UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA-PPGQB

HIDROLASES E FENOLOXIDASES DE MICRORGANISMOS COMO MARCADORES PARA SELEÇÃO DE BIOSUPLEMENTADORES E AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO SOBRE EFLUENTES SUCROALCOOLEIROS

NATALINO PEROVANO FILHO

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

ORIENTADORA: Profª Drª Ana Maria Queijeiro López

MACEIÓ, ESTADO DE ALAGOAS
MAIO DE 2007

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

P453h Perovano Filho, Natalino.
Hidrolases e fenoloxidases de microrganismos como marcadores para a seleção de biosuplementadores e avaliação do tratamento sobre efluentes sucroalcooleiros / Natalino Perovano Filho. – Maceió, 2007.
xxii, 170 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Ana Maria Queijeiro López.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió 2007.

Bibliografia: f. [113]-134.
Apêndices: f. 135-174.

1. Microrganismos. 2. Hidrolases. 3. Fenoloxidases. 4. Águas residuais – Purificação – Tratamento biológico. 5. Biorremediação. 6. Efluentes industriais. I. Título.

CDU: 577.152.3/.32

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 Natalino Perovano Filho, intitulada: "**Hidrolases e Fenoloxidases de Microrganosmos como Marcadores para Seleção de Biosuplementadores e Avaliação do Tratamento sobre Efluentes Sucro-alcooleiros**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 29 de maio de 2007, às 14h30 na sala de Multimeios do bloco 14 da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Profª. Drª. Ana Maria Queijeiro López
Orientadora – IQB/UFAL
CPF: 057.628.118-24

Profª. Drª. Maria de Mascena Diniz Maia
UFRPE
CPF: 127.843.624-34

Profª. Drª. Lúcia Maria Conserva
IQB/UFAL
CPF: 160.564.264-91

Dedico este trabalho a minha Família e a todos
que fazem Ciência com paixão e responsabilidade.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento de meu projeto;

À Profª. Drª. Ana Maria Queijeiro López, não apenas pela orientação, mas também pela sabedoria, confiança, apoio, incentivo e compartilhamento de idéias e reflexões durante a execução deste trabalho e desde minhas primeiras lições de pesquisa científica;

À Sra. Ângela Queijeiro Ramos López, pelo carinho apoio e compreensão durante a execução deste trabalho;

À amiga e companheira de laboratório Kelly Fernanda Seara da Silva, pelas contribuições durante a execução deste trabalho, pelas reflexões compartilhadas sobre os experimentos e pela convivência;

À companheira de laboratório Amanda Lys dos Santos Silva, pelas contribuições com os experimentos de identificação dos isolados bacterianos;

Ao companheiro de laboratório Fábio Almeida Muniz, pelo auxílio na execução de análises físico-químicas;

Aos demais companheiros do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental (LBPVMA), pela convivência, aprendizado, auxílio, respeito e por, de alguma forma, terem apoiado e contribuído para meu crescimento intelectual e pessoal.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertold Brecht

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS viii

LISTA DE TABELAS xv

LISTA DE QUADROS xvii

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS xviii

RESUMO xxi

ABSTRACT xxii

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3

3. REVISÃO DA LITERATURA 4

3.1. QUALIDADE E REUSO DE ÁGUAS 4

3.1.1. Reuso de águas 5

3.2. O CONSUMO DE ÁGUA NA PRODUÇÃO DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL 8

3.2.1. Geração de efluentes e impactos ambientais 10

3.3. TRATAMENTO DE EFLUENTES 11

3.3.1. Tratamento primário 12

3.3.2. Tratamento Secundário 12

3.4. BIORREMEDIAÇÃO 13

3.5. UTILIZAÇÃO DE FUNGOS EM BIORREMEDIAÇÃO 15

3. 6. COMPOSTOS XENOBIÓTICOS 17

3.6.1. Lignina e biodegradação 17

3.6.2. Taninos e sua degradação 25

4. METODOLOGIA 33

4.1. COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DE AMOSTRAS (EFLUENTES E TURFA) DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES (ETE) DE AGROINDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA 33

