

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: Prof^ª Dr^ª Ana Maria Queijeiro López

MACEIÓ, ESTADO DE ALAGOAS
MAIO DE 2007

Catálogo 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 fenoloxidasas 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., graf.

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. Fenoloxidasas. 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 Fenoloxidasas de Microrganismos 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

Prof.ª. Dr.ª. Ana Maria Queijeiro López
Orientadora – IQB/UFAL
CPF: 057.628.118-24

Prof.ª. Dr.ª. Maria de Mascena Diniz Maia
UFRPE
CPF: 127.843.624-34

Prof.ª. Dr.ª. 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 Prof^a. Dr^a. 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

	<i>Página</i>
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 <i>Mucor</i> sp, <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Geotrichum candidum</i> E <i>Cladosporium</i> 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 <i>Cladosporium</i> sp EM DIFERENTES SUBSTRATOS	76
5.5.1. CONDUTIVIDADE E PH NA REMOÇÃO DE AZUL DE METILENO POR <i>Cladosporium</i> 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 <i>Mucor</i> sp, <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Geotrichum candidum</i> E <i>Cladosporium</i> 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

	<i>Página</i>
Figura 1. Estrutura dos três precursores de lignina: (1) álcool <i>p</i> -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 <i>Coprinus cinereus</i> , 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 <i>et al.</i> , 2001).....	24
Figura 7. Estruturas do ácido gálico (1) e do β -1,2,3,4,6-pentagaloi-O-D-glicopirranose (2).....	25
Figura 8. Estrutura de quatro dímeros de taninos condensados, denominados B1= epicatequina-(4 β ->8)-catequina; B2= epicatequina-(4 β ->8)-epicatequina; B3= catequina-(4 α ->8)-catequina; B4= catequina-(4 α ->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 <i>et al.</i> , 2005, <i>apud</i> AGUILAR <i>et al.</i> , 1999).....	28
Figura 10. Vias metabólicas de degradação de taninos hidrolisáveis (Fonte: adaptada de BHAT <i>et al.</i> , 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 bioaugmentação 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 °C, 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 Agar 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 °C, 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 °C, 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 °C, 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 °C, 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 °C, 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 °C, 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 °C, 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 °C, escuro).....	68
Figura 28. Aspectos morfo culturais 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 °C, escuro).....	68
Figura 29. Aspectos morfo culturais 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 °C, escuro).....	69
Figura 30. Produção de fenoloxidasas pelo isolado XXI (<i>Cladosporium</i> 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 (<i>Cladosporium</i> 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 (<i>Cladosporium</i> 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 (<i>Cladosporium</i> 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 °C, 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 °C, 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 °C, no escuro..... 87

Figura 44. Remoção de ácido tânico em meio líquido contendo 0,4 % de ácido tânico, pelos fungos <i>Aspergillus</i> sp e <i>Cladosporium</i> 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 °C, no escuro.....	88
Figura 45. Remoção da DQO em meio líquido contendo 0,4 % de ácido tânico, pelos fungos <i>Aspergillus</i> sp e <i>Cladosporium</i> 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 °C, no escuro.....	89
Figura 46. Massa seca dos isolados fúngicos <i>Mucor</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp, <i>G. candidum</i> , <i>P. chrysosporium</i> , de <i>Mucor</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp, <i>G. candidum</i> e <i>P. chrysosporium</i> , 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 <i>Mucor</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp, <i>G. candidum</i> e <i>P. chrysosporium</i> , 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 <i>Mucor</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp, <i>G. candidum</i> e <i>P. chrysosporium</i> , 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 <i>Mucor</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp, <i>G. candidum</i> e <i>P. chrysosporium</i> , 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 <i>Mucor</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp, <i>G. candidum</i> e <i>P. chrysosporium</i> , 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 (\pm 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 bioaugmentação. (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 (\pm 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 (\pm 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 (\pm 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 (\pm 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 (\pm 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 (\pm 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 (\pm desvio padrão) da concentração de Fostatos Totais das

<p>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).....</p>	109
<p>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 +).....</p>	140
<p>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 °C. e) Reveladores do kit API.....</p>	144

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
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 <i>et al.</i> 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 °C, escuro).....	56
Tabela 6. Resultados dos testes clássicos de identificação bioquímica das espécies de <i>Pseudomonas</i> 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 fenoloxidasas 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 °C 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

	<i>Página</i>
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-hidroxitubúrico
API 20E.....	Sistema de identificação de <i>Enterobacteriaceae</i> 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 ₂ O.....	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 ₂ O.....	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 ₂ O.....	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 ₂ O.....	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio ou água oxigenada
H ₂ S.....	Gás sulfídrico
H ₃ BO 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 ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potássio
K ₂ HPO 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 ₂ O.....	Sulfato de magnésio heptahidratado
min.....	Minuto
mL.....	Mililitro
MM.....	Massa molecular
MnCl ₂ .2H ₂ O.....	Cloreto de manganês dihidratado
MnP.....	Manganês Peroxidase
Mo.....	Molibdênio
MoO ₃	Óxido de molibdênio
N.....	Normal
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Hidrogenofosfato de sódio
NaCl.....	Cloreto de sódio
NaMoO ₄	Molibdato de sódio
NaOH.....	Hidróxido de sódio
(NH ₄) ₂ SO 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.....	<i>p</i> -Nitrofenol-βD-galactopiranosidase
OX.....	Oxidase
P.....	Fósforo
p/v.....	Peso por volume
P ₂ O ₅	Ortofosfato
Pb.....	Chumbo
PCBs.....	Bifenilas policloradas
PGG.....	1,2,3,4,6-Pentagaloi-O- β-D-glicopiranosose ou pentagaloi-glicose
pH.....	Potencial hidrogênioônico
pI.....	Ponto isoelétrico
PNP.....	<i>p</i> -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 ₂ O.....	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 (Biomérieux), 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 fenoloxidasas 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 bioaugmentação diária das lagoas facultativas da ETE estudada (vazão de cerca de 5.000 m³.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 bioaugmentation 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).

1. INTRODUÇÃO

Em virtude da escassez de água potável para consumo humano em algumas regiões do planeta, e das previsões de que venha ocorrer o mesmo em outras áreas nos próximos 20 anos, o gerenciamento dos recursos hídricos tem se tornado uma ferramenta fundamental para manutenção, controle e fiscalização da qualidade e quantidade dos mesmos.

Entre outras estratégias utilizadas no gerenciamento de tal recurso está o reuso de águas, com ou sem tratamento prévio, em setores ou aplicações que não necessitem dos índices de potabilidade.

Levando-se em consideração que a área agrícola, no Brasil, é responsável por 70-80 % do consumo de água, a estratégia de reuso é caracterizada como de ordem prioritária.

No processo industrial de uma agroindústria sucro-alcooleira gera-se grande quantidade de resíduos líquidos (vinhaça, água de lavagem de cana, cinzas, gases, equipamentos e piso, e água dos condensadores), cujo manejo requer tratamentos diferenciados. O reuso de água nessas empresas, num circuito semi-aberto, consiste no reaproveitamento de parte dos efluentes nos processos industriais e parte deles na irrigação das lavouras, sem desperdícios.

Contudo, lençóis freáticos podem ser contaminados se tais efluentes forem utilizados em fertirrigação sem um tratamento devido, e, no caso de lançamento direto em corpos d'água, também comprometem a sobrevivência do ecossistema aquático. O caráter nocivo de tais efluentes está associado com os altos teores de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), sólidos suspensos totais e presença de derivados de lignina e taninos, responsáveis pela sua coloração marrom-escura.

Em vista dessa problemática, o propósito do presente trabalho foi isolar microrganismos da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, avaliar o comportamento enzimático dos mesmos, e de dois isolados fúngicos fornecidos pela Fundação André Toselo, sobre polímeros fenólicos tais como taninos e lignina, e verificar seus efeitos em laboratório e no campo sobre efluentes de agroindústria sucroalcooleira, monitorando os parâmetros físico-químicos dessas águas após bioaumentação, com vistas a seu reuso em fertirrigação.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Diante do exposto, este trabalho visou:

1. Isolar microrganismos presentes nos efluentes das lagoas da estação de tratamento da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, especialmente os capazes de degradar polissacarídeos e ácidos e/ou polímeros fenólicos.

2. Caracterizar os isolados do ponto de vista morfo-cultural e bioquímico, especialmente por alguns parâmetros enzimáticos.

3. Selecionar entre os isolados fúngicos aquele(s) com atividade positiva para fenoloxidasas, em meio contendo diferentes substratos (Bagaço de cana, serragem de madeira ou o azocorante azul de metileno).

4. Avaliar as variações de pH, Condutividade Elétrica e decaimento da absorvância, bem como a curva de crescimento, o decaimento de glicídios, proteínas totais, fenóis totais e Demanda Química de Oxigênio (DQO) no decurso do tempo, do cultivo do isolado capaz de degradar lignina e azocorantes.

5. Selecionar, entre os isolados fúngicos, aqueles capazes de crescer utilizando ácido tânico como única fonte de energia, verificando o decaimento de fenóis e DQO.

6. Avaliar os efeitos do desenvolvimento dos fungos *Mucor* sp, *Phanerochaete chrysosporium*, *Geotrichum candidum* e *Cladosporium* sp sobre amostras de efluente agroindustrial suplementado com 1 % da constituição de Carbono e Nitrogênio do meio ágar Sabouraud.

7. Bioaumentar, com 6 dos isolados, bacterianos e fúngicos, as lagoas facultativas da estação de tratamento de efluentes (ETE) de indústria sucroalcooleira e monitorar o desempenho do tratamento através da análise dos parâmetros físico-químicos durante duas safras.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. QUALIDADE E REUSO DE ÁGUAS

Segundo MOTA *et al.* (2006), apenas 2,5 % das águas do planeta podem ser utilizados para consumo humano mediante tratamento prévio, porém, 2 % encontram-se nas geleiras, restando somente 0,5 % superficialmente (rios, lagos e etc.).

O potencial hídrico do Brasil é imenso - chega a 36.000 m³ de água por habitante. Porém, a região nordeste possui somente 3,3 % da disponibilidade hídrica, com um terço da população brasileira (TUNDISI, 2003). Além da gravidade da escassez hídrica em diversas regiões, deve-se considerar a poluição concentrada e difusa de corpos hídricos.

As modificações naturais na água ocorrem quando materiais suspensos como areia, pólenes e gases, são incorporados a ela pelo ar. Há ainda a incorporação de partículas do solo, ou mesmo íons provenientes da dissolução de rochas, pelo escoamento superficial. As alterações antropogênicas, por sua vez, estão associadas à geração de resíduos (domésticos e industriais), seja de forma pontual (lançamento de esgoto em corpos de água) ou dispersa (aplicação de agroquímicos no solo) (MORAES & JORDÃO, 2002; SINGH, 2003).

Os corpos hídricos de áreas densamente povoadas sofrem processos de degradação que comprometem sua qualidade; neles ocorre eutrofização, presença de metais pesados, acidificação, derramamento de poluentes orgânicos e tóxicos em geral (MORAES & JORDÃO, 2002).

Para garantir o uso atual e futuro da água com qualidade aceitável, é necessário planejar a prevenção e recuperação dos corpos hídricos disponíveis, implantando medidas de acompanhamento e fiscalização do estado do ambiente aquático. A seleção dos parâmetros (**ANEXO 1**) de interesse para avaliação depende da fonte, uso e destino das águas. No Brasil, a resolução n° 357/2005 do

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (**ANEXO 2**) é que classifica as águas conforme seus usos e qualidades.

Por muito tempo não houve preocupação com a caracterização da geração de efluentes e com a avaliação dos impactos ambientais. Contudo, a legislação atual, juntamente com a conscientização ambiental, tem feito com que algumas indústrias desenvolvam atividades para quantificar a vazão e determinar a composição dos resíduos por elas lançados. A vazão dos efluentes, que pode ser constante ou bastante variada, está relacionada com o tempo de funcionamento das linhas de produção e com as características de cada processo, da matéria-prima e dos equipamentos empregados (PEREIRA, 2001).

3.1.1. Reuso de águas

Segundo FERREIRA & CUNHA (2005), a retirada de água para usos domésticos, industriais e de agropecuária está se projetando com um aumento de pelo menos 50 % para os próximos anos. Tal aumento irá limitar rigorosamente a retirada de água para irrigação, o que deixará a produção mais onerosa.

Como a demanda desse recurso continua a aumentar, o retorno das águas servidas e o seu reuso tornam-se componentes importantes no planejamento, desenvolvimento e utilização dos recursos hídricos, tanto em regiões áridas como úmidas, especialmente para fins onde não se necessita de potabilidade, como na agricultura. Por meio do planejamento integrado dos recursos hídricos, portanto, a reutilização pode propiciar suficiente flexibilidade para o atendimento das demandas de curto prazo, assim como assegurar o aumento da garantia no suprimento a longo prazo (HESPANHOL, 2003).

Segundo CARRERA-FERNANDEZ & GARRIDO (2000), a cobrança pelo uso da água é um dos instrumentos mais importantes na gestão dos recursos hídricos. Tal instrumento é utilizado para a manutenção do equilíbrio entre oferta e demanda na região ou bacia hidrográfica, auxiliando no processo de racionalização deste recurso. Pode atuar, ainda, como mecanismo de redistribuição de custos sociais, promovendo o desenvolvimento tanto social como ambiental da região, além de incentivar melhorias dos níveis de qualidade dos efluentes descarregados em corpos d'água.

O princípio poluidor-pagador é um mecanismo econômico usado com a finalidade de que o poluidor arque com as despesas decorrentes das atividades

poluidoras, de forma que possa repercutir nos custos dos produtos e/ou serviços originados desse tipo de atividade (COLOMBO, 2004).

CGER (1998), citado por FINK & SANTOS (2002), destaca a Califórnia e a Flórida como bons exemplos de estados norte-americanos que possuem critérios para o reuso. Na Califórnia, os requisitos gerais para reuso potável indireto são datados de 1978, onde o mesmo era realizado por meio da recarga dos aquíferos. Na Flórida, o gerenciamento de águas do Estado elabora estudos de viabilidade para as ETE's localizadas nas áreas identificadas como tendo ou que teriam problemas nos 20 anos seguintes. No Arizona, dois departamentos - *Arizona Department of Environmental Quality (ADEQ)* e *Arizona Department of Water Resources (ADWR)*, são responsáveis pela fiscalização da recarga de aquíferos com efluentes tratados em ETE's, uma vez que há proibição do reuso potável direto.

De acordo com BREGA F° & MANCUSO (2002), o reuso da água pode ocorrer nas formas direta, quando o uso de esgotos tratados para certas finalidades como irrigação, uso industrial, recarga de aquífero e água potável é planejado e deliberado, ou indireta, quando a água já utilizada uma ou mais vezes para uso doméstico ou industrial é descarregada nas águas superficiais ou subterrâneas, e usada novamente de forma diluída, através de ações planejadas ou não planejadas. O reuso interno das águas em instalações industriais, tendo como objetivo a economia de água e o controle da poluição, também é um processo de reciclagem interna.

Conforme HESPANHOL (2003), as modalidades de reuso consideradas prioritárias são as seguintes:

1. *Reuso urbano*: os efluentes podem ser utilizados para a irrigação de campos (golfe, futebol, etc), canteiros decorativos ao longo de rodovias, parques, lavagem de veículos, reserva de incêndio e descargas de banheiros.
2. *Reuso industrial*: mais da metade das águas consumidas nos processos industriais provém de efluentes que recebem ou não tratamento inadequado, sendo necessárias para sistemas de resfriamento, caldeiras e para lavadores de gases, por exemplo.
3. *Recarga de aquíferos e reuso no meio ambiente*: pode ocorrer para aumentar a disponibilidade e armazenamento de água, e controlar a concentração de sais em aquíferos costeiros. Os efluentes podem ser

utilizados para geração de lagos e represas, como habitats naturais e em estabelecimentos recreacionais, pesca e etc.

4. *Reuso agrícola*: Os efluentes oriundos de diversas fontes, tratados adequadamente podem ser utilizados na irrigação de culturas alimentícias, pomares e pastos, forragens, fibras, grãos, como também para a dessedentação de animais.

De acordo com BREGA F° & MANCUSO (2002), a prática de reuso em meio agrícola garante a recarga do lençol freático, além de servir para fertirrigação das culturas, bem como para fins de dessedentação de animais. A utilização de água proveniente de esgotos é diferenciada para a irrigação de plantas não comestíveis (silvicultura, pastagens, fibras e sementes) e comestíveis (nas formas cruas e cozidas), necessitando de um nível maior de qualidade. Conforme BEEKMAN (1998), deve-se atentar para as limitações sanitárias e ambientais de aplicação.

O conteúdo dos elementos presentes em efluentes urbanos brutos, destacando a presença de macronutrientes como N, P e K, bem como de micronutrientes como As, Cd, Cr, Hg, Mo, Ni, Pb, Se e Zn, deve ser analisado, visto que tais elementos são necessários ao desenvolvimento vegetal. Além disso, também há elementos fitotóxicos que possam estar presentes. Com relação aos patógenos e vetores de doenças aos seres humanos, o solo pode atuar como redutor do período de sobrevivência (GUIDOLIN, 2000).

Na Califórnia (EUA), Israel e Portugal, estudos realizados comprovaram que a complementação com fertilizantes químicos ou orgânicos tem sido pouca ou nenhuma, após a utilização de águas servidas do meio urbano para a irrigação de diversas culturas (BEEKMAN, 1998).

Em Brunswick, na Alemanha, há o reuso dos esgotos para irrigação, onde os esgotos são coletados na estação de tratamento e, por gravidade, são conduzidos às estações de bombeamento nas áreas de irrigação por aspersão. Nesta cidade, há uma sociedade que visa o aproveitamento dos esgotos, que atua desde 1952, a qual acompanha e gerencia o processo descrito e, em cerca de 20 anos de utilização, não relatou nenhum caso de infecção, indicando que as medidas de segurança que foram adotadas são suficientes (GUIDOLIN, 2000).

No Brasil, a área agrícola é responsável por aproximadamente 70-80 % do consumo de água, contra cerca de 10-20 % do consumo da área industrial. Tal demanda, em associação com a escassez dos recursos hídricos, tem levado a

caracterizar o reuso agrícola como sendo de ordem prioritária. Conforme matéria do jornal “O Estado de São Paulo”, de 29 de outubro de 2002, a cidade de São Paulo lançou o programa “Água de Reuso”, tendo como meta evitar o “rodízio racional” de água tanto na capital como na região metropolitana, e incentivar o uso de águas reutilizáveis para fins considerados menos nobres. Mini ETE’s são obrigatórias até na construção civil daquele estado. Vários estudos realizados pela SABESP (Secretaria de Abastecimento do Estado de São Paulo) e centros de pesquisa da USP (Universidade Estadual de São Paulo), têm demonstrado a viabilidade da utilização de efluentes tratados na agricultura.

Também as potencialidades do reuso de águas residuárias tem sido exploradas na região do Seridó, no Rio Grande do Norte, sendo que os efluentes pós-tratamento primário são utilizados na irrigação de capineiras nas proximidades da área urbana. Os municípios de Caicó, Campo Redondo, Currais Novos, Eduardo Gomes, Goianinha, Parelhas e Santa Cruz, têm tido destaque neste processo (ITEM, 2001).

O setor sucro-alcooleiro de várias regiões do Brasil também já faz uso dessa prática há vários anos.

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

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido da Índia e da Austrália. Essa cultura espalha-se pelo Centro-Sul e pelo Norte-Nordeste do país em dois períodos de safra (maio-novembro e setembro-março, respectivamente), ocupando 2,4 % da área agricultável do solo brasileiro (UNICA, 2004). Da produção total da safra 2006/07 (475,73 milhões de toneladas), onde houve um aumento de cerca de 10 % em relação à safra anterior (440,02 milhões de toneladas, **Tabela 1**), 50,9 % foram destinados à produção de açúcar, 38,6 % à produção de álcool e os 10,5 % restantes, para a fabricação de cachaça, alimento animal, sementes, fabricação de rapadura, açúcar mascavo e outros fins (CONAB, 2005; 2006).

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

REGIÃO/UF	CANHA-DE-AÇÚCAR (em 1000 t)				
	TOTAL	INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA			OUTROS
		TOTAL	AÇÚCAR	ÁLCOOL	
NORTE	903,30	762,61	217,43	545,18	140,69
RR	-	-	-	-	-
RO	-	-	-	-	-
AC	-	-	-	-	-
AM	233,80	222,11	217,43	4,68	11,69
AP	-	-	-	-	-
PA	505,50	465,06	-	465,06	40,44
TO	164,00	75,44	-	75,44	88,56
NORDESTE	63.798,20	53.787,76	34.122,93	19.664,83	10.010,44
MA	1.977,80	1.633,66	231,40	1.402,26	344,14
PI	636,80	557,84	-	557,84	78,96
CE	1.793,10	21,52	-	21,52	1.771,58
RN	2.735,50	2.390,83	1.813,64	577,19	344,67
PB	5.997,10	5.517,33	2.086,99	3.430,34	479,77
PE	17.889,00	15.187,76	12.066,13	3.121,63	2.701,24
AL	26.364,60	23.464,49	16.477,88	6.986,62	2.900,11
SE	1.442,40	656,29	-	656,29	786,11
BA	4.961,90	4.358,04	1.446,89	2.911,15	603,86
CENTRO-OESTE	41.126,20	38.854,51	18.376,56	20.477,95	2.271,69
MT	13.460,90	12.782,47	5.500,12	7.282,35	678,43
MS	11.511,60	10.936,02	5.122,66	5.813,36	575,58
GO	16.153,70	15.136,02	7.753,78	7.382,24	1.017,68
DF	-	-	-	-	-
SUDESTE	301.640,00	273.743,90	152.010,74	121.733,16	27.896,10
MG	27.152,10	23.079,29	13.853,00	9.226,28	4.072,82
ES	4.447,90	4.139,66	955,85	3.183,81	308,24
RJ	7.188,80	6.541,81	3.673,48	2.868,33	646,99
SP	262.851,20	239.983,15	133.528,41	106.454,74	22.868,05
SUL	32.555,30	29.957,57	14.455,37	15.502,20	2.597,73
PR	31.100,20	29.156,44	14.455,37	14.701,06	1.943,76
SC	584,30	-	-	-	584,30
RS	870,80	801,14	-	801,14	69,66
NORTE/NORDESTE	64.701,50	54.550,37	34.340,36	20.210,01	10.151,13
CENTRO-SUL	375.321,50	342.555,98	184.842,68	157.713,30	32.765,52
BRASIL	440.023,00	397.106,35	219.183,04	177.923,31	42.916,65

FONTE: CONAB - Levantamento: Ago/2005.

A região nordeste é a segunda na produção de cana de açúcar, e assume a terceira posição na produção de álcool (safra 2005/06 e 2006/07), sendo o Estado de Alagoas o primeiro colocado da região em ambas as atividades (CONAB, 2005; 2006).

Os consumos específicos de água para irrigação variam bastante, dependendo do método empregado. Outros elementos que são importantes nessa prática são a natureza do solo, o tipo de requerimentos das diferentes culturas, e os índices de evaporação das regiões (PAZ *et al.*, 2000).

A multiplicidade de usos da água durante o processo industrial de produção numa agroindústria sucroalcooleira gera grande quantidade de resíduos líquidos. O manejo dos resíduos líquidos originados na mesma (vinhaça, água de lavagem de cana, cinzas, gases, equipamentos e pisos, e água dos condensadores) deve ter tratamentos diferenciados. O uso de água nessas empresas, num circuito fechado dotado de filtros, permite melhor reaproveitamento, sendo esta empregada para a lavagem de cana no início do processo. A demanda em média observada em algumas usinas de São Paulo, por exemplo, foi de cerca de 8,5 m³ por litro de álcool produzido, e a eliminação residual foi de 0,03 m³ por litro de álcool, dependendo do nível de recirculação (BORRERO *et al.*, 2003).

Os efluentes do processo industrial da lavagem de cana-de-açúcar, depois de tratados, podem ser reaproveitados na fertirrigação. Lançados no campo, sem o tratamento devido, tais efluentes podem contaminar lençóis freáticos, e se liberados diretamente em corpos d'água, comprometem a sobrevivência do ecossistema aquático, tanto pela redução na disponibilidade de oxigênio, como por incluir nele fatores tóxicos, etc (MACARIE & LE MER, 2006).

3.2.1. Geração de efluentes e impactos ambientais

A maior quantidade do volume de efluentes da indústria sucroalcooleira é oriundo da lavagem de cana (cerca de 75 %) (CHANG *et al.*, 1990). Esta é realizada em mesas alimentadoras, sendo utilizada para remover matérias (areia, palha, etc.) que podem comprometer a qualidade do caldo e a duração dos equipamentos. Para evitar a remoção de grandes quantidades de sacarose, a lavagem nunca é realizada com a cana picada (COPERSUCAR, 1989).

Além da lavagem de cana, a indústria sucroalcooleira utiliza água para a extração do caldo de cana, que envolve princípios básicos para a eliminação das impurezas e obtenção de um produto final com condições para a fermentação. Também emprega água na fermentação, lavagem das dornas e arraste do CO₂ emitido no processo metabólico. Na destilação, a presença de água é importante para o processo de separação entre o vinho delevedurado e o álcool etílico. Dessa forma, o volume de efluente gerado nessas etapas da produção pode variar entre 1 e 20 m³/tonelada de cana processada (MACARIE & LE MER, 2006), sendo que suas propriedades físico-químicas variam de uma agroindústria para outra, devido às diferenças nos processos usados, tipo de plantio de cana, variedade e solo

empregados, e qualidade e quantidade de águas utilizadas (YANG *et al.*, 1991).

Em geral, tais águas residuárias não tratadas, de usinas sucroalcooleiras, apresentam DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) entre 1700-6600 mg/L (WORLD BANK GROUP, 1999), tendo essa concentração reduzida quando diluída nos corpos d'água. Isso leva à mortandade de peixes e outras formas de vida aquática. Além disso, cria condições para microrganismos anaeróbicos cujos metabolismos da decomposição bêntica geram sulfeto de hidrogênio, cujo odor é característico, e permitem a precipitação de ferro e outros sais, o que torna a água escura e altamente tóxica aos organismos superiores (AKBAR & KHWAJA, 2006).

Tais efluentes apresentam também DQO (Demanda Química de Oxigênio) que varia de 2300-8000 mg/L, cujos efeitos sobre os corpos receptores de água são similares e sinérgicos àqueles causados pela alta DBO. Além disso, o teor de sólidos suspensos totais nessas águas está, em geral, acima de 5000 mg/L (WORLD BANK GROUP, 1999), levando à proliferação de plantas na superfície do corpo de água, aumentando a turbidez e, como resultado, a inibição de organismos fotossintetizantes em outros níveis de profundidade. Finalmente, no momento da liberação, esses efluentes apresentam altas temperaturas, o que eleva a dificuldade de difusão do oxigênio atmosférico para os mesmos, especialmente se lançados em pequenas lagoas (AKBAR & KHWAJA, 2006).

3.3. TRATAMENTO DE EFLUENTES

A importância do tratamento a ser aplicado depende da legislação ambiental local. Essa está baseada na capacidade de auto-purificação dos corpos receptores ou, no caso de reciclagem, na qualidade necessária para uso na irrigação, por exemplo (RAMJEAWON & BAGUANT, 1995).

Para tanto, é necessário conhecer os limites máximos permitidos de cada parâmetro físico-químico analisado no efluente estudado, conforme seu destino, bem como determinar qual o tipo de tratamento (primário, secundário ou combinado de ambos) a ser proposto. Quando a taxa DBO/DQO é maior que 0,6, há alta carga de matéria orgânica bioquimicamente oxidável, e deve ser empregado o processo biológico no tratamento. Por outro lado, se essa taxa for menor que 0,2, o processo físico-químico é que deve ser utilizado. Ainda é possível tratar o efluente biologicamente quando a relação entre DBO e DQO estiver compreendida entre 0,2 e 0,6 (METCALF & EDDY, 1991).

3.3.1. Tratamento primário

Frequentemente, em usinas de cana-de-açúcar, este estágio é realizado em um tanque sedimentador, com um tempo de retenção hidráulico de vários dias (CALERO *et al.*, 2000), ocorrendo um odor desagradável face ao rápido desenvolvimento bacteriano em condições anóxicas. Uma alternativa é a utilização de unidades mais compactas, consistindo de um sistema de seleção de acordo com o tamanho da partícula a remover (MACARIE & LE MER, 2006) e, de acordo com as características dos sólidos suspensos restantes, é possível utilizar um sistema de flotação com injeção de ar. Este sistema pode ter uma vantagem adicional, pois pode remover óleos e graxas originários do maquinário empregado na usina (MACARIE & LE MER, 2006).

3.3.2. Tratamento secundário

O tratamento biológico de águas residuárias é usado primeiramente para a remoção de substâncias orgânicas passíveis de biodegradação, coloidais ou dissolvidas (METCALF & EDDY, 1991). A taxa DQO/DBO dos efluentes das usinas de açúcar está próxima de 2,5, indicando que a matéria orgânica presente é facilmente biodegradável, visto que corresponde primariamente a glicídeos e ácidos voláteis. O pH e a temperatura desses efluentes também são compatíveis com tratamentos biológicos que, segundo MACARIE & LE MER (2006), podem ser divididos em duas categorias: aeróbicos (Equação 1) e anaeróbicos (Equação 2).

Matéria orgânica (DQO 100 %) + O₂ → CO₂ + H₂O + biomassa (DQO 50 %) **eq. (1)**

O processo biológico aeróbico de tratamento de efluentes é favorecido quando a concentração DBO:N:P for igual a 100:5:1, sendo considerado grande produtor de lodo, visto que os microrganismos envolvidos se reproduzem eficientemente. Neste crescimento, eles podem transferir cerca de 50 % do carbono inicialmente presente no meio em carbono da constituição de biomoléculas de novas células. Para isso, também necessitam de nitrogênio, fósforo e enxofre para sintetizar suas novas proteínas, ácidos nucleicos (material genético) e ATP (trifosfato de adenosina), implicando na manutenção de uma taxa de DQO/N/P/S de cerca de 100/ 4,5/ 1,13/ 0,375. Portanto, os efluentes devem ser constantemente analisados para verificar se esses compostos estão presentes naturalmente na proporção

adequada, ou se esta deve ser corrigida para a eficiência do tratamento. Os microrganismos aeróbicos são capazes de diminuir as concentrações de DQO e DBO a níveis baixos, produzindo uma água com qualidade suficiente para ser descartada no ambiente (VIDALI, 2001).

Alguns gêneros de bactérias aeróbicas reconhecidas por sua capacidade degradativa são *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium*. Essas bactérias têm sido relatadas como espécies degradadoras de pesticidas e hidrocarbonetos, alcanos e compostos poliaromáticos. Muitas dessas bactérias utilizam o contaminante como única fonte de carbono e energia. Fungos lignolíticos tais como *Phanerochaete chrysosporium* têm a capacidade de degradar uma faixa extremamente extensa de poluentes ambientais persistentes e tóxicos. Além disso, bactérias aeróbicas, que crescem utilizando metano como fonte de carbono e energia, são de grande interesse. A enzima inicial na rota de degradação aeróbica de metano, a metano mono-oxigenase, é ativa contra uma ampla faixa de compostos, incluindo os alifáticos clorados tricloroetileno e 1,2-dicloroetano (VIDALI, 2001).

Os processos anaeróbicos, por outro lado, requerem uma cadeia trófica de microrganismos que não utilizam oxigênio como aceptor final de elétrons de seu metabolismo (respiratórios ou não), transformando a matéria orgânica em CH₄ e CO₂ (Equação 2), sendo indicado quando a relação DQO:N:P for de 500:5:1.

Matéria orgânica (DQO 100 %) → → → CH₄ + CO₂ + biomassa (DQO 10 %) **eq. (2)**

Os processos anaeróbicos produzem cerca de cinco vezes menos biomassa do que o processo aeróbico, convertendo apenas 10 % do carbono inicial em carbono de células novas. Nessas situações, o requerimento para nitrogênio, fósforo e enxofre (DQO/N/P/S) é de cerca de 100/ 1,0/ 0,225/ 0,075. Há um interesse crescente no uso de bactérias anaeróbicas para a biorremediação de bifenilas policloradas (PCBs) em sedimentos de rios, descloração do solvente tricloroetileno (TCE) e clorofórmio (VIDALI, 2001).

3.4. BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é definida como o processo pelo qual os resíduos orgânicos são degradados biologicamente, através de condições controladas, a um estado

inócuo ou a níveis abaixo da concentração limite estabelecida pelas legislações vigentes (MUELLER *et al.*, 1996). É uma opção que oferece a possibilidade de destruir ou remover vários compostos, usando a atividade biológica natural (microrganismos, plantas ou enzimas livres). Seu uso tem custo relativamente baixo, mas nem sempre é sustentável, contudo, com a escala de contaminantes presentes, visto que o tempo envolvido pode ser relativamente longo, e os níveis de contaminantes residuais disponíveis podem nem sempre ser apropriados. Suas técnicas têm alta aceitação pública e podem frequentemente ser realizadas no local. (VIDALI, 2001; CLEMENTE & DURRANT, 2005).

Os microrganismos utilizados podem ser nativos de uma área contaminada ou isolados de outros locais e dispostos nas áreas contaminadas (Bioaugmentação). A biodegradação total de um composto é frequentemente o resultado das ações de múltiplos organismos (MENDES *et al.*, 2005). Para ser efetiva, os microrganismos atacam enzimaticamente os poluentes, através de reações que fazem parte de seu processo metabólico, quando as condições ambientais permitem seu crescimento, e os convertem a produtos menos prejudiciais. Muitos sistemas de biorremediação são realizados sob condições aeróbicas, mas sistemas realizados sob condições anaeróbicas podem permitir que os microrganismos degradem inclusive moléculas recalcitrantes (ALEXANDER, 1999).

Diferentes técnicas são empregadas (**Tabela 2**), dependendo do grau de saturação e aeração da área contaminada. As técnicas “*in situ*” são definidas como aquelas aplicadas ao solo ou água no sítio de poluição, com o mínimo de distúrbio, apresentando baixo custo. Já as estratégias “*ex situ*” são as que se aplicam às águas e aos solos removidos para um outro local (por bombeamento ou escavação), onde serão tratados. A biorremediação em reatores envolve o processamento de material sólido contaminado (solo, sedimento, lodo) ou água por meio de um sistema de contenção (reator), no qual são adicionados os materiais a serem processados e a biomassa microbiana que os tratará (DIAS, 2000).

Tabela 2. Diferentes técnicas de biorremediação e seus conceitos.

