiva muito intensa.

Bactérias isoladas do lodo da lagoa de decantação

O sistema de lodo ativado é amplamente utilizado para o tratamento de despejos domésticos e industriais, em situações em que são necessários elevada qualidade do efluente final e reduzidos requisitos de área. Este sistema é baseado

na capacidade microbiana em catabolizar diferentes compostos orgânicos naturais e/ou sintéticos, e inorgânicos, utilizando estes substratos como fontes nutricionais e energéticas, possibilitando sua utilização como solução aos problemas gerados pelo lançamento de rejeitos ao meio ambiente.

Com base nos resultados obtidos das análises morfo-culturais e bioquímicas (**Tabelas 2 e 5; Figura 27**), e com o auxílio da chave de classificação de bactérias do Manual de Bergey (HOLT *et al.*, 1994), foi possível identificar as bactérias isoladas na safra 2004/05 do lodo da lagoa de decantação "A" da ETE estudada, como espécies pertencentes aos seguintes gêneros: L1 (*Achromobacter* sp), L2 (*Acinetobacter* sp.), L3 (*Proteus* sp), L4 (*Flavobacterium* sp), L5 (*Achromobacter* sp), L6 (*Acinetobacter* sp), L7 (*Serratia* sp) e L8 (*Serratia* sp).

O gênero *Achromobacter*, é caracterizado por bactérias Gram negativas, na forma de bastonetes ou cocobacilos. Não produzem endosporos, não são móveis, sua respiração é aeróbia estrita, e apresentam reação positiva para catalase e urease, embora sejam oxidase negativos (WILLIAMS *et al.*, 1966). Além disso, convertem nitratos a nitrogênio gasoso, tendo um papel importante nos processos de remediação de efluentes (RODRIGUES, 1996). BEAULIEU (1994) relatou que *A. eutrophus* produz polihidroxibutirato (PHB), um plástico com potencial comercial importante, pois leva de um a dez anos para se degradar no ambiente, enquanto o plástico de origem petroquímica pode levar centenas de anos para se degradar.

TAKAMATSU, em 1995, destacou o uso do gênero *Achromobacter* em processos de lixiviação para a extração de metais pesados em lodos ativados. REINECKE *et al.* (2000), isolaram de lodo de esgoto uma estirpe de *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, a qual foi capaz de degradar como única fonte de carbono o agente quelante sintético iminodisuccinate (IDS) em meio de crescimento mínimo (apenas com sais minerais e IDS). Tal estirpe foi capaz de crescer mesmo na presença de 1.0 % (m/v) desse composto, o qual entrou no mercado na última década como uma alternativa para o EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético), que poderá ser degradado no ambiente.

Enzimas oriundas de *Achromobacter* são utilizadas com eficácia em processos de biorremediação de herbicidas, óleos e gorduras (CASTRO *et al.*, 2002). Segundo observações de ABREU (2004), em uma planta de lodo ativado de uma estação municipal de tratamento de águas residuais da cidade de Braga, em Portugal, a

biomassa era constituída por aproximadamente 95% de bactérias, sendo *Achromobacter* um dos principais gêneros formadores de flocos no processo.

Conforme estudos de BEREKAA *et al.* (2005), um isolado de *Achromobacter* sp. foi capaz de utilizar borracha (látex) natural como única fonte de carbono e energia, aderindo-se a ela através de biofilmes e gerando compostos aldeídicos. Baseados nos dados de mineralização da borracha, os autores relatam que as variáveis que mais afetaram positivamente a degradação foi a presença de seus grânulos, K_2HPO_4 , Na-succinato e NH_4Cl , enquanto $MgSO_4 \times 7H_2O$ and KH_2PO_4 foram as variáveis cuja presença menos interferiu no processo.

As bactérias do gênero *Acinetobacter* são oxidase-negativas, imóveis, estritamente aeróbicas e aparecem como cocobacilos gram-negativos em pares sob o microscópio. Podem usar várias fontes do carbono para o crescimento, e podem ser cultivados em meios relativamente simples, incluindo o agar nutriente. São geralmente confundidas com as espécies do gênero *Neisseria*, entretanto, as primeiras são oxidase positivas (BERGOGNE-BÉRÉZIN & TOWNER, 1996). Entre as comunidades microbianas envolvidas em recuperação de ecossistemas tão diferentes como o solo, águas de mananciais, esgotos domésticos e industriais, diversas espécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter* têm sido identificadas, atraindo o crescente interesse médico, ambiental e biotecnológico. Os poluentes xenobióticos, tais como o benzeno, o tolueno, o fenol e o estireno, assim como compostos orgânicos halogenados (pentaclorofenol e bifenis policlorados) e metais pesados são frequentemente detectados nos córregos, em concentrações razoavelmente baixas. Podem também aparecer em quantidades maiores em pontos de lançamentos, ou no solo e na água de locais industriais abandonados. Estes compostos são geralmente altamente tóxicos e extremamente difíceis de serem removidos. Da mesma forma que esses, o óleo diesel ou outros derivados de petróleo lançados em esgotos são degradados por espécies de *Acinetobacter*, conforme relatado por vários autores (ABD EL-HALEEM *et al.*, 2002; ALLENDE *et al.*, 2000; FRANCISCO *et al.*, 2002; MISHRA *et al.*, 2001; ZILLI *et al.*, 2001). As bactérias do gênero *Acinetobacter* também têm sido estudadas pelos subprodutos importantes que produzem, como surfactantes (TOREN *et al.*, 2001), e enzimas lipolíticas (LI *et al.*, 2001).

De forma semelhante, inúmeros artigos têm relatado o papel de espécies de *Flavobacterium* na degradação de compostos clorados e herbicidas (SABER & CRAWFORD, 1985). Conforme MULBRY & KARNIS (1989) relataram que hidrolases

de *Flavobacterium* sp. são capazes de degradar o inseticida Parathion e seu derivado organofosforado O-etil-O-4-nitrofenil fenilfosfonotioato (EPN).

O Gênero *Proteus*, por sua vez, inclui bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae, com células medindo cerca de 0,4 a 0,8 µm de diâmetro, formando cocos, que podem se agrupar aos pares ou em cadeias, além de produzirem hastes geralmente retas e ausência de cápsula. São móveis, apresentando significativa produção de urease, responsável pela decomposição da uréia em amônia e CO₂. Além disso, produzem gás e sulfeto de hidrogênio (H₂S) resultantes da fermentação da glicose. O teste com vermelho de metila é geralmente positivo, e não fermentam lactose em meio ágar MacConkey. A temperatura ideal para o crescimento está em torno de 10-43 °C. Em relação a *P. vulgaris*, este é capaz de desaminar o aminoácido triptofano, liberando indol no meio de cultura. Em contrapartida, não há síntese de indol em *P. mirabilis*. Ademais, 98 % das amostras de *P. mirabilis* são produtoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S); utilizam citrato como única fonte de carbono, além de serem positivas para os testes da ornitina e Voges-Proskauer (SKERMAN, 1949; SHUCK & GRIFFIN, 1998).

Em 2000, estudos moleculares incluíram quatro espécies bacterianas dentro do gênero *Proteus*: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. myxofaciens* e *P. penneri*. Além disso, quatro genoespécies (3, 4, 5 e 6) não nomeadas, e pertencentes ao biogrupo 3 da espécie *P. vulgaris* foram também incluídas nesse gênero. Dentro da tribo *Proteae*, *P. mirabilis* é uma das espécies mais importantes clinicamente, sendo responsável por 10 % das infecções do trato urinário. Isto se deve à presença de flagelos, fímbrias, lipopolissacarídeos (endotoxina, LPS), e outros fatores de virulência. Também, muitas espécies de *Proteus* podem formar cristais de hidróxido de magnésio causando pedras nos rins e na bexiga (SWIERZKO *et al.*, 2000).

As bactérias pertencentes ao gênero *Proteus* têm ampla distribuição na natureza, podendo ser encontradas na água, nas plantas, nos excrementos de muitos animais, em esgotos e principalmente em solos onde existem proteínas animais em decomposição. Entre elas, as estóreas de *Proteus mirabilis*, devido ao seu crescimento disperso em meio ágar, além de outras características morfológicas e bioquímicas já mencionadas, parecem ser a mais importante nas transformações dos contaminantes de solos e águas (SIDORCZYK *et al.*, 2003). Para OKPOKWASILI & OLIVA (1991), alguns microrganismos Gram-negativos crescem

em detergentes líquidos e xampus, principalmente bactérias do gênero *Proteus*, que são mais tolerantes a concentrações de 10-20 mL de surfactantes.

De acordo com AKMAL *et al.* (2003), certas bactérias do gênero *Proteus* são capazes de degradar compostos complexos como o poli-3-hidroxi-butirato P(3HA) e o poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato P(3HB-co-3HV).

PANTAROTO (2001), isolou 66 bactérias aeróbias de amostras de manipueira e lodo de lagoas destinadas à decantação destes efluentes, avaliando-as quanto ao metabolismo de linamarina "*in vitro*", para futura aplicação das linhagens selecionadas em estudos de biorremediação. Desses, apenas 3 linhagens de *Serratia marcescens* demonstraram adaptar-se à manipueira diluída à 50% e 75%, mantendo-se viáveis mesmo em presença da microbiota indígena *in vitro*. MONTPAS *et al.* (1997) já haviam observado que uma estirpe de *S. marcescens*, isolada de solo de um local contaminado, degradara o 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como única fonte do carbono e energia. Segundo tais autores, em uma concentração inicial de 50 mg de TNT presente em um meio mínimo de sais, este foi totalmente degradado em 48 h sob condições aeróbicas. Os intermediários da redução (4-amino-2,6-dinitrotolueno e 2-amino-4,6-dinitrotolueno) foram monitorados, sendo que a presença do surfactante Tween 80 foi essencial para agilizar a rápida degradação do composto pela bactéria.

PAKALA *et al.* (2007) estudaram o efeito de *Serratia* sp. sobre a degradação do inseticida metil-Parathion, e de p-nitrofenol, 4-nitrocatecol, e 1,2,4-benzenetriol. O p-nitrofenol e o ácido dimetil-tiofosfórico foram encontrados como produtos principais da degradação do metil-Parathion. O crescimento no p-nitrofenol conduziu à liberação de quantidades estequiométricas de nitrito e à formação do 4-nitrocatecol e do benzenetriol. Quando estes intermediários catabólicos foram adicionados às células em repouso de *Serratia* sp., o consumo do oxigênio foi detectado. As enzimas chave envolvidas na degradação do metil-Parathion e na conversão do mesmo a p-nitrofenol e 4-nitrocatecol, chamada Parathion-hidroxilase e p-nitrophenol-componente "A" da hidroxilase foram detectadas nos proteomas das culturas crescidas naqueles substratos. Esse estudo foi o primeiro relato de uma enzima do tipo componente A de hidroxilase, típico de bactérias Gram positivas, em uma representante Gram negativa.

Portanto, todos os microrganismos identificados no lodo da lagoa de decantação "A" das águas de lavagens de cana, gases, cinzas e pisos da Usina sucroalcooleira em estudo apresentam potencial para utilização em estudos de biorremediação de tais efluentes.

Bactérias isoladas das águas residuárias da lagoas de decantação

No presente trabalho, algumas das bactérias das águas residuárias lançadas na safra de 2005/06 na lagoa de decantação da ETE estudada também foram identificadas, sendo estas pertencentes aos gêneros: A1 (*Klebsiella* sp), A2 (*Corynebacterium* sp), A3 (*Arthrobacter* sp), A4 (*Streptomyces* sp); A5 (*Stafilococcus* sp), A6 (*Acinetobacter* sp); A7(*Corynebacterium* sp) e A8 (*Serratia* sp).