4.1.1. Isolamento de Microrganismos dos Efluentes de Lagoas de Decantação 34

4.1.2. Isolamento de Microrganismos de Turfa de Lagoas de Decantação 36

4.2. MEIOS DE CULTURA PARA ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS 37

4.2.1. Ágar Caldo-de-Cana (25%) 37

4.2.2. Ágar Nutriente 37

4.2.3. Ágar-Sabouraud 37

4.2.4. Ágar-Extrato de Malte 38
4.2.5. Ágar-Extrato de Levedura 38
4.2.6. Ágar-Aveia 38
4.3. FUNGOS OBTIDOS EM COLEÇÃO NACIONAL 38
4.4. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM MEIO SÓLIDO 38
4.4.1. Atividade Xilanolítica 39
4.4.2. Atividade Ureásica 39
4.4.3. Atividade Amilolítica 39
4.4.4. Atividade Proteolítica 39
4.4.5. Atividade Pectinolítica 40
4.4.6. Atividade Lipolítica 40
4.4.7. Atividade Fenolítica 41
4.4.8. Atividade da Tanino Acil Hidrolase (Tanase) 41
4.5. PRODUÇÃO DE FENOLOXIDASE EM MEIO LÍQUIDO 41
4.5.1. Determinação do Conteúdo de Glicídios Redutores Totais 42
4.5.2. Determinação do Conteúdo de Proteínas Totais 43
4.5.3. Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais 43
4.5.4. Determinação da Atividade da Lignina Peroxidase (LiP) 43
4.6. PRODUÇÃO DE TANASE EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO ÁCIDO TÂNICO 44
4.6.1. Determinação da Concentração de Ácido Gálico 44
4.6.2. Determinação da Atividade da Tanase em Meio Líquido 45
4.7. CRESCIMENTO DOS FUNGOS *Mucor* sp, *Phanerochaete chrysosporium, Geotrichum candidum* E *Cladosporium* sp SOBRE AMOSTRAS DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL SUPLEMENTADO 45
4.7.1. Determinação da Concentração de DQO 46
4.8. BIOAUMENTAÇÃO EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE LAGOA FACULTATIVA DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES (ETE) E MONITORAMENTO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS 47
4.8.1. Preparo do Inóculo Inicial visando a Bioaumentação 47
4.8.2. Inoculação do Meio de Aplicação para Bioaumentação de Lagoa Facultativa e Monitoramento dos Parâmetros Físico-Químicos das Águas Residuárias 48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
5.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DE AMOSTRAS (EFLUENTES E TURFA) DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES (ETE) 51

5.1.1. Isolamento e Identificação de Microrganismos dos Efluentes 51

5.1.2. Fungos em Turfa de Lagoa de Decantação e Obtidos de Micoteca Oficial 63

5.2. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS EM MEIO SÓLIDO 69

5.3. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES EM MEIO SÓLIDO 70

5.4. SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE FENOLOXIDASE 73

5.5. MONITORAMENTO DA BIOMASSA, DE GLICÍDEOS REDUTORES, PROTEÍNAS E FENÓIS TOTAIS EM CULTIVOS DE *Cladosporium* sp EM DIFERENTES SUBSTRATOS 76

5.5.1. CONDUTIVIDADE E PH NA REMOÇÃO DE AZUL DE METILENO POR *Cladosporium* sp EM MEIO LÍQUIDO 82

5.6. SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE TANINO ACIL HIDROLASE (TANASE) 84

5.6.1. Remoção de ácido tânico em meio líquido 86

5.7. CULTIVO DOS FUNGOS *Mucor* sp, *Phanerochaete chrysosporium, Geotrichum candidum* E *Cladosporium* sp SOBRE AMOSTRAS DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL SUPLEMENTADO 90

5.8. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO EFLUENTE AGROINDUSTRIAL APÓS BIOAUMENTAÇÃO DE LAGOA FACULTATIVA DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE COM MIGRORGANISMOS SELECIONADOS 97

5.8.1. Estabelecimento do consórcio 97

5.8.2. Monitoramento de Parâmetros Físico-Químicos de Efluente pós Biosuplementação 99

6. CONCLUSÕES 111

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

APÊNDICE 1 135

APÊNDICE 2 146

APÊNDICE 3 148

ANEXO 1 154

ANEXO 2 157

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estrutura dos três precursores de lignina: (1) álcool *p*-coumarílico, (2) álcool coniferílico, (3) álcool sinapílico..... 17

Figura 2. Representação da composição molecular da lignina (ERIKSSON, 1991)..... 18

Figura 3. Mecanismo de reação da Lignina Peroxidase (LiP) sobre benzenos metoxilados, com formação de cátion radicalar intermediário, gerando metanol e benzoquinona..... 21

Figura 4. Mecanismo catalítico da Lignina Peroxidase (LiP), indicando a regeneração da enzima (MARTINEZ, 2002)..... 22

Figura 5. Ciclo da ação e regeneração da Manganês Peroxidase (MnP) de fungos (HOFRICHTER, 2002)..... 23

Figura 6. Estrutura tridimensional de lacase de *Coprinus cinereus*, com extremidades N-terminal (azul) a C-terminal (vermelho). Os átomos de cobre são mostrados como esferas, com os sítios de cobre T1 em azul e o par T3 em verde (DUCROS *et al.,* 2001)..... 24

Figura 7. Estruturas do ácido gálico (1) e do β-1,2,3,4,6-pentagaloil-*O*-D-glicopiranose (2)..... 25

Figura 8. Estrutura de quatro dímeros de taninos condensados, denominados B1= epicatequina-(4β->8)-catequina; B2= epicatequina-(4β->8)-epicatequina; B3= catequina-(4α->8)-catequina; B4= catequina-(4α->8)-epicatequina (HASLAM, 1998)..... 26