TÉCNICAS	CONCEITO
Atenuação Natural <i>in situ</i>	Consiste em acelerar o crescimento de microrganismos já existentes nas áreas contaminadas. Assim, após a determinação dos fatores limitantes ao crescimento dos microrganismos, acrescentam-se, na área a ser tratada, nutrientes, água e substâncias eletrofílicas (aceptores de elétrons).
Landfarming	Aplicada ao solo, a diferença básica está na necessidade de escavação do solo para que o tratamento seja efetivo. Revolve-se o solo contaminado para que haja aumento de contato deste com os nutrientes, água e oxigênio.
Reator de leite parado	Similar ao <i>landfarming</i> , mas em áreas de transferência, apenas controlam-se alguns fatores como irrigação, revestimento da parte inferior do solo a ser tratado, e meios de coleta do lixiviado produzido no tratamento.
Compostagem	Consiste em misturar o material contaminado com compostos orgânicos sólidos que serão degradados no processo. Também envolve a escavação do solo e adição de nutrientes e água.
Biorreatores	Podem incluir controles que permitam aeração, mistura do material contaminado, controle de pH, temperatura, adição de nutrientes orgânicos, entre outros parâmetros. Os reatores podem funcionar no sistema de batelada, fluxo contínuo e ainda ter células em suspensão, imobilizadas ou somente enzimas (isoladas de microrganismos e estabilizadas).
Fitorremediação	Atuação de forma direta ou indireta de plantas específicas na recuperação de áreas contaminadas, visto que o metabolismo pode envolver transformação do composto inicial ou mineralização do mesmo. Enzimas vegetais também podem ser usadas para biorremediação de compostos tóxicos.

Fonte: DIAS (2000).

As principais vantagens da biorremediação, quando comparada a outras tecnologias (incineração, estabilização, vitrificação), são os baixos custos operacionais, o potencial para redução significativa de resíduos tóxicos e, quando aplicada *in situ*, a mínima disrupção do sistema (BOLLAG, 1996). As desvantagens são os custos envolvidos nas pesquisas iniciais, o tempo necessário para o desenvolvimento de sistemas efetivos para os compostos-alvos, e as variáveis relacionadas ao deslocamento da escala do laboratório para o campo (DIAS, 2000).

3.5. UTILIZAÇÃO DE FUNGOS EM BIORREMEDIAÇÃO

Os fungos são heterotróficos e, devido à sua parede celular espessa, precisam secretar enzimas extracelulares para clivar complexos poliméricos e

absorver nutrientes simples. Para isso produzem uma ampla variedade de proteínas extracelulares, ácidos orgânicos e outros metabólitos (COULIBALY *et al.*, 2003). A produção destes metabólitos relevantes tem atraído um crescente interesse para o biotratamento (pela remoção ou mesmo completa destruição-mineralização) de componentes de águas residuárias, tais como metais, nutrientes inorgânicos e compostos orgânicos (COULIBALY *et al.*, 2002). Na degradação de biopolímeros, tais como amido e proteínas, numerosas enzimas hidrolíticas fúngicas têm sido purificadas, caracterizadas e utilizadas em processos industriais, entre elas celulases, amilases, glucoamilases, lipases, proteases e pectinases (ALLISON *et al.*, 1992; BEZALEL *et al.*, 1996).

Os fungos também são ótimos bioacumuladores de metais. Muitas espécies podem adsorver cádmio, cobre, chumbo, mercúrio e zinco em seus micélios e esporos. Sistemas utilizando *Rhizopus arrhizus* foram desenvolvidos para tratar ambientes contendo urânio e tório (TREEN-SEARS *et al.*, 1984), por exemplo. Podem, ainda, ser utilizados em processos de compostagem ou para tratar resíduos de pesticidas e de indústria de munição, para a degradação de hidrocarbonetos (petróleo, gasolina, óleos e graxas), e também de resíduos lignocelulósicos da indústria de polpa e papel (BENNET *et al.*, 2002).

Os sistemas degradadores dos fungos são induzidos mais pela diminuição da disponibilidade de nutrientes específicos do que pela presença de um poluente em particular. Isto é importante, uma vez que a repressão da síntese enzimática não ocorre quando a concentração de um composto é muito baixa para a indução efetiva da enzima (BARR e AUST, 1994).

Muitos dos poluentes são tóxicos para os organismos que supostamente os degradam. A natureza não-específica extracelular dos sistemas enzimáticos dos fungos os capacita a degradar misturas complexas de poluentes, e a tolerar mais as altas concentrações de certos compostos recalcitrantes e xenobióticos, do que as bactérias, cujo sistema enzimático age de forma intracelular. Muitos destes compostos xenobióticos apresentam baixa solubilidade em água, e os metabólitos formados durante a degradação podem ser tóxicos ou mais tóxicos do que as substâncias originais (BARKER & BRYSON, 2002).

Inúmeras indústrias de alimentos (óleo de oliva, amido, destilarias, etc) e de processamento de algodão, papel e polpa, lançam anualmente bilhões de litros de efluentes corados, frequentemente tóxicos e nocivos. Tais águas residuárias

apresentam elevada concentração de DQO ($10-200 \text{ gL}^{-1}$), fenóis e seus derivados ($0,5-8 \text{ g/L}$), como compostos clorados de ligninas, e, freqüentemente, contêm proteínas, cianetos e corantes (BORJA *et al.*, 1992, 1996; NIETO *et al.* 1992; JIMENEZ & BORJA, 1997; GARCIA *et al.*, 1997; YESILADA *et al.*, 1998; KAHMARK & UNWIN, 1999). A ampla quantidade de derivados de lignina e taninos desses efluentes é responsável pela sua coloração marrom-escuro (CALVO *et al.*, 1995). Fungos lignolíticos têm sido utilizados também na biodegradação ou remoção de diversos xenobióticos (BUMPUS & AUST, 1987; BOGAN & LAMAR, 1995; DURÁN & ESPOSITO, 2000; WESENBERG *et al.*, 2003).

Alguns apresentam a capacidade de remover corantes especialmente de efluente de indústrias têxteis por biosorção (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1997), biodegradação (CONNELLY *et al.*, 1999) e mineralização enzimática (YOUNG & YU, 1997; FERREIRA *et al.*, 2000; OLLIKA *et al.*, 1998; WONG & YUNH, 1999; ZHENG *et al.*, 1999; WESENBERG *et al.*, 2003).

3.6. COMPOSTOS XENOBIÓTICOS

3.6.1. Lignina e biodegradação

A lignina, de um modo geral, é um polímero amplo, com muitas ligações cruzadas, e estereoquimicamente complexo, sendo biossintetizado pela polimerização de precursores fenilpropanóides (WHETTEN & SEDEROFF, 1995), que diferem apenas no número de grupos metoxilas do anel aromático (**Figura 1**).

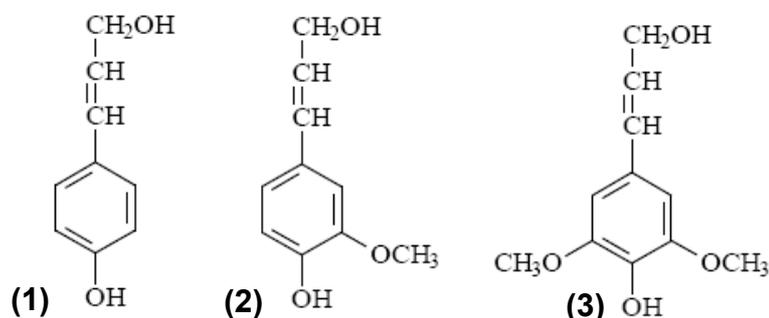


Figura 1. Estrutura dos três precursores de lignina: (1) álcool *p*-cumarílico, (2) álcool coniferílico, (3) álcool sinapílico.

A lignina constitui a parede celular das plantas vasculares e confere rigidez e durabilidade às mesmas (corresponde a 20-30 % da composição da madeira). Sua

polimerização ocorre após deposição dos polissacarídeos celulósicos e hemicelulósicos, e é iniciada pela oxidação enzimática dos precursores a radicais fenóxi. Esses radicais podem se unir com outros, alongando o polímero por diversos passos, até formar o complexo com ligações cruzadas (KIRK & FARREL, 1987). Os compostos polissacarídeos e fenóis isolados não estão distribuídos uniformemente na parede celular vegetal (TUOMELA, 2002).

A polimerização randômica da lignina leva a uma estrutura muito complexa e irregular (**Figura 2**).

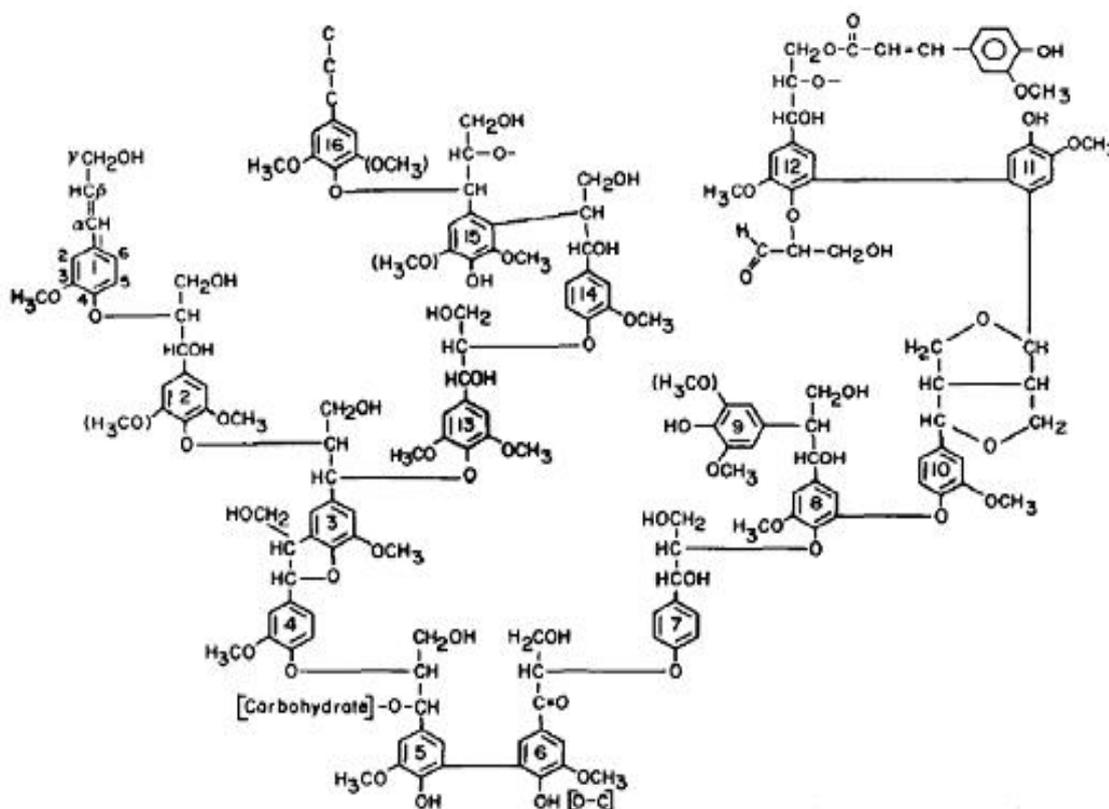


Figura 2. Representação da composição molecular da lignina (ERIKSSON, 1991).

Visto que a lignina é um polímero insolúvel, o passo inicial para a sua biodegradação deve ser extracelular e, em contraste com as bactérias, os fungos apresentam sistemas enzimáticos extracelulares (KIRK & FARREL, 1987).

De acordo com o tipo de deterioração da madeira, os fungos ligninolíticos são classificados em três categorias: fungos da “podridão branca”, fungos da “podridão marrom” e fungos da “podridão leve” (BOOMINATHAN & REDDY, 1992). Ainda conforme tais autores, o grupo que mais se destaca entre esses três é o grupo dos fungos da “podridão branca” e, deste grupo, *Phanerochaete chrysosporium* é o organismo mais comumente utilizado como modelo nos estudos de degradação

dessa molécula.

Os fungos da “podridão branca” compreendem uma coleção de centenas de espécies de basidiomicetos (AINSWORTH *et al.*, 1973) com capacidade de mineralizar completamente a lignina e os carboidratos da madeira. A diversidade das ligações inter-unidades e a irregularidade de seu arranjo torna difícil para os fungos ligninolíticos produzirem enzimas que possam reconhecer e clivar a lignina. A solução, na qual estão envolvidos os fungos da “podridão branca”, é a produção de enzimas de baixa especificidade, que iniciam, não diretamente, reações de oxidação da lignina. KIRK & FARREL (1987) utilizaram o termo combustão enzimática para esse processo, no qual a enzima ativa a lignina a ultrapassar a barreira energética e inicia uma fragmentação oxidativa termodinamicamente favorável, sem controle adicional da reação pela enzima. Contudo, mesmo sendo um substrato rico em carbono, a lignina não é utilizada como única fonte de energia por tais fungos, que necessitam de outras fontes alternativas, tais como celulose, hemicelulose ou qualquer carboidrato simples, para metabolizá-la. Muitos dos fungos da “podridão branca” degradam a lignina durante o *metabolismo secundário*, o qual é induzido pela limitação de nutrientes. Contudo, algumas espécies são relatadas como degradadoras da lignina durante o *metabolismo primário* sob condições de suficiência de nutrientes (LEATHAM & KIRK, 1983).

A biodegradação da lignina não ocorre através de uma remoção seqüencial das subunidades periféricas. Ela também envolve a oxidação dos anéis aromáticos e cadeias laterais, a clivagem oxidativa das cadeias propanóides laterais no interior do polímero e também a desmetilação e clivagem oxidativa do anel aromático (CHEN & CHANG, 1985) aumentando a solubilidade do núcleo do polímero e, ao mesmo tempo, liberando os fragmentos de diferentes tamanhos. A natureza desorganizada dessa degradação concorda com o conceito de combustão enzimática (REID, 1995).

Está claro que diferentes combinações de enzimas conhecidas são produzidas por vários fungos degradadores de lignina, sugerindo que há mais de uma estratégia bem sucedida para a biodegradação da lignina (HATAKKA, 1994).

As principais características e diferenças entre as enzimas ligninolíticas, como grupo prostético, glicosilação, isoforma, especificidade, estabilidade, etc., podem ser observadas na **Tabela 3**.

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

E.C.	Manganês Peroxidase MnP (1.11.1.13)	Lignina Peroxidase LiP (1.11.1.14)	Lacase (1.10.3.2)
Grupo prostético	Heme	Heme	1 cobre tipo I, 1 cobre tipo II e 2 cobres pareados tipo III
MM (kDa)	32-62,5	38-47	59-110 (tetrâmeros ≤ 390)
Glicosilação	N-	N-	N-
Isoformas	Monômeros; acima de 11	Monômeros; acima de 15	Mono-, di-, tetrâmeros, vários
pI	2,8-7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
Faixa de pH	2,6-4,5	2,0-5,0	2,0-8,5
E° (mV)	1510	1450	500-800
Requer H₂O₂	Sim	Sim	Não
Estabilidade	+++	+	+++
Mediadores naturais	Mn ²⁺ , Mn ³⁺	AV, 2-Cl-1,4-DMB	3-HAA
Especificidade	Mn ²⁺	Ampla, aromáticos, incluindo não fenólicos	Ampla, fenólicos
Mediadores secundários e sintéticos	Tióis, ácidos graxos insaturados	não	ABTS, HBT e siringaldazina

+++ = maior estabilidade, + = menor estabilidade

Para a utilização das enzimas ligninolíticas na biodegradação ou remoção de compostos xenobióticos, recalcitrantes ou não, pode-se adotar duas medidas: 1 – a transformação direta do xenobiótico utilizando culturas ativas do fungo ligninolítico, e 2 – o uso de enzimas extraídas do meio de cultura. Porém a decisão dependerá tanto das condições ambientais como dos objetivos da biorremediação (TRUPKIN *et al.*, 2003).

De acordo com RABINOVICH *et al.* (2004), a Lignina Peroxidase, ou LiP (**E.C. 1.11.1.14**) pode ter sido formada primariamente para detoxificar intracelularmente certos produtos, realizando reações de desaminação de compostos de ácidos amino-aromáticos, e, posteriormente, já na existência da lignina, o mecanismo extracelular possibilitou a degradação daquela. Tal enzima foi primeiramente isolada em culturas do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN *et al.*, 1983; TIEN & KIRK, 1983) e é produzida por muitos, mas não por todos, fungos da podridão

branca.

A LiP é uma hemoproteína extracelular, dependente de H_2O_2 , com um potencial redox raramente alto, requerendo baixo pH (GOLD & ALIC, 1993). Ela tem baixa especificidade, reage com uma ampla variedade de compostos modelos de lignina e moléculas não relacionadas (BARR & AUST, 1994). É capaz de iniciar a oxidação de anéis aromáticos metoxilados sem um grupo fenólico livre (**Figura 3**), gerando um cátion radicalar que pode reagir adicionalmente por uma variedade de rotas, incluindo clivagem $C\alpha-C\beta$, abertura de anel, desmetilação e dimerização de fenóis.

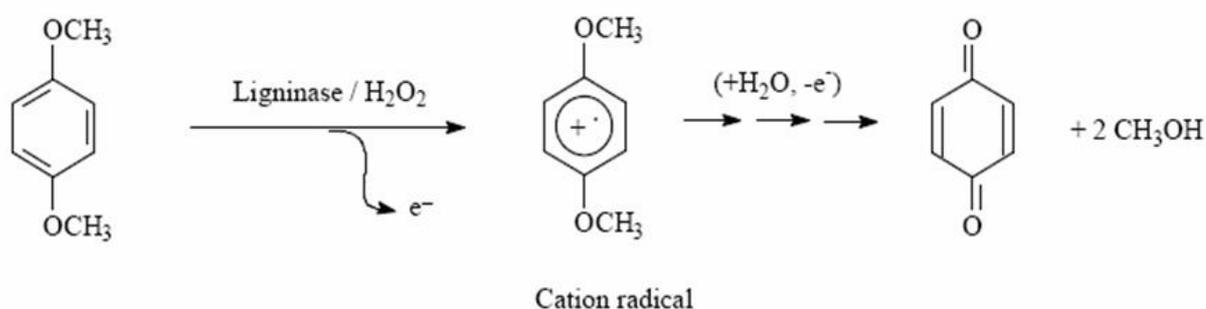


Figura 3. Mecanismo de reação da Lignina Peroxidase (LiP) sobre benzenos metoxilados, com formação de cátion radicalar intermediário, gerando metanol e benzoquinona.

Durante o processo da degradação da lignina, a LiP é oxidada pelo H_2O_2 , onde o Fe contido no grupo heme (Fe III) da enzima nativa é oxidado à Fe IV, porém na forma de um radical catiônico da LiP, denominado composto I (**Figura 4**). Este é reduzido pela transferência de um elétron (para o substrato ou H_2O_2), originando o composto II, ainda contendo Fe (IV). Na etapa final, uma nova redução leva a enzima para o seu estado nativo. Os cátions radicalares, formados a partir das moléculas do substrato, reagem com nucleófilos espontaneamente (H_2O ou O_2), clivando ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio, causando a abertura de anéis aromáticos e a despolimerização da lignina ("combustão enzimática") (KIRK & FARREL, 1987).

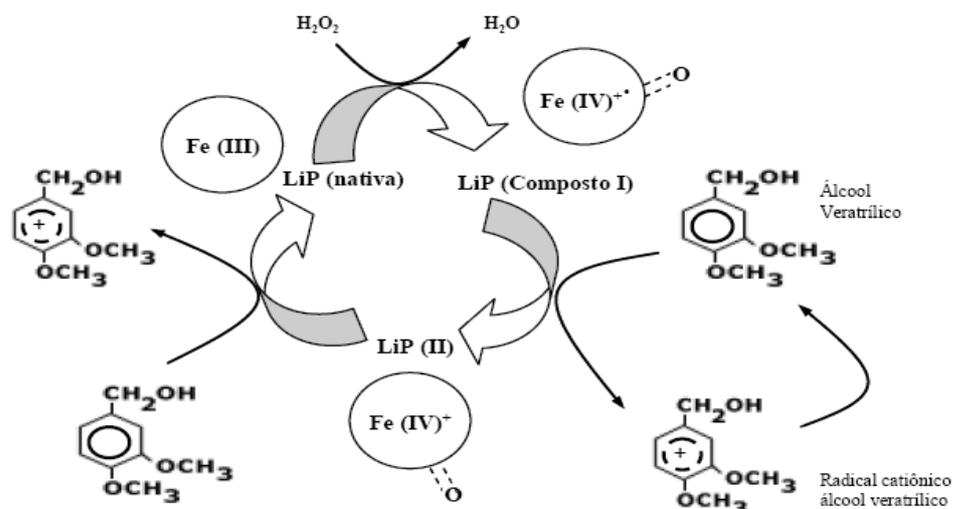
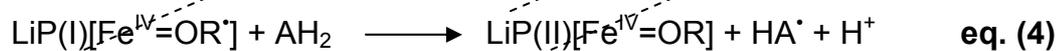


Figura 4. Mecanismo catalítico da Lignina Peroxidase (LiP), indicando a regeneração da enzima (MARTINEZ, 2002).

As Equações 3 a 6 (YEE & WOOD, 1997) revelam as reações envolvidas na degradação de xenobióticos por LiP, indicando a regeneração da enzima ao seu estado nativo (referência).



Outro tipo de hemeperoxidase, a Manganês Peroxidase, (**MnP**, **E.C. 1.11.1.13**), foi detectada nos meios de cultivo de alguns fungos (GLENN & GOLD, 1985). Essa enzima tem forte preferência por Mn (II) como seu substrato redutor. O produto Mn (III) forma complexo com ácidos orgânicos, a partir da enzima, para oxidar materiais como a lignina.

O potencial redox da MnP é menor do que o da LiP, e mostrou-se capaz apenas de oxidar substratos fenólicos *in vitro* (VARES, 1996). Substratos fenólicos são oxidados a radicais fenóxi, os quais reagem adicionalmente por demetilação, clivagem alqui-fenil, oxidação do C α ou clivagem C α -C β (TOUR *et al.*, 1992). A enzima MnP parece estar mais difundida entre os fungos da podridão branca do que LiP (HATAKKA, 1994), e é facilmente detectada em culturas sobre substratos lignocelulósicos reais.

No processo de degradação (**Figura 5**), a MnP forma um complexo ferro-peróxido, através da ligação entre o ferro protoporfirínico IX da enzima com H₂O₂.

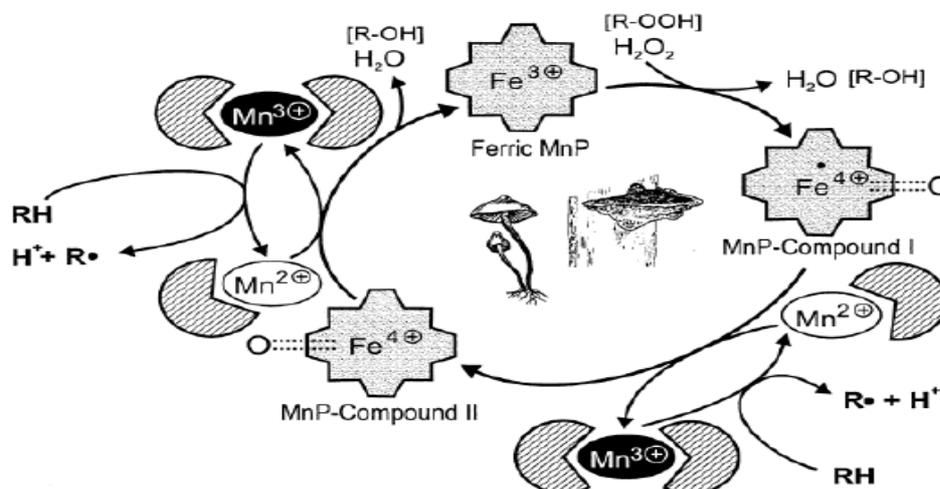


Figura 5. Ciclo da ação e regeneração da Manganês Peroxidase (MnP) de fungos (HOFRICHTER, 2002).

O complexo é desfeito pela quebra da ligação oxigênio-oxigênio do peróxido por meio da transferência de 2 elétrons do grupo heme, resultando na formação do complexo radicalar Fe⁴⁺-oxo-porfirina (composto MnP I) e liberação de uma molécula de água. Através da oxidação de Mn²⁺ para Mn³⁺, o complexo é reduzido originando um novo complexo (MnP II) Fe⁴⁺-oxo-porfirina não radicalar. Na seqüência, uma redução similar, com nova formação de Mn³⁺, retorna a enzima para a forma original (HOFRICHTER, 2002).

A Lacase (**E.C. 1.10.3.2**) é uma oxidase contendo cobre, e não requer peróxido (H₂O₂) (THURSTON, 1994), tendo a capacidade de despolimerizar e polimerizar compostos modelo de lignina (ERIKSSON *et al.*, 1990). Como no caso da MnP, ela normalmente oxida apenas compostos modelo de lignina com um grupo fenólico livre, formando radicais fenóxi. Contudo, na presença do substrato artificial ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-5-sulfonato) ou algum outro mediador sintético, a lacase também oxida certos compostos não-fenólicos, álcool veratrílico e Mn(II) (COLLINS & DOBSON, 1997). A lacase é produzida por muitos fungos da podridão branca (HATAKKA, 1994), mas vários estudos ao longo do tempo mostraram-se contraditórios quanto à sua produção por *P. chrysosporium* (KIRK & FARRELL, 1987; MELO & AZEVEDO, 1997).

São necessários quatro átomos de cobre por unidade de Lacase ativa para a

atividade catalítica (**Figura 6**).

O cobre T1, confere a coloração azul típica de proteínas multi-cobres (ligação cobre-cisteína) e é o aceptor primário de elétrons, devido ao alto potencial redox (790 mV). É o sítio onde ocorre a oxidação do substrato. O cobre T2, no espectro visível, não apresenta absorvância e tem propriedades paramagnéticas, e sua posição no sítio é próxima do cobre T3, formando o centro trinuclear responsável pela redução de O₂ e liberação de H₂O (BROWN *et al.*, 2002; ENGUITA *et al.*, 2003).

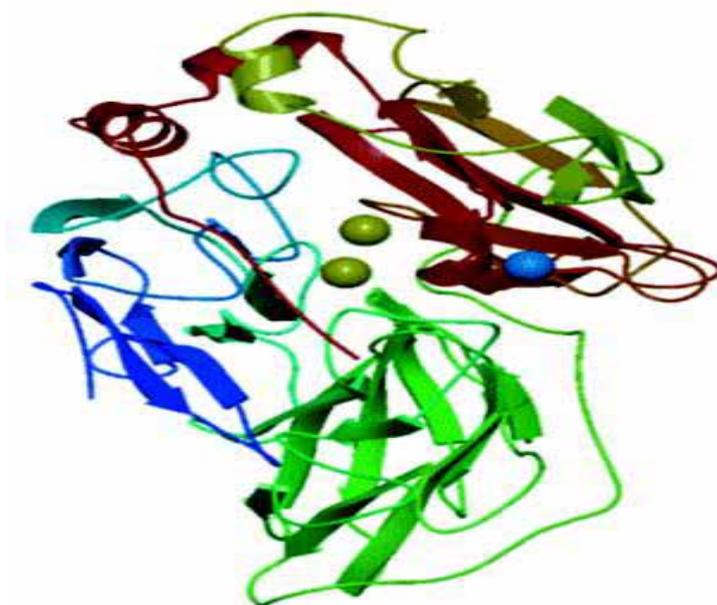


Figura 6. Estrutura tridimensional de lacase de *Coprinus cinereus*, com extremidades N-terminal (azul) a C-terminal (vermelho). Os átomos de cobre são mostrados como esferas, com os sítios de cobre T1 em azul e o par T3 em verde (DUCROS *et al.*, 2001).

Os fenóis clorados e os catecóis são parcialmente desclorados por enzimas lignolíticas, que podem atuar tanto na detoxificação desses compostos como na oxidação dos grupos fenólicos, agindo como enzimas iniciais na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. Alguns microrganismos apresentam peroxidases e lacases ou apenas uma delas. O fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp, por exemplo, é considerado ligninolítico por produzir lacase, apesar de não produzir LiP e MnP. 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).

3.6.2. Taninos e sua degradação

O grupo dos compostos fenólicos conhecido como o dos taninos é claramente distinguido de outros compostos fenólicos secundários de plantas por sua reatividade química e atividade biológica (HASLAM,1989; 1998; QUEIROZ *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2005). HASLAM (1989) define tais moléculas como compostos fenólicos solúveis em água tendo peso molecular entre 500 – 3000 KDa, que tem a habilidade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas. Conforme HASLAM (1998), os taninos complexam não apenas com proteínas e alcalóides mas também com certos polissacarídeos.

Devido a seus potenciais quelante de íons metálicos e antioxidante, os taninos têm diversos efeitos sobre o sistema biológico. Em virtude disso e de sua enorme variedade estrutural, tem sido difícil desenvolver modelos, que possam prever acuradamente os efeitos dos taninos em qualquer sistema (SILVA & SILVA, 1999; MONTEIRO *et al.*, 2005).

Taninos hidrolisáveis são derivados do ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxil benzóico). O ácido gálico (**Figura 7.1**) é esterificado para um poliol central e os grupos galoil podem ser esterificados ou formar ligações cruzadas oxidativamente produzindo complexos de taninos hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis mais simples são os galotaninos, e os mesmos são poligaloil ésteres de glicose. O galotanino típico é o pentagaloil glicose (**Figura 7.2**) ou PGG (1,2,3,4,6-pentagaloil-O-β-D-glicopirranose), sendo que este apresenta cinco ligações ésteres idênticas que envolvem os grupos alifáticos do açúcar central. O anômero alfa não é comum na natureza (McSWEENEY *et al.*, 2001; BRUYNE *et al.*, 1999).

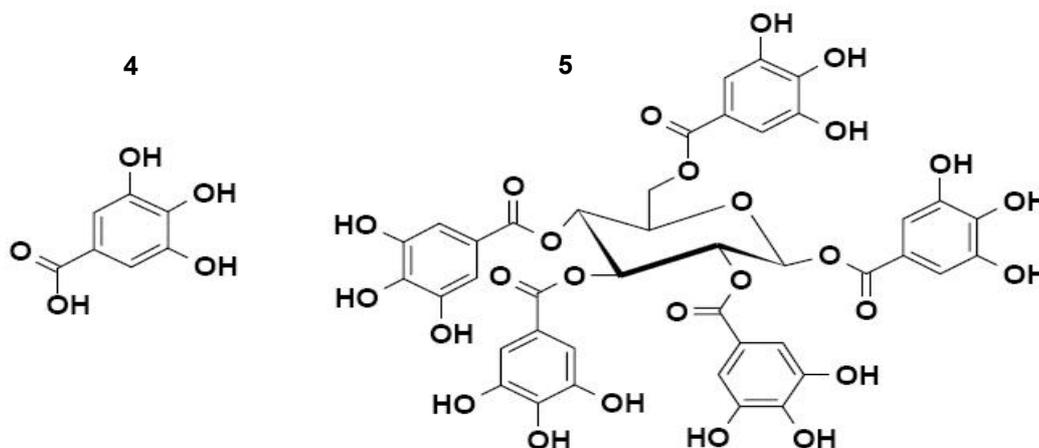


Figura 7. Estruturas do ácido gálico (**4**) e do 1,2,3,4,6-pentagaloil-O-β-D-glicopirranose (**5**).

Como todos os galotaninos, PGG tem muitos isômeros. O peso molecular de todos os galotaninos é o mesmo (940 g/mol). Porém, as propriedades químicas como a suscetibilidade à hidrólise e o comportamento cromatográfico e as propriedades bioquímicas como a habilidade de precipitar proteínas são dependentes da estrutura (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Proantocianidinas (taninos condensados) são flavonóides poliméricos, baseados em um sistema de anel heterocíclico derivado da fenilalanina e biossíntese de policetídeo (MONTEIRO *et al.*, 2005). São mais amplamente estudadas a flavon-3-olol (+)-catequina e a (-)-epicatequina. Os taninos condensados melhor caracterizados são ligados via ligações carbono-carbono entre o C-8 da unidade terminal e o C-4 da extensão (DESHPANDE *et al.*, 1984). Os quatro modos de união dos dímeros isolados por HASLAM (1998), geram quatro estruturas, originalmente codificadas B1, B2, B3 e B4, e os nomes especificam a posição e a estereoquímica da ligação interflavonoídica (**Figura 8**). A adição de uma terceira unidade flavonoídica no anel B produz galocatequina e epigalocatequina.

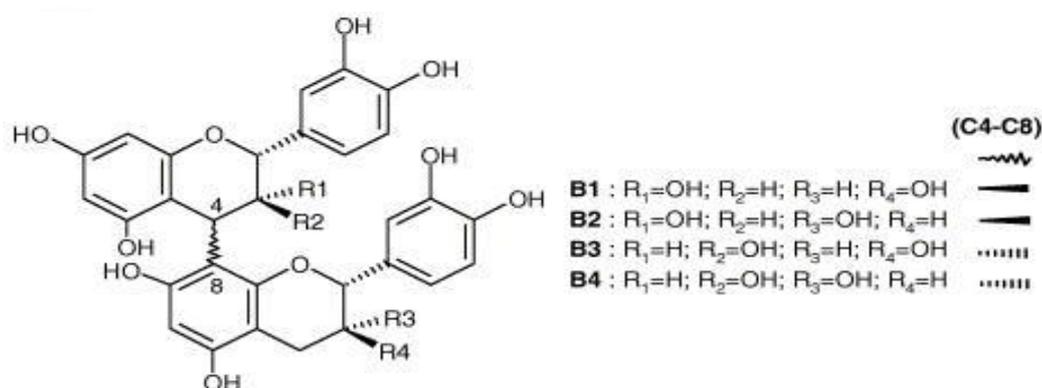


Figura 8. Estrutura de quatro dímeros de taninos condensados, denominados B1= epicatequina-(4 β ->8)-catequina; B2= epicatequina-(4 β ->8)-epicatequina; B3= catequina-(4 α ->8)-catequina; B4= catequina-(4 α ->8)-epicatequina (HASLAM, 1998).

Muitos fungos de solo crescem na presença de taninos condensados e hidrolisáveis podendo, assim, utilizá-los como fonte de carbono. Fungos filamentosos, principalmente espécies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fomes*, *Polyporus* e *Trametes* mostram-se eficazes na degradação de galotaninos, ácido gálico e catequina em comparação com seu potencial na degradação de elagitaninos ou taninos condensados (MONDAL & PATI, 2000).