O gênero *Klebsiella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo formado por bastonetes imóveis G-, com cápsula polissacarídica, que são disseminados na natureza. Em humanos, eles podem colonizar a pele, faringe e trato gastrointestinal, ou ferimentos e sistema urinário. Muitas das infecções causadas por esse gênero no homem devem-se às espécies *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*. WONG. & YUEN (1996), isolaram e selecionaram em esgoto de indústria têxtil uma estirpe de *K. pneumoniae* (RS-13). Esta foi avaliada quanto à sua capacidade em descolorir o azo corante vermelho de metila, em condições aeróbicas. Parâmetros físico-químicos foram monitorados durante o curso do crescimento. A bactéria descoloriu completamente o composto presente no meio numa concentração de 100 mg L⁻¹. A alta eficiência de *K. pneumoniae* RS-13 em degradar o vermelho de metila em baixo suplemente de nutrientes a capacita a ser utilizada para o tratamento de efluentes industriais contendo azo corantes. KWON *et al.* (2005), trabalhando com a mesma estirpe de *K. pneumoniae*, demonstraram que ela também foi capaz de degradar os inseticidas organoclorados α e β -endossulfan e endossulfan-sulfato.

ZAID (1996) observou a degradação de baixas e altas concentrações de p-nitrofenol por taxas celulares de 2×10^5 a $3,2 \times 10^6$ células/mL de *Corynebacterium* sp e de *Pseudomonas* sp. A baixas concentrações de PNP, as duas biomassas de ambas as bactérias apresentaram efeitos semelhantes e não alteraram o período de adaptação. Por outro lado, o tempo de aclimação foi encurtado e as taxas de extensão e mineralização do PNP foram maiores quando este estava presente em baixa concentração, à medida que se aumentou o inóculo de *Corynebacterium* sp,

mas não no caso de *Pseudomonas*. Adição de fosfato também reduziu o tempo de aclimação de *Corynebacterium* sp para a degradação de PNP.

Segundo ITO *et al.* (1998), bactérias degradadoras de ácido poli-4-hidroxi-butírico (APHB) foram isoladas de lodo ativado de esgoto. Uma estirpe, identificada como *C. aquaticum*, excretou uma depolimerase capaz de degradar esse composto, e crescer nele como única fonte de carbono. The APHB-depolimerase foi purificada por ultrafiltração da cultura, gel filtração e cromatografia em coluna hidrofóbica. O peso molecular da enzima foi de cerca de 33 KDa em eletroforese de gel de poli-acrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS). A atividade ótima foi detectada em pH 6.5 e 40°C. A enzima não teve atividade lipolítica e suas seqüências N-terminais não foram semelhantes às de outras enzimas conhecidas. A degradação de poliésteres foi estudada pela taxa de erosão de filmes solúveis em água de poli (3-hidroxi-butirato- co- 97mol% 4-hidroxi-butirato) e poli(ω -hidroxialcanoato de diferentes tamanhos de cadeia carbônica (C3-C6). Os produtos solúveis em água foram identificados por ressonância magnética nuclear (RMN) de prótons ^1H e análise de espectrometria de massa. O principal produto foi o dímero do ácido 4-hidroxi-butírico.

MESQUITA (2004) apresenta uma revisão sobre a biodegradação de alguns compostos de forma química e biológica, citando que *Corynebacterium* spp. estão envolvidas na biorremediação de PCBs (bifenilas policloradas) e HPAs (hidrocarbonetos poli-aromáticos).

Pesquisas de GIRBAL *et al.* (2000) mostram que o pesticida organofosforado demeton-S-metil foi degradado mais rapidamente quando *Corynebacterium glutamicum* atuou em co-metabolismo. Assim, glicose, acetato e frutose foram testados como substratos indutores do crescimento, obtendo-se a mais alta taxa de biotransformação do demeton-S-metil ($0.78 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e a taxa instantânea máxima sobre frutose ($1.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Essa eficiência está ligada ao atípico comportamento de *C. glutamicum* sobre esse substrato, caracterizado pelo período prolongado de crescimento acelerado ao invés de um crescimento constante como foi observado sobre glicose e acetato. Mais precisamente, para taxas de crescimento de $0.1-0.4 \text{ h}^{-1}$, houve uma relação direta entre o consumo de demeton-S-metil e o crescimento sobre frutose em culturas em batelada (estacionária-contínua) e contínuas (com um crescimento transitório controlado). A biotransformação foi mais favorecida durante a fase acelerada de crescimento.

WARD & CLAUS (1973) relatam a dificuldade na identificação das espécies do gênero *Arthrobacter*, por apresentarem variação à coloração de Gram. O gênero *Arthrobacter* é caracterizado por bactérias Gram positivas na forma de bastonetes, habitualmente não-móveis, aeróbicas estritas, não-esporogênicas, e que apresentam reação negativa para oxidase e urease, e positiva para catalase. Não reduzem nitrato de nitrito, e produzem H₂S a partir de cisteína (WILLIAMS *et al.*, 1966).

ATAGANA *et al.* (1999) isolaram 5 diferentes microrganismos de águas de lavagem de borracha natural, isto é, *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Streptococcus* sp, sendo o primeiro a espécie dominante, e seu potencial para utilizar o hidrocarboneto de borracha foi estudado. Seu crescimento esteve associado ao pH, sendo este melhor numa faixa de pH entre 7,5 e 8,5, reduzindo eficientemente a taxa de DBO nesse intervalo. Os autores sugeriram que esse microrganismo fosse, então, utilizado em processos de bioaugmentação de lagoas de tratamento de águas de lavagem de borracha natural, preferencialmente também associado a um fungo filamentoso aeróbico, o *Mucor* sp, capaz de adsorver em seu micélio outros componentes daquele efluente.

FAY *et al.* (2003), isolaram bactérias degradadoras do fungicida clorotalonil e constataram que espécies como *A. nicotinovorans*, *A. globiformis*, *A. ilicis* e *A. urea-faciens* degradaram acima de 80% do composto analisado por cromatografia gasosa. Os autores observaram que a incorporação de diferentes matérias orgânicas ao solo aumentou a comunidade de degradadores, diminuiu a disponibilidade e minimizou os efeitos adversos do clorotalonil.

Um biofilme de *Arthrobacter viscosus* imobilizado em carvão granular ativado foi testado por QUINTELAS (2000), visando a recuperação e reutilização de metais pesados. Foi possível remover cerca de 79,3% de chumbo e 86,6% de ferro durante o processo, esta remoção está associada à superfície da célula bacteriana que pode incluir fenômenos como adsorção, ligações iônicas, covalentes, permuta iônica e precipitação. Seguindo processo semelhante, TAVARES e SILVA (1998) já haviam relatado o uso de *Arthrobacter* para a remoção de metais pesados, por produzirem exopolissacarídeos em alta concentração, permitindo assim maior retenção dos íons metálicos. Os autores obtiveram resultados satisfatórios na remoção de cromo.

Segundo NITSCHKE e PASTORE (2001), isolados de *Arthrobacter* produzem biosurfactantes promissores na remoção de “piche” em areias contaminadas, e esses compostos possuem a capacidade de emulsificar e dispersar hidrocarbonetos

em água, aumentando assim a degradação destes compostos no ambiente. NORDIN (2004), em seus estudos evidenciou que a espécie *A. chlorophenicus* foi capaz de remover 180 µg/g de 4-chlorophenol de solo não-estéril através da produção de várias enzimas como a mono-oxygenase, hydroxyquinol dioxygenase e maleylacetato redutase.

Streptomyces spp. são bactérias G+, formadoras de esporos encontradas no solo e caracterizadas por suas colônias enrugadas, largas, e geralmente pigmentadas. São quimioheterotróficas e crescem bem a 25°C e pH 8-9. Sua habilidade degradativa faz dessas bactérias extremamente importantes para a fertilidade dos solos agrícolas, além de produzirem diferentes classes de moléculas voláteis que podem dar odores característicos a tais solos. SHELTON *et al.* (1996), estudaram o metabolismo de 12 herbicidas por *Streptomyces*, onde a degradação do diuron foi comparada com e sem fonte de nitrogênio (NH₄⁺). Os autores constataram uma baixa taxa de biodegradação do produto (19%), sendo esta aumentada na presença de nitrogênio (55%), após 7 dias de incubação. Estes dados corroboram com os apresentados neste experimento, onde o diuron como fonte de carbono foi importante para o metabolismo bacteriano. Espécies de *Streptomyces* também têm sido associadas com a degradação de azocorantes (SOARES, 2000).

Staphylococci são bactérias esféricas G+ que ocorrem em grupos. *Staphylococcus aureus* (amarela em meio rico) e *Staphylococcus epidermidis* (branca em meio rico) são as espécies mais importantes, embora mais de 20 sejam descritas. MONNA *et al.* (1993), verificaram que o isolado de *Staphylococcus auriculans* DBF63 pode crescer sobre dibenzofurano (DBF) ou fluoreno (FN) como única fonte de carbono e energia, acumulando-se os ácido salicílico e gentísico nas culturas. Também a formação de 9-fluorenol, 9-fluorenona, 4-hidroxi-9-fluorenone, e 1-hidroxi-9-fluorenona foi demonstrada, e o acúmulo de 1,1a-dihidroxi-1-hidro-9-fluorenona foi observado quando essa estirpe cresceu sobre FN.

Bactérias isoladas do bagaço de cana acumulado

No tocante aos isolados bacterianos obtidos do bagaço-de-cana acumulado em pirâmide no pátio da referida empresa, e coletado no início da safra 2005/06, a maioria foi identificada como representante dos gêneros: BC1 (*Bacillus* sp), BC2 (*Clostridium* sp), BC3 (*Acinetobacter* sp), BC6 (*Acinetobacter* sp); BC7(*Corynebacterium* sp) e BC11(*Lactobacillus* sp).

O gênero *Bacillus* possui mais de 50 espécies classificadas como G+, aeróbias ou anaeróbias facultativas, que apresentam endósporos. TONDO *et al.* (1998) isolaram uma bactéria com tais características, a partir de efluente de fábrica de polpa de celulose. Esse microrganismo, identificado como *Bacillus* sp. e nomeado IS13, foi capaz de degradar rapidamente o composto orgânico clorado 4,5,6-tricloroguaiacol (4,5,6-TCG) presente em meio de cultura a uma concentração de 50mg/L. Essa concentração equivale a 3×10^4 vezes mais 4,5,6-TCG que a concentração encontrada no efluente original. A biodegradação desse composto foi analisada por espectrofotometria de varredura e cromatografia gasosa. A falta de subprodutos de degradação sugeriu a verificação da possibilidade de adsorção e absorção celular do 4,5,6-TCG ao invés de biodegradação propriamente dita. Não foram encontrados traços de 4,5,6-TCG após lise celular com lisozima e SDS e não houve desprendimento desse composto após agitação vigorosa. Logo, o desaparecimento do 4,5,6-TCG do meio de cultura analisado foi interpretado como biodegradação devido ao metabolismo do *Bacillus* sp. IS13.

Segundo LEMOS (2006), esse gênero é o mais eficiente na produção de xilana por bactérias, sendo muito usado em fermentações industriais. Estudos de FEIKENHAUER (2001) também relatam, por exemplo, que a espécie *B. thermoleovorans* apresenta um ótimo crescimento e degradabilidade de poluentes fenólicos de águas residuárias a 65°C.

Surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterim* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piches em areia contaminada. Os biossurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Surfactantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis. Cepas de *Bacillus subtilis* produzem surfactantes apenas em substratos hidrossolúveis. A iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Além das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, outras dos gêneros *Clostridium*, *Sporosarcina* e *Heliobacterium* também formam endósporos dentro de suas células, sendo esta estrutura resistente a altas temperaturas, congelamento, radiação, dessecação e agentes químicos (MADINGAN *et al.*, 2000; TORTORA,

2002). Já o gênero *Clostridium*, possui aproximadamente 150 espécies, geralmente bastonetes retos ou curvos a pequenos bastonetes cocóides (longos ou filamentosos), podendo ser G+ e G- . Compreende uma série de microorganismos que, por necessitar para a sua multiplicação, de um baixo potencial redutor, recebem o nome de anaeróbios. Os Clostrídios abrangem numerosas espécies e tipos saprófitos amplamente difundidos pela natureza. Originam a putrefação das carnes e dos animais mortos. Algumas espécies de clostrídios têm importância como causas de doenças (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004).