Figura 9. Reação de clivagem da molécula de ácido tânico pela ação da tanase, originando ácido gálico e glicose como produtos finais (MACEDO *et al.,* 2005, *apud* AGUILAR *et al.,* 1999)..... 28

Figura 10. Vias metabólicas de degradação de taninos hidrolisáveis (Fonte: adaptada de BHAT *et al.*, 1998)..... 31

Figura 11. Esquema das lagoas da estação de tratamento de efluentes (ETE) gerados na matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool..... 33

Figura 12. Localização do município de Coruripe e da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool. (Fonte: Adaptado de LIMA, 1993)……..... 34

Figura 13. Esquema dos procedimentos adotados para o preparo do inóculo e das culturas a serem utilizadas na bioaumentação da lagoa facultativa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool..... 48

Figura 14. Número de microrganismos, dos 16 isolados em efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, com capacidade para degradar 18 diferentes agroquímicos..... 54

Figura 15. Número de agroquímicos, dos 18 estudados, degradados por 16 diferentes microrganismos isolados em efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool..... 55

Figura 16. Aspecto dos resultados dos testes bioquímicos no sistema API

20E (Biomerieux), inoculado com os isolados 3MB e T, dos efluentes lançados na lagoa "A" da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), 24 h após incubação a 35 ± 1 ºC, escuro..... 57

Figura 17. Aspecto do crescimento do Isolado T, de amostras de efluentes de lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), cultivado em meio Agar Nutriente após 9 dias de incubação em meio Ágar Nutriente (30 ± 1°C; escuro)..... 57

Figura 18. Produção de gelatinase por espécies de *Pseudomonas* (72 h de incubação a 30 ± 1 °C, escuro), isoladas de amostras de efluentes de lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05) **a)** Controle não inoculado; **b)** e **c)** Isolado T; **d)** isolado 3 MB..... 58

Figura 19. Meio Ágar Leite, para verificação de caseinase e produção de piocianina por espécies de *Pseudomonas* (48 h de incubação, 30 ± 1 °C, escuro), isoladas de amostras de efluentes de lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Isolado 3MB; **b)** Isolado T..... 58

Figura 20. Aspectos morfoculturais do isolado fúngico 2AMB, obtido de efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento de efluentes da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Sabouraud (15 dias de incubação a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 64

Figura 21. Aspectos morfoculturais do isolado fúngico XXI, obtido de efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento de efluentes da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 640 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Sabouraud (15 dias de incubação a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 65

Figura 22. Aspectos morfoculturais do isolado C1, obtido de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 640 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte (15 dias a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 65

Figura 23. Aspectos morfoculturais do isolado E1, obtido de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte (15 dias a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 66

Figura 24. Aspectos morfoculturais do isolado G2, obtido das águas residuárias da lagoa de decantação G, da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/2006). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Sabouraud (15 dias a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 66

Figura 25. Aspectos morfoculturais do isolado O1, obtido de turfa às

margens das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte (15 dias a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 67

Figura 26. Isolado Gc, obtido junto à Fundação André Toselo. **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte (15 dias a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 67

Figura 27. Isolado Pc, obtido junto à Fundação André Toselo. **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 640 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte (15 dias a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 68

Figura 28. Aspectos morfoculturais do isolado fúngico BF, obtido de efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento de efluentes da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Estrutura microscópica sob contraste de difração e coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 1000 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Sabouraud (15 dias de incubação a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 68

Figura 29. Aspectos morfoculturais do isolado O1, obtido de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de fucsina básica (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte (15 dias a 28 ± 2 ºC, escuro)..... 69

Figura 30. Produção de fenoloxidases pelo isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios de cultura (7 dias de incubação a 28 ± 2 °C, escuro) contendo diferentes azocorantes. **a)** azure B; **b)** azul de metileno; **c)** cristal violeta; **d)** verde malaquita..... 74

Figura 31. Massa seca do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), cultivado em meio líquido (sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro) contendo diferentes substratos fenólicos (azul de metileno, bagaço de cana e serragem de madeira), para a produção de fenoloxidase, sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 76

Figura 32. Concentração de glicídios redutores totais (eq. mg glicose/mL) ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de fenoloxidase, sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 77

Figura 33. Concentração de proteínas totais (eq. mg albumina de soro bovino/mL) ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de lignina peroxidase (LiP), sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 78

Figura 34. Concentração de fenóis totais (eq. mg ácido gálico/mL) ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de lignina peroxidase (LiP), sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 79

Figura 35. Concentração de DQO (mg de oxigênio consumido/L de meio) ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de lignina peroxidase (LiP), sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 80

Figura 36. Massa seca e absorvância (500 nm) do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), cultivado em meio líquido [sob agitação (100 rpm) a 30 ± 2 °C, no escuro] contendo azul de metileno..... 82