A Tanino-Acil-Hidrolase (**E.C. 3.1.1.20**), ou simplesmente tanase, foi

descoberta por TEIGHAM (1867), o qual relatou a formação de ácido gálico quando duas espécies de fungos se desenvolveram em solução aquosa de taninos. As espécies fúngicas foram, posteriormente, identificadas como sendo *Aspergillus niger* e *Penicillium galucum* (LEKHA & LONSANE, 1997). Atualmente, é de conhecimento que várias espécies fúngicas produzem tal enzima (**Quadro 1**).

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

Fungos	Referência Bibliográfica
Filamentosos	
* <i>Aschochyta</i> sp	(LEKHA & LONSANE, 1997)
∞ <i>Aspergillus niger</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
∞ <i>Aspergillus oryzae</i>	(YAMADA <i>et al.</i> , 1968)
* <i>Aspergillus flavus</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
∞ <i>Aspergillus japonicus</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Aspergillus aureus</i>	(BAJPAI & PATIL, 1996)
∞ <i>Aspergillus awamori</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Aspergillus fischerii</i>	(BAJPAI & PATIL, 1996)
* <i>Aspergillus rugulosus</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Aspergillus parasiticus</i>	(BAJPAI & PATIL, 1996)
* <i>Aspergillus terreus</i>	(BAJPAI & PATIL, 1996)
* <i>Chaetomium</i> sp	(LEKHA & LONSANE, 1997)
* <i>Penicillium chrysogenum</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Penicillium notatum</i>	(GANGA <i>et al.</i> , 1977)
* <i>Penicillium islandicum</i>	(GANGA <i>et al.</i> , 1977)
* <i>Penicillium digitatum</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Penicillium acrellanum</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Penicillium caryophilum</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Penicillium charlesii</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Penicillium citrinium</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
⊙ <i>Cryphonectria parasitica</i>	(FARIAS <i>et al.</i> , 1992)
⊙ <i>Fusarium solani</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Fusarium oxysporium</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Mucor</i>	(LEKHA & LONSANE, 1997)
* <i>Myrothecium</i>	(LEKHA & LONSANE, 1997)
⊙ <i>Rhizopus oryzae</i>	(HADI <i>et al.</i> , 1994)
⊙ <i>Trichoderma viride</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Trichoderma hamatum</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Trichoderma harzianum</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Trichothecium</i>	(LEKHA & LONSANE, 1997)
* <i>Helicostylum</i> sp	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Cunninghamella</i> sp	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
* <i>Syncephalastrum racemosum</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
□ <i>Neurospora crassa</i>	(BRADDOO <i>et al.</i> , 1996)
Leveduriformes	
⊙ <i>Candida</i> sp	(AOKI <i>et al.</i> , 1976)
⊙ <i>Pichia</i> spp.	(DECHAMPS, 1983)
* <i>Debaryomyces hansenii</i>	(DECHAMPS, 1983)

□ Baixa produção. * Produção moderada. ⊙ Produção significativa. ∞ Elevada produção.

Sobre o ácido tânico, a molécula de glicose está ligada por uma ligação éster

aos radicais R_2 (ácido digálico) nos carbonos 1,2,3 e 4, e o radical R_1 (ácido gálico) no carbono 6. Visto que a tanase cliva ligações ésteres de taninos hidrolisáveis e ésteres de ácido gálico na molécula de ácido tânico (**Figura 9**), age liberando glicose e ácido gálico (LEKHA & LONSANE, 1997; MACEDO *et al.*, 2005). A tanase também ataca ésteres metílicos de ácido gálico, mas possui alta especificidade para a porção acila do substrato. Usualmente, proteínas se complexam com ácido tânico, formando agregados insolúveis em água que inativam enzimas (HAWORTH *et al.*, 1985). A tanase, portanto, impede esse tipo de ocorrência.

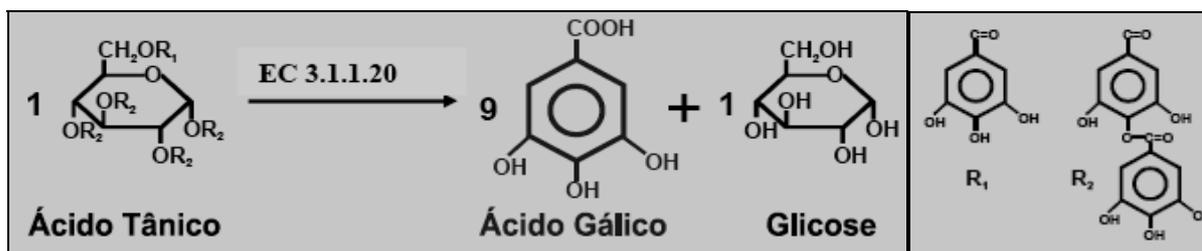


Figura 9. Reação de hidrólise da molécula de ácido tânico pela ação da tanase, originando ácido gálico e glicose como produtos finais (MACEDO *et al.*, 2005, *apud* AGUILAR *et al.*, 1999).

Nem toda tanase é igualmente ativa contra os diferentes substratos. Tanases de fungos filamentosos têm melhor atividade na degradação de taninos hidrolisáveis. Tanases de leveduras degradam melhor ácido tânico, mas têm menor afinidade por taninos de ocorrência natural (DESCHAMPS *et al.*, 1983). AOKI *et al.* (1976) isolaram e reportaram a degradação enzimática de galotaninos por espécies de leveduras, pertencentes ao gênero *Candida*, que foram capazes de produzir tanase.

Tanases bacterianas podem degradar e hidrolisar muito eficientemente taninos naturais e ácido tânico (DESCHAMPS *et al.*, 1983).

A tanase fúngica é uma glicoproteína (RAJKUMAR & NANDY, 1983) formada por uma unidade esterase e uma outra unidade depsidase, com ponto isoelétrico de 4,0-4,5, e um peso molecular entre 186 e 300 kDa. Seu pH e temperatura de estabilidade situam-se, respectivamente, entre 3,5 e 8,0, e entre 30 e 40°C, sendo o pH ótimo entre 5,5-6,0. Estas propriedades dependem fortemente das condições de cultura e da cepa utilizada (BEVERINI & METCHE, 1990).

De acordo com YAMADA *et al.* (1968), embora intracelular, a tanase pode ser detectada em filtrados de culturas líquidas. *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *A. oryzae* têm sido relatados como os melhores produtores de tanase em meio contendo ácido

tânico como única fonte de carbono, sendo evidenciado que a secreção extracelular dessa enzima pode ser induzida (GUPTA *et al.*, 1997, JEAN *et al.*, 1981; MATTIASON & KAUL, 1994; AGUILAR *et al.*, 1999).

GANGA *et al.* (1977) descreveram que *A. niger* e *Penicillium* spp crescem melhor sobre um meio contendo glicose, peptona e tanino, significando que a adição de fontes de carbono e nitrogênio favorecem a produção de tanase para a subsequente clivagem das moléculas de tanino para liberar uma fonte de carbono para o crescimento. BAJPAI & PATIL (1996) reportaram que cepas pertencentes aos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma* também produzem tanase nessas condições.

Em *Aspergillus niger*, o ácido gálico é oxidado e clivado por uma oxigenase para formar um ácido tricarboxílico instável. Este, por sua vez, é descarboxilado por uma descarboxilase oxidativa, originando o ácido *cis*-aconítico que, em seguida, entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. 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 tricarboxílicos (BHAT *et al.*, 1998).

As vias metabólicas da degradação aeróbica dos taninos condensados, catequina, quercetina (flavonol) e seus intermediários como floroglucinol, é mais complexa em *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp e fungos do solo como *Chaetomium cupreum*. Inicialmente, a catequina é degradada em ácido carboxílico floroglucinol e ácido protocatecólico pela catequina oxigenase. A degradação do ácido carboxílico floroglucinol começa com a formação do floroglucinol, resorcinol e hidroxihidroquinona. Este último composto aromático desta via metabólica é clivado em hidroxiquinol-1,2-dioxigenase para formar maleil acetato que, em seguida, é convertido em β -cetoadipato. O metabolismo do ácido protocatecólico segue duas vias metabólicas diferentes com ambas terminando com a formação do β -cetoadipato. No primeiro mecanismo, o ácido protocatecólico é convertido por protocatecólico 3,4-dioxigenase em *cis*- β -carboxi, *cis*-muconato que, então, é transformado em β -cetoadipato. Na segunda via metabólica, o ácido protocatecólico é descarboxilado (protocatecólico-descarboxilase) e forma catecol, que é clivado pela catecol 1,2-dioxigenase em *cis*-muconato e este, finalmente, transformado em

β -cetoadipato. Este último é usado para a produção de acetil-CoA, com cada mol de β -cetoadipato originando três moléculas de acetil-CoA (O' DONOVANT & BROOKER, 2001).

A tanase é inibida por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} e é inativada por O-fenantrolina, EDTA (Acido etilenodiaminotetracético), 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfato de magnésio e cloreto de cálcio e magnésio (YAMADA *et al.*, 1968; ADACHI *et al.*, 1971; IIBUCHI *et al.*, 1972; AOKI *et al.*, 1976; CHAE *et al.*, 1983; RAJKUMAR & NANDY, 1983; BARTHOMEUF *et al.*, 1994).

Algumas culturas bacterianas têm desenvolvido a habilidade para expressar tanase extracelular para degradar taninos, embora seja conhecido que as bactérias são muito sensíveis à presença de ácido tânico. DESCHAMPS (1983) mostrou que cepas de *Bacillus pumilus*, *B. polymyxa* e *Klebsiella planticola* foram capazes de produzir tanase extracelular. Contudo, o grupo mais abundante de bactérias capazes de degradar taninos é encontrado no trato gastrintestinal de ruminantes. BHAT *et al.* (1998), discutiram sobre a degradação microbiana de taninos e detalharam os passos referentes a esse processo, indicando a rota de degradação de taninos hidrolisáveis (**Figura 10**).

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 protocatecóico. 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 protocatecóico também é convertido em β -cetoadipato através de *cis*- β -carboxi, *cis*-muconato e das vias metabólicas do catecol. Quercetina e outros flavonóis produzem 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).

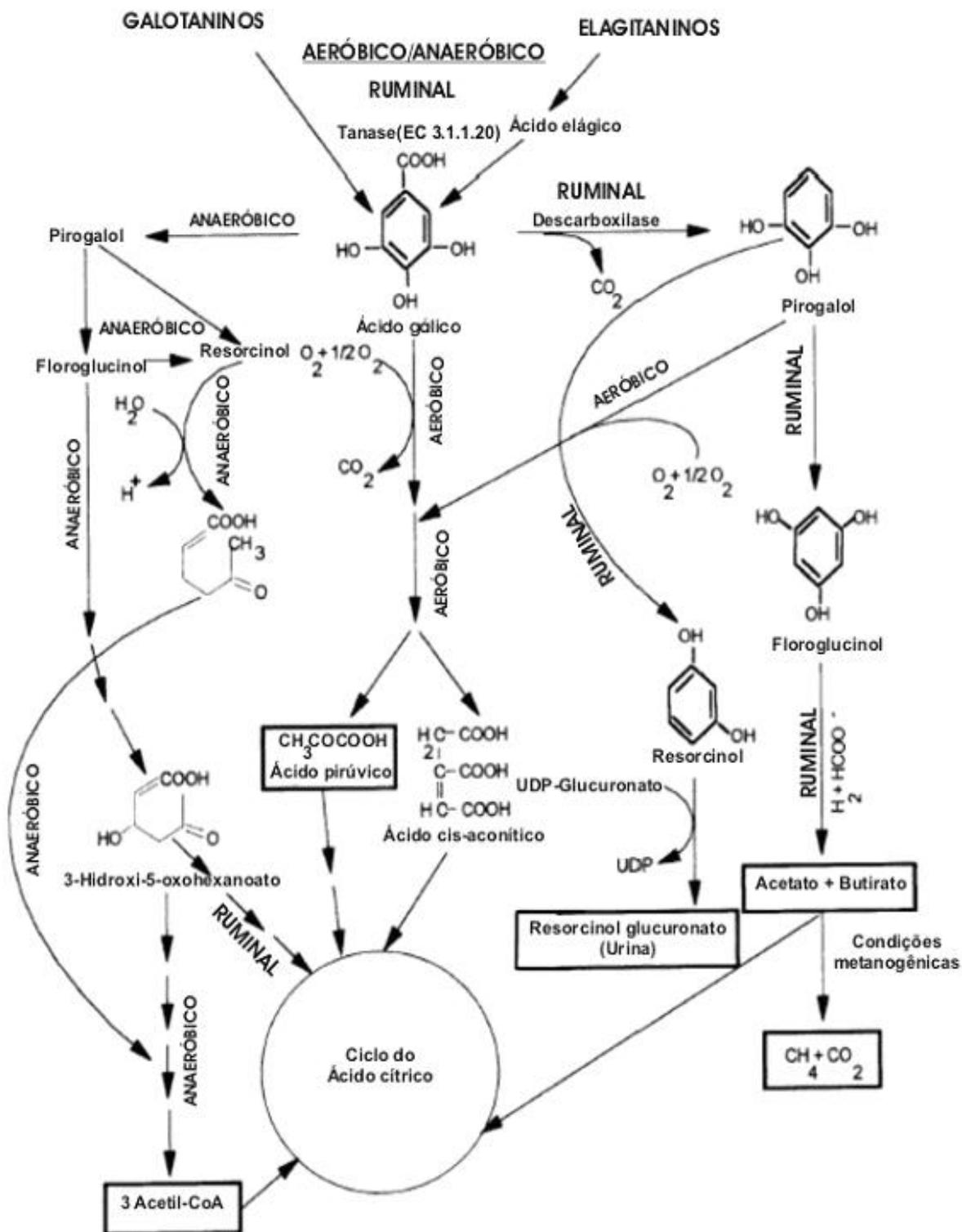


Figura 10. Vias metabólicas de degradação de taninos hidrolisáveis (Fonte: adaptada de BHAT *et al.*, 1998).

Em sistemas ruminantes, contudo, algumas bactérias podem degradar ácido gálico, pirogalol, floroglucinol e quercetina em acetato e butirato. 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 (KRUMHOLZ *et al.*, 1987).

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).

A degradação de taninos também pode ocorrer na ausência de oxigênio molecular. A espécie *Eubacterium oxidoreducens*, por exemplo, degrada galotanino, floroglucinol e pirogalol em acetato e butirato na presença de hidrogênio e ácido fórmico. Linhagens de *Streptococcus* e *Coprococcus* foram isoladas de bovinos, sendo estas capazes de degradar floroglucinol. Cepas de *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*), isoladas de ruminantes, que expressam atividade TAH, foram resistentes *in vitro* em concentrações de aproximadamente 7 % de ácido tânico e 4 % de taninos condensados (proantocianidinas). Entretanto, a resistência ao ácido tânico e aos taninos condensados por *S. gallolyticus* envolvem a atividade de galato descarboxilase e a secreção de polissacarídeos extracelulares sintetizados pelo microrganismo, o que favorece seu crescimento em altas concentrações de tanino. Já o crescimento de outros estreptococos, como o *S. bovis*, foi inibido por taninos em concentrações 10 vezes menor que aquela tolerada por *S. gallolyticus* (O' DONOVANT & BROOKER, *et al.*, 2001).

Lonepinella koalarum (OSAWA, 1990), *Bacillus licheniformis* (MONDAL & PATI, 2000), e várias espécies de lactobacilos (OSAWA *et al.*, 2000) também produzem TAH. No entanto, algumas são sensíveis aos taninos, dentre elas, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae*.

4. METODOLOGIA

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

Na terceira semana da safra 2004/05, amostras de água das lagoas de decantação (“A” e “B”) da estação de tratamento de efluentes (ETE) (**Figura 11**), da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, situada no município de Coruripe – AL (**Figura 12**) foram coletadas em duas diferentes profundidades (30-60 e 60-90 cm), visando o isolamento de bactérias e fungos.

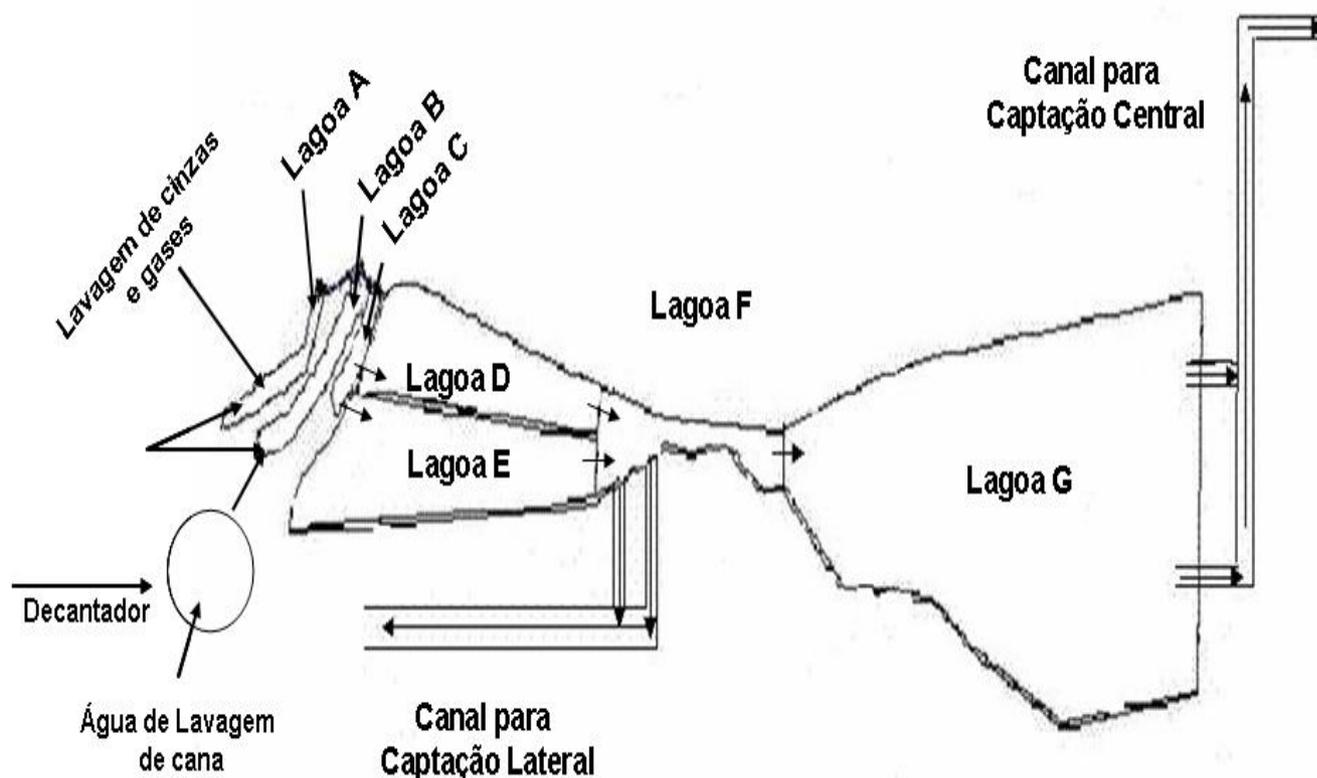


Figura 11. Esquema das lagoas da estação de tratamento de efluentes (ETE) geradas na matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool.

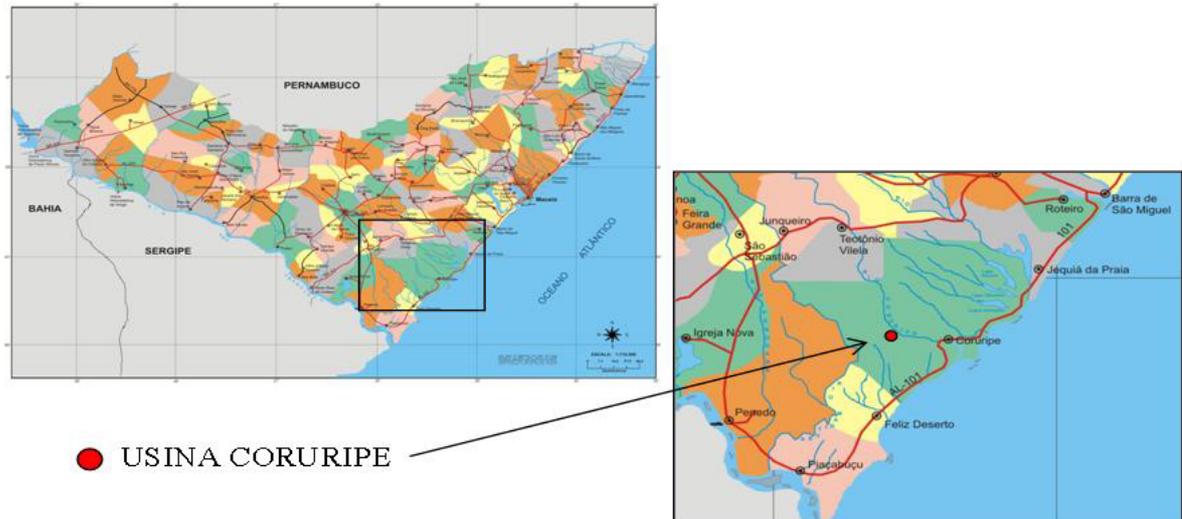


Figura 12. Localização do município de Coruripe e da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool. (Fonte: Adaptado de LIMA, 1993).

Para tanto, frascos de análises de DBO (250 mL) esterilizados (121 °C, 1 atm, 20 min) foram utilizados (3 para cada lagoa e profundidade), e monitorou-se a temperatura e o horário de coleta.

Na terceira semana da safra 2005/06, visando exclusivamente o isolamento de fungos, também foram colhidas 10 amostras de turfa [aproximadamente 50 g, em frascos de vidro (50 mL) esterilizados] ao longo das margens das lagoas de decantação da ETE, numa profundidade de cerca de 30 cm da superfície.

Tais amostras (águas e turfa) foram transportadas sobre gelo, em caixas de isopor, para o Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental (LBPVMA) da UFAL. Em seguida, as amostras de água de mesma profundidade das duas lagoas foram combinadas num mesmo frasco esterilizado (Duran-Schott[®] 1 L), assim como também o foram as amostras de turfa, sendo armazenadas em refrigerador (6 ± 2 °C) até sua utilização para o isolamento de microrganismos.

4.1.1. Isolamento de Microrganismos dos Efluentes de Lagoa de Decantação

As amostras de água das lagoas de decantação de efluente, combinadas conforme a profundidade, foram diluídas (NEDER, 1992) em água destilada estéril (1:10⁴, 1:10³, 1:10² e 1:10 v/v) e, em seguida, inoculou-se alíquotas de 500 µL de cada diluição de amostra em meio de cultura sólido ágar- caldo de cana 25 % (item

4.2.1), contido em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Para tanto, os ensaios foram efetuados em réplicas por diluição e profundidade de coleta. As culturas foram incubadas a uma temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por 24-168 h, sendo avaliadas diariamente com relação à sua estrutura macroscópica.

As colônias bacterianas desenvolvidas foram repicadas em meio Ágar Nutriente (AN) (**4.2.2**), enquanto aquelas com aspectos de leveduras ou fungos filamentosos foram individualmente transferidas para ágar Sabouraud (**4.2.3**), e incubadas nas mesmas condições e intervalo de tempo anteriormente descritos.

A partir da segunda repicagem, os cultivos foram efetuados em meios diferenciais para provas bioquímicas.

Os meios diferenciais utilizados para bactérias foram: Eosina-Azul de Metileno (EMB), Três Glicídios-Ferro (TSI sólido e líquido), Columbia, Rugai, Oxidação-fermentação (OF), Citrato Férrico (CF), Ágar-Bromocresol Púrpura (ABP), Ágar-Tirosina e Agar Base-Nitrogênio (ABN), conforme metodologias descritas por SILVA (1996), SILVA *et al.* (2000) e VERMELHO *et al.* (2006). Também avaliou-se a resposta do crescimento dessas bactérias frente a 18 diferentes agroquímicos utilizados em plantios de cana (**Apêndice 3**) e acrescidos ao meio AN de crescimento (800 mgL^{-1}). O preparo de tais meios está citado no **Apêndice 1** desta dissertação. Em cada um desses cultivos diferenciais (sólido ou líquido), avaliou-se também características morfo-culturais.

Paralelamente, os distintos isolados foram também submetidos a colorações em lâminas para microscopia, sendo utilizadas diferentes soluções corantes (Cristal de violeta, Safranina-Fuccina, Verde de Malaquita e Fucsina de Ziehl-Neelsen, Vermelho Neutro, Anilina Azul Algodão de Lactofenol, Azul de Toluidina), as quais foram preparadas conforme descrito por NEDER (1992), SILVA (1996) e SILVA *et al.* (2000). Confirmou-se o teste da coloração de Gram, pelo método descrito por SUSLOW *et al.* (1982). Inicialmente, portanto, ocorreu a discriminação entre bactérias Gram negativas e Gram positivas (produtoras ou não de endosporos); bactérias álcool-ácido resistentes ou não; ascomicetos, leveduras e fungos filamentosos. O procedimento de tais colorações também consta do **Apêndice 1** desta dissertação.

Verificou-se, então, a atividade das enzimas oxidase, catalase e nitrato redutase das bactérias isoladas, pelos métodos descritos por BERGAMIM F° *et al.* (1995), SILVA (1996) e SILVA *et al.* (2000), também descritos no **Apêndice 1**.

Assim, considerando-se as características detectadas nos meios diferenciais e a partir das avaliações microscópicas, utilizou-se as chaves de classificação de bactérias (Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey - KRIEG & HOLT, 1984) e fungos (SILVEIRA, 1995) para a identificação dos microrganismos a nível de gênero.

No caso de bactérias do gênero *Pseudomonas*, também avaliou-se a produção de pigmentos fluoresceína, através da utilização do meio King "B" (**Apêndice 2**) ou da piocianina, através do cultivo em meios King "A" e Agar Leite (**Apêndice 2**). Além disso, avaliou-se a produção de caseinase (BROWN & FOSTER, 1970), o crescimento a 4 e 42°C em meio Ágar Nutriente (**4.2.2**) acrescido ou não de 6,5 % de NaCl, e as respostas bioquímicas para reações enzimáticas do Sistema API 20E (Biomérieux, França), cujas metodologias também constam do **Apêndice 2**.

O cultivo nas galerias do sistema API 20E permite detectar as seguintes enzimas/reações dos isolados de *Pseudomonas*: β-galactosidase; arginina dihidrolase; lisina descarboxilase; ornitina descarboxilase; citrato-oxidase; produção de H₂S; urease; triptofano desaminase; produção de indol; produção de acetoina; gelatinase; fermentação/oxidação de: glucose, manitol, inositol, sorbitol, ramnose, sacarose, melibiose, amigdalina, arabinose; e produção de citocromo-oxidase.

4.1.2. Isolamento dos Microrganismos de Turfa das Lagoas de Decantação

Com relação à amostra combinada de turfa, cerca de 5 h antes de serem efetuadas as diluições, esta foi retirada do refrigerador com o objetivo de restabelecer a atividade normal da microbiota (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). O isolamento também foi baseado na técnica das diluições múltiplas, conforme descrito por NEDER (1992), sendo que estas variaram de 1:10 a 1: 10³ p/v (g/mL), isto é, de 0,1 g. mL⁻¹ a 0,001 g.mL⁻¹.

De cada diluição da amostra combinada de turfa, alíquotas de 500 µL foram assepticamente inoculadas em meio ágar Sabouraud (Item **4.1.3**) contido em placas de Petri (9 cm de diâmetro). As culturas foram incubadas em estufa, a 30 ± 2°C, no escuro, sendo observadas diariamente por 15 dias. As colônias fúngicas desenvolvidas, a partir das culturas cuja diluição da amostra permitiu melhor discriminação entre elas, foram repicadas individualmente para novo meio ágar Sabouraud, e incubadas nas mesmas condições do isolamento.

Os gêneros dos isolados dos fungos foram identificados a partir de suas

características microscópicas, morfo-culturais (4.2.3-4.2.6) e enzimáticas (4.5), sendo utilizada a chave de classificação de fungos descrita por SILVEIRA (1995).

4.2. MEIOS DE CULTURA PARA ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

O isolamento de microrganismos utilizados no presente estudo foi efetuado em meio Ágar-Caldo de cana, preparado conforme descrito no item 4.2.1.

Para manutenção e crescimento das colônias bacterianas, por outro lado, utilizou-se o meio descrito no item 4.2.2. Quanto aos isolados fúngicos, seu crescimento e manutenção foram considerados após cultivo nos meios descritos nos itens 4.2.3-4.2.6.

4.2.1. Ágar Caldo-de-Cana (25 %)

Este meio foi preparado para isolamento de microrganismos, adicionando-se 20 g de ágar a 1 L de caldo de cana diluído (25 %) em água destilada, sendo, em seguida, esterilizado (121°C, 1 atm, 20 min), e vertido em placas de Petri para inoculação.

4.2.2. Ágar Nutriente

Suspendeu-se 5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 1 g de cloreto de sódio e 15 g de agar em 1000 mL de água destilada, conforme descrito por NEDER (1992). Submeteu-se esse material à autoclavagem (121°C, 1 atm) por 20 min e, após resfriamento para 45-50°C, o meio foi distribuído em placas de Petri e tubos de ensaio, sendo utilizado para manutenção de culturas de bactérias.

4.2.4. Ágar-Sabouraud

Dissolveu-se 65 gramas do meio Sabouraud ACUMEDIA® desidratado, em 1000 mL de água destilada, conforme descrição do fabricante, adquirindo a seguinte composição: 5 g de caseína digerida enzimaticamente, 5 g de tecido animal digerido enzimaticamente, 40 g de dextrose e 15 g de agar em 1000 mL de água. Após esterilização em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min), esse material foi vertido em placas de Petri e deixado solidificar, sendo utilizado para isolamento de fungos.

4.2.4. Ágar-Extrato de Malte

Conforme descrito por KOZLOVSKII *et al.* (2000), acrescentou-se 1000 mL de água destilada a 20 g de extrato de malte, 20 g de D-glicose, 1 g de peptona e 20 g de ágar bacteriológico. Após submeter esse material à autoclavagem (121 °C, 1 atm, 20 min), e aguardar seu resfriamento para 45-50°C, o mesmo foi vertido em placas de Petri e tubos de ensaios, sendo, nos últimos, deixado solidificar de forma inclinada. Esse meio foi utilizado para ativação do crescimento de fungos.

4.4.5. Ágar-Extrato de Levedura

Suspendeu-se 23 gramas do meio comercial OXOID® desidratado em 1000 mL de água destilada. Este adquiriu a seguinte composição: 3 g de extrato de levedura, 5 g de peptona e 15 g de agar em 1000 mL de água. Após esterilização em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min), esse material foi vertido em placas de Petri. Este meio foi utilizado para ativação do crescimento de fungos.

4.4.6. Ágar-Aveia

Suspendeu-se 30 g de farinha de aveia e 15 g de ágar bacteriológico em 1000 mL de água destilada, conforme descrito por GOODING & LUCAS (1959). Após esterilização em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min), esse material foi vertido em placas de Petri e tubos de ensaios, sendo, nos últimos, deixado solidificar de forma inclinada. Este meio foi utilizado para ativação do crescimento de fungos

4.3. FUNGOS OBTIDOS EM COLEÇÃO NACIONAL

Isolados dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* Burds (CCT 1999) e *Geotrichum candidum* Link. & Pers. (CCT 1205) foram obtidos a partir de *slants* da “Coleção de Culturas Tropicais” da “Fundação André Tosello”, situada em Campinas, São Paulo. Para tanto, foram repicados para os meios Ágar Sabouraud (item 4.2.3), Ágar-Extrato de Malte (item 4.2.4) e Ágar-Extrato de Levedura (item 4.2.5).

4.5. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM MEIO SÓLIDO

Procedeu-se a inoculação de cada meio contendo substrato específico (itens 4.4.1 - 4.4.8, em triplicata) dispondo-se um disco de micélio de cultura em extrato de malte ágar (7 mm de diâmetro, 15 dias) e incubando-se o material durante 5-7 dias a 30 ± 2 °C (escuro). Placas de meio controle não foram inoculadas.

4.4.1. Atividade Xilanolítica

Inicialmente, triturou-se 30 g de papel ofício claro e picado em 1000 mL água. Acrescentou-se 15 g de ágar e levou-se o mesmo para autoclavagem (121 °C, 1 atm, 20 min). Após vertê-lo em placas de Petri previamente esterilizadas e aguardar sua solidificação, este foi inoculado com os microrganismos, e as culturas incubadas por 5 dias a 30 ± 2 °C (escuro). Verificou-se, então, o halo de degradação do substrato utilizando-se solução de lugol como revelador (resultado positivo - zona amarelada ao redor da colônia; negativo - sem alteração).

4.4.2. Atividade Ureásica

A detecção da enzima urease foi verificada em meio Ágar Uréia, preparado conforme descrito por SILVA (1996). Esse meio é composto por 1 g de peptona, 1 g de glicose, 5 g de cloreto de sódio, 2 g de dihidrogenofosfato de potássio, 0,012 g de vermelho de fenol, 12 g de ágar, 20 g de uréia e 1000 mL de água destilada. Após autoclavagem (121 °C, 1 atm, 20 min), distribuição em placas de Petri esterilizadas e solidificação, tal meio foi inoculado e as culturas incubadas por 5 dias (30 ± 2 °C, escuro). A alteração da cor do meio de amarelo-alaranjado para rosa (pH ≥ 8,4), concomitante ao crescimento do microrganismo, indicou atividade ureásica positiva, enquanto a não alteração da cor do meio (pH 6,8) indicou resultado negativo.

4.4.3. Atividade Amilolítica

A produção de amilases foi detectada em meio ágar nutriente (NEDER, 1992) contendo solução de amido solúvel 0,5 % (suspensão pré-aquecida), em pH 6,5, previamente esterilizado, inoculado e incubado por 5 dias a 30 ± 2 °C (escuro). A degradação foi avaliada pela presença de uma zona amarelada ao redor da colônia, contra um fundo roxo-azulado após adição de solução de lugol ao meio (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.4.4. Atividade Proteolítica

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 (121 °C, 1 atm, 20 min), vertido em placas de Petri, inoculado com culturas jovens (24 h) e incubado a 30 ± 2 °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 2 %. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.4.5. Atividade Pectinolítica

A 500 mL de solução salina [4 g, K₂HPO₄; 2 g, (NH₄)SO₄; 6 g, NaPO₄; 2 g, FeSO₄ .7H₂O; 1 mg, CaCl₂; 10 µg, H₃Bo₃; 10 µg, MgSO₄; 70 µg, ZnSO₄; 50 µg, CuSO₄ e 10 µg, MoO₃, em 1000 mL de água destilada] adicionou-se 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 (121 °C, 1 atm, 20 min), vertido em placas de Petri, inoculado e incubado por 5 dias (30 ± 2 °C, no escuro). A atividade foi verificada pela adição de solução hidroetanólica (60 %) contendo 2 % de vermelho de metila 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).