Clostridium orbiscindens converteu os flavonóides quercetina e taxifolina a 3,4-ácido dihidroxifenil-acético; luteolina e eriodictiol a ácido 3-(3,4-dihidroxifenil-propionico); e apigenina, naringenina, e floretina a ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico, respectivamente. Genisteina e daidzeina não foram utilizados pela bactéria. As ligações glicosídicas da luteolina-3-glucosídeo, luteolina-5-glucosídeo, naringenina-7-neohesperidosídeo (naringina), quercetina-3-glucosídeo, quercetina-3-rutinosídeo (rutina), e floretina-2'-glucosídeo não foram clivados (SCHOEFER *et al.*, 2003).

LODAYA (1989) avaliou a biodegradação aeróbica de benzeno foi estudada usando lodo ativado imobilizado em alginato de cálcio unido a silicone. Peróxido de hidrogênio foi usado como uma fonte do oxigênio dissolvido para a remoção física do benzeno, devido às perdas pela oxidação abiótica do benzeno. Foi utilizado o reator de fluxo contínuo, para determinar os parâmetros cinéticos seguindo mudanças na concentração do benzeno, taxa de fluxo, e biomassa imobilizada. Depois, o modelo simulado dos parâmetros cinéticos estabelecidos, foi utilizado num outro reator alimentado com benzeno, tolueno e p-xileno (BTX). A eficiência do catalisador seco e imobilizado foi de 0.4453 grânulos secos por ppm de benzeno/h/g, e 0.067 grânulos secos do catalisador não imobilizado por ppm benzeno/h/g. Isolamento dos microorganismos do lodo utilizado rendeu espécies dos gêneros *Microbacterium*, *Plesiomonas*, *Kurthia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, e *Pseudomonas*, sendo que o degradador inicial do benzeno foi o isolado de *Pseudomonas*, que gerou metabólitos utilizados pelos demais microorganismos.

A inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biossurfactante produzido por *Lactobacillus* também já foi relatada. Os autores sugeriram o desenvolvimento de agentes anti-adesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilme (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

5.2. Detecção de enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos

A **Figura 33** ilustra a distribuição percentual dos isolados bacterianos obtidos em cada substrato (lodo, águas residuárias e bagaço de cana) em termos de atividades enzimáticas testadas.

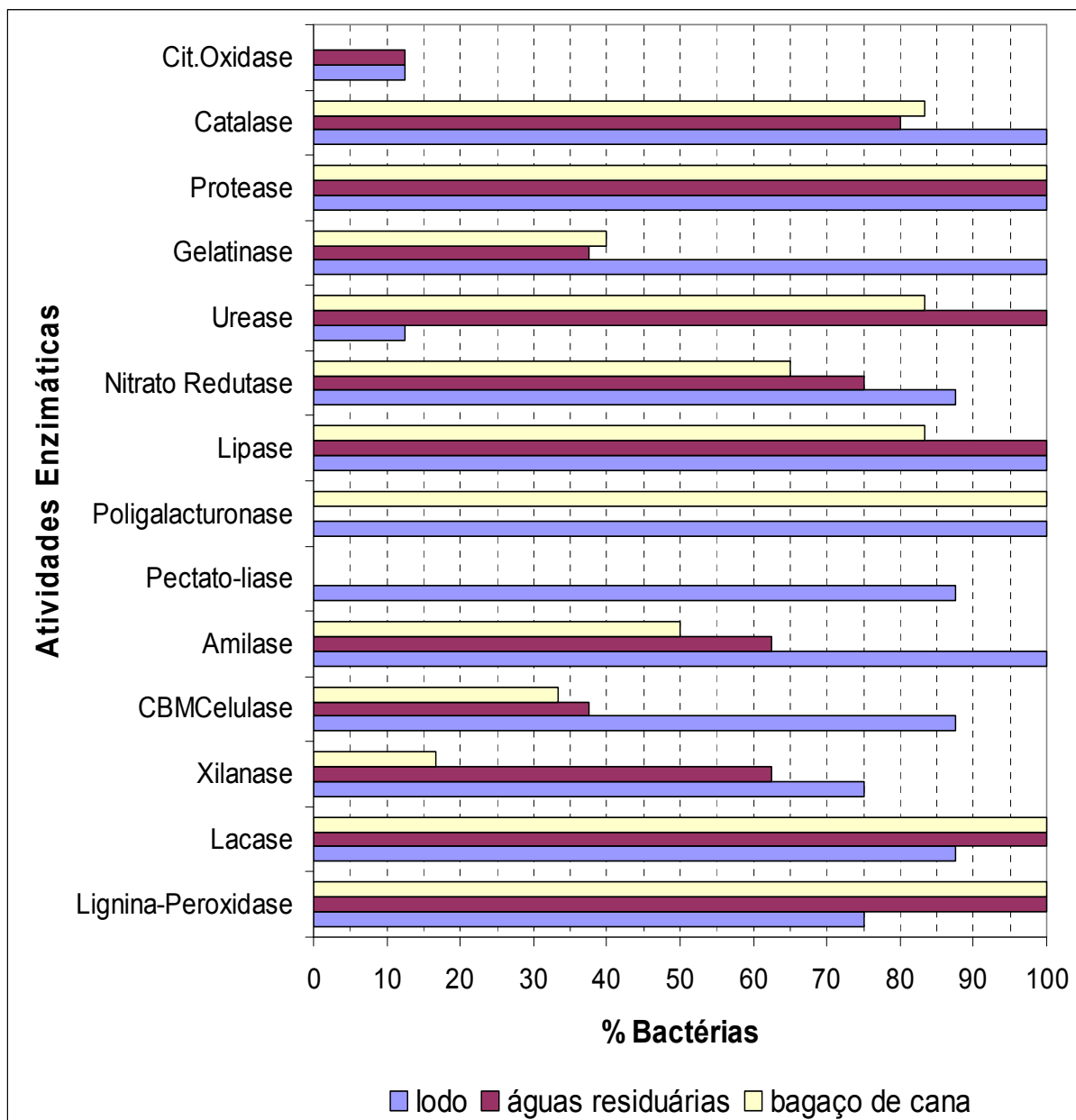


Figura 33. Distribuição em % de bactérias isoladas de bagaço de cana, lodo e águas residuárias da lagoa de decantação “A”, da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05 e 2005/06), por faixa de atividades enzimáticas extracelulares detectadas.

De acordo com MOREIRA & SIQUEIRA (2002), microrganismos isolados de ambientes com alta carga orgânica são, em geral, detentores de sistemas enzimáticos capazes de degradar os principais componentes da matéria orgânica nele presentes. No caso do grupo todo dos microrganismos aqui relatados como isolados de lodo, a produção de enzimas específicas em termos de número de organismos isolados seguiu a seguinte ordem crescente: citocromo-oxidase e urease < lignina-peroxidase e xilanase < lacase, carboximetilcelulase, pectato-liase e nitrato-redutase < amilase < poligalacturonase < protease, gelatinase, catalase e lípase. Já no grupo completo dos isolados das amostras de efluente da lagoa "A", a produção de enzimas cresceu na seguinte ordem de número de microrganismos expressando-as: pectato-liase e citocromo-oxidase < xilanase < carboximetilcelulase < gelatinase < amilase < nitrato-redutase < urease e catalase e lípase < lacase, lignina peroxidase, protease < poligalacturonase. O grupo dos isolados a partir de bagaço de cana produziu com frequência crescente as seguintes enzimas avaliadas: pectato-liase e poligalacturonase < citocromo-oxidase < gelatinase e carboximetilcelulase < amilase e xilanase < nitrato-redutase < catalase < lignina-peroxidase, lacase, lípase, protease e urease.

Verificou-se que todos os isolados de lodo sintetizam catalase e, com exceção do isolado de *Flavobacterium* sp, todos os demais produziram nitrato-redutase, sendo capazes de produzir nitrito e gás nitrogênio, processo que usualmente ocorre sob condições anaeróbias e é importante na degradação de compostos aminados e de condições onde o suprimento de oxigênio dissolvido é baixo.

Como visto anteriormente, várias pesquisas revelam uma grande quantidade de microrganismos com a capacidade de recuperar ambientes contaminados, pois são capazes de degradar compostos recalcitrantes, materiais lignocelulósicos e azocorantes (TEN *et al.*, 2004a; TEN *et al.*, 2004b; SANOMIYA & NAHAS, 2003). Segundo LI *et al.* (2004), alguns fatores podem atuar negativamente sobre a ação enzimática, como no caso de uma linhagem de *Achromobacter* sp, que manifestou perda parcial da atividade nitrato-redutase em virtude da presença de cobre tipo II em meio de cultura.

SANOMIYA & NAHAS (2003) observaram alta incidência de bactérias proteolíticas (65 %) em solos cultivados com braquiária e guandu, sujeitos ainda ao efeito da adubação fosfatada e da calagem. É certo que as transformações

metabólicas nos solos e lodos de efluentes industriais ocorrem mediante consórcio de microrganismos, visto que a taxa de crescimento e o potencial enzimático dos isolados estudados podem ser influenciados pela interação das populações microbianas (metabolismo e co-metabolismo).

O processo de co-metabolismo oferece um potencial valioso nas tecnologias de tratamento ambiental porque a população microbiana pode crescer em altas concentrações de uma fonte inócua de Carbono e ainda degradar o contaminante. A utilidade do processo co-metabólico tem sido demonstrada com a degradação de uma variedade de poluentes, incluindo herbicidas clorados (BOLLAG & LIU, 1990).

Para propósitos práticos, o co-metabolismo e o metabolismo fortuito podem ser considerados como uma simples espécie do processo metabólico, com ampla aplicabilidade no tratamento de misturas de resíduos com diversas populações metabólicas. Isso inclui duas fases normalmente conhecidas como Fase I e Fase II. As maiores reações envolvidas na Fase I são: oxidação, redução e hidrólise. Durante a Fase I, o composto químico pode adquirir grupos reativos tais como: OH, NH₂, COOH ou SH. As reações da Fase II são reações sintéticas ou de conjugação. As substâncias endógenas comumente envolvidas com as reações de conjugação incluem: glicina, cisteína, glutatona, ácido glicurônico, sulfatos e outros compostos solúveis em água (LANDIS & MING-HO, 1995). Muitos compostos sofrem, de forma seqüencial, as reações da Fase I e Fase II, enquanto outros sofrem reações de apenas uma fase. Os compostos lipofílicos, nas reações envolvendo as duas fases, são primeiramente oxidados e, assim, um grupo funcional (normalmente uma OH) é introduzido na molécula. Esse grupo é, então, unido por enzimas de conjugação à uma molécula polar, facilitando a excreção desse composto (LANDIS & MING-HO, 1995).

De acordo com CHONAN *et al.* (2002) e MONTGOMERY *et al.* (1995), cepas de *Achromobacter* sp, *Citrobacter* sp, *Lisobacter* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Cytophaga johnsonii*, foram eficientes quanto à produção de endopeptidases, fosfatases e nucleases extracelulares.

Efeitos secundários da atividade microbiana também podem levar à transformação da molécula. Por exemplo, alterações de pH (contribuem com a hidroxilação de muitas substâncias, tornando-as mais polares e mais passíveis de degradação), no potencial redox, etc. (PRATA, 1988.; BOLLAG & LIU, 1990).

Segundo pesquisas de GIESE *et al.* (2004), em condições apropriadas, os detergentes podem combinar-se com as lipoproteínas constituintes das membranas biológicas, tornando-as permeáveis. Conforme tais autores, o Tween 20 utilizado em seus ensaios alterou a parede celular de *Proteus* sp, favorecendo a secreção de enzimas para o meio extracelular, com exceção das lacases, visto que estas não foram sintetizadas pelo referido microrganismo naquelas condições.

GUEVARA & ZAMBRANO (2006) relataram o isolamento de 178 microrganismos de cana-de-açúcar, sendo que apenas 23 tiveram capacidade de degradar a celulose a 40°C, enquanto 13 e 5 isolados produziram halo de degradação quando a temperatura estava entre 50 - 60 °C, respectivamente. KIM *et al.* (2005) obtiveram seus melhores resultados entre 40 - 60 °C para atividade celulolítica com espécies de *Bacillus* sp. PÉREZ *et al.* (2002) relataram que as bactérias celulolíticas mais estudadas pertencem aos gêneros *Cellulomas*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*, e que temperaturas ótimas para produção e ação da xilanase, tanto em bactérias como em fungos, variam entre 40 - 60 °C.