Figura 37. Condutividade elétrica e pH de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), cultivado em meio líquido [sob agitação (100 rpm) a 30 ± 2 °C, no escuro] contendo azul de metileno..... 83

Figura 38. Reação geral da degradação de Azul de Metileno por lignina-peroxidase (LiP), sem indicação das espécies radicalares intermediárias..... 84

Figura 39. Culturas dos fungos isolados de águas residuárias e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, em meio contendo ácido tânico (2 %) como única fonte de carbono (28 ± 2 °C, no escuro) após 15 dias de incubação **a**) *Trichosporon* sp (BF), **b**) *Penicillium* sp (G2); **c**) *Geotrichum candidum* (Gc)*;* **d**) isolado V1; **e**) *Cladosporium* sp (XXI); **f**) *Penicillium* sp (O1); **g**) *Mucor* sp (2AMB) e **h**) *Phanerochaete chrysosporium* (Pc)..... 85

Figura 40. Descoloração do meio ácido tânico (2 %) sólido pelo isolado XXI (*Cladosporium* sp), de águas da lagoa de decantação da estação de tratamento de efluentes da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), após 30 dias de incubação (30 ± 2 °C, no escuro)..... 85

Figura 41. Aspecto de culturas em meio líquido contendo ácido tânico (2 %) pelos isolados fúngicos (XXI, V1, C1, E1, 2AMB), obtidos de amostras de efluente e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05 e 2005/06), após 30 dias de incubação a 28 ± 2 ºC, no escuro. B= controle..... 86

Figura 42. Aspecto de culturas em meio líquido contendo ácido tânico (2 %) pelos isolados fúngicos (Gc, O1, G2, Pc, BF), obtidos de micoteca oficial ou de amostras de turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05 e 2005/06), após 30 dias de incubação a 28 ± 2 ºC, no escuro. B= controle..... 87

Figura 43. Remoção de ácido tânico pelos isolados fúngicos obtidos ou de micoteca oficial ou de amostras de efluentes e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05 e 2005/06), em meio líquido contendo 2 % de ácido tânico, após 30 dias de incubação a 28 ± 2 ºC, no escuro..... 87

Figura 44. Remoção de ácido tânico em meio líquido contendo 0,4 % de ácido tânico, pelos fungos *Aspergillus* sp e *Cladosporium* sp, obtidos das amostras de turfa e efluente da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, nas safras 2004/05 e 2005/06, após 168 h de incubação a 28 ± 2 ºC, no escuro..... 88

Figura 45. Remoção da DQO em meio líquido contendo 0,4 % de ácido tânico, pelos fungos *Aspergillus* sp e *Cladosporium* sp, obtidos das amostras de turfa e efluente da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, nas safras 2004/05 e 2005/06, após 168 h de incubação a 28 ± 2 ºC, no escuro..... 89

Figura 46. Massa seca dos isolados fúngicos *Mucor* sp, *Cladosporium* sp, *G. candidum*, *P. chrysosporium*, de *Mucor* sp, *Cladosporium* sp, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa "D" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud, sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 92

Figura 47. Concentração de glicídios redutores totais ao longo do tempo de cultivo dos isolados fúngicos de *Mucor* sp, *Cladosporium* sp, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa "D" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud, sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 93

Figura 48. Concentração de proteínas totais ao longo do tempo de cultivo dos isolados fúngicos de *Mucor* sp, *Cladosporium* sp, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa "D" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud, sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 94

Figura 49. Concentração de fenóis totais ao longo do tempo de cultivo dos isolados fúngicos de *Mucor* sp, *Cladosporium* sp, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa "D" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud, sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 95

Figura 50. Concentração de DQO (mg de oxigênio consumido/L de meio) ao longo do tempo de cultivo dos isolados fúngicos de *Mucor* sp, *Cladosporium* sp, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa "D" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud, sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro..... 96

Figura 51. Média (± desvio padrão) da temperatura em águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = comporta da captação lateral para irrigação, na entrada da lagoa F; C.C. = comporta da captação central para irrigação, na saída da lagoa facultativa G; V.R. = valor de referência permitido pela legislação)..... 100

Figura 52. Média (± desvio padrão) da concentração de Oxigênio Dissolvido (OD) em águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = comporta da captação lateral para irrigação, na entrada da lagoa F; C.C. = comporta da captação central para irrigação, na saída da lagoa facultativa G; V.R. = valor de referência permitido pela legislação)..... 101

Figura 53. Média (± desvio padrão) dos valores de pH em águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = comporta da captação lateral para irrigação, na entrada da lagoa F; C.C. = comporta da captação central para irrigação, na saída da lagoa facultativa G; V.R. = valor de referência permitido pela legislação)..... 102