4.4.6. Atividade Lipolítica

Dissolveu-se 10 g de peptona; 5 g de NaCl; 0,1 g de CaCl₂ e 20 g de ágar para 1 L de água destilada. Após a homogeneização dos reagentes, o meio foi autoclavado (121 °C, 1 atm, 20 min.). O Tween 20 [Mono-oleato de Polioxietileno(20) sorbitan] foi utilizado como substrato lipídico e esterilizado em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min) sendo, posteriormente, adicionado ao meio na proporção de 1:100. Após resfriamento (45-50⁰C), o meio foi vertido em placas de Petri, inoculado e incubado por 5 dias no escuro. O aparecimento do halo ao redor da colônia é resultado da formação de cristais de cálcio de ácido láurico, liberado pela reação da enzima e pela completa degradação dos sais de lipídeos. Para evidenciar a presença do halo de degradação adicionou-se sobre o crescimento 2 mL da solução de vermelho de fenol 2 %. A revelação com esse corante torna o meio rosa quando o resultado é positivo, não sendo alterado quando o resultado é negativo (HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) modificado por FERREIRA *et al.*, 2002).

4.4.7. Atividade Fenolítica

Para a seleção dos fungos produtores de fenoloxidase, utilizou-se o meio descrito por DHOUIB *et al.* (2005) modificado, cuja composição foi a seguinte: 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 ; 0,005 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 mg de NaMoO_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 (AM); 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min), esse material foi vertido em placas de Petri, inoculado e incubado conforme descrito acima.

O mesmo meio também foi utilizado substituindo-se o azocorante AM por outros, na mesma concentração, Os corantes que substituíram o AM foram: verde malaquita (CHA *et al.*, 2001), cristal violeta (BUMPUS & BROCK, 1988) e azure B (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2003).

4.4.8. Atividade da Tanino Acil Hidrolase (Tanase)

Para a seleção dos fungos produtores de tanase, utilizou-se um meio com a seguinte composição: 3 g de nitrato de sódio, 1 g de fosfato dibásico de potássio, 0,5 g de sulfato de magnésio, 0,5 g de cloreto de potássio, 20 g de ágar, 4 g de ácido tânico, 0,04 g de azul de bromofenol e 1000 mL de água destilada. Também preparou-se meio com a mesma composição, exceto pelo fato de se omitir nesta a presença de azul de bromofenol e de se aumentar a concentração de ácido tânico para 20 g. Após esterilização em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min), esses meios foram vertidos em placas de Petri, solidificados e inoculados, utilizando-se triplicatas para cada fungo estudado e para o controle (sem inoculação). A incubação foi conduzida conforme descrito acima. A faixa de pH em que ocorre a viragem da cor azul (do corante presente no meio com a menor concentração do ácido tânico) para amarelo, situa-se entre 3,1 e 4,7.

4.5. PRODUÇÃO DE FENOLOXIDASE EM MEIO LÍQUIDO

Para avaliar a taxa de produção de fenoloxidase pelo fungo *Cladosporium* sp sobre 3 diferentes substratos, utilizou-se meio líquido com AM, bagaço de cana e serragem.

Para a verificação da remoção desses substratos foi preparado o mesmo

meio descrito em 4.4.7, porém isento de ágar e AM, bem como o mesmo meio (4.4.7) isento de ágar, mas acrescido de 0,1 g de AM ou 1 g de bagaço de cana (coletado no processo de moagem da safra 2005/06 da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool) ou, ainda, 1 g de serragem de madeira compensada (coletada em marcenaria localizada no bairro Tabuleiro dos Martins, Maceió, em 2005).

Paralelamente, a partir de uma cultura de *Cladosporium* sp em meio sólido (15 dias, 30 ± 2 °C, no escuro) obteve-se uma suspensão de conídios (água destilada estéril) correspondente a $3,1 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹. Inoculou-se 1 mL da suspensão em 400 mL de cada meio (frascos erlemeyer de 1 L), obtendo-se uma concentração final de $7,75 \times 10^4$ conídios.mL⁻¹. As culturas, em triplicata, foram incubadas a 30 ± 2 °C, sob agitação orbital constante (100 rpm), no escuro.

A intervalos de tempo de 48h (0-144h) alíquotas de 50 mL foram retiradas dessas culturas. Estas foram, posteriormente, filtradas a vácuo (membrana Milipore com porosidade de 0,45 µm) e a biomassa seca foi mensurada através de pesagem das membranas filtrantes 12 h após submetê-las a 50 °C, em estufa. Os filtrados foram estocados a 6-8 °C para posterior determinação dos teores de carboidratos, proteínas, fenóis e secreção de lignina peroxidase, conforme itens 4.5.1-4.5.4.

Além disso, o meio líquido AM também foi distribuído (20 mL) em tubos Falcom (50 mL), esterilizado e inoculado com um volume de 100 µL da suspensão de *Cladosporium* sp (2×10^6 conídios.mL⁻¹), originando culturas contendo 1×10^4 conídios.mL⁻¹. Estas foram incubadas a 30 ± 2 °C, sob agitação constante (100 rpm), no escuro e a biomassa foi mensurada a diferentes intervalos de tempo (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h) após a inoculação, procedendo-se a filtração conforme descrito acima. Os filtrados foram estocados a 6-8 °C para posterior análise do decaimento da absorvância do corante presente.

As medidas de pH e da condutividade dos filtrados de cultura, nos diferentes intervalos de tempo, foram feitas através de pHmetro Químis™ (modelo Q-400A) e condutímetro Instrutherm™ (modelo CD-840). Para verificar o decaimento da absorvância do corante em meio AM, foram realizadas leituras espectrofotométricas dos filtrados das culturas a 500 nm (espectrofotômetro Femto™, modelo 800 XI).

4.5.1. Determinação do Conteúdo de Glicídios Redutores Totais

Os glicídeos redutores foram quantificados através do método do ácido dinitrosalicílico (DNSA) (MILLER, 1959) modificado. Assim, adicionou-se 200 µL da

solução reagente (0,25 g DNSA, 75 g tartarato de sódio e potássio, 50 mL NaOH 2M, 250 mL H₂O) a 200 µL das amostras de filtrado de culturas ou de solução padrão em diferentes concentrações (D-glicose), para construção da curva-padrão. Aqueceu-se as misturas a 100°C por 10 min e, em seguida, diluiu-se cada uma delas para 5 mL, com água destilada. As absorvâncias foram determinadas a 570 nm. A curva-padrão foi produzida variando-se a concentração de D-glicose entre 0 e 2 mg.mL⁻¹

4.5.2. Determinação do Conteúdo de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada de acordo com o Método do Biureto, descrito por LAYNE (1957). O reagente Biureto apresentou a seguinte composição: citrato trissódico 0,57 M, carbonato de sódio 1,05 M e sulfato de cobre 0,052 M e 100 µL da solução de hidróxido de sódio 6 M. A coloração varia de rosa a púrpura, devido ao complexo formado entre os íons de cobre e o nitrogênio das ligações peptídicas. Assim, a cada 50 µL da amostra, ou solução padrão de albumina de soro bovino (ASB) diluída, foram adicionados 2,5 mL do reagente de biureto. As absorvâncias foram determinadas a 550 nm.

A curva-padrão foi produzida variando-se a concentração de ASB entre 0 e 7 mg.mL⁻¹.

4.5.3. Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais

Preparou-se, previamente, uma curva-padrão variando-se a concentração de ácido gálico em água destilada entre 0 e 500 µg.mL⁻¹. Para a determinação de fenóis totais, adicionou-se, sob agitação constante de agitador de tubos, 150 µL da amostra dos filtrados das culturas ou das diluições de ácido gálico foram adicionados, a 3 mL de Na₂CO₃ 2 % (m/v). Após homogeneização, acrescentou-se às misturas 150 µL do reativo de Folin-Ciocalteu 2N (FOLIN & CIOCALTEU, 1927) diluído (1:1, v/v). Após 30 min de repouso, efetuou-se a leitura das absorvâncias a 750 nm (BRAY & THORPE, 1951).

4.5.4. Determinação da Atividade da Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade da enzima LiP foi determinada conforme metodologia descrita por ARORA & GILL (2001), e consiste na oxidação do corante Azure B. A mistura reacional constituiu-se de 1mL de tampão tartarato de sódio (pH 3,0), 500 µL de

azure B (0,160 mM), 500 µL do filtrado e 500 µL de peróxido de hidrogênio (1,6 mM).

A reação iniciou-se pela adição de peróxido de hidrogênio. Uma unidade de atividade enzimática foi expressa como o decréscimo, a 651 nm, de 0,1 unidade na absorvância da mistura reacional, por minuto, por mL do filtrado.

4.6. PRODUÇÃO DE TANASE EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO ÁCIDO TÂNICO

A remoção de ácido tânico em cultura líquida não aerada foi verificada através do meio cuja composição foi descrita no item **4.4.8**, com 4 g de ácido tânico, porém, isento de ágar. Frascos (100 mL) contendo 50 mL desse meio foram esterilizados (121 °C, 1 atm, 20 min) e os mesmos foram inoculados com 2 discos (7 mm) de micélio das culturas de cada isolado em ágar-extrato de malte (7 dias, 30 ± 2 °C, escuro). As culturas foram incubadas a 30 ± 2 °C, no escuro, sem aeração.

Paralelamente, a ação dessa enzima no mesmo meio líquido aerado também foi observada, sendo, porém, preparados frascos erlemeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio, e inoculando-se estes com um volume de uma suspensão aquosa de conídios de *Cladosporium* sp ou de *Aspergillus* sp (culturas em meio ágar-extrato de malte, 15 dias de incubação), gerando concentração final de 10⁴ conídios.mL⁻¹. Após diferentes intervalos (0-168 h) de incubação a 30 ± 2 °C, sob agitação orbital constante (100 rpm) e no escuro, estimou-se a biomassa microbiana dessas culturas. Para tanto, estas foram submetidas a filtração (vácuo) através de membrana Millipore (0,45 µm), sendo a biomassa seca obtida através da mensuração da massa das membranas 12 h após submetê-las a 50°C (estufa). Os filtrados foram estocados a 6-8 °C para posterior determinação da concentração de ácido gálico, DQO e da atividade da tanase (itens **4.6.1- 4.6.2**).

4.6.1. Determinação da Concentração de Ácido Gálico

A determinação da concentração de ácido gálico foi realizada conforme metodologia descrita por SHARMA *et al.* (2000). Para tanto, a um volume de 0,5 mL de cada filtrado e do “branco” (tampão citrato, 0,05 M, pH 5,0), adicionou-se 0,3 mL da solução de rodanina metanólica (0,667 %, p/v). Após 5 min de incubação a 30 °C, adicionou-se 0,2 mL de hidróxido de potássio (0,5 M) e incubou-se os tubos novamente por 5 min a 30 °C. Acrescentou-se, então, 4 mL de água destilada e, 10 min depois, efetuou-se as leituras das absorvâncias a 520 nm (Femto[®], modelo 800

XI).

A curva padrão foi efetuada variando-se a concentração de ácido gálico entre 0-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (solução aquosa).

4.6.2. Determinação da Atividade da Tanase em Meio Líquido

A determinação da tanase ocorreu através do método baseado na formação de cromógeno entre ácido gálico e rodanina, descrito por SHARMA *et al.* (2000). Para tanto, utilizou-se uma solução de 0,1 mM de ácido gálico, preparado em tampão citrato (0,05 M, pH 5,0).

A mistura reacional consistiu de 0,25 mL da solução de ácido gálico (substrato) e 0,25 mL dos filtrados de culturas obtidos conforme descrito acima (amostras testadas). Como referência, utilizou-se 0,25 mL do substrato acrescido de 0,25 mL do tampão citrato (0,05 M, pH 5,0) e um controle contendo apenas 0,25 mL do substrato. Os tubos, então, foram incubados a 30 °C por 5 min e, em seguida, adicionou-se aos mesmos 0,3 mL da solução de rodanina metanólica (0,667 %, p/v). Após 5 min de incubação a 30 °C, adicionou-se 0,2 mL de hidróxido de potássio (0,5 M) e novamente incubou-se a mistura por 5 min a 30 °C. Acrescentou-se, então, 0,25 mL do filtrado apenas à mistura reacional controle sem tampão citrato. Finalmente, cada mistura foi diluída com 4 mL de água destilada e incubada a 30 °C por 10 min. A absorvância (520 nm) foi mensurada utilizando-se água destilada como “branco” para calibragem.

A atividade enzimática foi calculada a partir da variação na absorvância:
$$\Delta A_{520} = (A_{\text{teste}} - A_{\text{branco}}) - (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}})$$

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de ácido gálico (μM) formada por minuto de reação.

4.7. CRESCIMENTO DOS FUNGOS *Mucor sp*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Geotrichum candidum* E *Cladosporium sp* SOBRE AMOSTRAS DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL SUPLEMENTADO

Para avaliar o efeito dos isolados dos fungos *Mucor sp*, *P. chrysosporium*, *G. candidum* e *Cladosporium sp* sobre as águas residuárias da matriz da S. A. Usina Coruripe, volumes de 50 mL das amostras coletadas (erlenmeyers de 125 mL) em 19/12/2006, conforme item 4.1, na lagoa “D” da ETE, suplementadas com 1 % da

constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud isento de ágar, foram autoclavados (121°C, 1 atm, 20 min) e inoculados com uma suspensão aquosa de conídios desses fungos (culturas em meio ágar-extrato de malte, 15 dias de idade), originando uma concentração final de 10^4 conídios.mL⁻¹. As culturas foram incubadas sob agitação constante em banho-agitador orbital (100 rpm, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 168 h), em triplicata.

Para cada intervalo de incubação (0, 48 e 168 h), efetuou-se a filtração das culturas (vácuo) utilizando-se papel de filtro Whatman nº1. Os filtrados armazenados a 6-8 °C foram submetidos a análises de DQO (conforme item 4.7.1), fenóis totais (conforme item 4.5.3) e glicídios redutores (conforme item 4.5.1).

4.7.1. Determinação da Concentração de DQO

Preparou-se previamente uma solução de digestão. Assim, adicionou-se 334 mL de ácido sulfúrico concentrado em 1,5 L de água destilada. Após o resfriamento, adicionou-se nesta 66,6 g de sulfato de mercúrio e agitou-se com o auxílio de agitador magnético. Ainda sob agitação, acrescentou-se 20,432 g de dicromato de potássio. Após o resfriamento, completou-se o volume para 2 L com água destilada, e esta solução foi armazenada em frasco âmbar.

Também preparou-se uma solução de sulfato de prata-ácido sulfúrico. Para tanto, adicionou-se 10,1 g de sulfato de prata em 1 L de ácido sulfúrico concentrado, sob agitação. Esta mistura pode permanecer armazenada em frasco âmbar, desde que antes de seu uso sempre sofra agitação.

Para a determinação da DQO, então, depositou-se 1,5 mL de solução de digestão (dicromato de potássio-sulfato de mercúrio) e 3,5 mL de solução de sulfato de prata-ácido sulfúrico, em tubos de ensaio (12 mL). Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de cada amostra ou da solução padrão (hidrogenoftalato de potássio) para medida de DQO. Água destilada foi utilizada como “branco”.

Os tubos foram cuidadosamente agitados até a completa homogeneização, sendo, em seguida, submetidos à digestão a 150 °C por 2 h. Após esse período, as misturas foram resfriadas à temperatura ambiente e em local sob proteção da luz.

A solução padrão de hidrogenoftalato de potássio foi preparada obtendo-se uma concentração teórica de DQO de 10.000 mg.L⁻¹. Após diluição dessa solução, traçou-se uma curva padrão de DQO variando-se a concentração da solução padrão de 100 a 1000 mg.L⁻¹.

4.8. BIOAUMENTAÇÃO EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE LAGOA FACULTATIVA DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE (ETE) E MONITORAMENTO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Durante as safras 2005/06 e 2006/07, efetuou-se a bioaugmentação da lagoa de tratamento “D” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (**Figura 11**). Para tanto, utilizou-se três bactérias previamente isoladas (*Pseudomonas* sp, *Corynebacterium* sp e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente codificadas 3 MB, 6 MB e T), que exibiram respostas satisfatórias nas determinações de atividades enzimáticas em meio sólido, bem como em testes de degradação de matéria orgânica e traços de agroquímicos provavelmente presentes nos efluentes, e 3 fungos (*Mucor* sp, *P. chrysosporium* e *G. candidum*), estudados no presente trabalho.

4.8.1. Preparo do Inóculo Inicial visando a Bioaugmentação

Culturas (30 °C, no escuro) em meio ágar nutriente (bactérias, 72 h) e ágar Sabouraud (fungos, 120 h) foram utilizadas para o preparo do inóculo (**Figura 13**). Para tanto, foram preparadas suspensões aquosas de células e conídios dessas culturas em água destilada estéril. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão foi utilizada para a contagem do número de células ou conídios por mL da suspensão original em câmara de Neubauer.

Para a inoculação de cada microrganismo, preparou-se 3 frascos Duran-Schott® (1 L), sendo que cada um deles continha 500 mL de meio com a seguinte composição otimizada: 20000 mg.L⁻¹ de sacarose; 6000 mg.L⁻¹ de proteínas totais; 3600 mg.L⁻¹ de gorduras totais; 20 mg.L⁻¹ de cálcio; 6 mg.L⁻¹ de fósforo; 1,5 mg.L⁻¹ de ferro; 0,2 mg.L⁻¹ de cobre; 0,3 mg.L⁻¹ de magnésio; 0,6 mg.L⁻¹ de zinco; 0,012 mg.L⁻¹ de iodo; 0,0022 mg.L⁻¹ de selênio; 2,4 mg.L⁻¹ de α-tocoferol; ; 2 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico; 0,44 mg.L⁻¹ de tiamina; 0,14 mg.L⁻¹ de riboflavina; 0,1 mg.L⁻¹ de piridoxina; 0,88 mg.L⁻¹ de cianocobalamina; 0,044 mg.L⁻¹ de ácido fólico; 0,02 mg.L⁻¹ de ácido pantotênico; 0,96 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 46 mg.L⁻¹ de colina; 2,7 mg.L⁻¹ de biotina). Após autoclavagem (121 °C, 1 atm, 20 min), o meio em tais frascos foi inoculado com 5 mL de suspensão do respectivo inóculo [10⁸ células.mL⁻¹ para bactérias e 10⁶ conídios.mL⁻¹ para fungos, visto que a taxa de crescimento individual fora previamente estudada por PEROVANO F° (2004)]. Em seguida, as culturas foram incubadas por 96 h (30 ± 2 °C, escuro) antes de sua utilização para

reinoculação em 15 L do mesmo meio estéril contido em galões de plástico assépticos.

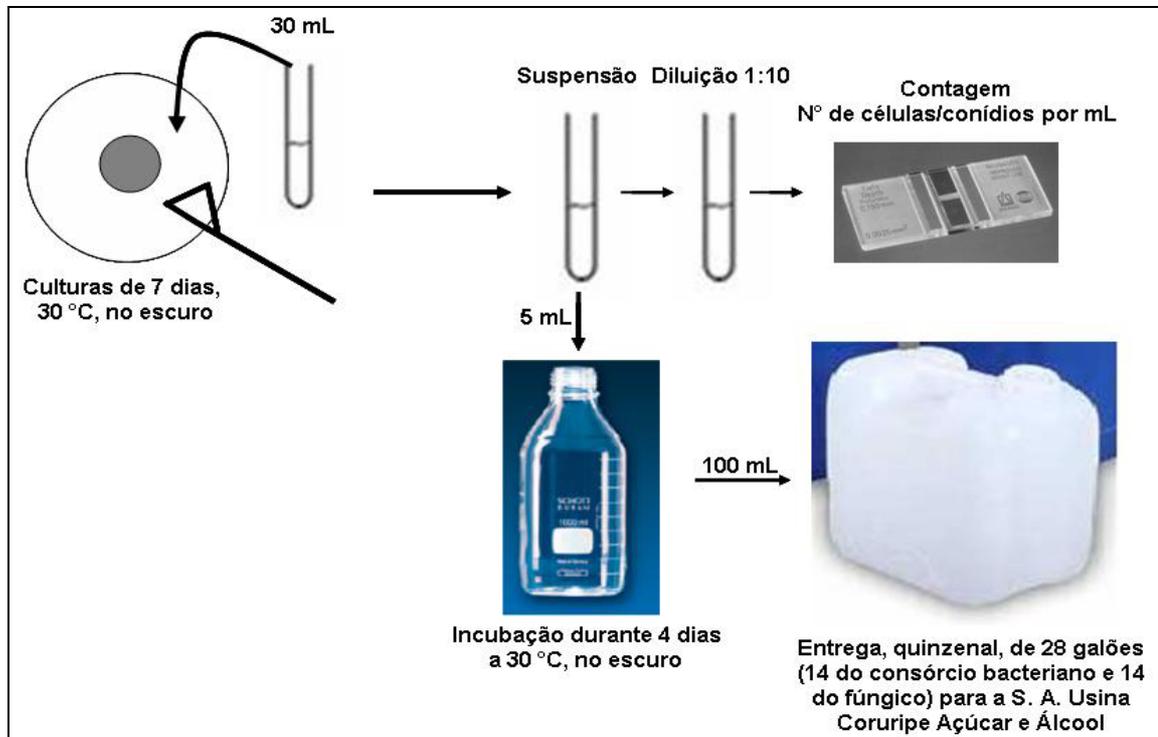


Figura 13. Esquema dos procedimentos adotados para o preparo do inóculo e das culturas a serem utilizadas na bioaugmentação da lagoa facultativa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool.

4.8.2. Inoculação do Meio de Aplicação para Bioaugmentação de Lagoa Facultativa e Monitoramento dos Parâmetros Físico-Químicos das Águas Residuárias

Durante as safras 2005/06 e 2006/07 da moagem de cana no Estado de Alagoas, 14 galões assépticos contendo 15 L de culturas de um consórcio de 3 bactérias e 14 galões assépticos contendo 15 L de culturas de um consórcio de 3 fungos foram quinzenalmente preparados e armazenados para aplicação diária.

O meio contido em tais galões apresentou a mesma composição mencionada no item 4.8.1, sendo inoculado com 100 mL de cada uma de 3 culturas de bactérias ou fungos, também obtidas conforme descrito no mesmo item. Esse volume de inóculo foi calculado através de equações estabelecidas em estudos prévios individuais da cinética de crescimento de cada um dos microrganismos em tal meio (PEROVANO F°, 2004), de forma que eles viessem a apresentar concentração

celular/conidial correspondente a 1×10^{19} (células ou conídios).mL⁻¹ na data da aplicação em campo.

Após preparadas, essas culturas consorciadas (3 bactérias em um galão e 3 fungos em outro galão) e fornecidas para a empresa onde ocorreram os ensaios de bioaugmentação (lagoa facultativa “D” da ETE, **Figura 11**), foram inicialmente estocadas em câmaras de crescimento (8-10 °C). Diariamente, então, retiravam-se da câmara 1 galão de culturas fúngicas e outro de culturas bacterianas, para aplicação na comporta de entrada da lagoa D da ETE estudada. Além disso, 6 horas antes de cada aplicação, um tratamento neutralizante com NaOH (75 Kg/aplicação) foi efetuado nas comportas de entrada da lagoa que antecedia essa lagoa de tratamento biológico.

Para monitorar o efeito do tratamento durante as safras 2005/06 e 2006/07, foram efetuadas coletas quinzenais de amostras de efluentes na entrada das lagoas de decantação (“A” e “B”), onde não havia tratamento, e na saída das lagoas facultativas “D” e “G” da mesma ETE, bem como na captação central e lateral para irrigação, ambas canalizando águas que já haviam passado pelo tratamento.

Para as amostras coletadas em cada ponto, foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, temperatura, oxigênio dissolvido (OD=mg/L O₂); DQO (mg de O₂/L); Condutividade (mS/cm a 25 °C); Sólidos Dissolvidos Totais (STD=mg/L); Resíduos Sedimentáveis (RS); Nitratos (mg/L NO₃⁻); Nitritos (mg/L NO₂⁻) e Fosfatos (mg/L).

As amostras de água foram sempre coletadas em garrafas coletoras assépticas, segundo instruções descritas pelo “Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater”, manual da agência americana de proteção à saúde (APHA, 1995), e transportadas para o laboratório sobre gelo em caixa de isopor.

Os parâmetros pH, Temperatura, OD e Condutividade foram avaliados no momento da coleta das amostras. Para tanto, utilizou-se um medidor de pH (PHTEK™, modelo pH-100), um termômetro convencional, um oxímetro Instrutherm™ (modelo MO-880) e um condutivímetro Instrutherm™ (modelo CD-840).

Os demais parâmetros foram obtidos por meio de ensaios realizados no LBPVMA, conforme técnicas também descritas no manual da agência americana de proteção à saúde (APHA, 1995) (**Tabela 4**).

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.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	TÉCNICAS / MÉTODOS ANALÍTICOS
DQO - Demanda Química de Oxigênio (mg/L O ₂)	Método do Refluxo Aberto (SMEWW 5220 B)
Fosfatos (mg/L P ₂ O ₅)	Espectrofotometria de absorção molecular (IBP N°8)
Nitratos (mg/L NO ₃)	Espectrofotometria de absorção molecular – Método do Salicilato do Sódio (Rodier)
Nitritos (mg NO ₂ /L)	Espectrofotometria de absorção molecular – Bull 167
SDT - Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L)	Eletrometria (SMEWW)
RS – Resíduos Sedimentáveis (mg/L)	Gravimetria (SMEWW 2540 D)

SMEWW = “Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater”, APHA, 1995.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DE AMOSTRAS (EFLUENTES E TURFA) DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES (ETE)

5.1.1. Isolamento e Identificação de Microrganismos dos Efluentes

Conforme características morfo-culturais e bioquímicas citadas nos **Quadros 2-3**, na safra 2004/05 foram isolados 16 microrganismos das águas das lagoas de decantação da ETE estudada, sendo um fungo filamentososo (2AMB: *Mucor* sp), uma levedura (VPC: *Rhodotorula* sp) e 14 bactérias (*Staphylococcus* sp: 1AMB; *Micrococcus* spp: II e 1MB; *Pseudomonas* spp: T e 3MB; *Corynebacterium* sp: 6MB; *Arthrobacter* sp: VIII; *Achromobacter* sp: XIIPC; e formas corineformes e actinomicetos: 2MB, 4MB, 5MB, 7MB, 8MB e V).

A caracterização de espécies tem sido realizada por meio de comparação de testes fenotípicos clássicos, tais como crescimento, reações enzimáticas e microscopia, que são a base do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey. A dificuldade de se usar as chaves desse Manual, entretanto, é que se apenas um teste separa duas espécies ou biovariedades, o isolado em estudo pode ser erroneamente identificado devido a pequenas mudanças nos perfis metabólicos, comparados com o padrão geral. No entanto, essa metodologia trabalhosa e com limitações (YAMAOKA-YANO & VALARINI, 1998) ainda é base de classificação e identificação dos microrganismos (BOSSIS *et al.*, 2000), e vem sendo simplificada através de *kits* manuais ou automatizados (PALLERONI, 2003).

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).

Microrganismos	1A MB	2AMB	6 MB	7 MB	8 MB	XII PC	VIII	T
Forma da Colônia em AN	Irregular	Circular	Irregular	Rizóide	Rizóide	Irregular	Irregular	Irregular
Elevação da Colônia em AN	Plana	Convexa	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Convexa
Borda da Colônia em AN	Ondulada	Filamentosa	Ondulada	Ondulada	Ondulada	Ondulada	Ondulada	Ondulada
Estrutura da Colônia em AN	Lisa	Filamentosa	Lisa	Lisa	Filamentosa	Lisa	Filamentosa	lisa
Brilho da Colônia em AN	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Transparente	Opaca	Opaca	Brilhante
Cor da Colônia em AN	Incolor	Branca	Marrom	Marrom	Incolor	Bege	Incolor	Incolor
Coloração de Gram	+	-	+	+/-	+/-	-	+	-
Confirmação de Gram (KOH a 3 %)	+	-	-	+	+	-	+	-
Endósporos	-	-	-	-	-	-	-	-
Meio EMB	-	-	+	+	+	+	-	+
Meio Columbia	+	+	+	+	+	+	+	+
Meio TSI-ágar (96 h)	+glicídeos e Peptona	+glicídios e Peptona	- glicídeos +Peptona	+glicídeos e Peptona	+glicídeos e Peptona	+lactose e Peptona	+ glicose, +gás e Peptona	+ glicose e Peptona
NH ₄ (TSI Líquido)	+	-	-	+	+	-	+	+
H ₂ S (TSI Líquido)	+	+	-	-	+	+	-	-
Meio OF	Anaerób. Facult..	Aeróbio	Anaerób. Facult..	Anaerób. Facult..	Anaerób. Facult..	Anaerób. Facult..	Aeróbio	Aeróbio
Meio King (fl. 254 nm)	-	-	- (*gas)	-	-	-	-	+
Meio SIM	-	NR	-	+	+	-	-	+
Citrato descarboxilase	-	NR	+	-	+	+	+	+
Indol	NR	NR	-	-	NR	-	-	+
Lisina Triptofano descarboxilase	NR	NR	+	+	NR	-	-	-
Ornitina descarboxilase	+	+	-	-	-	-	-	-
Urease	+	NR	+	-	+	+	-	+
Oxidase	+	-	-	+	-	+	+	+
Catalase	+	+	+	-	+	+	+	+
Nitrato-redutase	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilase	+	+	+	+	+	+	+	+
Protease	+	+	+	+	+	+	+	-
Xilanase	+	+	-	-	-	+	-	+
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectatoliase	+	+	+	+	+	+	+	+
Poligalacturonase	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenol-oxidase	+	+		+	+	+	+	+
Forma das células	Cocos (<i>Staphylococcus</i> sp)	Hifas (<i>Mucor</i> sp)	Formas Variadas (<i>Corynebacterium</i> sp)	Formas Variadas (Actinomiceto)	Formas Variadas (Actinomiceto)	Bastonetes (<i>Achromobacter</i> sp)	Cocos e bastonetes retos (<i>Arthrobacter</i> sp)	Bastonetes peq. (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)

+ = positivo; - = negativo; +/- = positivo ou negativo; NR= não realizado.

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 (2004/05).

Microrganismos	1 MB	2 MB	3 MB	4 MB	5 MB	II	V	V PC
Forma da Colônia em AN	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Circular	Rizóide	Circular
Elevação da Colônia em AN	Plana	Plana	Convexa	Plana	Plana	Convexa	Plana	Convexa
Borda da Colônia em AN	Lisa	Ondulada	Ondulada	Ondulada	Ondulada	Lisa	Filamentoso	Lisa
Estrutura da Colônia em AN	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Filamentosa	Lisa
Brilho da Colônia em AN	Opaca	Transparente	Brilhante	Transparente	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
Cor da Colônia em AN	Amarela	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Amarela	Bege	Rosa-laranja
Coloração de Gram	+	+	-	+/-	+/-	+	+/-	+
Confirmação de Gram (KOH a 3 %)	+	+	-	+	+	+	+	+
Endósporos	-	-	-	-	-	-	-	-
Meio EMB	+	-	+	-	-	-	-	+
Meio Columbia	+	+	+	+	+	+	+	+
Meio TSI-ágar (96 h)	+glicideos e peptona	+glicideos e peptona	+glicideos	+glicideos e peptona	+glicideos e peptona	+glicideos e peptona	+glicideos e peptona	+glicideos e peptona + gás
NH ₄ (TSI Líquido)	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S (TSI Líquido)	-	-	-	-	-	-	-	-
Meio OF	Aeróbio	Anaerób. Facult..	Aeróbio	Anaerób. Facult..	Anaerób. Facult..	Aeróbio	Anaerób. Facult..	Anaerób. Facult..
Meio King (fl. 254 nm)	-	-	+	-	-	-	-	-
Meio SIM	-	+	+	+	+	-	+	NR
Citrato descarboxilase	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	+	-	+	+	-	-	-
Lisina Triptofano descarboxilase	-	NR	-	NR	NR	-	-	-
Ornitina Descarboxilase	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	+	+	+	+/-	-	-	-
Oxidase	-	-	+	+	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	-	-	-
Nitrato Redutase	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilase	+	+	+	+	+	+	+	+
Protease	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilanase	-	+	+	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectato-liase	+	+	+	+	+	+	+	+
Poligalacturonase	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenol-oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Forma das células	Cocos (Micrococcus sp.)	Formas Variadas (Actinomiceto)	Bastonetes peq. (<i>Pseudomonas putida</i>)	Formas Variadas (Actinomiceto)	Formas Variadas (Actinomiceto)	Cocos (Micrococcus sp.)	Formas Variadas (Actinomiceto)	Levedura (<i>Rhodotorula</i> sp)

+ = positivo; - = negativo; +/- = positivo ou negativo; NR= não realizado.

Para AHMED *et al.* (2001), o polímero fenólico lignina, combinado com celulose e hemicelulose (lignocelulose), é altamente recalcitrante e freqüentemente encontrado em águas residuárias agroindustriais. Dos isolados obtidos de águas residuárias neste trabalho, 75 % 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 preliminarmente 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 variabilidade genética pode ser utilizada na manipulação e aplicação em melhoramento de processos.

A resposta desses 16 isolados frente a 18 distintos agroquímicos (800 mgL⁻¹) está representada nas **Figuras 14 e 15**.