Para AHMED *et al.* (2001), o polímero fenólico combinado com celulose e hemicelulose (lignocelulose) é altamente recalcitrante e freqüentemente encontrado em águas residuárias agroindustriais. Dos isolados obtidos de águas residuárias neste trabalho, 62,5 % apresentaram atividade xilanolítica e 100% apresentaram atividade fenolítica (degradação de ácido gálico a 0,5 %), revelando-se promissores para estudos de detoxificação de ambientes contaminados por tais compostos.

Embora nenhum ensaio quantitativo tenha sido conduzido para avaliação dessas atividades, pode-se inferir que, pelos halos de degradação obtidos em meio sólido, os microrganismos aqui estudados apresentam um arsenal enzimático que permite utilizá-los em processos de biorremediação, sendo altamente promissores para os tratamentos de resíduos e efluentes industriais, como também sua biovariabilidade genética podem ser utilizada na manipulação e aplicação de melhoramento de processos.

Visto seu versátil metabolismo, os isolados *Achromobacter* sp e *Proteus* sp, obtidos do lodo das lagoas da ETE, foram selecionados para testes de cinética de degradação de fenóis, por apresentaram variadas atividades enzimáticas, e contrastarem em suas atividades xilanolítica e seu metabolismo aeróbio e anaeróbio facultativo.

5.3. Crescimento de *Proteus* sp e *Achromobacter* sp em AN e meio sólido contendo ácido tânico (ATS)

Os ensaios preliminares de degradação de ácido tânico foram realizados em meios sólidos contendo 0,8 % (ATS₁) e 1% (ATS₂) do substrato fenólico, visto que o método fornece uma análise qualitativa rápida. O isolado L3 obtido de lodo da ETE estudada, identificado como *Proteus* sp, foi o único que apresentou crescimento em meio ATS₁ (0,8 %) (**Figura 34**). Os demais isolados não toleraram a concentração de 0,8 % do substrato fenólico.



Figura 34. Crescimento de *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa de decantação “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio sólido com ácido tânico (0,8 %), acrescido de 0,1 % de glicose, 0,1 % de peptona e 0,1 % de NaCl.

De acordo com BAIJAI & PATIL (1997), LEKHA & LONSANE (1997) e PINTO (2003), o ácido tânico atua como fonte de carbono e indutor da síntese de tanase para os microrganismos. Assim, o crescimento das colônias em ATS₁ foi considerado um indicador da capacidade de utilização do ácido tânico como fonte de carbono devido à ação da tanase sobre o meio de cultura. De acordo com O’ DONOVANT & BROOKER (2001), os microrganismos freqüentemente secretam uma ME (matriz extracelular), constituída por uma compacta cápsula de monossacarídeos com ligações do tipo α e β , que os tornam mais resistentes ao ácido tânico, uma vez que confere uma barreira de proteção aos mesmos. A resistência ao ácido tânico não se deve apenas à síntese da ME, ou da produção de fenoloxidasas, uma vez que o aumento da produção da ME não torna o microrganismo mais tolerante ao ácido tânico.

É provável que o isolado *Proteus* sp tenha se adaptado e crescido na presença de ácido tânico (0,8 %) por meio da síntese de tanase e da ME. Já em meio ATS₂ [1% de ácido tânico e sais minerais (NaNO₃, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄ . 7H₂O, Fe₂SO₄ . 7H₂O, CuSO₄)], nem esse isolado pôde crescer.

O isolado *Achromobacter* sp (L1) foi capaz de crescer em ácido gálico em meio sólido (atividade ligninolítica), o que indica sua possível aplicação na decomposição de compostos fenólicos. Na seleção em meio sólido contendo ácido tânico, no entanto, em concentrações de 0,8 e 1 %, não se observou crescimento, desse isolado, provavelmente devido à ausência de cofatores necessários para a atividade enzimática. Segundo estudos de BHAT *et al.* (1998), espécies de *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) foram tolerantes à presença de 7% de ácido tânico e 4 % de proantocianidinas em meio de cultura, mas *S. bovis* não suportou concentrações tão baixas quanto 0,7% desse composto.

Concentrações de ácido tânico entre 0,8- 1 % nem sempre são tóxicas para os microrganismos em geral. Estudos realizados por MONDAL *et al.* (2001), com o cultivo de *B. cereus* KBR9 sobre 1% de ácido tânico, mostraram a produção significativa de tanase (0,22 U/mL), cuja síntese está diretamente relacionada com a concentração de ácido tânico adicionada ao meio de cultura.

Estudos de AYED & HAMD (2002) mostram que *Lactobacillus plantarum* produziu uma tanase extracelular após 24 h de crescimento em meio mínimo de aminoácidos contendo 2 g L⁻¹ de ácido tânico. A produção da enzima (6 U mL⁻¹) foi ótima a 37 °C e pH 6 com 1 g L⁻¹ de glicose e 2 g L⁻¹ de ácido tânico na ausência do O₂. Este substrato favorece a rápida produção de tanase e de outras fenoloxidasas, que, por sua vez, clivam os taninos hidrolisáveis fornecendo suprimento contínuo de fonte de carbono. Em experimento preliminar realizado por PINTO (2003), sem adição de ácido tânico no meio de fermentação de *Aspergillus niger*, não foi observada atividade taninolítica em nenhum tempo de incubação (30 ± 1°C, escuro).

5.4. Cinética de Crescimento de *Proteus* sp e *Achromobacter* sp em CN e meio ácido tânico (ATL)

O perfil de crescimento de *Proteus* sp em CN demonstra dois picos de intensa divisão celular nas primeiras 2 h de incubação (30 ± 1°C, escuro) e no intervalo de

24-48 h (sem aeração) considerado (**Figura 35**).

Partindo do pressuposto de que as células do isolado *Proteus* sp não se agregam, e que cada uma delas originaria uma colônia, avaliou-se o nº de UFC em AN (**Figura 36**) a partir do crescimento de células em CN, verificando-se a viabilidade das mesmas. O crescimento do isolado apresentou duas fases de produção de material celular, confirmando sua adaptação e, assim, a capacidade em metabolizar os substratos nas condições em que o teste foi realizado.

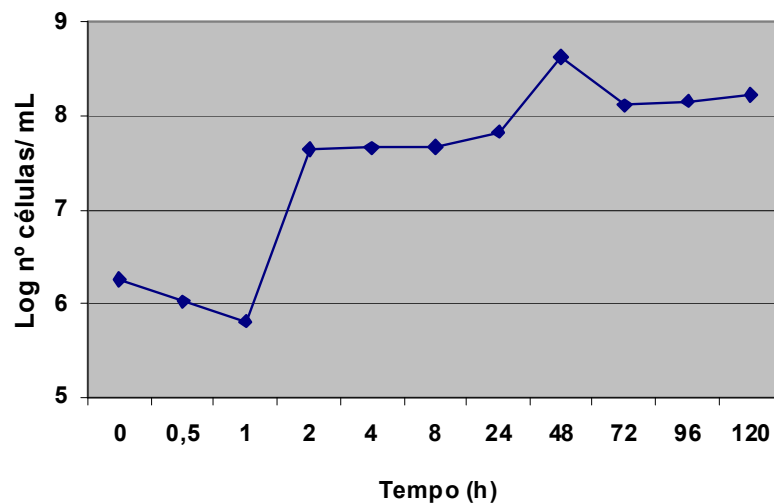


Figura 35. Crescimento de *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa “A “ da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em caldo nutriente (anaerobiose, $30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro).

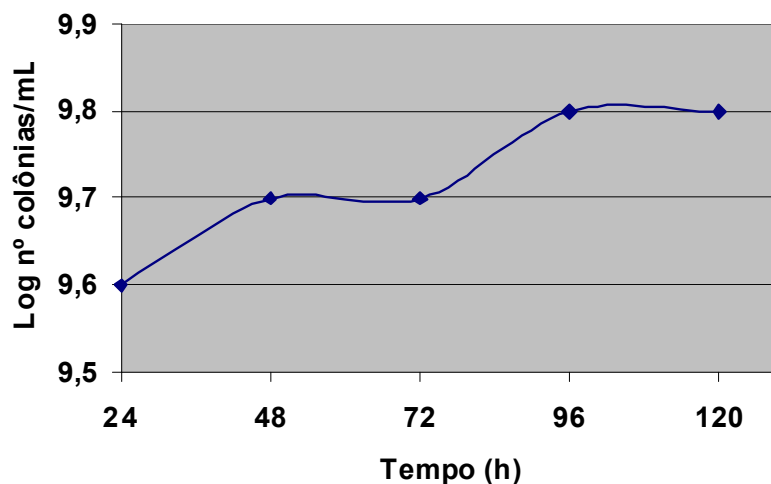


Figura 36. Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa de decantação “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), inoculado em CN e, posteriormente, em ágar nutriente ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro).

O curso do crescimento e a cinética de degradação de ácido tânico pelo isolado *Proteus* sp estão ilustrados nas **Figuras 37 e 38**. Em virtude de interferências dos cristais de tanino na leitura da densidade óptica, o número de células/mL de meio ATL foi determinado apenas por contagem direta com o auxílio de câmara de Newbauer, em microscópio óptico binocular. Conseqüentemente, o crescimento foi avaliado considerando o Log do número de células/mL, ao longo do tempo. Em ambos os meios (CN e ATL), o isolado de *Proteus* sp manifestou intensa divisão celular nas primeiras 2 h de incubação, de acordo com os dados constantes nas **Figuras 37-38**. Para tanto, os meios de cultura disponibilizaram, além do substrato tânico, também de peptona e glicose, sendo este último escolhido por ser o carboidrato mais utilizado pelas bactérias nos metabolismos oxidativo e fermentativo, permitindo a adaptação ao substrato fenólico e, conseqüentemente, indução da produção de fenol-oxidases.

Segundo BROWN (2000), a glicose é transportada por transporte facilitado mediado por transportadores de membrana específicos (GLUT) ou o co-transporte com o íon sódio (SGLT). Como o meio de cultura descrito foi acrescido de NaCl, o transporte intracelular de glicose se deu às custas do gradiente de concentração do sódio

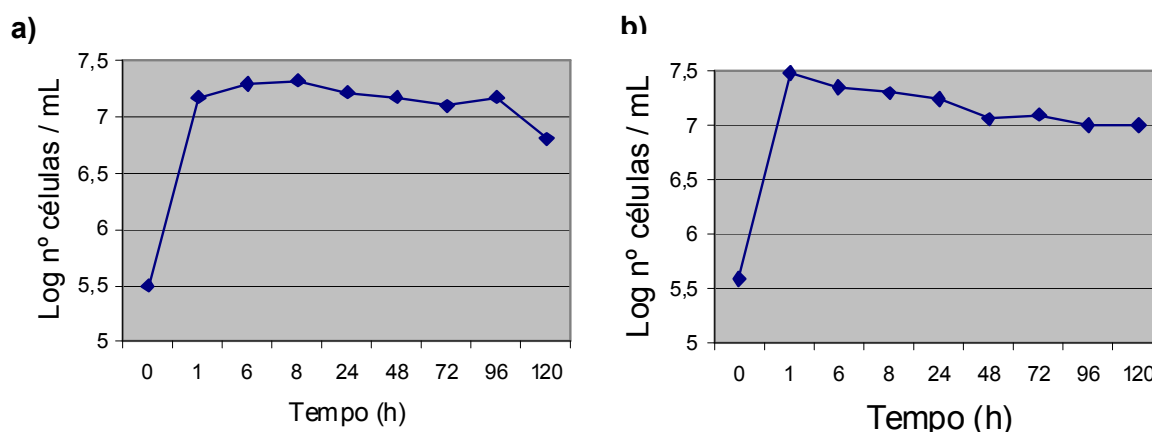


Figura 37. Crescimento de *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio líquido com ácido tânico (0,8 %) contendo também 0,1 % de glicose; 0,1 % de peptona e 0,1 % de NaCl. Culturas incubadas a 30 ± 1 °C no escuro. a) sem aeração; b) com aeração.