Figura 54. Média (± desvio padrão) dos valores de Condutividade Elétrica das águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = comporta da captação lateral para irrigação, na entrada da lagoa F; C.C. = comporta da captação central para irrigação, na saída da lagoa facultativa G; V.R. = valor de referência permitido pela legislação)..... 104

Figura 55. Média (± desvio padrão) da concentração de Sólidos Totais Dissolvidos (STD) de águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/2006 e 2006/2007, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = comporta da captação lateral para irrigação, na entrada da lagoa F; C.C. = comporta da captação central para irrigação, na saída da lagoa facultativa G; V.R. = valor de referência permitido pela legislação)..... 105

Figura 56. Média (± desvio padrão) dos valores de Turbidez de águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = comporta da captação lateral para irrigação, na entrada da lagoa F; C.C. = comporta da captação central para irrigação, na saída da lagoa facultativa G; V.R. = valor de referência permitido pela legislação)..... 106

Figura 57. Média (± desvio padrão) da concentração da Demanda Química de Oxigênio (DQO) das águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = comporta da captação lateral para irrigação, na entrada da lagoa F; C.C. = comporta da captação central para irrigação, na saída da lagoa facultativa G; V.R. = valor de referência permitido pela legislação)..... 107

Figura 58. Média (± desvio padrão) da concentração de Fostatos Totais das

águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = comporta da captação lateral para irrigação, na entrada da lagoa F; C.C. = comporta da captação central para irrigação, na saída da lagoa facultativa G; V.R. = valor de referência permitido pela legislação)..... 109

Figura 59. Meios utilizados na identificação de isolados bacterianos. **A** - SIM (Sulfato/Indol/Motilidade); **B**– Ágar-uréia; **C**- Ágar-Citrato-Simmons; **D**–TSI (Três glicídeos- ferro); **E**– Culturas após incubação: motilidade + e degradação de uréia, citrato, lactose, sacarose e glicose +)..... 140

Figura 60. **a)** Caixa de incubação do sistema API 20E (**b**), usado para identificação de microrganismos G^-, com 5 mL de água destilada esterilizada. **c**) Inoculação da suspensão de microrganismos nas galerias do sistema. **d)** Sistema API 20E inoculado e incubado por 24 h a 37 ºC. **e)** Reveladores do kit API..... 144

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Produção brasileira de cana-de-açúcar, açúcar, álcool e outros derivados na safra de 2005/06..... 9

Tabela 2. Diferentes técnicas de biorremediação e seus conceitos..... 15

Tabela 3. Principais características das enzimas pertencentes ao sistema ligninolítico (WESENBERG *et al.* 2003)..... 20

Tabela 4. Análises físico-químicas efetuadas com as amostras de águas residuárias da ETE da unidade industrial da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool..... 50

Tabela 5. Resultados dos testes bioquímicos do sistema API 20E (Biomerieux), inoculado com os microrganismos T e 3MB, isolados dos efluentes lançados nas lagoas de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), e incubou-se por 48 h (35 ± 1 ºC, escuro)..... 56

Tabela 6. Resultados dos testes clássicos de identificação bioquímica das espécies de *Pseudomonas* isoladas de amostras de efluentes de lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Isolado 3MB; **b)** Isolado T..... 59

Tabela 7. Média do crescimento micelial (mm/placa) dos isolados fúngicos ou de micoteca oficial ou de amostras de efluentes e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05 e 2005/06), em diferentes meios de cultura (7 dias de incubação a 28 ± 2 °C, escuro)..... 69

Tabela 8. Detecção das atividades enzimáticas extracelulares dos isolados fúngicos ou de micoteca oficial ou de amostras de efluentes e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05 e 2005/06), em diferentes meios de cultura (7 dias de incubação a 28 ± 2 °C, escuro)..... 70

Tabela 9. Detecção da produção de fenoloxidases pelos isolados fúngicos de micoteca oficial ou de amostras de efluentes e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05 e 2005/06), em meios de cultura contendo diferentes azocorantes (7 dias de incubação a 28 ± 2 °C, escuro). Os valores entre parênteses referem-se ao tamanho das colônias e dos halos de descoloração (mm)..... 73

Tabela 10. Análises físico-químicas das amostras de águas residuárias coletadas em na lagoa facultativa "D" da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool em 19/12/2006 (91 dias após início da moagem, com adição diária de NaOH e bioaumentação com consórcio de 6 microrganismos)..... 91

Tabela 11. Propriedades físico-químicas a 20-25 ºC de princípios ativos de alguns herbicidas usados na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool..... 152

Tabela 12. Avaliação de risco de contaminação de águas subterrâneas com base nos critérios de seleção estabelecidos pela EPA, e no índice GUS [GUS = log $T_{1/2}$X(4-log Koc)], para alguns agroquímicos usados na S.A. Usina Coruripe..... 152

Tabela 13. Classificação dos princípios ativos de alguns agroquímicos

usados nos plantios de cana da S. A. Usina Coruripe..... 153

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Exemplos de fungos capazes de produzir tanino acil hidrolases…. 27