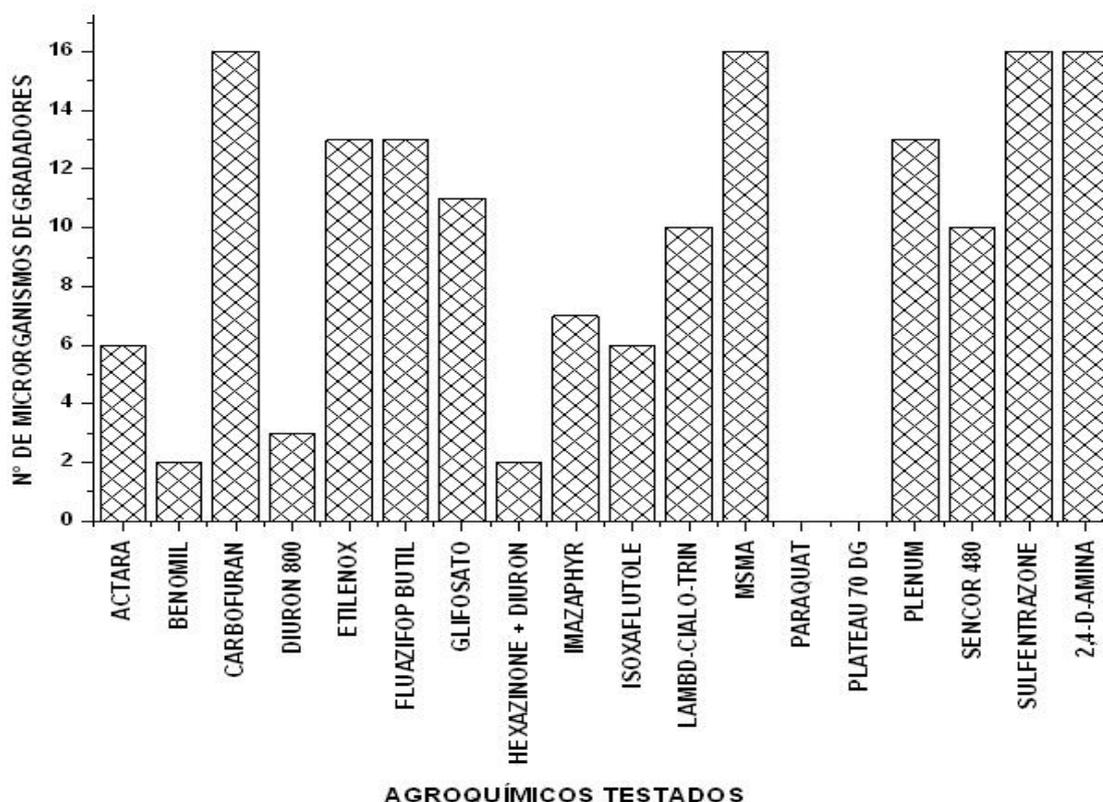


Figura 14. Número de microrganismos, dos 16 isolados em efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, com capacidade para degradar 18 diferentes agroquímicos.

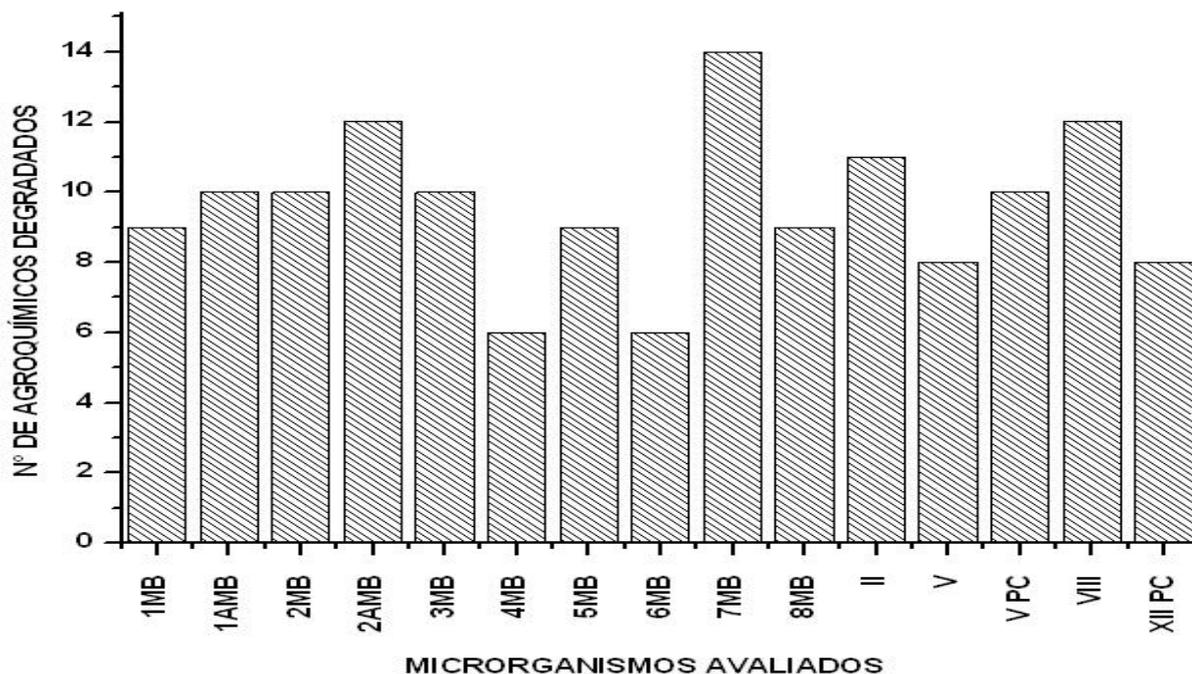


Figura 15. Número de agroquímicos, dos 18 estudados, degradados por 16 diferentes microrganismos isolados em efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool.

Desses, os que apresentaram atividades amilolítica, xilanolítica, proteolítica, lipolítica, pectinolítica e fenolítica, aliados à sua capacidade de degradar os agroquímicos mais tóxicos (Fluazifop-butil, Sencor, Etilenox), e em maior número, foram selecionados (2AMB, 3MB, 6MB e T) para os ensaios de biorremediação. Os quatro isolados selecionados foram identificados como *Mucor sp*, *Pseudomonas sp*, *Corynebacterium sp* e *Pseudomonas sp*, respectivamente. Todos os isolados cresceram em culturas contendo o fungicida Carbofuran ou os herbicidas MSMA, Sulfentrazona e 2,4-D-amina, mas nenhum deles cresceu sobre os herbicidas imidazolinínicos (Paraquat e Plateau). Os demais agroquímicos foram tolerados/degradados por pelo menos um dos microrganismos, sendo o isolado T o que cresceu em mais produtos.

Os dois isolados do gênero *Pseudomonas* selecionados para os testes de biorremediação (3MB e T) foram, em seguida, identificados respectivamente como *P. putida* e *P. aeruginosa* (Tabelas 5 e 6 e Figuras 16-19).

Tabela 5. Resultados dos testes bioquímicos do sistema API 20E (Biomérieux), 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 incubados por 48 h (35 ± 1 °C, escuro).

SUBSTRATOS			MICROORGANISMOS	
Abreviaturas	Descrição	Reações	T	3MB
ONPG	2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo	β -galactosidase	-	-
ADH	L-arginina	Arginina desidrolase	+	+
LDC	L-lisina	lisine descarboxilase	-	-
ODC	L-ornitina	Ornitina descarboxilase	-	-
CIT	Citrato de sódio	Utilização de citrato	+	+
H₂S	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/Fermentação	+	-
MAN	manitol	Oxidação/Fermentação	-	-
INO	Inositol	Oxidação/Fermentação	-	-
SOR	D-sorbitol	Oxidação/Fermentação	-	-
RHA	L-ramnose	Oxidação/Fermentação	-	-
SAC	D-sacarose	Oxidação/Fermentação	-	-
MEL	D-melibiose	Oxidação/Fermentação	-	+
AMY	Amigdalina	Oxidação/Fermentação	-	-
ARA	L-arabinose	Oxidação/Fermentação	+	-
OX	Oxidase	Oxidase	+	+
NO₂	Nitrato	Nitrato redutase	-	-
N₂	Nitrogênio	Assimilação de N ₂	+	+
MacC	Mac Conkey	lactase	+	+

+ = positivo; - = negativo

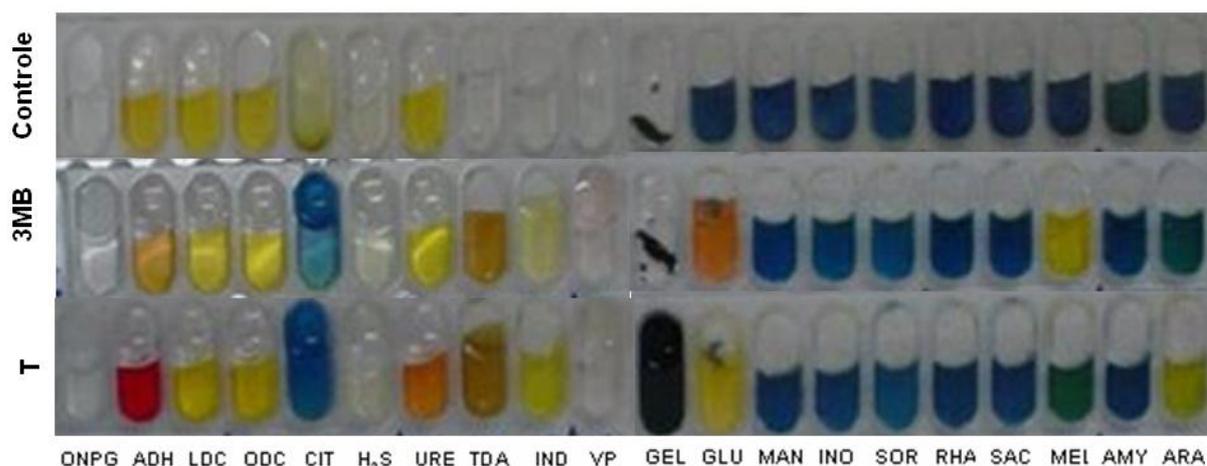


Figura 16. Aspecto dos resultados dos testes bioquímicos no sistema API 20E (Biomérieux), inoculado com os isolados 3MB e T, dos efluentes lançados na lagoa "A" da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05), 24 h após incubação a 35 ± 1 °C, escuro.

O isolado T do gênero *Pseudomonas* apresentou modificações morfológicas bem características ao longo do tempo em meio Ágar Nutriente. Após 24 h de incubação nesse meio (30 ± 1 °C; escuro), as colônias apresentaram-se opacas e não houve produção de pigmento. Após uma semana, no entanto, as colônias tornaram-se transparentes e começaram a produzir um pigmento amarronzado que se difundiu no meio de cultura (**Figura 17**). O outro isolado de *Pseudomonas* (3MB) não sofreu grandes modificações na sua morfologia ao longo do período de incubação nesse meio.



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).

Em meio King “B”, após 48 h de incubação ($30 \pm 1^\circ\text{C}$; escuro), os isolados 3MB e T apresentaram bastante crescimento e produção de pigmentos que fluoresceram sob luz ultravioleta (365 nm). Após 15 dias de incubação no meio King “A”, o isolado T produziu piocianina. No meio de gelatina, apenas o isolado T hidrolisou o substrato (**Figura 18**). Também houve crescimento desses isolados a 42°C e em 6,5 % de NaCl . A 42°C , contudo, esses isolados não foram capazes de produzir pigmento. Essa capacidade não foi recuperada mesmo após 6 dias a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Os dois isolados também cresceram no meio Ágar Leite, mas apenas o isolado T produziu um pigmento verde difusível no meio e hidrolisou a caseína (**Figura 19**), sendo identificado como *P. aeruginosa*, de acordo com BROWN & FOSTER (1970).

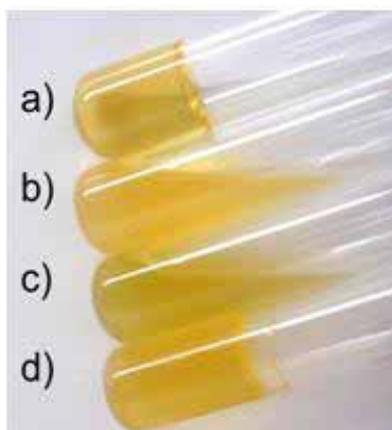


Figura 18. Produção de gelatinase por espécies de *Pseudomonas* (72 h de incubação a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro), isoladas de amostras de efluentes de lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05) **a)** Controle não inoculado; **b)**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

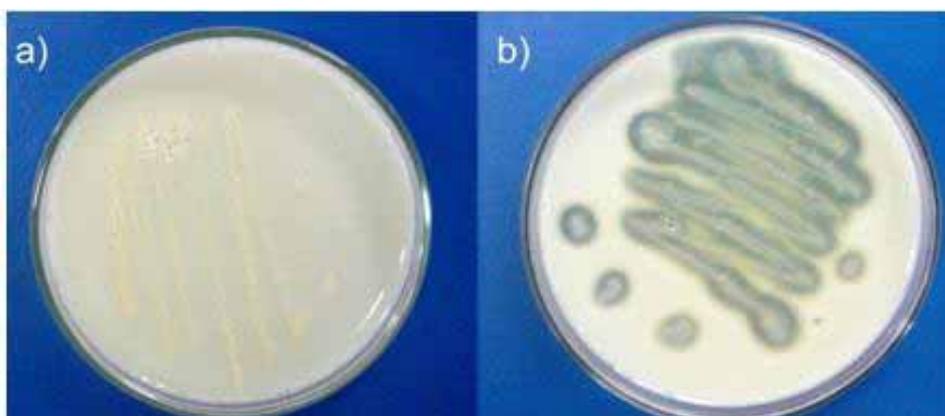


Figura 19. Meio Ágar Leite, para verificação de caseinase e produção de piocianina por espécies de *Pseudomonas* (48 h de incubação, $30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro), isoladas de amostras de efluentes de lagoa de decantação da estação de tratamento da matriz S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra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

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.

Microrganismos	A¹	F¹	P¹	T	3MB
Gram	-	-	-	-	-
KOH 10 %	viscoso	viscoso	viscoso	viscoso	viscoso
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	+	+
Produção de H ₂ S	-	+	-	-	-
Produção de Indol	-	-	-	-	-
Oxidação da Glicose	+	+	+	+	+
Fermentação da Glicose	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Produção de Fluoresceína	+	+	+	+	+
Produção de Piocianina	+	-	-	+	-
Proteinase	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	-	-	+	-
Caseinase	+	-	-	+	-
Crescimento a 42°C	+	-	-	+	-
Crescimento a 4°C	-	+	-	-	-
Crescimento em 6,5 % NaCl	+	-	-	+	-

¹ Características de linhagens de *Pseudomonas* da Coleção de Culturas Tropicais da “Fundação André Tosello”: A= *P. aeruginosa* (ATCC 9027, CCT 1987), F = *P. fluorescens* (ATCC 13525, CCT 7393) e P= *P. putida* (ATCC 12633, CCT 2357).

+ = Reação Positiva; - = Reação negativa; (+) = Reação fracamente positiva.

Os sistemas de classificação bacteriano foram insatisfatórios até meados dos anos 60, quando PALLERONI (1993) começou a investigar regiões conservadas do genoma que pudessem preencher essa lacuna da taxonomia. Seu trabalho foi destinado aos genes de RNAr de *Pseudomonas*. O gênero, que já estava caracterizado classicamente como um grupo de bastonetes estritamente aeróbios com flagelo polar, tornou-se subdividido em cinco grupos bem definidos de acordo com a homologia do RNAr: I, II, III, IV e V. O impacto de tais resultados foi tão grande que o pesquisador, em revisão publicada em 2003, definiu o século XX em relação à taxonomia dos procariontes em dois períodos: um anterior à *Pseudomonas* e o outro, posterior à esse gênero: BP e AP (do inglês, “Before” e “After” *Pseudomonas*, respectivamente).

De acordo com a taxonomia atual, o grupo I é o maior e corresponde às

espécies autênticas de *Pseudomonas*, e por isso, o gênero é denominado de *Pseudomonas stricto sensu*. As espécies dos grupos restantes foram movidas para outros gêneros, famílias ou ordens porque estão filogeneticamente distantes de *Pseudomonas* (PALLERONI, 2003).

Nesse novo contexto, *Pseudomonas stricto sensu* é um grupo filogeneticamente homogêneo que pertence à subclasse γ de Proteobacteria. Ele é conhecido como o grupo “fluorescente”, embora possa conter algumas espécies que não o sejam (BOSSIS *et al.*, 2000). A espécie típica do grupo é *P. aeruginosa*. Ela foi escolhida porque é uma das espécies mais bem conhecidas do gênero, além de ser facilmente caracterizada (PALLERONI, 1993). Assim, as bactérias do gênero *Pseudomonas* caracterizam-se pela morfologia (bastonetes), composição complexa da parede celular (gram-negativas), não formação de esporos, metabolismo não-fermentativo e enorme diversidade metabólica, a qual é sua propriedade fisiológica mais notável (GILARDI, 1971). A faixa muito ampla de compostos diferentes que podem utilizar como fontes de carbono e energia permite que o gênero seja utilizado como alvo de intensos estudos que visam a remoção de compostos recalcitrantes e/ou xenobióticos de diversos ambientes (LOVLEY, 2003). Esses microrganismos têm habilidade de degradar os mais diferentes contaminantes, principalmente hidrocarbonetos do petróleo (MACÊDO, 2000).

A distribuição de espécies de *Pseudomonas* nos mais variados lugares sugere um elevado grau de adaptabilidade (BOSSIS *et al.*, 2000; SPIERS *et al.*, 2000). Na tentativa de descobrir a causa dessa diversidade, SPIERS *et al.* (2000) reuniram os mais recentes trabalhos sobre o tema, focalizando dois aspectos principais: as causas ecológicas (oportunidade, competição, produtividade etc) e genéticas (mutação, recombinação, tamanho do genoma, flexibilidade fisiológica). E, apesar de abranger tantos aspectos, parece que não existem características particularmente notáveis nesse gênero que sejam capazes de fazer com que ele evolua mais rapidamente que qualquer outra bactéria. Assim, a explicação dos autores é bastante simples: uma longa história evolutiva, oportunidades de transferência lateral de genes e contínua exposição a muitos ambientes complexos permitiram o sucesso bacteriano. Todavia, a presença de enzimas induzíveis, plasmídios catabólicos e plasmídios conjugativos transferíveis para outras bactérias gram-negativas também contribuem para a elevada plasticidade do gênero (GLAZER & NIKAIDO, 1998; MACÊDO, 2000).

Os métodos de rápida identificação podem ser divididos em três categorias: a) Sistemas bioquímicos manuais (API); b) Sistemas mecanizados/automatizados (BIOLOG) e c) Sistemas imunológicos. Cada um dos sistemas apresenta suas vantagens e limitações. Alguns produtos comerciais, tais como o API 20E e API Rapid NFT, são aplicáveis apenas até o nível de espécie (JUANG & MORGAN, 2001). Por isso, a pesquisa tem recorrido ao uso de técnicas moleculares incluindo testes metabólicos, perfis protéicos, sequenciamento de DNAr e suas regiões intergênicas, sondas com diferentes especificidades e análises de fragmentos de restrição (BOSSIS *et al.*, 2000). Especialmente para fins taxonômicos, ambas as fontes de informação, genômica e fenotípica (incluindo testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos), são sempre necessárias para a exata identificação do microrganismo (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). No caso do API 20E, esse apresenta-se como o sistema mais conveniente e fácil para identificar bactérias gram-negativas que os testes convencionais (GLASS & POPOVIC, 2005).

Para evitar discordâncias de resultados entre diferentes testes empregados para a identificação bacteriana, as várias metodologias têm objetivado a incorporar os seguintes fatores: padronização, rapidez, reprodutibilidade, miniaturização, mecanização e automação.

Segundo GILARDI (1971), as linhagens piocianogênicas de *P. aeruginosa*, diferentemente das apiocianogênicas, são de fácil identificação, como constatado no presente estudo. Por isso, muitas linhagens dessa espécie e outras relacionadas a ela têm sido identificadas de forma errônea. Considerando, entretanto, o grande interesse clínico por *P. aeruginosa*, a qual é a única espécie oportunista de *Pseudomonas* reconhecidamente patogênica para o homem, muitos autores buscam uma metodologia cada vez mais rápida e segura para sua identificação (GABY & HADLEY, 1957; BROWN & FOSTER, 1970; LAMBE & STEWART, 1972; BRODSKY & NIXON, 1973; DALY *et al.*, 1994; WELLINGHAUSEN *et al.*, 2005), já que erros de diagnóstico conduzem a uma seleção incorreta da terapia (WELLINGHAUSEN *et al.*, 2005).

PÉREZ *et al.* (2002) relataram que as bactérias celulolíticas mais estudadas pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Cellulomas* e *Streptomyces*, e que temperaturas ótimas para produção e ação da xilanase, tanto em bactérias como em fungos, variam entre 40-60°C. Além disso, bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem biossurfactantes, os quais são úteis na biorremediação de locais

contaminados com derivados de petróleo, metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo (MILLER, 1995). Surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas (BOGNOLO, 1999). A degradação de hexaclorociclohexano, por exemplo, foi favorecida pela ação de surfactante produzido por espécies de *Pseudomonas*, sendo que outros organoclorados como DDT e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau (KARANTH *et al.*, 1999).

RAHMAN *et al.* (2003) verificaram o efeito da associação de 0,004 % de um surfactante ramnolipídio, produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, com 1 % de um consórcio bacteriano ($2,1 \times 10^3$ UFC/mL) formado por *Micrococcus* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Corynebacterium*, e *Flavobacterium* sp ($2,1 \times 10^3$ UFC/mL), e uma solução contendo 0,00001 % de NPK (nitrogênio, fosfato e potássio), sobre solos estéreis ou não e contaminados com diferentes concentrações (9-18 %) de petróleo a pH 6,7. A degradação máxima de *n*-alcanos foi obtida no 56º dia após o tratamento, sendo de 100 % para aqueles com 8-11C, 83-98 % para compostos com 12-21C, 80-85 % para cadeias com 22-31C, e 57-73 % para aquelas com 32-40C. Analisando a interferência de cada um dos componentes do tratamento, os autores concluíram que todos tiveram efeito sinérgico significativo na biorremediação estudada.

ZAIDI *et al.* (1996) observaram a degradação de baixas e altas concentrações de *p*-nitrofenol palmitato (PNPP) por *Corynebacterium* sp e *Pseudomonas* sp com taxas celulares respectivamente de 2×10^5 a $3,2 \times 10^6$ células/mL. A baixas concentrações de PNPP, as 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 o grau de mineralização do PNPP foi maior, à medida que se aumentou o inóculo de *Corynebacterium* sp, quando o composto estava presente em baixa concentração, mas não no caso de *Pseudomonas*. Adição de fosfato também reduziu o tempo de aclimação de *Corynebacterium* sp para a degradação de PNPP.

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 *Corynebacterium aquaticum*, excretou uma depolimerase capaz de degradar esse composto e crescer nele como única fonte de carbono. A 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 poliacrilamida na presença de dodecil 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 -hidroxi-alcanoato de diferentes tamanhos de cadeia carbônica (C-3-C-6). Os produtos solúveis em água foram identificados por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ¹H e análise de espectrometria de massa. O principal produto da degradação do polímero foi o ácido 4-hidroxi butírico.

MESQUITA (2004) apresenta uma revisão sobre a biodegradação de alguns compostos de forma química e biológica, citando que *Corynebacterium spp* têm sido 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 *C. glutamicum* atuou em cometabolismo. 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 mg L⁻¹ h⁻¹) e a taxa instantânea máxima sobre frutose (1,4 mg L⁻¹h⁻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 h⁻¹, houve uma relação direta entre o consumo de demeton-S-metil e o crescimento sobre frutose em culturas em batelada e contínuas.

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

Conforme descrito no **Quadro 4**, 10 fungos (Gc, Pc, 2AMB, XXI, G2, BF, C1, E1, O1 e V1) foram obtidos de micoteca oficial ou isolados de efluentes e turfa das lagoas de decantação da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05 e 2005/06), sendo esses posteriormente utilizados nos estudos de produção de fenoloxidasas e de biorremediação.

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 (safra 2004/05 e 2005/06).

Isolados	Origem	Identificação
Pc	Isolado cedido pela Fundação André Tosello	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (CCT 1999)
Gc	Isolado cedido pela Fundação André Tosello	<i>Geotrichum candidum</i> (CCT 1205)
2AMB	Amostras de efluente das lagoas de decantação da ETE da Usina Coruripe (safra 2004/05).	<i>Mucor</i> sp
XXI	Amostras de turfa das lagoas de decantação da ETE da Usina Coruripe	<i>Cladosporium</i> sp
G2	Amostras de turfa das lagoas de decantação da ETE da Usina Coruripe	<i>Penicillium</i> sp
BF	Amostras de turfa das lagoas de decantação da ETE da Usina Coruripe	<i>Trichosporon</i> sp
C1	Amostras de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da Usina Coruripe	<i>Aspergillus</i> sp
E1	Amostras de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da Usina Coruripe	<i>Aspergillus</i> sp
O1	Amostras de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da Usina Coruripe	<i>Penicillium</i> sp
V1	Amostras de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da Usina Coruripe	Não identificado

O isolado 2AMB (**Figura 20**) apresentou micélio filamentoso contínuo (sem septos), cujo corpo frutífero é um esporangióforo simples sem dilatação no ápice e isolado, com ramos retos. Este produz esporangiosporos esféricos. Tal fungo foi identificado como um representante do gênero *Mucor*.

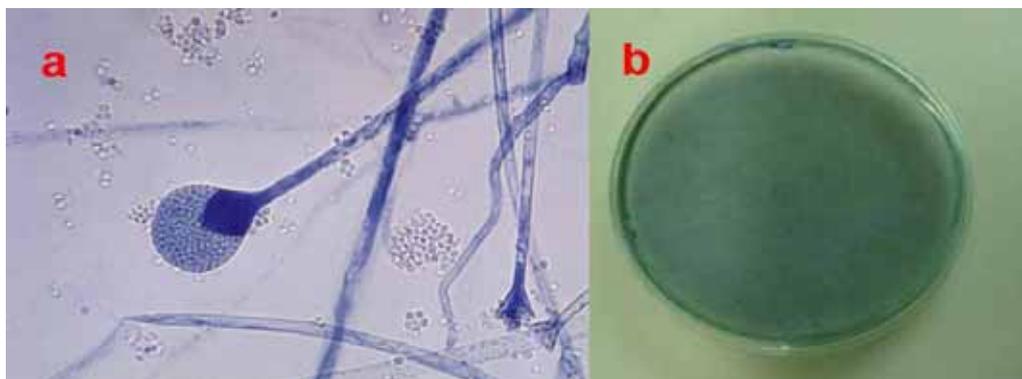


Figura 20. Aspectos morfoculturais do isolado fúngico 2AMB, obtido de efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento de efluentes da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento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

No caso do isolado XXI (**Figura 21**), o mesmo apresenta micélio septado, esporos aéreos sobre conidióforos simples sendo esses conídios catenulados e irregulares, contínuos e sub-hialinos. Tais características levaram a identificá-lo como pertencente ao gênero *Cladosporium*.

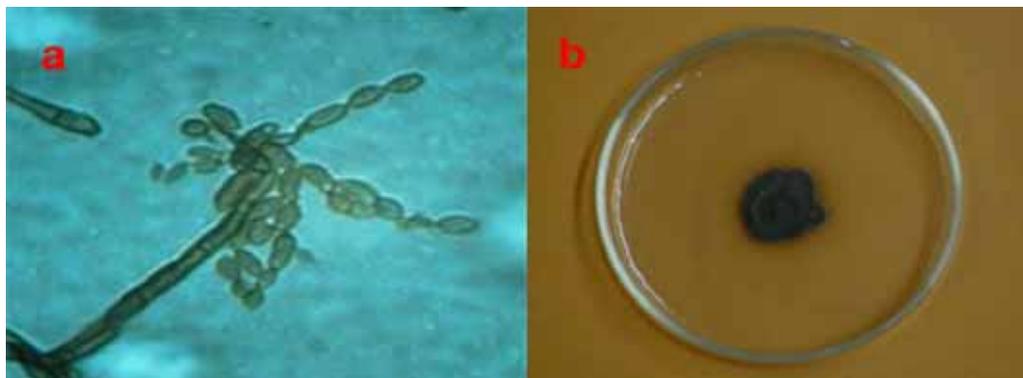


Figura 21. Aspectos morfo-culturais do isolado fúngico XXI, obtido de efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento de efluentes da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 640 X); **b)** Crescimento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

Os isolados C1 e E1 (**Figuras 22 e 23**) apresentaram características macro e microscópicas semelhantes, como micélio septado, esporos exógenos sobre conidióforos nus e ramificados com conídios agrupados em seu ápice dilatados em forma de vesícula. Isso permitiu que ambos fossem identificados como pertencentes ao mesmo gênero, isto é, *Aspergillus* (Micheli ex Link, 1809).

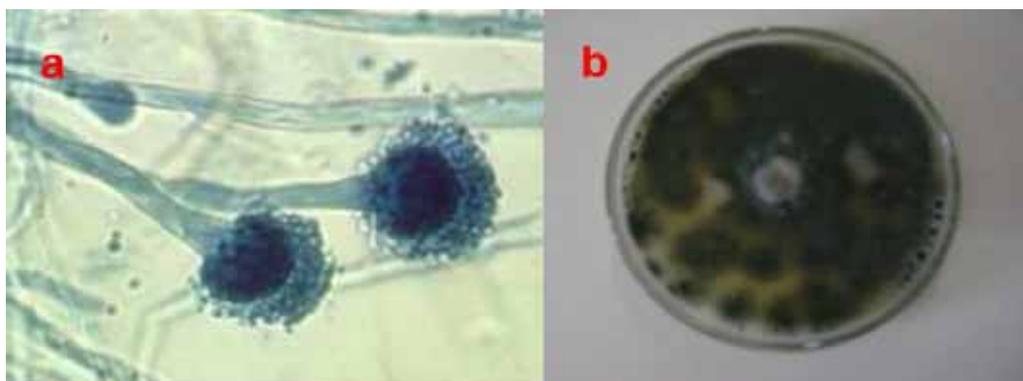


Figura 22. Aspectos morfo-culturais do isolado C1, obtido de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 640 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar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

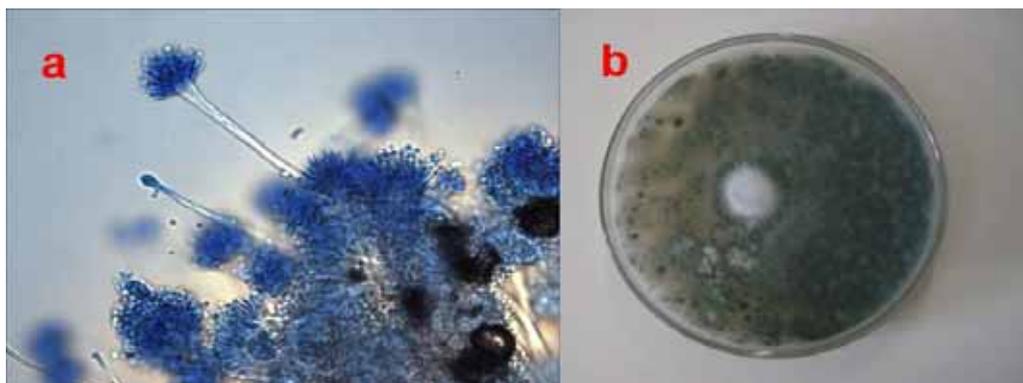


Figura 23. Aspectos morfo-culturais do isolado E1, obtido de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar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

Dois isolados (G2 e O1) (**Figuras 24 e 25**) apresentaram micélio septado, esporos exógenos sobre conidióforos nus cujos conídios catenulados acham-se agrupados no ápice e não formavam massas mucosas. O isolado G2 apresentou ramificações monoverciligadas de seus conidióforos e o isolado O1 apresentou ramificação divaricada dessa estrutura. Conforme LACAZ *et al.* (1998), ambos podem ser classificados como espécies de *Penicillium* (Link, 1809).

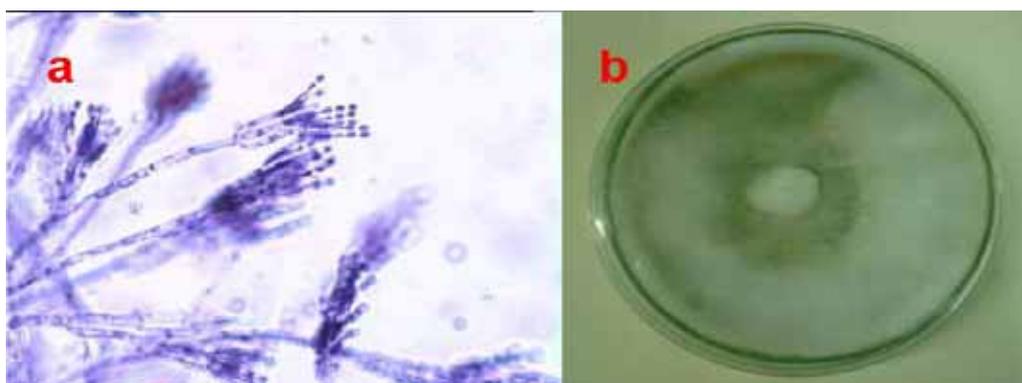


Figura 24. Aspectos morfo-culturais do isolado G2, obtido das águas residuárias da lagoa de decantação G, da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/2006). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Sabouraud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

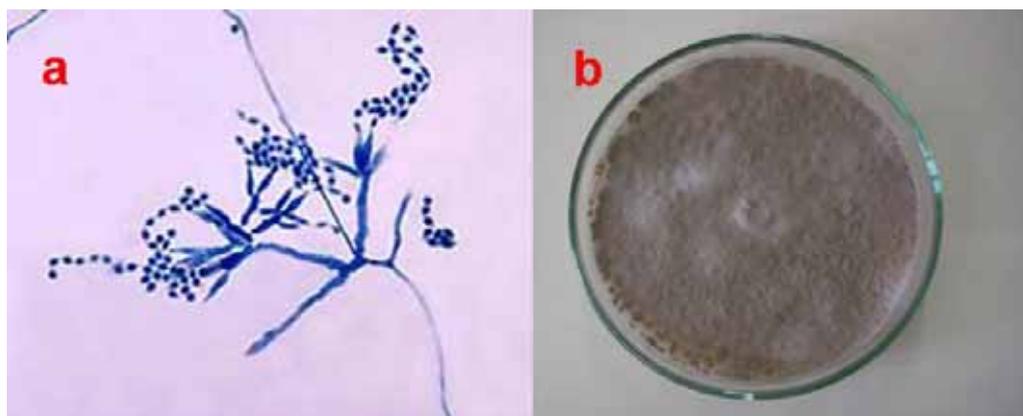


Figura 25. Aspectos morfo-culturais do isolado O1, obtido de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte (15 dias a 28 ± 2 °C, escuro).

O isolado Gc (**Figura 26**) apresenta hifas com ramificações e fragmentadas por fissão. Os fragmentos constituíam-se de artroconídios, em cadeia e hialinos. Não foram observados conidióforos ou outra estrutura. As características microscópicas observadas são compatíveis com as de *Geotrichum candidum*.