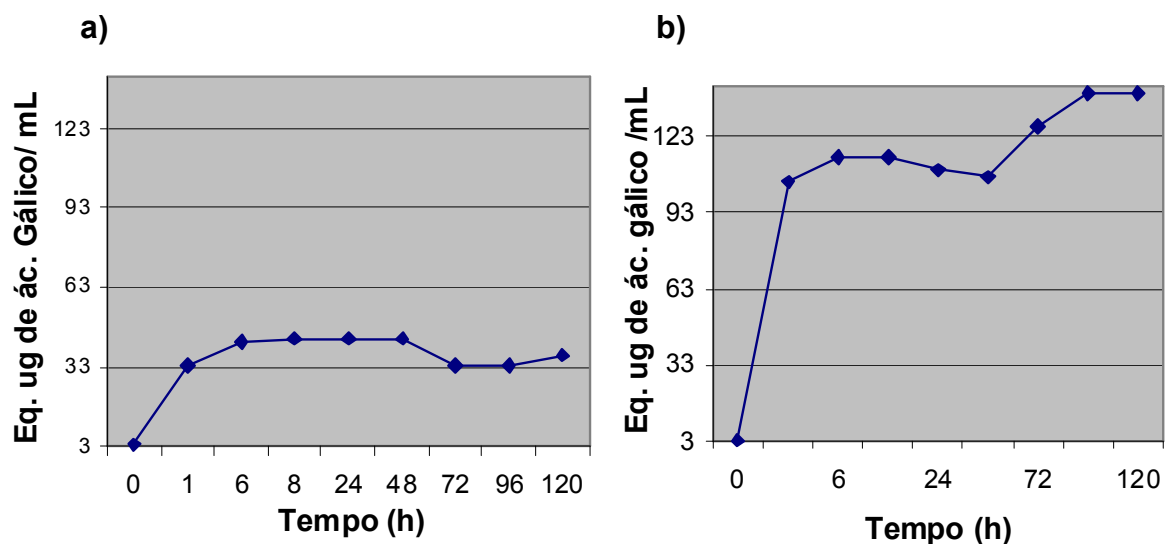


Figura 38. Cinética de liberação de ácido gálico a partir da degradação de ácido tânico (0,8 %) por *Proteus* sp, isolado de lodo da lagoa de decantação A da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio líquido contendo também 0,1 % de glicose; 0,1 % de peptona e 0,1 % de NaCl. As culturas foram incubadas ($30 \pm 1^\circ \text{C}$, escuro) e a concentração de ácido gálico foi avaliada após reação com vanilina-HCl concentrado. a) sem aeração; b) com aeração.

Verificou-se que a fase exponencial do crescimento em ATL se deu na primeira hora de cultivo (com aeração e sem aeração). Inferiu-se que o crescimento microbiano nas horas iniciais de incubação em ATL₁, deveu-se à glicose, e não necessariamente ao ácido tânico, e que a aeração favoreceu intensamente o processo de captação de energia, com acentuada produção de ácido gálico (**Figuras 37 e 38**). Isto se justifica pela produção de tanases que hidrolizam as ligações éster da molécula de ácido tânico, liberando ácido gálico. Este reagiu muito melhor que o pentagalolil-glicose com a vanilina-HCl, formando um complexo avermelhado. Sob anaerobiose, percebe-se que a produção de ácido gálico acentuadamente menor, indicando que a eficiência do processo requer oxigênio.

Quando a concentração de ácido tânico no meio foi aumentada de 0,8 % para 1 %, o isolado *Proteus* sp perdeu sua atividade taninolítica, e foi inibido, confirmando a ação antimicrobiana dos taninos.

Segundo estudos de O' DONOVANT & BROOKER (2001), espécies de *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) foram tolerantes à presença de ácido tânico e proantocianidinas em meio de cultura, até concentrações de aproximadamente 7 % e 4 %, respectivamente. Contudo, o crescimento de *S. bovis* foi inibido por taninos

em concentrações 10 vezes menor do que aquela tolerada por *S. gallolyticus*. Portanto, as cepas de *S. gallolyticus* apresentaram maior tolerância a altas concentrações do substrato tânico que a espécie *Proteus* sp, isolada neste trabalho, cuja tolerância ao ácido tânico pareceu mais próxima àquela de *S. bovis* (0,7 %).

De acordo com O' DONOVANT & BROOKER (2001), o ácido gálico produzido por cepas de *Proteus* sp pode ser transformado a pirogalol pela enzima galato descarboxilase, e este é menos recalcitrante que seu precursor. Contudo, tal mecanismo não ocorreu com o isolado *Proteus* sp, de lodo, visto que este não conseguiu degradar ácido gálico (0,5 %) no meio teste para atividade fenólica (**Tabela 5**).

BHAT *et al.* (1998) relataram que bactérias do gênero *Achromobacter* e espécies como *Enterobacter aerogenes*, *Agglomerans* sp, *Cellulomonas* sp, *Staphylococcus* sp, *Pseudomonas* sp e *Arthrobacter* sp são capazes de degradar galotaninos (taninos hidrolisáveis). Dessa maneira, pode-se utilizar consórcios destes microrganismos, aumentando o potencial enzimático bacteriano.

De acordo com SANOMIYA & NAHAS (2003), tanto a frequência como a atividade enzimática das bactérias são maiores que a dos fungos, o que sugere sua maior participação na transformação dos nutrientes do solo. Tais associações microbianas são comuns no ambiente natural e de grande importância para a preservação do equilíbrio termodinâmico. O ácido gálico, por exemplo, não sendo mais metabolizado por *Proteus* sp, pode ser utilizado por outras comunidades de microrganismos, reduzindo a toxicidade no meio e ainda contribuindo para a manutenção da biomassa microbiana.

A fase exponencial, de crescimento do isolado de *Achromobacter* sp em CN, ocorreu nas primeiras 24-72 h de incubação sem aeração. Entretanto, o isolado *Achromobacter* sp apresentou um crescimento moderado nas primeiras 8 h após inoculação, pelo fato do microrganismo ainda estar se adaptando às condições do meio e, principalmente, pela ausência de aeração, visto que é um organismo aeróbio estrito. Após esse período, o crescimento aumentou gradualmente, até 96 h, período a partir do qual verificou-se um declínio da população, possivelmente em virtude do esgotamento do oxigênio dissolvido (**Figura 39**). Em relação à contagem de UFC nas culturas em meio AN, os resultados revelaram maior crescimento 96 h após inoculação (**Figura 40**).

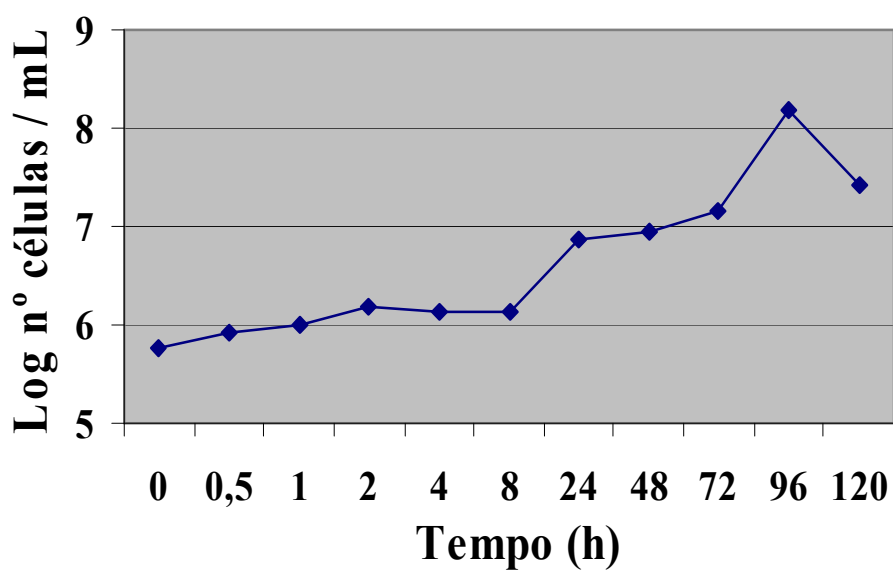


Figura 39. Crescimento (Log nº de células/mL) em caldo nutriente, de *Achromobacter* sp, isolado de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S.A.Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), incubado a 30 ± 1 °C, no escuro, sem aeração.

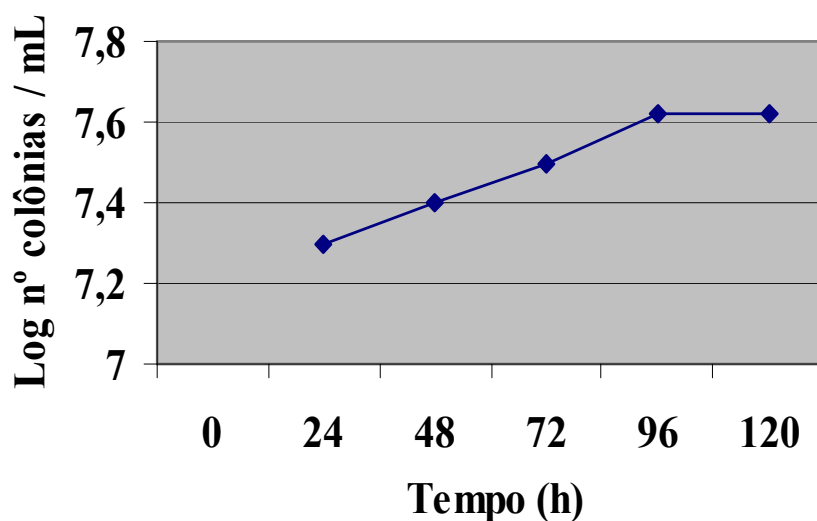


Figura 40. Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Achromobacter* sp isolado de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), inoculado previamente em CN e, posteriormente, em agar nutriente (30 ± 1 °C, no escuro).

O crescimento do isolado *Achromobacter* sp em meio ATL (0,8 %) evidenciou a produção da enzima tanase. Tal crescimento autolimitou-se, uma vez que aconteceu num curto período de produção de tanase nos ensaios sem aeração. O número de células manteve-se estável na primeira hora de cultivo sob aeração, aumentando gradativamente até 72 h de incubação (**Figura 41**). No entanto a partir desse instante, o crescimento do isolado sofreu um declínio. Em ambiente aeróbio, o crescimento do isolado atingiu taxas mais elevadas de crescimento, quando comparado ao resultado em meio líquido sem aeração, reafirmando-se que a presença de oxigênio é importante para seu metabolismo.

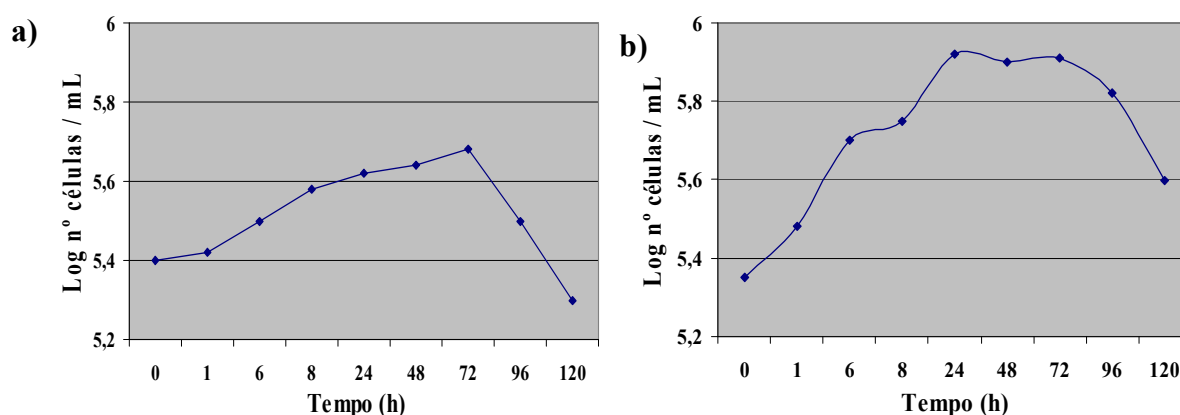


Figura 41. Crescimento de *Achromobacter* sp isolado de lodo da lagoa de decantação “A” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), em meio líquido contendo 0,8%, de ácido tânico; 0,1% de glucose e 0,1% de peptona, 0,1% de NaCl a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro. a) anaerobiose; b) aerobiose.