Quadro 2. Aspectos morfológicos e bioquímicos de oito microrganismos isolados de amostras de efluentes de lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05)..... 52

Quadro 3. Aspectos morfológicos e bioquímicos de oito microrganismos isolados de amostras de efluentes de lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05)..... 53

Quadro 4. Origem e identificação dos fungos filamentosos obtidos de micoteca oficial ou isolados de efluentes ou turfa das lagoas de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safras 2004/05 e 2005/06)..... 64

Quadro 5. Agroquímicos utilizados nos plantios de cana da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool..... 148

Quadro 6. Nomenclatura e Fórmula dos Agroquímicos utilizados nos plantios de cana da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool..... 149

Quadro 7. Classes de água Doce (Resolução CONAMA 357/05)..... 157

Quadro 8. Classe 1 de águas doces – padrões..... 160

Quadro 9. Classe 1 de águas doces - padrões para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo..... 161

Quadro 10. Classe 3 de águas doces – padrões..... 163

Quadro 11. Lançamento de efluentes – padrões..... 167

Quadro 12. Resumo dos parâmetros para águas doces de diferentes classes (Resol. CONAMA n° 357/05)..... 167

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

ABTS.....2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-sulfonato)
ADEQ……Arizona Department of Environmental Quality
ADH…….Arginina desaminase
ADWR……...Arizona Department of Water Resources
ALC.....Águas de lavagem de cana
AM……Azul de metileno
AN.....Ágar Nutriente
APHA.....American Public Health Association
APHB.....Ácido poli-4-hidroxibutírico
API 20E.....Sistema de identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos não exigentes
As.....Arsênio
ASB.....Albumina de soro bovino
Atm.....Atmosfera
ATP.....Trifosfato de adenosina ou Adenosina trifosfato
AV.....Álcool veratrílico
°C.....Graus Celsius
$CaCl_2$.....Cloreto de cálcio
$CaCl_2.2H_2O$.....Cloreto de cálcio dihidratado
CC.....Captação Central
CCT.....Coleção de culturas tropicais
Cd.....Cádmio
CGER.....Comission on geoscience, environmental and resources
CH_4.....Metano
CIT.....Citrato
Cl.....Cloro
CO_2.....Dióxido de carbono ou Gás carbônico
CONAB.....Companhia Nacional de Abastecimento
CONAMA.....Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr.....Cromo
Cu^{2+}.....Íon Cobre II
$CuSO_4$.....Sulfato de cobre
$CuSO_4.5H_2O$.....Sulfato de cobre pentahidratado
DBO.....Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMB.....Dimetoxibenzeno
DNAr.....Ácido desoxiribonucleico ribossômico
DNSA.....Ácido dinitrosalicílico
DQO.....Demanda Química de Oxigênio
E°.....Potencial redox
EDTA.....Ácido etilenodiamino tetracético
ETE.....Estação de Tratamento de Esgoto ou de Efluente
EUA.....Estados Unidos da América
Facult.....Facultativo
$FeSO_4$.....Sulfato ferroso
$FESO_4.7\ H_2O$.....Sulfato ferroso heptahidratado
g.....Grama
gL^{-1}.....Grama por litro
$gmol^{-1}$.....Grama por mol

GEL.....Gelatinase
GLU.....D-glicose
GUS.....Groundwater Ubiquity Score
h.....Hora
H_2O.....Água
H_2O_2.....Peróxido de hidrogênio ou água oxigenada
H_2S.....Gás sulfídrico
H_3BO_3.....Ácido Bórico
HAA.....Ácido hidróxiantranílico
HBT.....Hidróxibenxotiazol
Hg.....Mercúrio
HOHN.....3-hidróxi-5-oxohexanoato
IND.....Indol
INO.....Inositol
ITEM.....Irrigação & Tecnologia Moderna
K.....Potássio
KDa.....KiloDalton
KH_2PO_4.....Dihidrogenofosfato de potássio
K_2HPO_4.....Hidrogenofosfato de potássio
LBPVMA..Laboratório de Bioquímica do Paratismo Vegetal e Microbiologia Ambiental
LDC.....Lisina descarboxilase
LiP.....Lignina Peroxidase
M.....Molar
m^3.....Metro cúbico
MAN.....Manitol
mgL^{-1}.....Miligrama por litro
Mg^{2+}.....Íon Magnésio II
$MgSO_4$.....Sulfato de magnésio
$MgSO_4.7H_2O$.....Sulfato de magnésio heptahidratado
min.....Minuto
mL.....Mililitro
MM.....Massa molecular
$MnCl_2.2H_2O$.....Cloreto de manganês dihidratado
MnP.....Manganês Peroxidase
Mo.....Molibdênio
MoO_3.....Óxido de molibdênio
N.....Normal
Na_2CO_3.....Carbonato de sódio
Na_2HPO_4.....Hidrogenofosfato de sódio
NaCl.....Cloreto de sódio
$NaMoO_4$.....Molibdato de sódio
NaOH.....Hidróxido de sódio
$(NH_4)_2SO_4$.....Sulfato de amônia
Ni.....Níquel
nm.....Nanômetro
NO_2.....Nitrito
NO_3.....Nitrato
NPK.....Adudo à base de nitrogênio, fosfato e potássio
NR.....Não realizado
NTU.....Unidade Nefelométrica de Turbidez