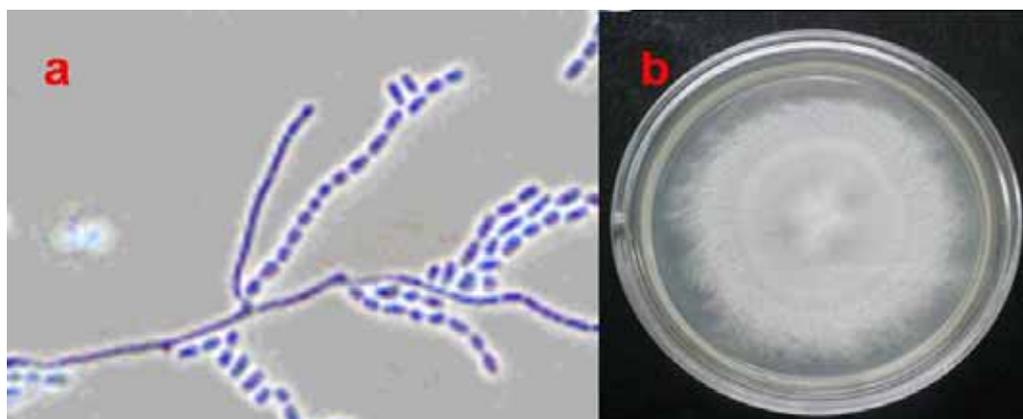


Figura 26. Isolado Gc, obtido junto à Fundação André Toselo. **a)** Estrutura microscópica sob coloração de azul de algodão de lactofenol (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte (15 dias a 28 ± 2 °C, escuro).

O isolado Pc (**Figura 27**) apresenta hifas septadas, ramificadas, com conidióforos simples e conídios elipsoidais, os quais apresentaram uma parte relacionada com a separação do mesmo com o conidióforo. As características microscópicas observadas são compatíveis com as de *Phanerochaete*

chryso sporium.



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 °C, escuro).

O isolado BF (**Figura 28**) produziu hifas abundantes, septadas e ramificadas com presença de artroconídios, os quais eram unicelulares, geralmente na forma cúbica. Tais características levaram a identificá-lo como pertencente ao gênero *Trichosporon*.

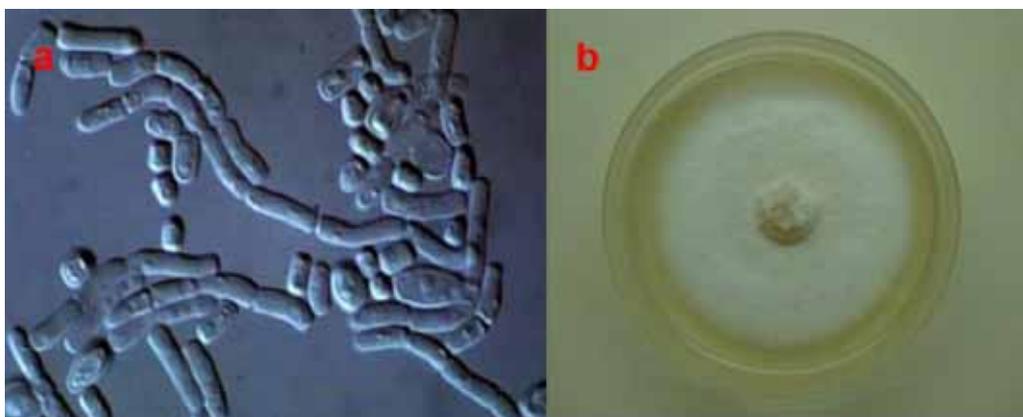


Figura 28. Aspectos morfo culturais do isolado fúngico BF, obtido de efluentes da lagoa de decantação da estação de tratamento de efluentes da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/05). **a)** Estrutura microscópica sob contraste de difração (contraste de Normansky) e coloração de azul de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

O isolado V1 (**Figura 29**) apresentou hifas hialinas, ramificadas e não septada, porém sua identificação não foi efetuada até o momento.

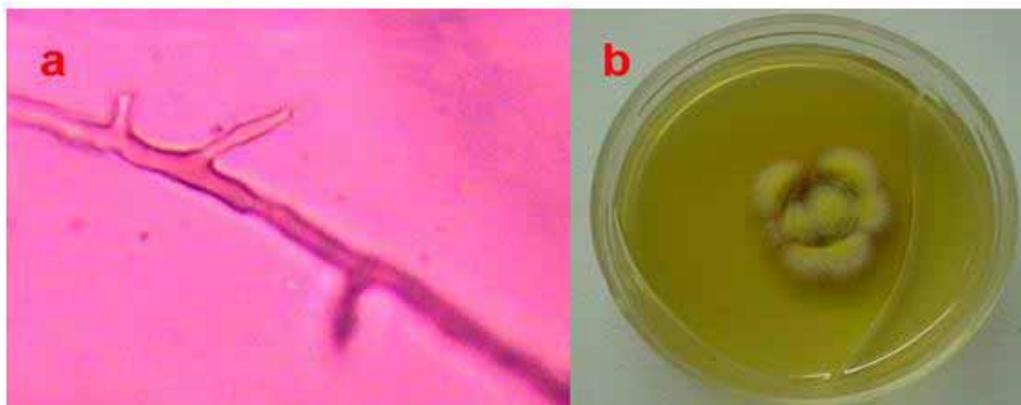


Figura 29. Aspectos morfo-culturais do isolado O1, obtido de turfa às margens das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2004/2005). **a)** Estrutura microscópica sob coloração de fucsina básica (Aumento 400 X); **b)** Crescimento micelial em meio Agar Extrato de Malte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

5.4. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS EM MEIO SÓLIDO

Os dados referentes ao crescimento micelial dos fungos estudados, em diferentes meios de cultura, estão dispostos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Média do crescimento micelial (mm/placa) dos 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 diferentes meios de cultura (7 dias de incubação a 28 ± 2 °C, escuro).

Meios	ISOLADOS FÚNGICOS									
	Diâmetro (mm) das Colônias									
	2AMB	BF	C1	E1	G2	Gc	O1	Pc	V1	XXI
AAv	90 ±0	37 ±2	90 ±0	90 ±0	90 ±0	39 ±1	25 ±1	37 ±2	32 ±1	16 ±1
AEL	82 ±1	28 ±1	90 ±0	90 ±0	90 ±0	43 ±1	75 ±1	81 ±1	35 ±0	21 ±1
AEM	90 ±0	31 ±2	90 ±0	90 ±0	90 ±0	72 ±2	90 ±0	90 ±0	38 ±0	21 ±0
Sab.	90 ±0	42 ±2	90 ±0	90 ±0	90 ±0	52 ±1	24 ±1	90 ±0	30 ±2	18 ±1

AAv= Ágar-aveia, AEL= Ágar-extrato de levedura, AEM=Agar- extrato de malte, Sab.= Ágar Sabouraud.

Dentre os meios utilizados, verificou-se que, em geral, o crescimento micelial

foi favorecido em Agar-Extrato de Malte, seguido por Ágar Sabouraud. Cerca de 40 % dos fungos tiveram menor desenvolvimento quando foram inoculados em meio Agar-aveia. O desenvolvimento dos fungos no meio Agar-Extrato de levedura só foi satisfatório para aqueles fungos que também tiveram máximo crescimento nos demais meios, isto é, 2AMB, C1, E1 e G2. CUTRIM *et al.* (2006) observaram que o cultivo de diferentes fungos, em meio Agar-Aveia apresenta produção de micélios densos e alta taxa de esporulação, enquanto que o cultivo em outras fonte sintéticas levam o inóculo fúngico a produzir micélios menos densos e, com isso, suas colônias aparentemente apresentam maior crescimento/desenvolvimento. Tais autores afirmam que os fungos utilizam melhor as fontes naturais de nutrientes, as quais possibilitam um maior estímulo para o crescimento e reprodução.

5.5. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES EM MEIO SÓLIDO

A **Tabela 8** ilustra o espectro das atividades enzimáticas testadas para os fungos utilizados no presente trabalho.

Tabela 8. Detecção das atividades enzimáticas extracelulares dos 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 diferentes meios de cultura (7 dias de incubação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro).

Isolados Fúngicos	Atividades Enzimáticas Testadas						
	Atividade Lipolítica	Atividade Amilolítica	Atividade Proteolítica	Atividade Pectinolítica	Atividade Xilanolítica	Atividade Pectinolítica	Atividade Ureolítica
2AMB (<i>Mucor</i> sp)	+	+	+	-	-	-	+
BF (<i>Trichosporon</i> sp)	+	+	+	-	+	-	-
C1 (<i>Aspergillus</i> sp)	+	+	+	-	+	-	+
E1 (<i>Aspergillus</i> sp)	+	+	+	-	+	-	+
G2 (<i>Penicillium</i> sp)	+	+	+	-	+	-	+
Gc (<i>Geotrichum candidum</i>)	+	+	+	-	-	-	+
O1 (<i>Penicillium</i> sp)	+	+	+	-	+	-	+
Pc (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)	+	+	-	-	-	-	-
XXI (<i>Cladosporium</i> sp)	+	+	+	+	+	-	+
V1	+	+	+	+	+	-	-

+ = positivo, - = negativo.

As enzimas extracelulares de fungos são de grande valor, não só para a sobrevivência em ambientes inóspitos e extremos, sendo imprescindíveis para a adaptabilidade a tais ambientes, mas para a utilização do nicho trófico para a subsistência (GOPINATH *et al.*, 2005).

O principal método de detecção de atividade enzimática extracelular de fungos é justamente o uso de meios sólidos contendo os substratos específicos para cada atividade (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975), o que permite uma rápida seleção e diferenciação entre microrganismos de um amplo espectro de populações, fornecendo dados para sua identificação (RYAN *et al.*, 2006; STRAUSS *et al.*, 2001).

Enzimas pectinolíticas ou xilanolíticas apresentam aplicações na fabricação de papel, especialmente na clivagem seletiva das ligações lignina-carboidratos. Pectinases, hemicelulases, celulases e enzimas ligninolíticas são utilizadas para alterar a superfície ou ligações vicinais, facilitando a subsequente remoção de tinta (MARQUES *et al.*, 2003), a degradação de material lignocelulósico e celulósico originário de agroindústrias e a descoloração de efluentes de indústrias papeleiras e têxteis, por exemplo (BEARY *et al.*, 2002; GILL *et al.*, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2006). Lipases e esterases podem também degradar tintas que utilizam óleos vegetais e reduzir os níveis de lipídios em qualquer tipo de efluente e solo contaminado por eles (CASTRO *et al.*, 2005).

No presente trabalho, o isolado 2AMB identificado como *Mucor* sp apresentou atividades amilolítica, lipolítica, proteolítica e ureolítica, o que corrobora estudos de ALVES *et al.* (2002), os quais mostraram que 56 isolados de *Mucor*, pertencentes a 11 táxons diferentes, foram capazes de produzir amilase (84 % dos isolados), protease (82 %), poligalacturonase (96 %) e lipase (66 %).

O isolado XXI, cujos aspectos estruturais o identificaram como uma espécie de *Cladosporium*, produziu *in vitro* as enzimas amilase, lipase, protease, xilanase, pectinálise e urease. DAS *et al.* (2004), *apud* KOHLMAYER & VOLKMANN-KOHLMEYER (2003), já haviam descrito que o gênero *Cladosporium* sp possui atividades ligninolítica, celulolítica, pectinolítica e proteolítica.

Os dois isolados fúngicos de turfa das lagoas de decantação da ETE estudada, e com características do gênero *Aspergillus*, isto é, C1 e E1, apresentaram atividades amilolítica, lipolítica, proteolítica, xilanolítica e ureolítica, conforme também observaram GOPINATH *et al.* (2005), ao estudar espécies do gênero *Aspergillus* que eram capazes de produzir amilase, celulase e protease

(hidrólise da gelatina) em meios sólidos contendo os substratos específicos.

A cepa de *G. candidum* obtida da “Fundação André Tosello”, por sua vez, apresentou *in vitro* capacidade de degradar amido, mono-oleato de polioxietileno, gelatina e uréia. BERTOLINI *et al.* (1994) já havia purificado e caracterizado geneticamente as diferentes isoformas de lipase produzidas por diferentes cepas de *G. candidum*. Diferente do obtido no presente estudo, RODIONOVA *et al.* (2001) detectaram a produção de xilanase, pectinase, e celulase pela cepa 3C de *G. candidum*, sendo que o pico de produção de xilanase ocorreu a 72 h, o máximo de produção de pectinases ocorreu entre 52-66 h da inoculação, e a produção de celulase foi detectada entre 8-28 h de incubação. É possível que a cepa ora estudada necessite de algum indutor, além do substrato específico, para a expressão dos genes que codificam para xilanase e pectinases (liase e poligalacturonase).

Quanto ao isolado de *P. chrysosporium* obtido da coleção de culturas da “Fundação André Tosello”, nas condições do experimento *in vitro* aqui relatado, apresentou apenas atividade amilolítica e lipolítica. ROLDAN-CARRILLO *et al.* (2003), verificaram a produção de amilase por *P. chrysosporium* durante crescimento sobre bagaço de cana. A secreção de lipase por *P. chrysosporium*, isolado de plantações de *Eucaliptus* e *Pinus*, do sul da África, foi verificada por DE KOKER *et al.* (2000).

O isolado BF, cujos aspectos estruturais o identificaram como uma espécie de *Trichosporon*, produziu *in vitro* as enzimas lipase, amilase, protease e xilanase. SUZZI *et al.* (2003) detectaram as atividades lipolítica e proteolítica de isolado de *trichosporon* que ocorrem naturalmente em Manteca (produto, à base de queijo, de algumas regiões do sudeste da Itália), enquanto DE MOT & VERACHTERT (1986), utilizando β -ciclodextrina como indutor, evidenciaram a produção de amilase por *Trichosporon* e outras leveduras. A xilanase de um isolado de *Trichosporon* foi utilizada por WEN *et al.* (1999), em ensaios de caracterização dos grupamentos essenciais para a atividade enzimática.

Os isolados G2 e O1, identificados como pertencentes ao gênero *Penicillium*, produziram as enzimas xilanase, protease, lipase, amilase e urease, nos ensaios *in vitro*. LUDEMANN *et al.* (2004) avaliaram a produção de lipase e protease por 13 isolados do gênero *Penicillium*; os ensaios demonstraram que todos os isolados foram capazes de produzir ambas enzimas. RAY (2001), verificou a produção de

amilase e xilanase por *Penicillium* sp (RR 99), o qual apresentou o máximo de produção de amilase com 4 dias e de xilanase com 6 dias de cultivo. A produção de urease por *Penicillium* foi evidenciada por WONG *et al.* (2001), ao avaliarem 32 isolados desse gênero.

5.4. SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE FENOLOXIDASE

A **Tabela 9** ilustra a produção de fenoloxidase pelos fungos utilizados no presente trabalho. Com base no ensaio do crescimento em meio azul de metileno (Cloreto de 7-dimetilaminofenotiazin-3-ilideno-dimetil-azanio), verde malaquita {4-[(4-dimetilaminofenil)-fenil-metil]-N,N-dimetil-anilina}, cristal violeta (Cloreto de *N*-(4-{bis[4-(dimetilamino)-fenil]metileno} ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-etilmetanaminio) e azure B (3-Dimetilamino-7-metilimino-3H-fenotiazina hidrocloreto), apenas o fungo do gênero *Cladosporium* descoloriu os corantes na concentração em que estavam presentes nos meios de cultivo (**Figura 30**).

Tabela 9. Detecção da produção de fenoloxidase 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 $28 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro). Os valores entre parênteses referem-se ao tamanho médio das colônias e dos halos de descoloração (mm).

ISOLADOS	Azure B	Azul de metileno	Cristal violeta	Verde malaquita
XXI (<i>Cladosporium</i> sp)	+ (12; 1,5)	+ (12; 2)	+ (12; 2,2)	+ (11,5; 1,5)
2AMB (<i>Mucor</i> sp)	-	-	-	-
BF (<i>trichosporon</i> sp)	-	-	-	+ (13,2; 0)
Pc (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)	-	-	-	-
Gc (<i>Geotrichum candidum</i>)	-	-	-	+ (35,1; 0)
O1 (<i>Penicillium</i> sp)	* (23,3; 0)	* (23,4; 0)	-	-
E1 (<i>Aspergillus</i> sp)	-	-	-	-
C1 (<i>Aspergillus</i> sp)	-	-	-	-
G2 (<i>Penicillium</i> sp)	-	-	* (22,3; 0)	* (45,6; 0)
V1	-	-	-	-

+ = crescimento com halo de descoloração além do diâmetro da colônia;
 - = crescimento sem descoloração; * = crescimento com descoloração, sem halo além do diâmetro da colônia.

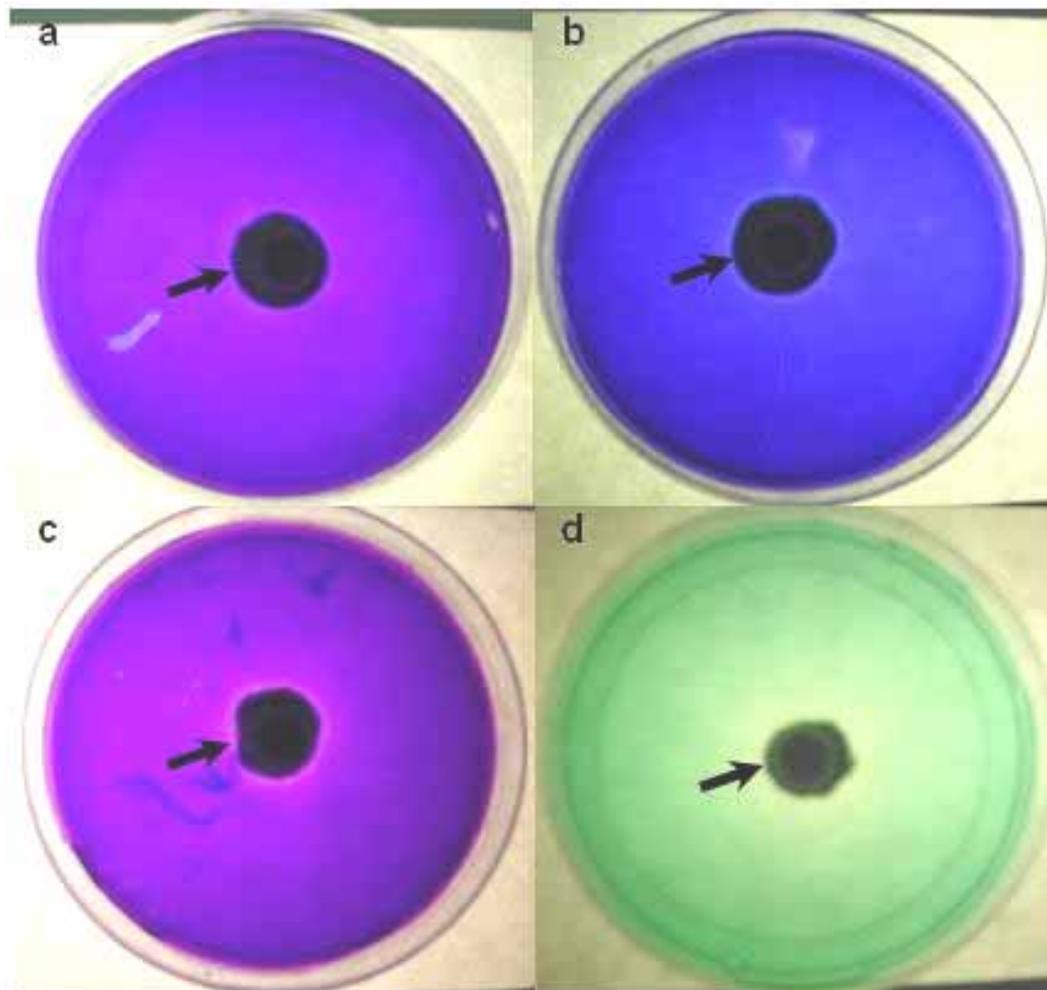


Figura 30. Produção de fenoloxidasas pelo isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios de cultura (7 dias de incubação a 28 ± 2 °C, escuro) contendo diferentes azocorantes. **a)** azure B; **b)** azul de metileno; **c)**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

A ação da lignina peroxidase na descoloração de corantes é amplamente divulgada na literatura. Dezoito isolados fúngicos capazes de degradar materiais lignocelulósicos e derivados de lignina foram testados por HEINFLING *et al.* (1997) quanto à sua capacidade de descolorir os azocorantes Laranja Reativo 96 (*reactive orange*), Violeta Reativo 5 (*reactive violet*) e Preto Reativo 5 (*reactive black*). Dentre os isolados estudados, os que revelaram-se positivos mediante os compostos testados foram apenas aqueles dos fungos *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor* e *P. chrysosporium*. GILL *et al.* (2002) também utilizaram 9 isolados de fungos da “podridão branca” de madeiras, conhecidos por sua capacidade lignolítica, em ensaios de descoloração dos corantes Verde Brilhante, Vermelho de Cresol, Cristal

Violeta, Vermelho Congo e Laranja II (*Orange II*). Verificaram que *Dichomitus squalens*, *Phlebia fascicularia* e *P. floridensis* descoloriram todos os corantes no meio sólido e, em meio líquido limitado em nitrogênio, apresentaram maior capacidade de descoloração do que *P. chrysosporium*. Por outro lado, PAZARLIOGLU *et al.* (2005) avaliaram a habilidade de isolamento do fungo *P. chrysosporium*, imobilizado em polímero ativado com $ZrOCl_2$, em descolorir nove azocorantes diferentes estruturalmente em culturas estacionárias. O corante Azul direto 15 (DB15, 1210 mg/L) foi o que melhor induziu a atividade enzimática. Ensaio similares em reator de leito parado levaram à taxa de 95-100 % de descoloração do mesmo corante. No presente trabalho, o isolado desse fungo não apresentou capacidade de degradar os azocorantes testados.

CLAUS *et al.* (2002) verificaram que, embora tenham sido encontradas lacases de *T. versicolor*, *Polyporus pinisitus* e *Myceliophthora thermophila* com capacidade de descolorir altas taxas de corantes derivados de antraquinonas, o azocorante Vermelho Congo (*Direct Red 29*) foi um substrato fraco para lacases. KAMIDA *et al.* (2005) avaliaram a descoloração, pelo fungo *Pleurotus sajor-caju*, de efluente da ETE de uma indústria têxtil em Americana (São Paulo), contendo o corante índigo. Verificaram que o pico de produção de lacases e peroxidases deu-se no 9º dia de incubação, e a descoloração do efluente foi total após 14 dias de incubação, indicando a ação dessas enzimas sobre o corante. ZHAO *et al.* (2006) verificaram a ação do fungo *P. ostreatus* sobre o azocorante “*Orange 3*”, [4-(4-nitrofenilazo) anilina], constatando cerca de 10-15 % de descoloração e produção de uma série de metabólitos na cultura utilizada.

O azul de metileno, bem como os corantes azure B, cristal violeta e verde malaquita, revelaram-se ótimos substitutos do corante Poly R 478 no método de seleção de microrganismos produtores de fenoloxidase descrito por DHOUIB *et al.* (2005).

O método utilizado permitiu selecionar o fungo com maior potencial de produção de enzimas ligninolíticas; tal produção foi evidenciada pela descoloração do meio contendo cada corante empregado e o melhor produtor foi selecionado por ter descolorido todos os quatro corantes. Conforme descrito por DHOUIB *et al.* (2005), os fungos que não apresentavam descoloração do meio contendo o corante utilizado foram considerados como não produtores da enzima.

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

Os resultados dos ensaios realizados conforme descrito no item 4.5 estão descritos nas Figuras 31-35.

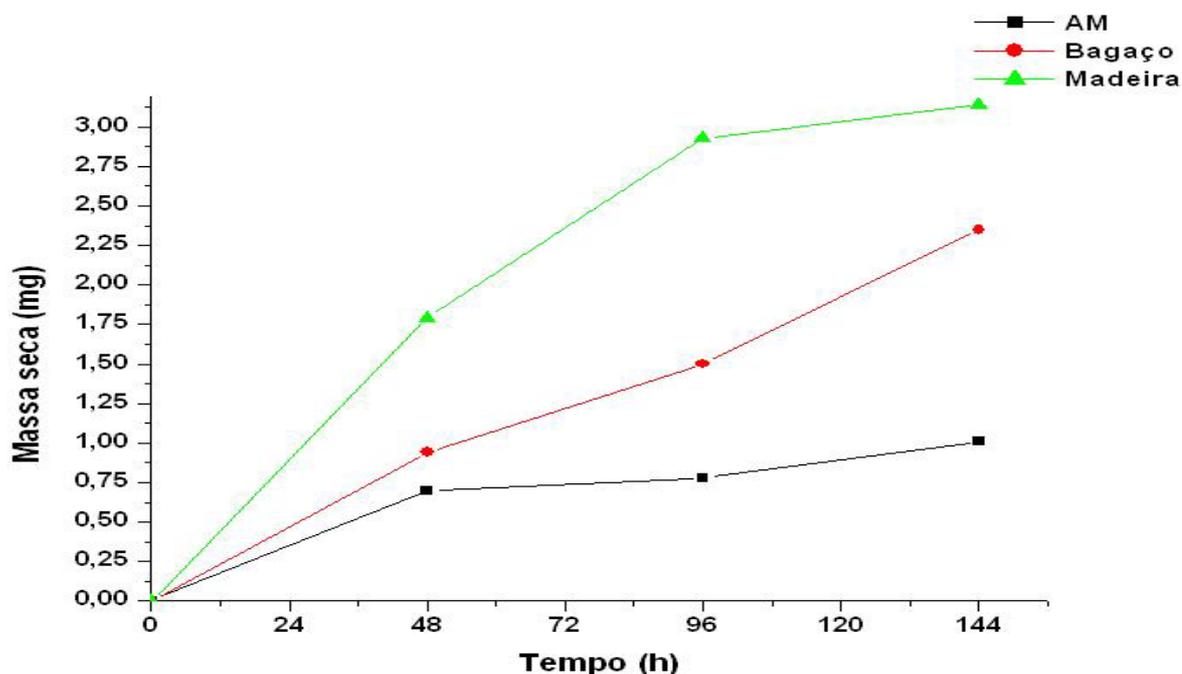


Figura 31. Massa seca ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de fenoloxidase, a 100 rpm, $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro.

Com relação à taxa de crescimento do fungo *Cladosporium* sp nos meios avaliados (**Figura 31**), o melhor desenvolvimento ocorreu no meio contendo serragem de madeira, seguido pelo meio contendo bagaço de cana. Provavelmente, nesses meios o fungo pode produzir mais enzimas lignocelulolíticas, apresentando maior concentração de monômeros nutrientes, visto que no meio contendo azul de metileno, com crescimento menos expressivo, as concentrações de glicídios redutores (**Figura 32**) e proteínas totais (**Figura 33**), além de DQO (**Figura 35**), é que foram gradualmente reduzidas ao longo do tempo.

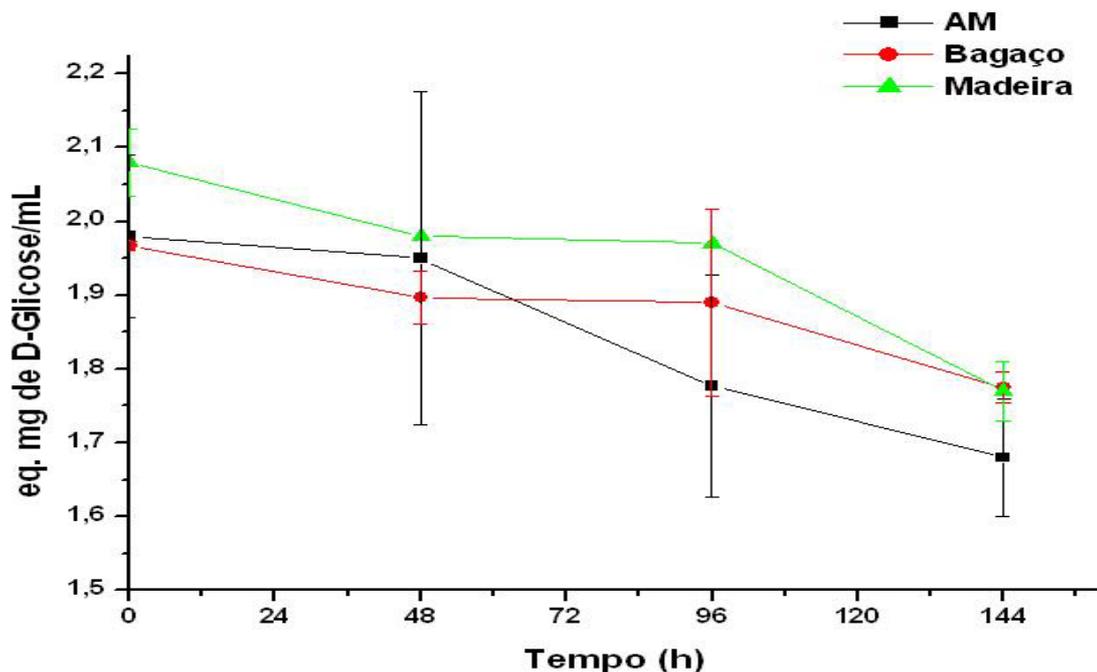


Figura 32. Consumo de glicídios redutores totais (eq. mg glicose/mL) ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de fenoloxidase, a 100 rpm, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro.

Assim, verificou-se pouco consumo de glicídios redutores pelo isolado de *Cladosporium* sp nas primeiras 48 h de incubação em meio AM (**Figura 32**), possivelmente devido a adaptabilidade do isolado à substância recalcitrante (azul de metileno) (KONONOVA & NESMEYANOVA, 2002). Após esse período, o consumo desses glicídios foi contínuo. Contudo, nas culturas em bagaço de cana e madeira, com crescimento mais expressivo do fungo, observou-se lenta remoção de glicídios redutores (**Figura 32**) entre 0 e 48 h, e depois, mais acentuada entre 96 e 144 h, embora não no mesmo patamar da cultura contendo azul de metileno.

É provável que ao produzir lignocelulases nos meios contendo fontes naturais de lignocelulose (bagaço e madeira), o fungo dispôs de maior concentração de monossacarídeos desse tipo em seu meio de cultivo, apresentando uma concentração total de glicídios redutores proporcionalmente maior do que no meio AM e especialmente entre 48 e 96 h de cultivo, período estacionário do crescimento em AM mas progressivo nos demais meios.

Por outro lado, nesse mesmo meio (AM), a alteração na concentração de

fenóis totais ao longo de 144 h de cultivo (**Figura 34**) foi proporcionalmente tão baixa quanto aquela do meio contendo bagaço de cana.

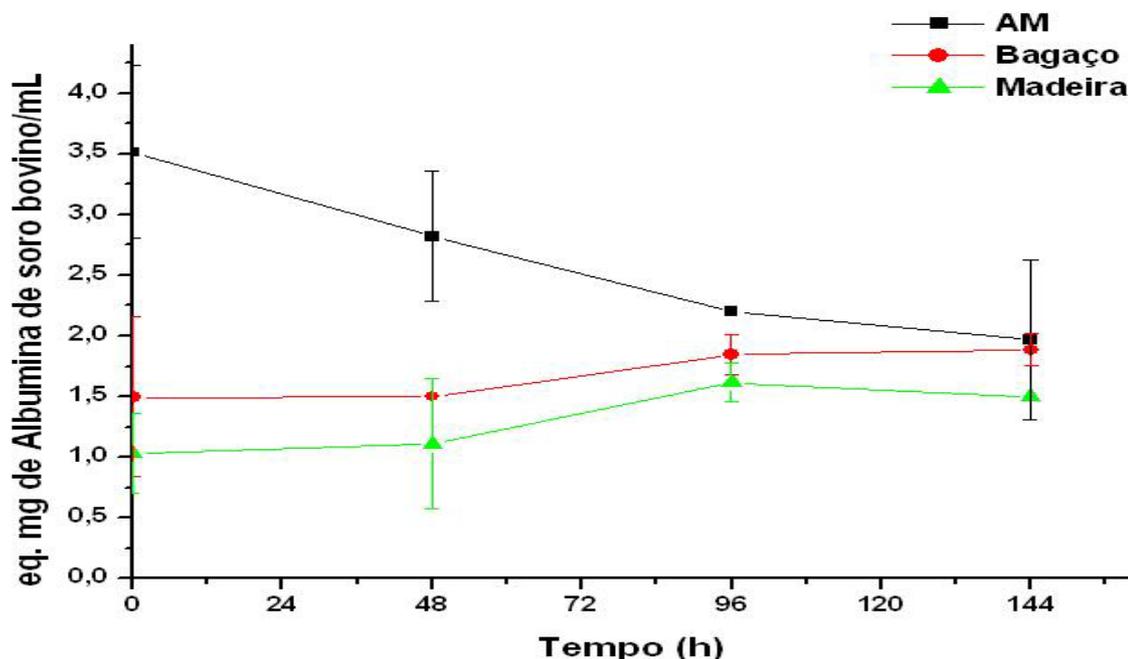


Figura 33. Concentração de proteínas totais (eq. mg albumina de soro bovino/mL) ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de fenoloxidase, a 100 rpm, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro.

Simultaneamente, a remoção de proteínas totais (**Figura 33**) no meio AM foi progressiva ao longo do tempo de cultivo, indicando que o fungo possivelmente consumiu mais compostos nitrogenados do que secretou nesse período em termos de enzimas extracelulares. Porém, nas culturas contendo bagaço de cana e madeira ocorreu aumento da concentração desses compostos, especialmente entre 48 e 96 h, exatamente na maior faixa de seu crescimento.

KEREM *et al.* (1992) relataram que ao longo do tempo de cultivo dos fungos *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* em material lignocelulósico, tais fungos secretam proteínas solúveis. ALBORÉS *et al.* (2006) também verificaram aumento na concentração de proteínas de 0 a 14 dias de cultivo de *Pleurotus* spp em resíduos agroindustriais.