O crescimento de *Achromobacter* sp em meio líquido contendo 0,8 % de ácido tânico foi verificado nas primeiras 24 h após a inoculação, sob condições de aeração. Na ausência de aeração, o isolado apresentou redução do número de células, sendo este, portanto, um fator limitante de crescimento.

O aumento da concentração de ácido gálico, decorrente da degradação de ácido tânico por *Achromobacter* sp, foi intenso nas primeiras 72 h sob condições de aerobiose e anaerobiose (**Figura 42**). PINTO *et al.* (2001) verificaram a produção da enzima tanase por *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, utilizando casca de côco seca (3 mm de diâmetro), e ácido tânico em diferentes concentrações, como substratos indutores. A maior produção de enzima foi obtida em 72 h após inoculação.

Em estudos realizados por SOARES *et al.* (2004), com microrganismos isolados da água de irrigação utilizada no plantio de arroz, foram consideradas algumas enzimas responsáveis pela degradação de agrotóxicos como, por exemplo, o complexo enzimático degradador da lignina. Este complexo consiste de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e lacases, que podem ser definidas como fenoloxidasas.

Quando avaliou-se a cinética de degradação do ácido tânico pelo isolado *Alcaligenes* sp, verificou-se que ocorreu maior produção de ácido gálico com consequente produção de tanase. TUOMELA *et al.* (2000) utilizaram corantes poliméricos semelhantes à lignina (um deles derivado do antraceno, o que representa uma classe importante de poluentes orgânicos) no cultivo de microrganismos, e puderam determinar o início do metabolismo secundário desses isolados ligninolíticos.

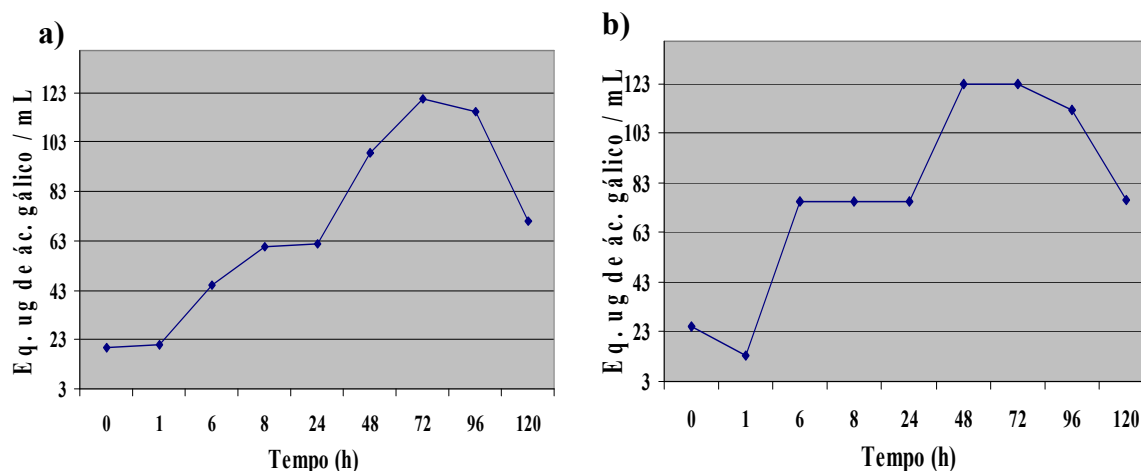


Figura 42. Cinética da liberação de ácido gálico a partir da degradação do ácido tânico (0,8 %) por *Achromobacter* sp, isolado de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool (safra 2004/05), em meio contendo 0,1 % de glucose; 0,1 % de peptona e 0,1 % de NaCl ($30 \pm 1^\circ$ C, escuro), observada após reação com vanilina - HCl . a) sem aeração; b) com aeração

Em estudos realizados por AGUILAR & GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ (2001), a respeito da degradação do ácido tânico, com consequente produção de tanase, verificou-se que cepas bacterianas de *Bacillus pumilus*, *B. polymyxa*, *Corynebacterium* sp e *Klebsiella pneumoniae*, foram capazes de apresentar atividade taninolítica com consequente hidrólise de ácido tânico, quando utilizou-se este como única fonte de carbono no meio de cultura também de glucose como substrato de aclimatação.

6. CONCLUSÕES

1. Foram isoladas 8 linhagens bacterianas (L1-L8) de lodo da lagoa de decantação "A" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, na safra de 2004/05, sendo 3 deles anaeróbios facultativos com metabolismo fermentativo (L3, L7 e L8). Os isolados foram identificados como espécies de *Achromobacter* (L1 e L5), *Acinetobacter* (L2 e L6), *Proteus* (L3), *Flavobacterium* (L4), e *Serratia* (L7 e L8), apresentando diversas atividades enzimáticas.
2. Quanto às amostras do efluente da mesma lagoa de decantação da ETE estudada, e do bagaço de cana-de-açúcar acumulado na empresa sucroalcooleira, foram isolados 19 microrganismos (8 do efluente e 11 do bagaço), sendo que 14 são bactérias G+ e G- (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, BC1, BC2, BC3, BC6, BC7 e BC11) e 5 são fungos, isto é, 3 leveduriformes (BC4, BC5 e BC9) e 2 filamentosos (BC8 e BC10). Todos os microrganismos obtidos cresceram bem entre 30 e 40°C, sendo, portanto, mesofílicos. Para os propósitos da presente dissertação, as linhagens fúngicas não foram estudadas, sendo seus representantes levados à armazenagem em refrigerador e na Micoteca do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental (LBPVMA) da UFAL.
3. As bactérias dos efluentes da ETE estudada foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Klebsiella* sp (A1), *Corynebacterium* sp (A2 e A7), *Arthrobacter* sp (A3), *Streptomyces* sp (A4); *Stafilococcus* sp (A5), *Acinetobacter* sp (A6); *Serratia* sp (A8).

4. No tocante às bactérias isoladas do bagaço-de-cana, pertencem ao gêneros *Bacillus* sp (BC1), *Clostridium*. sp (BC2), *Acinetobacter* sp (BC3 e BC6); *Corynebacterium* sp (BC7) e *Lactobacillus* sp (BC11).
5. Por terem apresentado um alto potencial em degradar polissacarídeos, lipídeos, proteínas e compostos fenólicos (tanino), bem como a terem ou o metabolismo apenas oxidativo e fixador de nitrogênio, ou o metabolismo fermentativo, os isolados de lodo L1 (*Achromobacter* sp) e L3 (*Proteus* sp) foram selecionados para testes de cinética de crescimento/degradação de ácido tânico.
6. Embora concentrações de 0,8 % de ácido tânico ainda favoreçam o crescimento de *Proteus* sp, a concentração de 1 % desse substrato em meio sólido inibiu seu crescimento, sugerindo que o microrganismo não tolera altas concentrações desse composto.
7. Apesar de não ter sido observado o crescimento do isolado de lodo *Achromobacter* sp. em meio sólido contendo 0,8-1 % de ácido tânico, o mesmo foi capaz de crescer em meio contendo ácido gálico, e hidrolisar as ligações éster da molécula de ácido tânico em meio líquido, liberando ácido gálico.
8. As espécies de *Proteus* e *Achromobacter*, isoladas de lodo da lagoa de decantação da ETE da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), são promissoras para estudos de biorremediação de áreas degradadas por compostos fenólicos, utilizando-se um consórcio com diferentes microrganismos para bioaumentação de águas residuárias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-HALEEM, D.; BESHEY, U.; ABDELHAMID, A.; MOAWAD, H.; ZAKI, S.. Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. strain W-17. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, 8-12, 2002.
- ABREU, Â. A. V. **Identificação de Bactérias Filamentosas em Processos de Lamas Activadas Através da Técnica de Hibridização *in-situ* de Fluorescência (FISH)**. 2004. Dissertação (mestrado) – Departamento de Engenharia Biológica – Área de Tecnologia do Ambiente, Universidade do Minho.
- ACUNZO, F. D’.; GALLI, C.; MASCI, B. Oxidation of phenols by and laccase-mediator systems. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 5330-5335, 2002.
- ANDRADE, M.C. **Usina e destilaria de Alagoas: Uma Contribuição ao estudo de produção do Espaço**: EDUFAL, Maceió, 1997, p. 136.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, v. 26, p. 763-765, 2003.
- AGUILAR, C.; AUGUS, C.; GONZÁLEZ, G.; FAVELA, E. A. Comparison of methods to determine tannin acyl hidrolase activity. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v.42, p.63, 1999.
- AGUILAR, C.N. & GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G. Sources, properties, and potential uses of tannin acyl hydrolase (3.1.1.20). **Food Science and Technology International**, v.7, p. 373-382, 2001.

AGUIAR, C. L. & MENEZES, T. J. B. Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar –Aplicação da biotecnologia enzimática na conversão de resíduos da indústrias de alimentos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 26- p. 52-55, maio/jun. 2002.

AHMED, Z.; BANU H.; M. RAHMAN, M.; AKHTER, F. M.; Haque, S. Microbial Activity on the Degradation of Lignocellulosic Polysaccharides. On Line **Journal of Biological Sciences**, v.1, n.10, p.993-997, 2001.

ALEXANDER, M. Biodegradation & Bioremediation, 2nd, Calafornia: Academic Press, 1999, 453p.

ALLENDE, L.; GIBELLO, A.; FORTUN, A.; MENGES, G.; FERRER, E.; MARTIN, M. 4-Hydroxybenzoate uptake in an isolated soil *Acinetobacter* sp. **Current Microbiology**, v. 40, p.34-39, 2000.

AKMAL, D.; AZIZAN, M. N.; MAJID, M.I.A. Biodegradation of microbial polyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under the tropical climate environment. **Polymer degradation and Stability**, v.80, p. 80–85, 2003.

ATAGANA, H. I. ; EJECHI, B. O.; OGODU. M. I. Bacteria Associated with Degradation of Wastes from Rubber Processing Industry. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 59, n. 2 , p. 145-154, 1999.

AYED, L. & HAMDY, M. Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 21, 1763-1765, 2002.

BAJPAI, B; PATIL. Induction of tannin Acyl Hidrolase (EC 3.11.20) activity in some members or imperfecti fungi. **Enzyme and Microbial Tecnology**, [S.1], v.20, p.612-614, 1997.

BANERJEE, D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, p. 313-318, 2001.

BARTH, F. S. Biodegradation kinetics. In: ENVE 306/CE394. 1999.

BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. **Journal of Ferment Technology**. v. 77, p. 320-323, 1994.

BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.1, p.165-169, 1995.

BEREKAA, M.M.; BARAKAAT, A.; EL-SAYED, S.M.; EL-AASSAR, S.A. Degradation of natural rubber by *Achromobacter* sp. NRB and evaluation of culture conditions. **Pol. Journal of Microbiology**, v. 54, n.1, p. 55-62, 2005.

BERGAMASCO, Alessandra Fabiola. **Sistema de apoio a decisão para manejo de fertilizantes nitrogenados em cana-de-açúcar colhida sem queima**. 2003, 157p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. & TOWNER, K.. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Review**, v.9, p.148-165, 1996.

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins – A current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.

BHAT, M.K.; BHAT, S. – Cellulose degrading enzymes and their potencial industrial application. **Biotechnology advances**, v. 15, p.583-620, 1997.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia, em suas aplicações à medicina e à higiene**. Rio de Janeiro, 17^a ed., 1976, p. 106-110.

BOLLAG, J M.; LIU, S. Y. Biological transformation processes of pesticides. In: CHENG, H. H. (ED.) Pesticides in the soil environment: Processes, impacts and modeling. **Soil Science society of America**, p.169-211, 1990.

BROADHURST, R.B.; JONES, W.T. Analysis of condensed tannins using acidified vanilin. **Journal of Science and Food Agriculture**, New York, v. 29, p.78-91, 1978.

BROWN, G. K. Glucose transporter: structure, function and consequences of deficiency. **Journal of Inheritance**, v. 23, p.237-246, 2000.