O_2.....Oxigênio molecular
OD.....Oxigênio dissolvido
ODC.....Ornitina descarboxilase
OF.....Oxidação-Fermentação
ONPG.....*p*-Nitrofenol-βD-galactopiranosidose
OX.....Oxidase
P.....Fósforo
p/v.....Peso por volume
P_2O_5.....Ortofosfato
Pb.....Chumbo
PCBs.....Bifenilas policloradas
PGG.....1,2,3,4,6-Pentagaloil-*O*- β-D-glicopiranose ou pentagaloil-glicose
pH.....Potencial hidrogêniônico
p*I*.....Ponto isoelétrico
PNP.....*p*-nitrofenol
RHA.....L-ramnose
RMN.....Ressonância magnética nuclear
RNAr.....Ácido ribonucléico ribossômico
rpm.....Rotações por minuto
RS.....Resíduos sedimentáveis
S.....Enxofre
SABESP.....Secretaria de Abastecimento do Estado de São Paulo
SDS.....Dodecil sulfato de sódio
Se .....Selênio
SMEWW……Standard methods for the examination of the water and wastewater
SOR.....D-sorbitol
STD.....Sólidos totais dissolvidos
TAH.....Tanino Acil Hidrolase
TCE.....Tricloroetileno
TDA.....Triptofano desaminase
TSI.....Tríplice Sugar Iron
UFAL.....Universidade Federal de Alagoas
UFC.....Unidades formadoras de colônia
µL.....Microlitro
UNICA.....União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo
URE.....Urease
USP.....Universidade de São Paulo
v/v.....Volume por volume
VP.....Vogues-Proskaeur
Zn.....Zinco
Zn^{2+}.....Íon Zinco II
$ZnSO_4$.....Sulfato de zinco
$ZnSO_4.7H_2O$.....Sulfato de zinco heptahidratado

RESUMO

Face à atual e futura problemática da manutenção dos recursos hídricos, o reuso de águas tem sido utilizado como estratégia no gerenciamento de mananciais. A biosuplementação é uma das técnicas de purificação de efluentes e, com base nisso, estudos foram conduzidos visando sua utilização em lagoas de tratamento de efluente (ETE) de uma indústria sucroalcooleira, situada em Coruripe, estado de Alagoas, para o reuso em fertirrigação. Nas safras 2004/05 e 2005/06, foram coletadas respectivamente amostras de águas residuárias e turfa da ETE estudada, inicialmente para isolamento de microrganismos (agar-caldo de cana 25%). Os isolados foram posteriormente identificados conforme seu crescimento em meios diferenciais e sua morfologia microscópica. Foram também avaliadas as atividades de enzimas secretadas. Os isolados com características do gênero *Pseudomonas* foram cultivados nos meios King "A" e "B", ágar-leite (produção de caseínase) e no sistema API 20E (Biomerieux), para identificação a nível de espécie. Os oito fungos isolados das amostras, bem como dois cedidos pela Fundação André Toselo (*Phanerochaete chrysosporium* e *Geotrichum candidum*), foram avaliados quanto à secreção de fenoloxidases em meios sólidos, em especial de Lignina-Peroxidase e Tanase. Todos os dez fungos cresceram nesses meios, embora apenas alguns tenham gerado halos de descoloração maiores do que o tamanho de suas colônias, como o isolado "XXI" identificado como *Cladosporium* sp. Este também foi capaz de degradar diferentes azocorantes, ácido tânico e diferentes substratos fenólicos naturais (bagaço-de-cana e serragem de madeira) em meios sólido e líquido. Quando cultivado em meio líquido contendo o azocorante azul de metileno, a curva de crescimento desse fungo, bem como sua atividade descolorante e de alteração do pH e da condutividade elétrica, também foram avaliadas. Também comparou-se a remoção de glicídios redutores, proteínas e fenóis totais, bem como a produção de fenoloxidase por tal fungo em meio líquido contendo ou azul de metileno ou substratos fenólicos naturais. Constatou-se que a fenoloxidase secretada pelo fungo nessas condições é provavelmente a lacase, e que a remoção de fenóis foi mais lenta nos substratos naturais, aparentemente devido à grande disponibilidade de glicídios liberados na degradação dos polímeros lignocelulósicos, não sendo necessário degradar fenóis durante o intervalo de tempo dos experimentos (144 h). Em meio líquido contendo 2 % de ácido tânico, os isolados que promoveram maior descoloração (*Cladosporium* sp e *Aspergillus* sp), tiveram suas culturas monitoradas quanto à redução das concentrações de glicídeos redutores, proteínas, fenóis totais e demanda química de oxigênio (DQO). Verificou-se que o isolado de *Cladosporium* sp removeu 12 % da DQO desse meio, contra 9,3 % de remoção pelo isolado de *Aspergillus* sp, e ambos reduziram na mesma proporção os teores de fenóis totais ao final do período avaliado. Já nas amostras de efluente agroindustrial suplementado com 1 % da composição em Carbono e Nitrogênio do meio ágar Sabouraud, constatou-se que o fungo *Mucor* sp apresentou as melhores taxas de redução de DQO e fenóis, seguido pelos isolados de *Cladosporium* sp, *P. chrysosporium* e *G. candidum*. Finalmente, após a bioaumentação diária das lagoas facultativas da ETE estudada (vazão de cerca de 5.000 $m^3.h^{-1}$ e aproximadamente 2 dias de retenção hidráulica), durante as safras 2005/06 e 2006/07, por um consórcio de 6 dos microrganismos isolados e testados *in vitro*, as análises físico-químicas quinzenais permitiram evidenciar que a estratégia mostrou-se promissora por ter melhorado a maioria dos parâmetros de qualidade, tornando a água adequada para fertirrigação, embora algumas das características (OD, DQO e fosfatos) ainda não obedeçam a legislação para lançamento em rios.