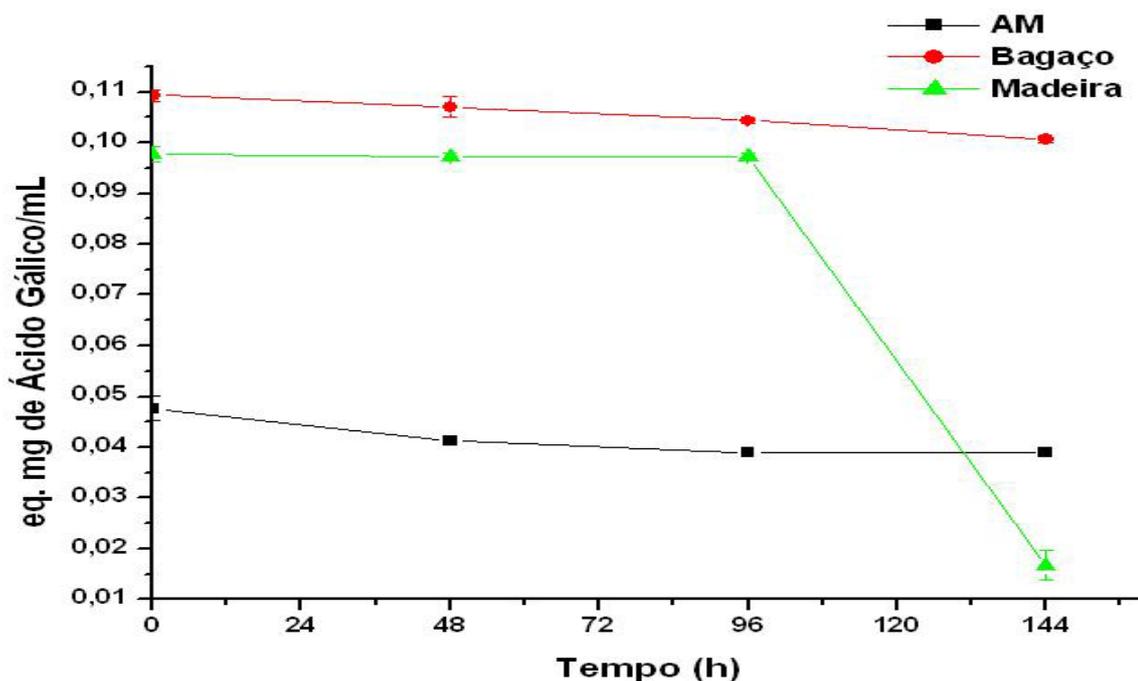


Figura 34. Concentração de fenóis totais (eq. mg ácido gálico/mL) ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de fenoloxidase, a 100 rpm, $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro.

Embora nas culturas contendo madeira tenha ocorrido redução drástica da concentração de fenóis totais (**Figura 34**), entre 96 e 144 h, indica a produção de uma ou mais fenoloxidasas capazes de degradar resíduos de lignina. A remoção de fenóis nas culturas contendo bagaço e azul de metileno foi muito reduzida durante as 144 h de incubação, indicando que não houve produção dessas enzimas durante o período estudado.

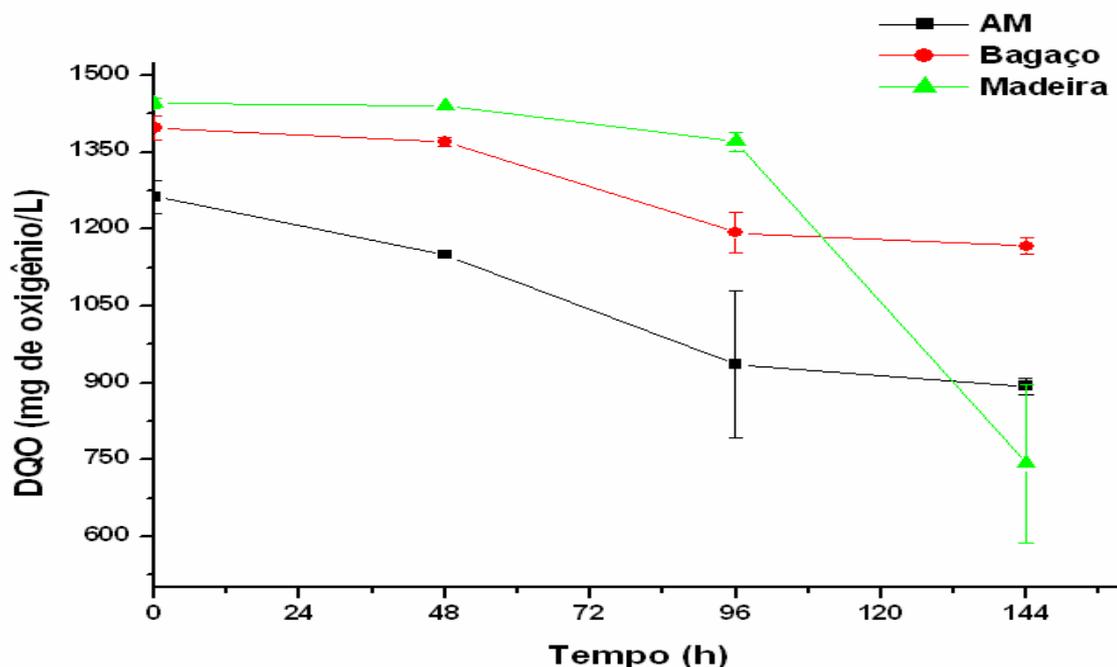


Figura 35. Concentração de DQO (mg de oxigênio consumido/L de meio) ao longo do tempo de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios contendo diferentes fontes fenólicas (azul de metileno, bagaço de cana, serragem de madeira), para a produção de fenoloxidase, a 100 rpm, $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro.

A remoção da DQO (**Figura 35**) entre 0-96 h foi mais acentuada nas culturas de *C. sp* sobre AM e bagaço de cana. Porém, nas culturas contendo madeira, a remoção da DQO foi mais drástica entre 96 e 144 h, coincidindo com o máximo de remoção de glicídios redutores, proteínas e fenóis totais na mesma cultura contendo madeira.

As taxas de remoção de DQO foram de 46,4 %, 30,8 % e 21,4 %, respectivamente sobre madeira, AM e bagaço de cana (**Figura 35**).

Em escala piloto, RAGUNATHAN & SWAMINATHAN (2004) estudaram a habilidade dos fungos *Pleurotus sajor-caju*, *P. platypus* e *P. citrinopileatus* em remover DQO de efluente de indústria papeleira, verificando que *P. ostreatus* apresentou o melhor desempenho, isto é, 61,3 % de remoção em 10 dias de tratamento. WU *et al.* (2005) também estudaram o tratamento de efluente de indústria de papel, porém avaliaram o efeito individual de 5 fungos da “podridão branca” (*P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *Lentinus edodes*, *T. versicolor* e o isolado S22), sendo que a máxima eficiência dessa remoção (cerca de 48 %) foi obtida

pelos fungos *P. chrysosporium* e *P. ostreatus*, aos 10 dias de cultivo.

Comparando-se os dados de remoção obtidos pelo isolado de *C. sp* estudado com os obtidos pelos fungos acima citados verifica-se que o isolado estudado apresenta um bom potencial de remoção de DQO, uma vez que nos trabalhos mencionados a remoção ocorreu com 10 dias de cultivo e nos ensaios realizados considerou-se apenas 6 dias de cultivo.

Com relação à metodologia, verificou-se que o Azure B mostrou-se mais eficiente que a oxidação do álcool veratrílico, visto que, entre outras vantagens, o corante não é descolorido sob as condições biológicas e ambientais usuais e nem é oxidado por álcool oxidases e o álcool veratrílico é oxidado apenas pela lignina peroxidase e por aril álcool oxidases (KHINDARIA *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2001).

Porém, em virtude da remoção de fenóis observada nas culturas de *Cladosporium sp* contendo madeira, entre 96-144 h de cultivo, conclui-se que outra enzima lignolítica pode ter sido produzida, como a lacase (E.C. 1.10.3.2), por exemplo (GIANFREDA *et al.*, 1999; BALDRIAN, 2005).

CHÁVEZ-LÓPEZ *et al.* (2005) cultivaram *Cladosporium cladosporioides* em meio líquido com e sem adição de fenantreno, verificando que o fungo produziu lacase nas duas condições, porém, sem a adição de fenantreno a atividade enzimática máxima ocorreu 84 h após a inoculação (1,01 U/g de peso seco), e, nas culturas contendo o composto, a atividade máxima da lacase foi maior e ocorreu com 72 h de incubação (3,09 U/g de peso seco).

Considerando-se que a enzima LiP, associada à remoção de fenóis, faz parte do metabolismo secundário e sua produção, portanto, só ocorre em condições limitantes de carbono e nitrogênio (KLUCZEK-TURPEINEN *et al.*, 2003), é possível que não tenha sido detectada pelos métodos descritos por ARCHIBALD (1992) e por TIEN & KIRK (1983) por que ainda havia razoável disponibilidade de glicídios e proteínas no final do intervalo de tempo avaliado (144 h).

Tal intervalo de 144 h de cultivo foi estabelecido não somente porque nos ensaios em meio sólido detectou-se o halo de degradação de azocorantes entre 96-120 h de incubação, mas também por que há relatos de secreção dessa enzima pelos fungos *Oxyporus latemarginatus*, *Trametes trogii* e *Polyporus sp*, através de diferentes indutores, a partir do quarto ou quinto dia de cultivo em meio líquido (DHOUIB *et al.*, 2005).

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

As **Figuras 36** e **37** ilustram a biomassa, decréscimo do corante, Condutividade Elétrica e pH dos filtrados das culturas de *Cladosporium* sp em meio AM.

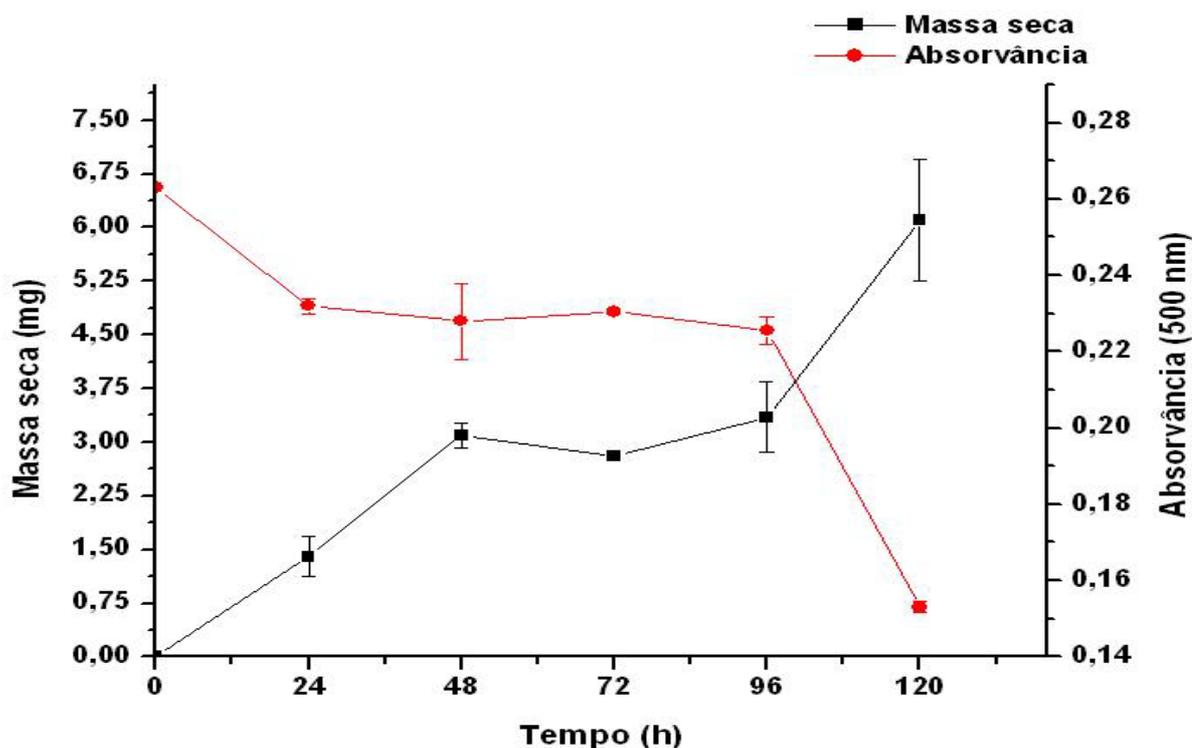


Figura 36. Massa seca e absorvância (500 nm) do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), cultivado em meio líquido [sob agitação (100 rpm) a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro] contendo azul de metileno.

Um decréscimo na absorvância dos filtrados de cultura de *Cladosporium* sp em meio líquido contendo azul de metileno (**Figura 36**), a partir de 96 h, indicou que uma vez adaptado à substância recalcitrante, como observado para o crescimento (**Figura 31**), o fungo provavelmente passou a expressar as enzimas degradadoras da mesma e juntamente com os demais nutrientes, utilizou-a para o desenvolvimento (KONONOVA & NESMEYANOVA, 2002).

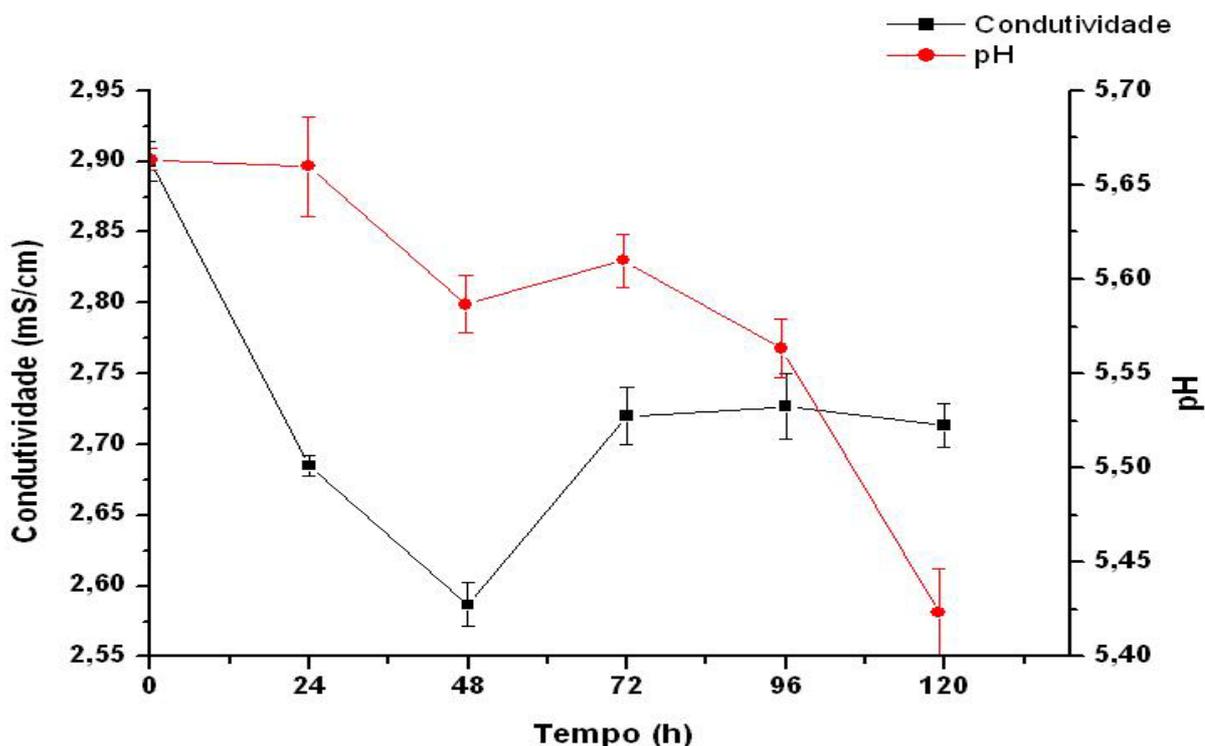


Figura 37. Condutividade elétrica e pH de cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp), de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), cultivado em meio líquido [sob agitação (100 rpm) a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro] contendo azul de metileno.

A condutividade elétrica (**Figura 37**) das culturas de *Cladosporium* sp em meio AM diminuiu durante as primeiras 48 h de cultivo, elevando-se ligeiramente até 72 h, e permanecendo constante a partir de então. Também verificou-se que o pH das culturas (**Figura 37**) diminuiu mais expressivamente nas 48 h iniciais de incubação, e após 96 h, face à liberação de íons H^+ a partir da oxidação do corante e formação de metanol (**Figura 38**).

Durante a ação de enzimas lignolíticas, espécies radiculares intermediárias são formadas, o que está relacionado com o aumento temporário de íons, e, portanto, da condutividade (KAPICH *et al*, 1999).

YESILADA *et al.* (1998), observaram decréscimo do pH nas primeiras 48 h de cultivo de *Coriolus versicolor* em meio contendo o corante *Orange II*, seguindo-se um ligeiro aumento desse pH até 72 h. O mesmo comportamento foi observado no cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp) aqui estudado.

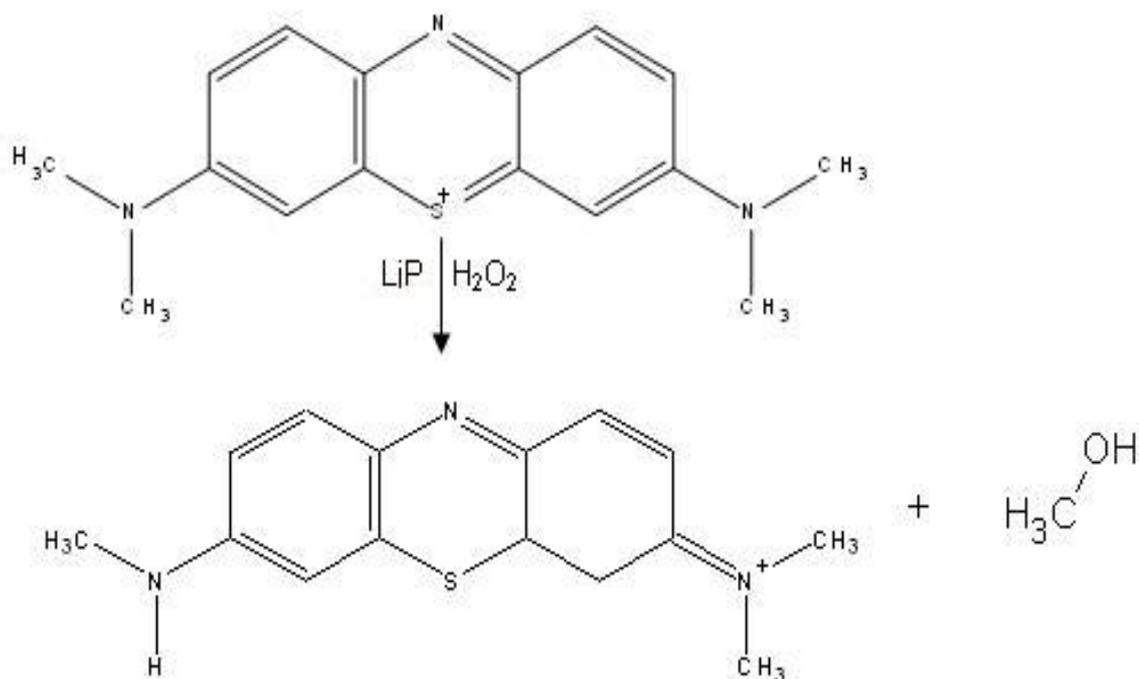


Figura 38. Reação geral da degradação de Azul de Metileno por lignina-peroxidase (LiP), sem indicação das espécies radiculares intermediárias.

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

Nas culturas para seleção de fungos produtores de tanase (**Figura 39**), cujos meios continham 2 % de ácido tânico, verificou-se que apenas os isolados dos fungos *Mucor* sp e *P. chrysosporium* (**Figura 39 g-h**, respectivamente) não se desenvolveram. No caso do isolado de *P. chrysosporium*, seu crescimento em cultura contendo ácido tânico já fora relatado, embora numa concentração de apenas 0,5 % desse fenol (PILDAIN, *et al.*, 2005). É provável, portanto, que a alta concentração desse composto tenha sido limitante para o crescimento de ambos os fungos sob as condições de cultivo, levando-se em conta, inclusive, a pressão osmótica do meio (GUIMARÃES-BEELLEN *et al.*, 2006).

Quanto aos demais isolados fúngicos testados, especialmente *Trichosporon* sp, *Penicillium* sp, V1 e *Geotrichum candidum*, estes ou degradaram ou toleraram a concentração do ácido fenólico presente. No caso do isolado de *Cladosporium* sp, verificou-se a presença de halo de descoloração do ácido tânico do meio ao redor da colônia (**Figura 40**).

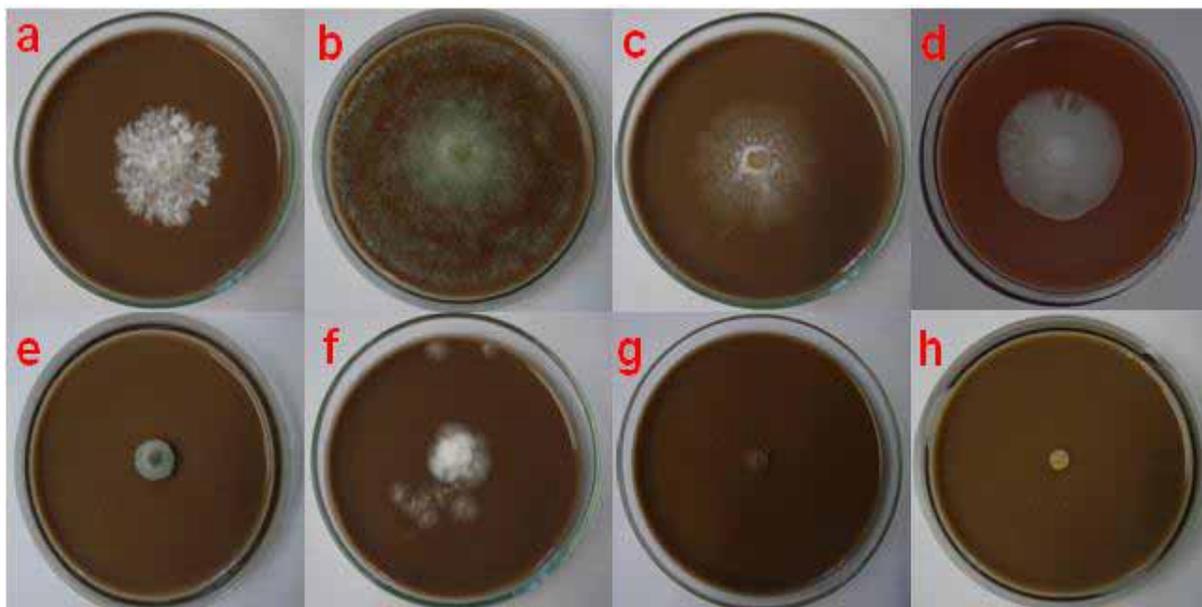


Figura 39. Culturas dos fungos isolados de águas residuárias e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, em meio contendo ácido tânico (2 %) como única fonte de carbono ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro) após 15 dias de incubação **a)** *Trichosporon* sp (BF), **b)** *Penicillium* sp (G2);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

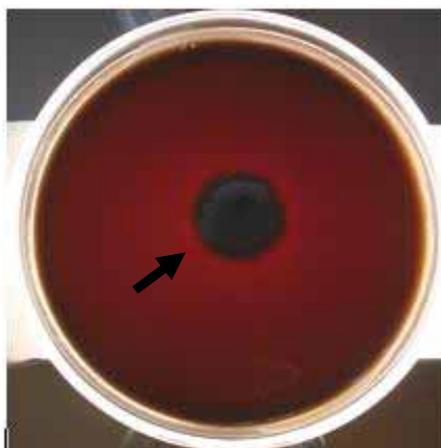


Figura 40. Descoloração do meio ácido tânico (2 %) sólido pelo isolado XXI (*Cladosporium* sp), de águas da lagoa de decantação da estação de tratamento de efluentes da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), após 30 dias de incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro).

PINTO *et al.* (2001) verificaram o crescimento micelial de trinta cepas de *Aspergillus* sp em meio sólido contendo ácido tânico a 1 %, por 72 h a 32°C ,

havendo dificuldade na detecção da tanase através do halo de descoloração, o que os levou, como já tinha ocorrido com BRADDOO *et al.* (1996), a avaliar a produção de tanase pelo diâmetro da colônia. Após a seleção, utilizaram quatro cepas mutantes de *Aspergillus niger* (28, 3T588, 11T25A5 e 11T53A9) em fermentação semi-sólida, e quantificaram a atividade da enzima. Verificaram que a cepa 11T25A5 apresentou a melhor atividade, isto é, 67,5 U.g⁻¹/72 h de fermentação. LEKHA & LONSANE (1997) induziram a produção de tanase por *Penicillium* spp a partir do uso de ácido tânico ou ácido gálico como indutores, mas não correlacionaram tal síntese com o crescimento micelial das colônias.

No presente trabalho, o isolado XXI (*Cladosporium* sp) foi o único que apresentou uma zona clara em torno da colônia, após 30 dias de cultivo (**Figura 40**), sendo este halo indicativo da produção de tanase.

A formação de halo por *Cladosporium cladosporioides* e *C. herbarum*, em meio contendo tanto ácido gálico como tânico, já foi descrita por CONCEIÇÃO *et al.* (2005) *appud* MINOURA & OKAZAKI (1968).

5.6.2. Remoção de ácido tânico em meio líquido

As **Figuras 41** e **42** apresentam o aspecto do crescimento dos fungos estudados quando cultivados em meio líquido contendo ácido tânico (2 %) por 30 dias.



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 °C, no escuro. B= controle.



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 °C, no escuro. B= controle.

Conforme a **Figura 43**, verificou-se que os isolados de *Aspergillus* sp (C1 e E1), *Cladosporium* sp (XXI), V1 e *Penicillium* sp (O1) apresentaram maiores taxas de remoção de ácido tânico em meio líquido nas condições e período estudados.

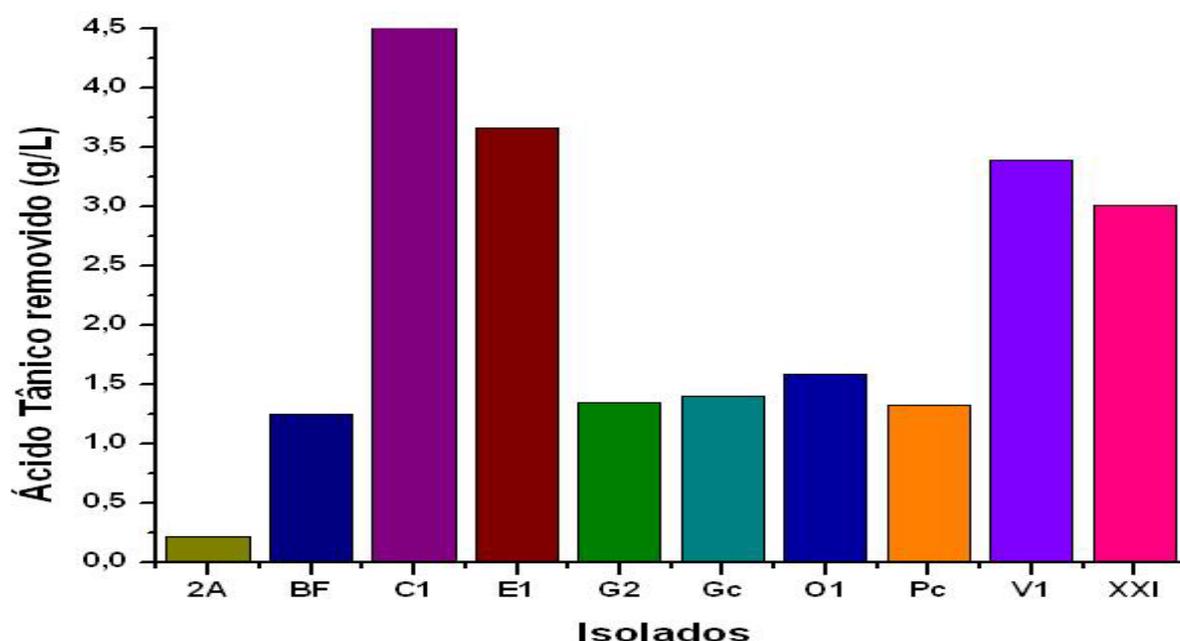


Figura 43. Remoção de ácido tânico pelos isolados fúngicos obtidos ou de micoteca oficial ou de amostras de efluentes e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05 e 2005/06), em meio líquido contendo 2 % de ácido tânico, após 30 dias de incubação a 28 ± 2 °C, no escuro.

O desenvolvimento dos fungos *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum* e *Penicillium* sp em meio líquido contendo estruturas moleculares semelhantes às do ácido gálico já foram descritos por RÖSCH & LIESE, 1971 appud CONCEIÇÃO *et al.*, 2005. DONNISON *et al.* (2000) também relataram a produção de fenoloxidasas e peroxidases de espécies fúngicas de *Cladosporium* e *Phoma* isoladas de solos na Inglaterra.

Por outro lado, durante o desenvolvimento dos isolados fúngicos de *Aspergillus* sp e *Cladosporium* sp em meio líquido contendo 0,4 % de ácido tânico (100 rpm), obteve-se a redução da concentração de taninos totais (**Figura 44**) e DQO (**Figura 45**), sendo que o isolado de *Aspergillus* sp apresentou uma taxa de remoção maior entre 0 e 48 h e o isolado de *Cladosporium* sp apresentou uma redução progressiva durante todo o período de incubação. O fungo *Cladosporium* sp obteve uma remoção de cerca de 12 % de DQO do meio (**Figura 45**), enquanto que *Aspergillus* sp, apenas 9,3 %.

Porém, após 168 h de incubação, ambas as culturas apresentavam a mesma concentração final de fenóis (1,14 eq. g de ácido gálico/L), conforme **Figura 44**.

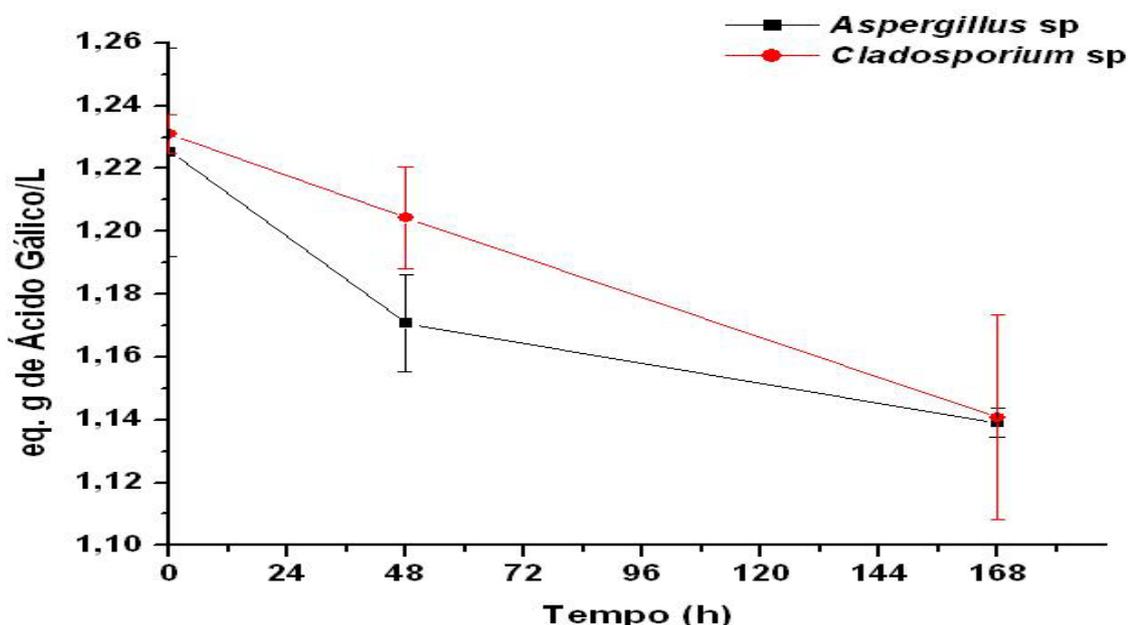


Figura 44. Remoção de ácido tânico em meio líquido contendo 0,4 % de ácido tânico, pelos fungos *Aspergillus* sp e *Cladosporium* sp, obtidos das amostras de turfa e efluente da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, nas safras 2004/05 e 2005/06, após 168 h de incubação a 28 ± 2 °C, no escuro.

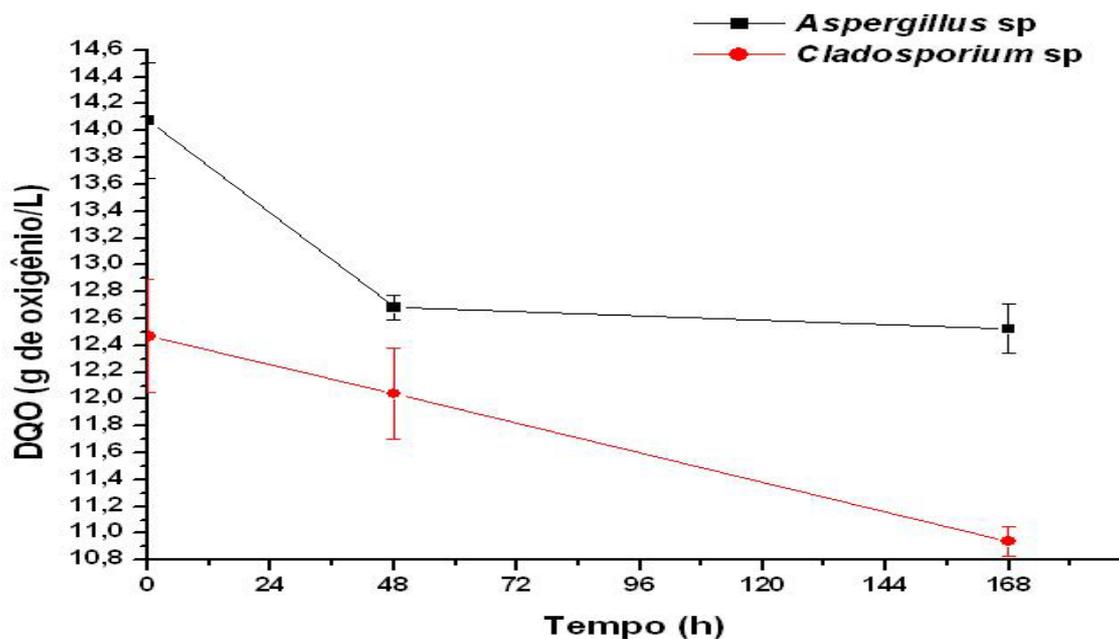


Figura 45. Remoção da DQO em meio líquido contendo 0,4 % de ácido tânico, pelos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp*, obtidos das amostras de turfa e efluente da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, nas safras 2004/05 e 2005/06, após 168 h de incubação a 28 ± 2 °C, no escuro.

YESILADA *et al.* (1999), trabalhando com águas residuárias do processamento de azeite de oliva e seu tratamento com *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*, *P. chrysosporium* ME446, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *Lentinus tigrinus* e *Laetiporus sulphureus*, verificaram alta remoção de cor, fenóis e DQO. O efluente estudado tinha como característica a coloração preta devida à alta concentração de polifenóis (taninos, lignina e etc). AISSAM *et al.* (2005) verificaram que o crescimento do fungo *Aspergillus niger* HA37 em efluentes da indústria de azeite de oliva (diluído 4 vezes) estava correlacionado com a degradação de 70 % dos compostos fenólicos presentes.