BRITO, N. N.; ZAMORA, P. P.; NETO, A. L. O.; BATTISTI, A.; PATERNIANI, J. E. S.; PELEGRINI, R. T. Utilização de Fungos na Remediação de Efluentes Industriais. 2004. In: **IV Fórum de Estudos Contábeis**.

- CAMARGO, C. A. **Perfil do setor.** In: Conservação de energia na indústria do açúcar e do álcool: manual de recomendação. São Paulo: IPT, 1990. Cap. 2, p. 5-16.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, 2002.
- CAZAU, C.; MASELLY, Y. A. M. ARAMBARRI. Utilização de diferentes espécies de fungos como biodegradadores de hidrocarbonetos: Ensaio Preliminar. **Boletim Microbiológico**, v.7, pp.79-83, 1992.
- CHO, N. S.; SHIN, W.; JEONG, S. W.; LEONOWICZ, A. Degradation of lignosulfonate by fungal laccase with low molecular mediators. **Bulletin of Korean Chemistry Society**, v. 25, p.1551-1554, 2004.
- CHOHNAN, S.; NONAKA, J.; TERAMOTO, K.; TANIGUCHI, K.; KAMEDA, Y.; TAMURA, H.; KURUSU, Y.; NORIOKA, S.; MASAKI, T.; SAKIYAMA, F. *Lysobacter* strain with high lysyl endopeptidase production. **FEMS Microbiology Letters**, v.213, p.13-20, 2002.
- CLOPPET, H.; DENOYEL. G, A.; VINCENT. P. Le genre *Citrobacter*. Etat actuel de nos connaissances. **Revue Institut Pasteur Lyon**, v.10, 1-23p. 1977.
- CONCEIÇÃO, D. M.; de ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E.D. & de ANGELIS D.F. Fungos isolados do Rio Atibaia – SP e Refinaria de Petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.99-106, 2005.
- DHOUIB, A; HAMZA, M.; ZOUARI, H.; MECCHICHI, T.; H'MIDI, R.; LABAT, M.; MARTINEZ, M. J.; SAYADI, S. Autochthonous Fungal Strains With High Ligninolytic Activities from Tunisian Biotypes. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.5, p. 431-436, 2005.
- DUA, M; SING, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotecnologia e Biorremediação: Sucessos e Limitações, **Applied Microbiol Biotechnology** , v.59, p.143-152, 2003.
- DURAN, N & ESPÓSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos, In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., eds. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa, Jaguariúna, 1997. 269-292p.

ERLICH, C.; O'HMANB, M.; BJÖRNBOMC, E.; FRANSSON, T. H. Thermochemical characteristics of sugar cane bagasse pellets, **Fuel**, v. 84, n.5, p.569–575, 2005.

ESPÓSITO, E. & AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Educs - Caxias do Sul, Coleção Biotecnologia, 2004. 510 p.

FAENQUIL. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Bol. Agosto/ 2003

FASS, R; FLASHNER, Y.; REUVENY, S. Novel Approaches for Bioremediation of Organic Pollution. In: **42nd OHOLO Conference Eilat**, Israel, 1999. 316 p.

FAY, F.; SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F. **Degradação do Fungicida Clorotalonil por *Arthrobacter spp.*** In: Segundo Congresso Virtual Iberoamericano Sobre Gestión de Calidad en Laboratorios (www.iberolab.org) 2003.

FEIKENHAUER, H.; SCHNICKE, S.; MULLER, R; MÄRRKI, Determonation of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus themoleovorans* sp.A2, **Applied Microbiology Biotechnology**, v.57, p.744-750, 2001.

FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI e SCHIDELL, W., Eds. **Biotecnologia Industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. 1^a ed., Ed. Edgard Blucher Ltda. v. 3, 2001. 465-484p.

FERREIRA, L. F. R., PEREIRA, D. S. T., TEIXEIRA, A. P. S., LOPEZ, A. M. Q. Eventos iniciais na interação *Annona squamosa-Colletotrichum gloeosporioides* In: XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2002, Recife, Pe. **Revista Fito-pat. Brás.** (R.256). Brasília: SBFv.27. p.S109 - S110, 2002.

FRANCISCO, R.; ALPOIM,, M.C.; MORAIS, P.V.. Diversity of chromium-resistant and -reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p.837-843, 2002.

FREIRE, R. S.; LAURO, R. P.; KUBOTA, T.; DURAN, N. Revisão: Novas Tendências para o Tratamento de Resíduos Industriais Contendo Espécies Organocloradas. **Química Nova**, v.23, n.4, 2000.

GIRBAL, L.; ROLS, J.L.; LINDLEY, N.D. Growth rate influences reductive biodegradation of the organophosphorus pesticide demeton by *Corynebacterium glutamicum*. **Biodegradation**, v.11, n.6, p.:371-376, 2000.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, v. 26, p. 463-470, 2004.

GIANFREDA, L. & RAO, M. A. Potential of Extra Cellular Enzymes in Remediation of Polluted Soils: A Review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.339–354, 2004.

GOODWIN K.D.; AND OREMLAND R.S. Marine bacterial degradation of brominated methanes, **Environmental Soil. Technology** , v.31, pp. 3188 - 3192, 1997.

GUEVARA, C. & ZAMBRANO, M. M. Sugarcane Cellulose Utilization By Defined Microbial Consortium. **FEMS Microbiology Letters**, v.255, p.52-58. 2006.

HANKIN, L. AND ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use Media For Detection Of Enzyme Production By Fungi. **Micologia**, v.67, 1975.

HELBIG, Elizabete. **Ação da maceração prévia ao cozimento do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L) nos teores de fitatos e taninos e conseqüências sobre o valor protéico**. 2000. 67 f. Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HENDRICKS, C. W.; DOYLE, J. D. ; HUGLEY, B. A New Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacterial In Soil. **Applied and Environmental Microbiology**. p.2016-2019, 1995.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin Conversion By Manganese Peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. v.30, p. 454-466, 2002.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

<http://academic.scranton.edu/>. Acessado em janeiro de 2007.

<http://lignin.cib.csic.es/pelas/pelas.html>. Acessado em janeiro de 2007).

ITO, M.; SAITO, Y.; MATSUNOBU, T.; HIRUTA, O.; TAKEBE H Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoate) by *Corynebacterium aquaticum* IM-1 isolated from activated sludge. **Polymer Degradation and Stability** , v. 61, n.2, p. 319-327 , 1998.

KIM, J-Y.; HUR, S-H AND HONG, J-H. Purification And Characterization Of An Alkaline Cellulose From A Newly Isolated Alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. **Biotechnology Letters**, v.27, p.313-316, 2005.

KNUDSON, L. Tannin acid fermentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 14, p. 159-202, 1913.

KUMAR, R.; VAITHIYANATHAN, S. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. **Animal Food Science and Technology**, v. 30, p. 21-38, 1990.

KWON, G-S.; SOHN, H-Y.; SHIN, K-S.; KIN, E.; SEO, B-I. Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. **Environmental Biotechnology**, v. 67, n. 6, p. 845-850, 2005.

IIBUCHI, S. MINIDA, Y.; YAMANDA, K. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tañí Acyl Hidrolase of *Aspergillus Oryzae*. **Agricultura and Biological Chemistry**, v.37, p. 1553-1562, 1972.

LANDIS, W. G.; MING-HO, Y. **Introduction to environmental toxicology**: Impactas of chemicals upon Ecological Systems (HRD) – GB. 1º ed., 1995.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B. K. Comparative trites, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Asprgillus niger* in solid – state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, v.29, p.497, 1994.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B.K. production and application of tañí Acyl Hidrolase: state of the Art. **Advances in Applied Biochemistry an Microbioloy**, v.44, p.215-260, 1997.

LEMOS, J. L. S. **Seleção de microrganismo para a produção de xilanases em bagaço de can-de-açúcar**, Dissertação (Mestrado) – Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CETEM/MCT, 2006.

LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K-E. L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.2654-2660, 1999.

LI, Y. C.; WU, J.Y.; CHEN, T.L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated batch culture in presence of nonwoven fabric. **Biotechnology and Bioenergetic**, v. 76, p.214-218, 2001.

LIMA J. P.; SICSÚ, A. B. Revisitando o Setor Sucro-Alcooleiro do Nordeste - o Novo Contexto e a Reestruturação Possível - Grupo de Estudos Sucro-Alcooleiro NU-CA – IE – Universidade Federal do Rio de Janeiro In Estudos Infosucro N° 4 p.1-20/ Out., 2001.

LIMA J. P.; SICSÚ, A. B. A Agroindústria Canaveira do Nordeste: O Desafio da Reestruturação Possível, In:www.race.nuca.ie.ufrj.br/nuca-wp/papers/sep/mesa12/policarp.doc, 2004.

LODAYA, M.P. Biodegradation of benzene and a BTX mixture using immobilized activated sludge. Thesis (Ph. D.). New Jersey Inst. of Tech., Newark, N.J. (United States). 129 p., 1989.

LÓPEZ, M. J; NICHOLS, N. N; DIEN, B.S.; MORENO. J.; BOTHAST, R. J. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.1, p.81-88, 2004.

LÓPEZ, A. M. Q. **Controle alternativo de antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS. em sorgo [*Sorghum Biocolor* L. (MOENCH)]**. São Paulo: Rio Claro, p.181-185, 2001.

MACÊDO, J. A. B.; **Introdução à química ambiental**. 1ª edição, Juiz de Fora – MG, 2002, 487p.

MACÊDO, J. A. B. **Métodos Laboratoriais de Análises Físico-químicas e Microbiológicas**. 3ª edição, Belo-Horizonte – MG, 2005. 601p.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M. AND PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. Ninth Edition. Prentice Hall, 2000. 991p.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER K.;. Effects of tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**. Amsterdam, v.175, p.327-335.1999.

MALHEIROS, Sérgio Mauricio Pinheiro. **Avaliação do Processo de Compostagem Utilizando Resíduos Agroindustriais**. 1996, 256p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

MARGESIN, R.; BERGUAER, P.; GANDER, S. Degradation of phenol and toxicity of phenol compounds: a comparación of cold-tolerante *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*, **Extremophiles**, v.8, p.201-207, 2004.

MARTIN, A. **Biodegradation and Bioremediation**, 2^a edition, Academic Press, 1999. 453p.

MARTIN, N. **Isolamento de linhagens termófilicas produtoras de pectinases termoestáveis: Produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase**. Dissertação (Mestrado) – Ciências Biológicas e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências - Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro, São Paulo, 65p. 2006.

MESQUITA, A.C. **Uso das técnicas de oxidação química e biorremediação da remoção de compostos orgânicos (DNAPLs)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004, 171 p.

MEUNCHANG, S.; PANICHSAKPATANA, S.; WEAVER, R.W. Co-composting of filter cake and bagasse; by-products from a sugar mill. **Bioresource Technology**, v.96, p.437–442, 2005.

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R.C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1675-1681, 2001.

MONDAL, K. C.; BANERJEE, M. J.; PATI, B. R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 295, p.168-171, 2001.

MONNA L, OMORI T, KODAMA T. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n. 1, p. 285-289, 1993.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p.892-896, 2005.

MONTGOMERY, D. M.; DEAN, A. C. R.; WIFFEN, P.; MACASKIE, L. E. Phosphatase production and activity in *Citrobacter freundii* and a naturally occurring, heavy-metal-accumulating *Citrobacter* sp. **Microbiology**, v.141, p.2433-2441, 1995.

MONTPAS, S.; SAMSON, J.; LANGLOIS, E.; LEI, J.; PICHÉ, Y.; CHÊNEVERT, R. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 3, p. 291-294 , 1997.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. UFLA. Lavras Minas Gerais. 2002. 625p.

MULBRY, W. W. & KARNS, J .S. Purification and characterization of three parathion hydrolases from gram-negative bacterial strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n. 2, p.289-293, 1989.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v.25, n.5, p.772-776, 2002.

NEDER, R. N. Microbiologia: manual de laboratório. Nobel –São Paulo, 1992, p.137.

NEVES, J.L.M.; MAGALHÃES, P.S.G.; OTA, W.M. Sistema de monitoramento de perdas visíveis de cana-de-açúcar em colhedora de cana picada. Engenharia Agrícola de Jaboticabal, v.24, n.3, p.764-770, set./dez. 2004

NORDIN, K. 4-chlorophenol Biodegradation by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. Ph Thesis. Stockholm University, Department of Biochemistry and Biophysics, 2004.