ABSTRACT

Due to the current and future problematic of the maintenance of the hydric resources, the reuse of waters after previous treatment has been a strategy in the management of aquifers. The bioaugmentation is one of the techniques of purification of effluents and, because of this, studies were carried out in lagoons from the station of treatment of effluents (STE) of one sugar-alcohol industry, in Coruripe, State of Alagoas, aiming its reuse in ferti-irrigation. Therefore, in the sugarcane harvests of 2004/05 and 2005/06, samples were collected respectively from residuary waters and turf of this STE, initially for isolation of microorganisms (agar-broth of sugar-cane 25%). The isolates were identified in agreement to its growth in differential media and microscopic morphology. The activities of extracellular enzymes were also evaluated. The isolates with characteristics of the genus *Pseudomonas* were cultivated in the media King "A" and "B", agar-milk (production of caseinase) and in the system API 20E (Biomerieux), for identification at the level of species. The eight fungi isolated from the samples, as well as two fungi furnished by André Toselo Foundation (*Phanerochaete chrysosporium* and *Geotrichum candidum*), were evaluated in solid media according to their secretion of phenoloxidases, in special Lignin-Peroxidase and Tanase. All the ten fungi grew in these media, even so only some have generated halos of discoloration larger than the size of the colonies, as it happened with the isolate "XXI" identified as *Cladosporium* sp. This was able to degrade different azodyes, tannic acid and different natural phenolic substrates (sugar-cane bagasse and wood-dust) in solid and liquid media. When this fungus was cultivated in liquid medium with methylene blue, its growth curve and azodye discoloration, as well as its action on the variation of pH and electric conductivity, were evaluated. It was also compared its ability to remove total reducing glicids, proteins and phenols, as well as its production of Lignin-Peroxidase in liquid medium with methylene blue or natural phenolic substrates. Laccase was the probable phenoloxidase produced by the isolate of *Cladosporium* sp in these circumstances, mainly in natural substrates. It is possible that this fungus consumed the glicids released from the degradation of lignocellulosic polymers so that they didn't need to use the phenols during the time interval of the experiments (144 h). The best isolates to remove the azodye in the liquid medium containing 2 % of tannic acid, that is, *Cladosporium* sp and *Aspergillus* sp, were monitored according to the variation on the concentrations of total reducing-glicids, proteins, phenols, and chemical oxygen demand (COD) in the media. The isolate of *Cladosporium* sp removed 12 % of the total COD of the media, against 9.3 % of removal by the isolate of *Aspergillus* sp, and both had reached the same rate of phenol reduction at the end of the evaluated period. Regarding to the samples of the agri-industrial effluent supplemented with only 1% of Carbon and Nitrogen composition of the Sabouraud-agar medium, it was observed that *Mucor* sp showed the best rates of reduction of COD and phenols, followed by the isolates of *Cladosporium* sp, *P. chrysosporium* and *G. candidum*. Finally, after the daily bioagumentation of the facultative lagoons from the studied STE (with an outflow of about 5.000 m3.h-1 and approximately 2 days of hydraulic retention), during the harvests of 2005/06 and 2006/07, by a consortium of 6 of the isolates tested *in vitro*, the monitoring of the physico-chemiscal parameters of biweekly collected water samples during both seasons showed that this strategy was promising, for having improved most of the quality parameters and turning the water appropriated for ferti-irrigation. Even so, some of the characteristics did not obey yet the legislation got for launching in rivers (DO, COD and phosphates).