OASHI, Maria da Conceição Guimarães. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do SISAL na Paraíba**. Florianópolis – SC, Tese (Doutorado) – Engenharia de Produção, Universidade Federa de Santa Catarina. 1999.

O' DONOVANT, L.; BROOKER, J. D. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. **Microbiology**, v.147, p.1025-1033, 2001.

OKPOKWASILI, G. C.; OLIVA, A. O. River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos. **The Electrochemical Society Interface**, v.25, p.1425-1429, 1991.

OSAWA, R.; NISHITANI, Y. A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 281-284, 2003.

OSAWA, R. Formation of a clear zone on tannin-treated brain heart infusion agar by a *Streptococcus* sp Isolated from feces of koalas. **Applied Environment Microbiology**, v.56, p.829-831, 1990.

OTUK G.; DESCHAMPS, A. M. Degradation of condensed tannin by several types of yeasts. **Mycopathologia**, v.83, p.107-111, 1983.

PAKALA, S.B.; GORLA, P.; PINJARI, A.B.; KROVIDI, R.K.; BARU, R., YANAMANDRA, M.; MERRICK, M.; SIDDAVATTAM, D. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n.6, p.1452-62, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse - **Bioresource Technology**, v.74, p. 69 – 80, 2000.

PANTAROTO, S. **Isolamento, seleção, identificação e avaliação de microrganismos aeróbios "in situ", com habilidade à biodegradação de linamarina.** Dissertação (Mestrado em Agronomia / Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2001, 128 p.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation And Biological Treatments Of Cellulose, Hemicellulose And Lignin: An Overview. **International Microbiology**, v.5, 53-63p. 2002.

PEROVANO F^o, N. **Biorremediação e monitoramento de parâmetros físico-químicos de águas residuárias da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool.** Maceió, 2003, Bibliografia: f.71-77. Monografia (TCC em Química Licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Naturais. Curso de Química Licenciatura, 2004.

PIEPER, D. H. & REINEKE, W. Engineering Bacteria For Bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.11, p.262-270, 2000.

PINTO, G. A. S.; LEITE, S. G. F.; TERZI, S. C.; COURI, S. Selection of tannase-production *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, p. 57-67, 2001.

PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 207p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,

PIZZI, A. Tannin-Based adhesives. In PIZZI A. (ed.) wood adhesives: **Chemistry and technology**, v.30, p. 77-246, 1993.

PRATA, F. **Biodegradação e adsorção dos herbicidas diuron e Ametrina em solos tratados com vinhaça**. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1998, p.76.

QUINTELAS, Cristina Maria Catalão. **Recuperação e Reutilização de Metais Pesados**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Biológica – Área de Biotecnologia, Universidade do Minho – Praga.

RAMALHO, J.F.G.P. & SOBRINHO, N.M.B.A. – Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.120 - 129, jan./dez. 2001.

REINECKE, F; GROTH, T.; HEISE, K.-P. JOENTGEN, W.; MÜLLER, N.; STEINBÜCHEL, A. Isolation and characterization of an *Achromobacter xylooxidans* strain B3 and other bacteria capable to degrade the synthetic chelating agent iminodisuccinate. **FEMS Microbiology Letters** , v.188, n.1, p. 41–46, 2000.

RODRIGUES, R. S.; KOETZ, P. R. Remoção de Nitrogênio de Efluente da Indústria de Arroz Parboilizado por Incorporação em Biomassa Celular de *Cândida utilis* – IZ-1840. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, n.3, p.141-146, 1996.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v.24, p.77-86, 2001.

RYCKEBOER, J.; MERGAERT, J.; COOSEMANS, J. DEPRINS, K.; SWINGS, J. Microbiological Aspects Of Biowaste During Composting In A Monitored Compost Bin. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.127-137. 2003.

SABER, D. L. & CRAWFORD, R. L Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n.6, p.1512–1518, 1985.

SANOMYA, L. T. AND NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33. n.5. p.835- 842. Set-Out., 2003.

SAUVE, S., MCBRIDE, M.B. AND HENDERSHOT, W.H. Speciation of Lead in Contaminated Soils. **Environmental Pollution**, v.2; p.149-155, 1997.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SHELTON, D.R.; KHADER, S.; KARNS, J.S.; POGELL, B.M. Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. **Biodegradation**, v.7, p.129-136, 1996.

SCHOEFER, L.; MOHAN, R.; SCHWIERTZ, A.; BRAUNE, A. BLAUT, M. Anaerobic Degradation of Flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, . 5849-5854, 2003.

SHUCK, K. & GRIFFIN, D. Field Microbiology. University of Nebraska-Lincoln. Department of Veterinary and Biomedical Sciences. Great Plains Veterinary Educational Center. January, 1998.

SIDORCZYK, Z.; KONDAKOVA, A. N.; ZYCH, K.; SENCHENKOVA, S. N.; SHASHKOV, A. S.; DRZEWIECKA, D.; KNIREL, Y. A. Structure of the o-polysaccharide from *Proteus myxofaciens*: classification of the bacterium into a new *Proteus* o-serogroup. **European Journal of Biochemistry**, v.270, p.3182-3188, 2003.

SILVA, M. & ESPÓSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental In: AZEVEDO, J. L.; ESPÓSITO, E., eds. **Fungos: uma introdução à biologia bioquímica e biotecnologia**, EducS – Caxias do Sul, Coleção Biotecnologia, 2004. 338-375p.

SILVA, N. **Testes Bioquímicos para Identificação de Bactérias em Alimentos**. Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos; Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Informes Técnicos N°1, 1996, 87p.

SILVA, E. N. **Tecnologia Avançada de Carnes e Derivados**. Contaminação e Deterioração da Carne - Roteiro de aula, Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Tecnologia de Alimentos, 1999.

SILVEIRA, N. **Testes bioquímicos para identificação de bactérias em alimentos**.

Campinas: Instituto de Alimentos; Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Informes Técnicos n.1), 1996, p.87.

SKERMAN, V. B. D. **A mechanical key for the generic identification of bacteria.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, v. 3, p. 75-188, 1949.

SOARES, G.M.B. *Aplicação de sistemas enzimáticos para a degradação de azocorantes. Tese de Doutorado em Engenharia Têxtil, Escola de Engenharia Têxtil, Universidade do Minho, Portugal, 2000, 173 p.*

SOARES, M.; OLIVEIRA, R. P.; SILVA C. M. S. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** / Embrapa Meio Ambiente. Embrapa 2004.

STRAUS, E. L.; MENEZES, L.V.T. Minimização de Resíduos. In: **Anais do 17 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 1993, p. 212-225.

SWIERZKO, A, ST.; KIRIKAE, T.; KIRIKAE, F.; HIRATA, M.; CEDZYNSKI, M.; ZIOLKOWSKI, A.; HIRAI, Y.; KUSUMOTO, S.; YOKOCHI, T.; NAKANO, M. *Biological activities of lipopolysaccharides of Proteus spp. e their interactions with polymyxin B and an 18-kDa cationic antimicrobial protein (CAP18) - derived peptide.* **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 127-138, 2000.

SUTHERSAN, S. S. In Situ Bioremediation. **Remediation engineering: design concepts.** Ed. Suthan S. Suthersan Boca Raton: CRC Press LLC, 1999.

TAKAMATSU, Alexandre Akira. **Avaliação da Biolixiviação de Metais Pesados por Bactérias do Gênero *Thiobacillus* em Lodos Biológicos para Utilização Agrícola como Fertilizante.** Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Agrárias – Área de Ciência do solo, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Pr. 1995, 126p.

TAVARES, T.; SILAVA, I. S. **Remoção de metais pesados por biofilmes suportados em carvão activo.** In: **Catalisadores y adsorventes para la protección ambiental em la región iberoamericana**, ed. J. Blanco, P. Ávila, CYTED, Rede Temática V.C. *Catalisadores para la protection ambiental*, Madrid, 1998, p.231-234.

TIMMIS K. N. & PIEPER, D. H. Bacteria designed for bioremediation, **TIBTECH** , v.17, p.201-204, MAY. 1999.

TONDO, E.C., ANDRETTA, C.W.S., SOUZA, C.F.V. High biodegradation levels of 4,5,6-trichloroguaiacol by *Bacillus* sp. isolated from cellulose pulp mill effluent. **Review in Microbiology**, v.29, n.4, p.265-270. 1998.

TOREN, A.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Emulsifying Activities of Purified Alasan Proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p.1102-1106, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. and CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª edição – Porto Alegre, Ed. Artemed, 2002. 827p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F. AND CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**, 3ª edição, Ed. Atheneu – São Paulo, 1999. 586p.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 3ª edição, Ed. Atheneu – São Paulo, 2004. 718p.

TROJANOWSKI, J. Biological Degradation of Lignina. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**, v.48, p.213-218. 2001.

TRUGILHO, P. F.; MORI, F. A.; LIMA, J. T.; CARDOSO, D. P. Determinação do teor de taninos na casca de *Eucalyptus spp.* **Nota Técnica**. Cerne, Lavras, v.9, p.246-254, 2003. Cerne, Lavras, v.9, n.2. jul./dez. 2003, p. 246-254.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; IRAVAARA, M. Biodegradation of Lignin in a Compost Environment: A Review. **Biores.Technology**, v.72, p.82-94, 2000.

VAZOLLER, R. F. Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável: Microbiologia e Saneamento Ambiental. In: Fundação André Tosello; FINEP; CNPq. (Org.). **Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologias André Tosello, 1995.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**, Guanabara Koogan, 2006. 239p.

VICUÑA R. Review: Bacterial Degradation of Lignina. **Enzyme Microbial Technology**. v. 10, Nov., 1988.

VON SPERLING, M. Lodos Ativados. Princípios de Tratamento Biológico de águas Residuárias. 2ª edição. v.4, 1997.

WATANABE, K., Microorganisms Relevant to Bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**. v.12, p.237-241, 2001.

www.infektionsnetz.at/view.php?name=BakterienProteus, acessado em 05/03/2006.

www.asm.org/branch/brctvalley/home.htm, acessado em 05/03/2006.

WARD, JR. C.M. & CLAUSS, G.W. Gram Characteristics and Wall Ultrastructure of *Artrobacter crystallopoietes* During Coccus-Rod Morphogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.114, n.1, p.378-389, Printer in U.S.A. Apr. 1973.

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, v.4, p.2340-2345, 1966.

WINKELMANN, G. **Microbial Degradation of Natural Products**. Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 1992. 419p.

WONG, P. K. & YUEN, P. Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. **Water Research**, v. 30, n.7, p. 1736-1744, 1996.

XU, F.; KULYS, J. J.; DUKE, K.; LI, K.; KRIKSTOPAITIS, K.; DEUSSEN, H. J. W.; ABBATE, E.; GALINYTE, V.; SCHNEIDER, P. Redox chemistry in laccase-catalysed oxidation of *n*-hydroxy compounds. **Applied Environment Microbiology**, v.66, p.2052-2056, 2000.

YAN, Q. Y.; BENNICK, A. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. **Biochemistry Journal**, v.311, p.341-347, 1995.

ZAIDI, B.R.; IMAM, S.H. ; GREENE, R.V. Accelerated Biodegradation of High and Low Concentrations of *p*-Nitrophenol (PNP) by Bacterial Inoculation in Industrial Wastewater: The Role of Inoculum Size on Acclimation Period. **Current Microbiology**, v. 33, n.5, p. 292-296, 1996.

ZAMAN, M. B. & KHAN, A. A. Studies on the indigenous tannin-bearing plants of Pakistan. **The Pakistan Journal Forestry**, v.11, p.162-167, 1961.

ZARAT, M. F. *Uso de Águas Industriais em Destilarias Autônomas*, 1999.

ZILLI, M.; PALAZZI, E.; SENE, L.; CONVERTI, A.; BORGHI, M.D. Toluene and styrene removal from air in biofilters. **Process in Biochemistry**. V.10, p.423-429, 2001.

SANTOS, E.S. 2007. *Microrganismos promissores para a degradação de compostos.....* 112

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**, v.121, p.335-365, 1983.