A produção da tanase por esse isolado foi também avaliada pelos autores em um meio líquido sintético contendo diferentes concentrações de ácido tânico, sendo verificado que o máximo de atividade aumentou proporcionalmente com a concentração de ácido tânico utilizado, isto é, com 0,2 %, 0,5 % e 1 % desse composto conseguiu-se, respectivamente, 0,6, 0,9 e 1,5 unidades de atividade enzimática. Quando águas residuárias de fábrica de oliva (diluídas 4 vezes) foram utilizadas, a produção de tanase manteve-se entre 0,37 a 0,65 unidades de atividade enzimática por mL.

VIJAYARAGHAVAN & MURTHY (1997) avaliaram a eficiência de um reator de contato para o tratamento de águas residuárias contendo tanino, variando a concentração deste. Verificaram que concentrações mais altas de ácido tânico (no caso 2 g/L) levam a uma menor remoção de DQO (60-70 %), entre 0 a 60 h, enquanto que concentrações próximas de 0,5 g/L permitem uma remoção de 80 % da DQO a partir de 48- 60 h.

Visto que durante a degradação de ácido tânico ocorre liberação de 9 moléculas de ácido gálico e 1 de glicose, seria esperado que esses compostos pudessem ser quantificados (LEKHA & LONSANE, 1997; MACEDO *et al.*, 2005). Contudo, durante o crescimento, apenas 10 % de ácido tânico foram degradados e 10 % da DQO foram removidos, indicando que os fungos avaliados provavelmente podem degradar ácido tânico de forma mais eficaz na presença de outros compostos como fonte primária de carbono, fazendo com que a degradação ocorra como parte do metabolismo secundário (GANGA *et al.*, 1977; BAJPAI & PATIL, 1996; 1997). Os filtrados das culturas inoculadas não apresentaram diferença com relação ao controle utilizado, ou seja, a degradação obtida de ácido tânico não foi suficiente para detectar-se excesso de ácido gálico (produção), e glicose mais do que o original das fontes e glicídios redutores totais dos filtrados. Também não foi detectada atividade extracelular da tanase, sugerindo que, em virtude da remoção de ácido tânico, ainda que baixa, a ocorrência da enzima seja intracelular, ou mesmo se trate de outra fenoloxidase atuando, como a lacase, uma vez que o meio suplementado com 0,5 % de ácido tânico pode ser utilizado também para seleção de fungos produtores de tal enzima (KIISKINEN *et al.*, 2004).

A ausência de excesso de ácido gálico pode ser outro indicativo da secreção de lacase nos meios, visto que este também é substrato para tal enzima (HARKIN & OBST, 1973; KIISKINEN *et al.*, 2004).

Portanto, tanto nos ensaios para Lignina Peroxidase quanto para Tanase surgiram indícios de que a fenoloxidase presente nas culturas estudadas é a lacase.

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

Os isolados fúngicos de *Mucor* sp, *Cladosporium* sp, *G. candidum*, *P. chrysosporium* foram cultivados em 50 mL das amostras de efluente bioaumentado

da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool coletadas em 19/12/2006, na lagoa facultativa D, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud isento de ágar. Tais amostras foram previamente analisadas quanto a seus parâmetros físico-químicos e os valores obtidos comparados com a referência, para águas de classe 3 da resolução CONAMA n° 357/2005 (**Tabela 10**). Os filtrados de tais culturas foram analisados quanto à biomassa (**Figura 46**) e concentrações de glicídios redutores (**Figura 47**), proteínas (**Figura 48**) e fenóis totais (**Figura 49**) e DQO (**Figura 50**).

Tabela 10. Análises físico-químicas das amostras de águas residuárias coletadas 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 bioaugmentação com consórcio de 6 microrganismos).

AMOSTRA DE EFLUENTE (em vermelho, valores fora do limite)		Valores de Referência CONAMA 357/05, 20/86 e DEC. AL 6200/85, para águas de Classe 3
Horário (h)	9:50	
pH	6,4	5,0 a 9,0
Temperatura (°C)	38	≤ 40
Condutividade (µS/mL)	700	≤ 750
STD (mg/L)	525	≤ 500,0
OD (mg/L)	1,4	≥ 4,0
RS (mL/L)	3,6	≤ 1,0
Fosfato (mg/L)	4,83	0,15
Nitrato (mg/L)	VMB - SQ	≤ 10,0
Nitrito (mg/L)	VMB - SQ	≤ 1,0
DQO (mg/L)	1997,02	150,0

STD – Sólidos Totais Dissolvidos

RS – Resíduos Sedimentáveis

VMB – SQ = Valores Muito Baixo – Sem Quantificação

No intervalo de 168 h de incubação (sob aeração a 30 ± 2 °C, no escuro), verificou-se que o desenvolvimento (**Figura 46**) de *P. chrysosporium* foi mais intenso após as 48 h iniciais no meio do efluente agroindustrial suplementado, enquanto nestas primeiras 48 h ocorreu o maior desenvolvimento de *G. candidum* e

Cladosporium sp no mesmo meio. O isolado de *Mucor* sp cresceu em progressão aritmética sobre o efluente suplementado durante todo o intervalo estudado.

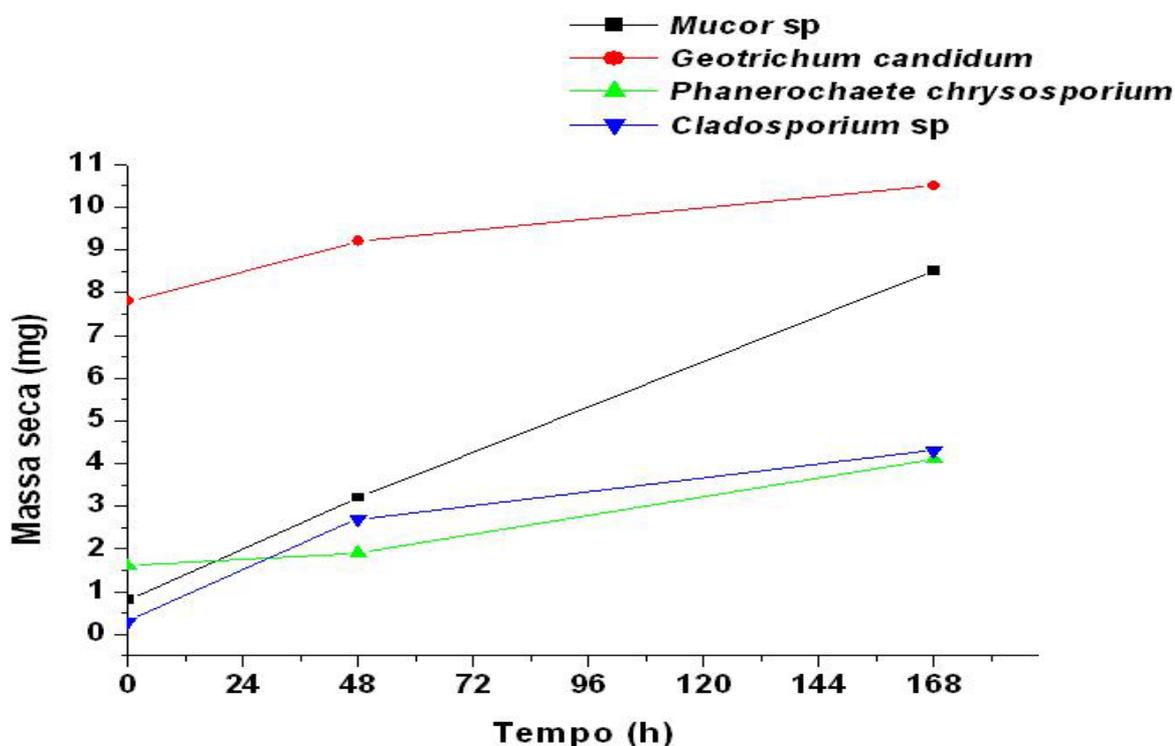


Figura 46. Massa seca dos isolados fúngicos de *Mucor* sp, *Cladosporium* sp, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa “D” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud (100 rpm, 30 ± 2 °C, no escuro).

Verificou-se que o consumo de glicídios redutores por *Mucor* sp foi mais intenso e progressivo durante todo o cultivo (**Figura 47**). A redução desses glicídios por *G. candidum*, *Cladosporium* sp e *P. chrysosporium* também foi proporcional ao crescimento dos mesmos, isto é, mais intenso nas 48 h iniciais para os dois primeiros fungos, especialmente para *G. candidum*, e de 48-168 h para *P. chrysosporium*.

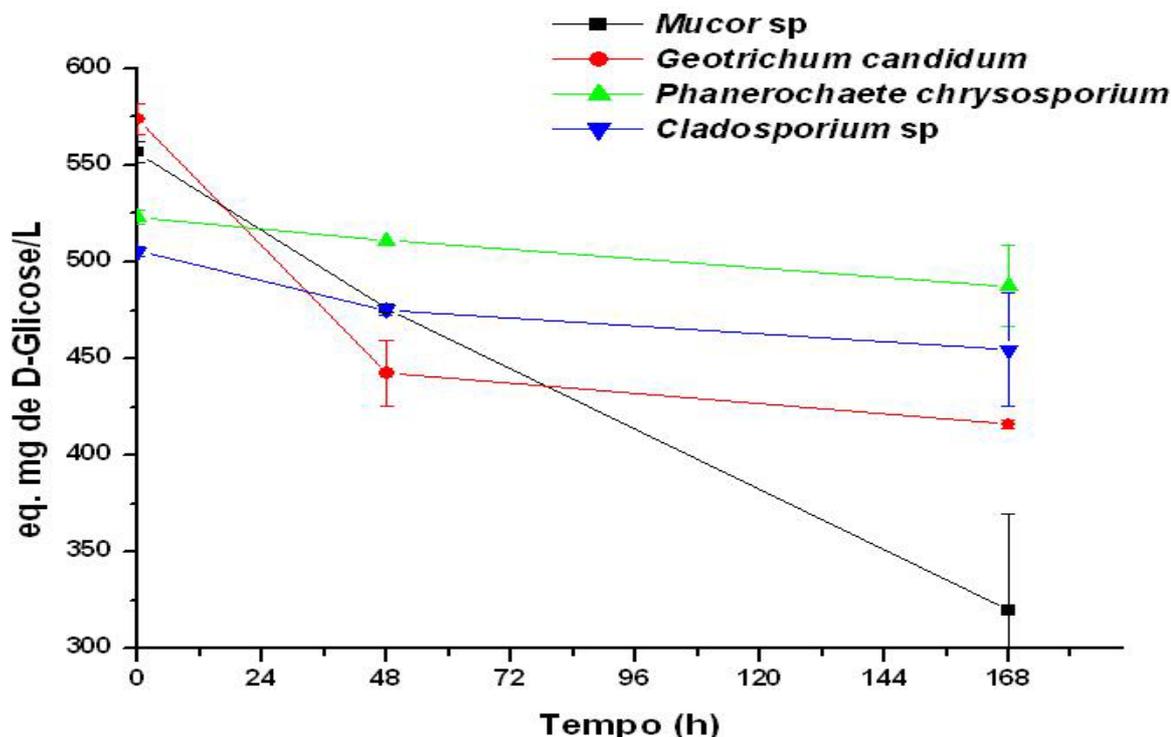


Figura 47. Concentração de glicídios redutores totais ao longo do tempo de cultivo dos isolados fúngicos de *Mucor sp*, *Cladosporium sp*, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa “D” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud (100 rpm, 30 ± 2 °C, no escuro).

Já o consumo da fonte protéica foi bastante acentuado durante as 48 h iniciais do cultivo de *P. chrysosporium* (**Figura 48**), provavelmente em face à adaptação ao meio ofertado e ao requerimento de novas enzimas. Os cultivos de *Mucor sp* e *Cladosporium sp* também apresentaram um maior consumo de proteínas nas 48 h iniciais, embora a diferença não seja tão acentuada como no caso de *P. chrysosporium* e provavelmente porque o consumo de glicídios redutores por parte deste último tenha sido inferior ao dos primeiros. *G. candidum* degradou proteínas em progressão aritmética ao longo das 168 h, o que parece estar de acordo com seu crescimento no meio contendo o efluente agroindustrial suplementado.

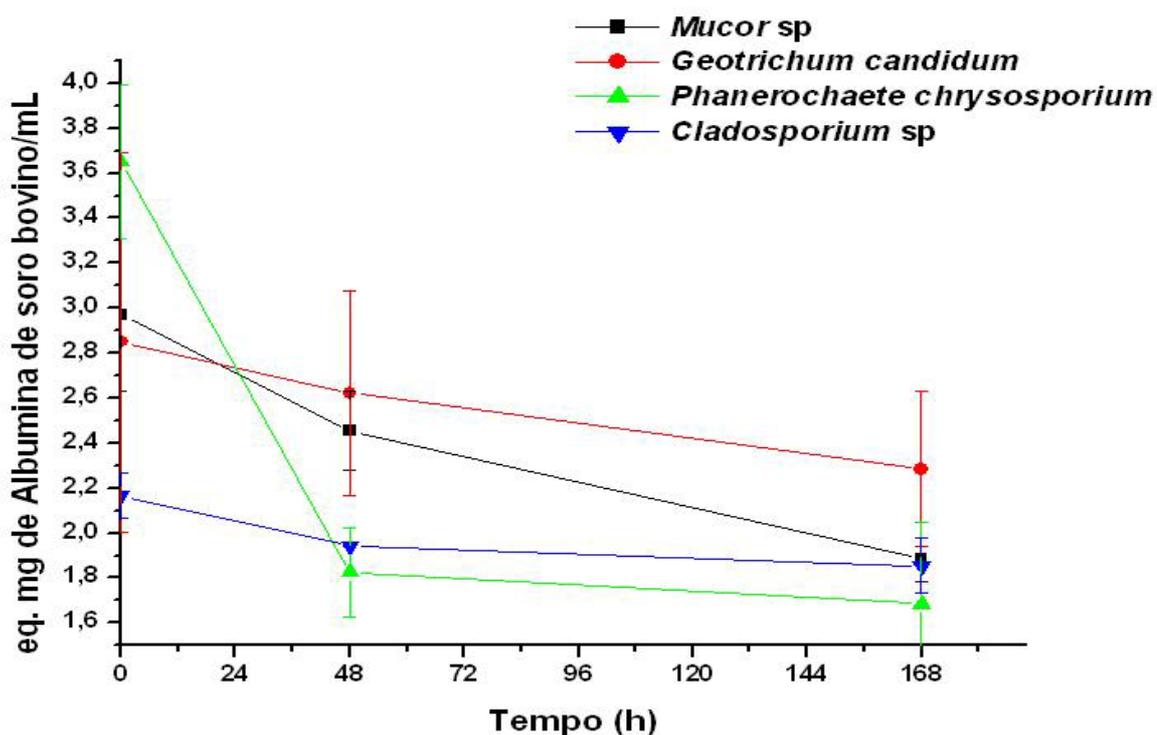


Figura 48. Concentração de proteínas totais ao longo do tempo de cultivo dos isolados fúngicos de *Mucor sp*, *Cladosporium sp*, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa “D” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud (100 rpm, 30 ± 2 °C, no escuro).

Quanto à concentração de fenóis totais nesses cultivos (**Figura 49**), a remoção desses compostos foi maior naqueles inoculados por *Mucor sp*, especialmente entre 48 e 168 h (32,25 %). *Cladosporium sp* removeu fenóis do meio (6,66 %), exatamente nesse período, quando já havia consumido glicídios redutores e proteínas. O fungo *P. chrysosporium*, cujo crescimento foi mais lento, apresentou remoção de 9,1 % de fenóis totais ao longo de todo tempo, mas especialmente entre 0 e 48 h, quando também consumiu mais proteínas e pouco se desenvolveu. *G.candidum*, por outro lado, também removeu mais fenóis do meio entre 0 e 48 h, quando cresceu mais e consumiu mais glicídios redutores. Após esse intervalo, o teor de compostos fenólicos no meio cultivado por *G. candidum* manteve-se constante até 168 h (3,33 %).

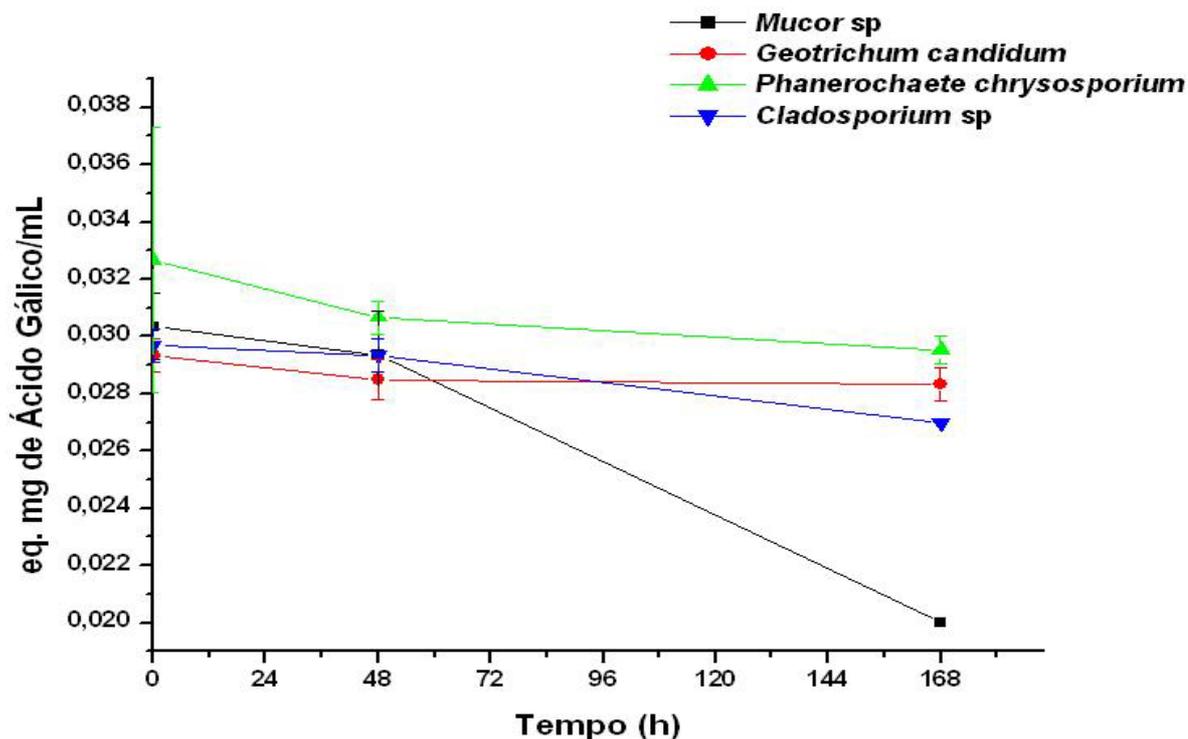


Figura 49. Concentração de fenóis totais ao longo do tempo de cultivo dos isolados fúngicos de *Mucor sp*, *Cladosporium sp*, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa “D” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud (100 rpm, 30 ± 2 °C, no escuro).

Todos os fungos estudados removeram a DQO do meio estudado (**Figura 50**), principalmente após 48 h de incubação, sendo o isolado de *Mucor sp*, aquele que apresentou a maior taxa de remoção de matéria orgânica nesse período, o que corrobora também seu perfil de crescimento no período (**Figura 46**). A segunda melhor taxa de remoção de DQO foi do isolado de *Cladosporium*, seguido pelos fungos *P. chrysosporium* e *G. candidum*, cujos crescimentos não foram tão expressivos no meio e intervalo de tempo estudados.

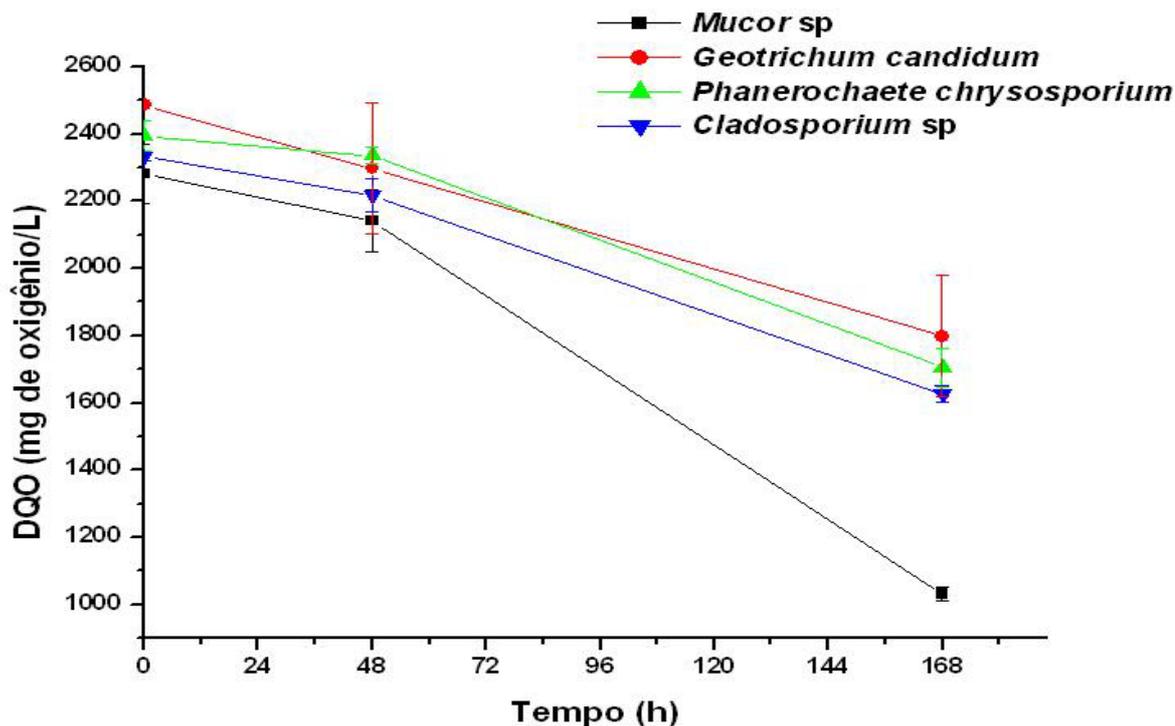


Figura 50. Concentração de DQO (mg de oxigênio consumido/L de meio) ao longo do tempo de cultivo dos isolados fúngicos de *Mucor sp*, *Cladosporium sp*, *G. candidum* e *P. chrysosporium*, em amostras de águas residuárias oriundas da lagoa facultativa “D” da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, suplementadas com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Sabouraud (100 rpm, 30 ± 2 °C, no escuro).

É sabido que a decomposição de matéria orgânica no ambiente é realizada por uma sucessão de comunidades microbianas. Os fungos do gênero *Mucor* são citados como colonizadores primários, por utilizarem moléculas simples, como as de monossacarídeos, mais rapidamente que outros microrganismos, seguidos, então, pelos fungos degradadores de celulose e lignina (STIRLING, 2001). O comportamento descrito acima corrobora os resultados encontrados neste estudo (**Figuras 47-49**) onde observou-se maior utilização de moléculas como glicídios, proteínas e fenóis totais, por *Mucor sp*, o que ocasionou maior remoção da DQO no efluente testado (**Figura 50**).

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

5.8.1. Estabelecimento do consórcio

Nos ensaios de bioaumentação das lagoas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, foram utilizadas três bactérias previamente isoladas, 3 MB, 6 MB e T (respectivamente, *Pseudomonas putida*, *Corynebacterium* sp e *Pseudomonas aeruginosa*), e três fungos, 2AMB, Pc e Gc, (respectivamente, *Mucor* sp, *Phanerochaete chrysosporium* e *Geotrichum candidum*). Tais organismos foram selecionados em função de seu perfil enzimático e de tolerância a xenobióticos, bem como, de evidências relatadas em literatura.

Em ensaios de tratamento de efluente industrial com alto teor de óleos e DQO (16000-250000 mg/L), por exemplo, der MERWE *et al.* (2005) verificaram que sete isolados conseguiram reduzir a DQO em cerca de 90 %, entre eles *Mucor circinelloides f. circinelloides* (CBS 108.16), o qual obteve uma taxa de remoção de 84 %. EL-MORSY (2004) isolou alguns fungos, os quais foram avaliados quanto a habilidade de biosorção de íons metálicos em águas poluídas no Egito, verificando que *Mucor* sp foi efetivo tanto como *Cunninghamella echinulata* e *Rhizopus* spp.

KUMAR *et al.* (1998), relataram a descoloração e biodegradação de efluentes de cana-de-açúcar (melaço) por *P. chrysosporium* e *Coriolus versicolor*, enquanto BEARY *et al.* (2002) utilizaram um consórcio de fungos e bactérias para acelerar a degradação de resíduos sólidos de cana de açúcar.

RAHMAN *et al.* (2002), por exemplo, relataram a eficiência de um consórcio bacteriano na degradação de óleo cru. Dentre estas bactérias, foram identificados isolados de *Bacillus* sp DS6-86, *Micrococcus* sp GS2-22, *Corynebacterium* sp GS5-66, *Flavobacterium* sp DS5-73 e *Pseudomonas* sp DS10-129, selecionadas pela eficiente utilização deste óleo. Este consórcio obteve degradação de 78 % do óleo, sendo que, *Pseudomonas* sp DS10-129, foi responsável por 66 % desse total, a uma temperatura de 30 °C e pH = 7,5.

A capacidade desulfurante de *Corynebacterium* foi avaliada por OMORI *et al.* (1992), utilizando dibenzotiofeno como substrato. Tal capacidade, desse gênero de microrganismos bem como sua ação desemulsificante de petróleo e derivados,

também foram verificadas por van HAMME *et al.* (2003).

SANTIAGO *et al.* (1998), por sua vez, avaliaram a produção de sideróforos por *P. fluorescens* e outras cinco espécies desse gênero no tratamento de efluentes de indústria têxtil e de papel. Verificaram que *P. fluorescens* promoveu 9 e 10 % de descoloração, respectivamente num comprimento de onda de $\lambda_{465\text{nm}}$ e de $\lambda_{480\text{nm}}$, no efluente têxtil, e 9,5 % de descoloração a $\lambda_{465\text{nm}}$ do efluente papelero, por possuírem a capacidade de realizar a clivagem reductiva nas ligações azo deste tipo de composto, através da enzima azoredutase. KUNZ *et al.* (2002), relataram que *Pseudomonas* sp e *Sphingomonas* sp são particularmente úteis na degradação de azocorantes. Por outro lado, CUNHA & LEITE (2000) e KERN *et al.* (2002), demonstraram que *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas alcaligenes* e *Pseudomonas* sp, são capazes de degradar gasolina e derivados presentes em solos contaminados.

NISTSCHKE & PASTORE (2002), também relataram algumas propriedades e aplicações de biosurfactantes produzidos por *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* na remoção de “piche” em areias contaminadas e a biodegradação de pesticidas. TULEVA *et al.* (2002) registraram a ação biosurfactante de uma estirpe de *P. putida* (21BN) cultivada sobre substratos pobremente solúveis, como o hexadecano, ou solúveis, como glicose, e a natureza química do surfactante é ramnolipídica.

LAMAR & DIETRICH (1990) verificaram a degradação de pentaclorofenol (PCP) por *P. chrysosporium* em solo contaminado. SOARES *et al.* (2002), por sua vez, relataram a descoloração de corantes azosintéticos por algumas espécies de fungos produtores de lacases, dentre eles, *P. chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus* sp e *Bjerkandera* sp.

Estudos envolvendo *P. chrysosporium*, observou-se que a degradação mais eficiente de fenóis ocorre em meio deficiente de nitrogênio, em temperaturas entre 35 e 37 °C, pela ação das peroxidases e, às vezes, de lacase, mas para isso o fungo requereu peróxido de hidrogênio (MELO & AZEVEDO, 1997).

OGAWA *et al.* (2004) constataram também a capacidade do *P. chrysosporium* em degradar o biocida 2-metiltio-4-ter-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina (Irgarol 1051), detectado em águas costeiras, lagos e sedimentos.

Por outro lado, vários trabalhos têm sido publicados sobre a utilização de *G. candidum* no tratamento de xenobióticos, por meio de reações de hidrólise, especialmente para obtenção de ácidos graxos, e esterificação e também devido à

produção de peroxidases e lacases viáveis em biotransformação. (FARDELONE *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2003). Segundo FARDELONE *et al.* (2003), a estirpe CCT 1205 deste fungo tem sido usado em síntese enantiosseletiva para redução de α -haloacetofenonas obtendo-se um excesso enantiomérico de 92-99 %.

KIM *et al.* (2001) reportaram que a estirpe Dec 1 do fungo *G. candidum*, conseguiu descolorir 21 tipos de corantes reativos, incluindo corantes azo e antraquinonas. Este amplo espectro de descoloração sugere o envolvimento de peroxidases extracelulares. A purificação e caracterização de uma peroxidase (DyP) produzida por *G. candidum*, envolvida na descoloração de corantes, foi relatada por KIM & SHODA (1999). Esta peroxidase é uma glicoproteína de massa molecular de 60KDa e ponto isoelétrico (pI) de 3,8.

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

Assim, após o tratamento da lagoa “D” por bioaumentação, durante as safras 2005/06 e 2006/07, foi realizado o monitoramento da qualidade dos efluentes, através de coletas e análises físico-químicas de amostras. Estas ocorreram na entrada das lagoas de decantação (“A” e “B”), onde ainda não havia tratamento, e na saída das lagoas facultativas “D” (tratada) e “G” da mesma ETE, bem como na captação central e lateral para irrigação, ambas canalizando águas que já haviam passado pelo tratamento (**Figura 11**).

Com relação à temperatura (**Figura 51**), mensurada durante o período de estudo (safras 2005/2006 e 2006/2007), somente as amostras das águas da Lagoa “A”, proveniente da lavagem de cana (ALC), pisos, gases e cinzas (caldeiras), encontraram-se acima do valor previsto na resolução CONAMA 357/2005 para lançamento em corpos d’água (40 °C), embora em todas as lagoas esse parâmetro fosse desfavorável às trocas gasosas, especialmente de oxigênio atmosférico (BARBOSA *et al.*, 2000).

Durante as análises da safra 2005/06, verificou-se redução de 19 % no valor médio de temperatura entre as 12 amostragens da lagoa “D”, onde é aplicada a bioaumentação, e as 12 amostragens da captação central final (CC) para uso na irrigação das culturas. Nas amostragens realizadas na safra 2006/07, a redução da temperatura entre as águas da lagoa “D” e da CC foi de 14 %.

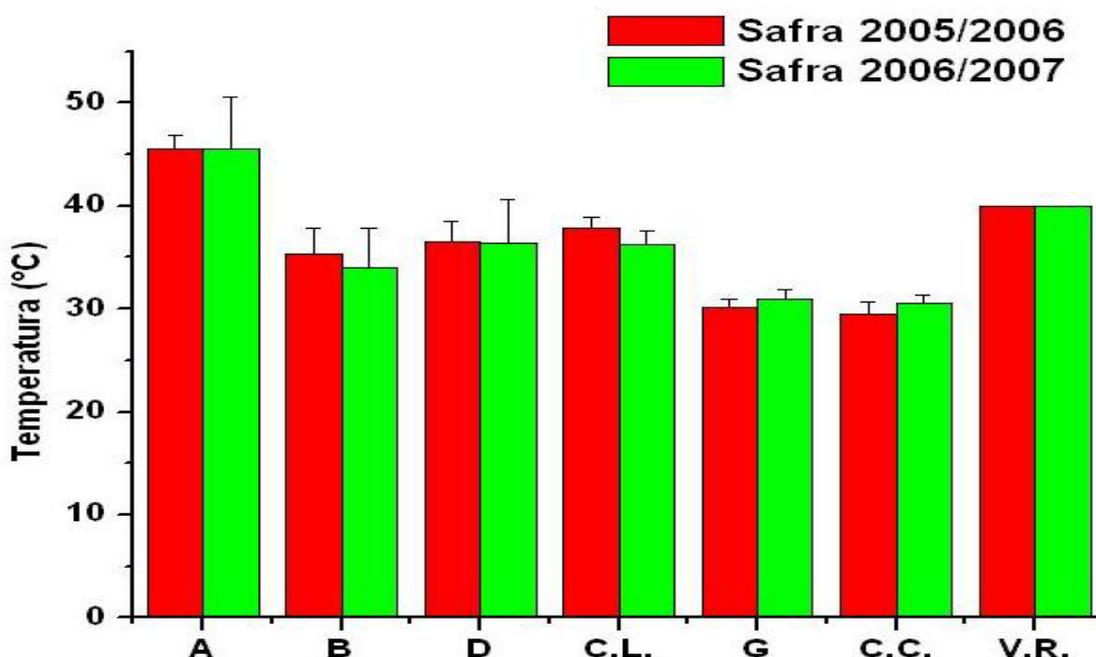


Figura 51. Média (\pm desvio padrão) da temperatura em águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = 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).

Variações súbitas de temperatura nas águas causam efeitos danosos aos ecossistemas aquáticos. Aumentos de temperatura resultam na redução do oxigênio dissolvido e no consumo de oxigênio devido à estimulação das atividades biológicas (NAIME & FAGUNDES, 2005).

Com relação ao Oxigênio Dissolvido (**Figura 52**) as amostras da lagoa “B” apresentaram valores acima do mínimo recomendado na legislação (4 mg/L) (**Anexo 2**) durante a safra 2006/07. Neste mesmo período, o desvio positivo da média das amostras da lagoa “A” demonstra que, em certas ocasiões, os efluentes nela amostrados apresentaram concentração de OD com a qualidade prevista na legislação e semelhante à da lagoa “B”. A lagoa “B” da ETE da matriz da Usina Coruripe recebe material proveniente de um decantador mecanizado, para onde é canalizada a ALC a ser reutilizada - apenas 50 % desta retornam para as esteiras de lavagem de cana, sendo diluída por novo aporte de água. Após a lavagem, parte

desse volume (50 %) soma-se às águas residuárias das caldeiras e pisos, sendo lançadas na lagoa “A”, e parte retornam para o decantador mecânico. Os 50 % de água da decantação restantes seguem com o lodo e bagacilhos para a lagoa “B”.

Na safra 2005/06, verificou-se um aumento de 60 % da concentração de OD entre as 12 amostragens da lagoa “D”, onde se aplica a bioaumentação, e as 12 amostragens da CC para irrigação. Já entre as amostragens realizadas durante a safra 2006/07, o aumento de OD nas águas desse trecho foi de 56 %. Esse aumento, entretanto, não significa que tais efluentes tivessem alcançado a qualidade de corpos hídricos destinados ao consumo (classe 3).

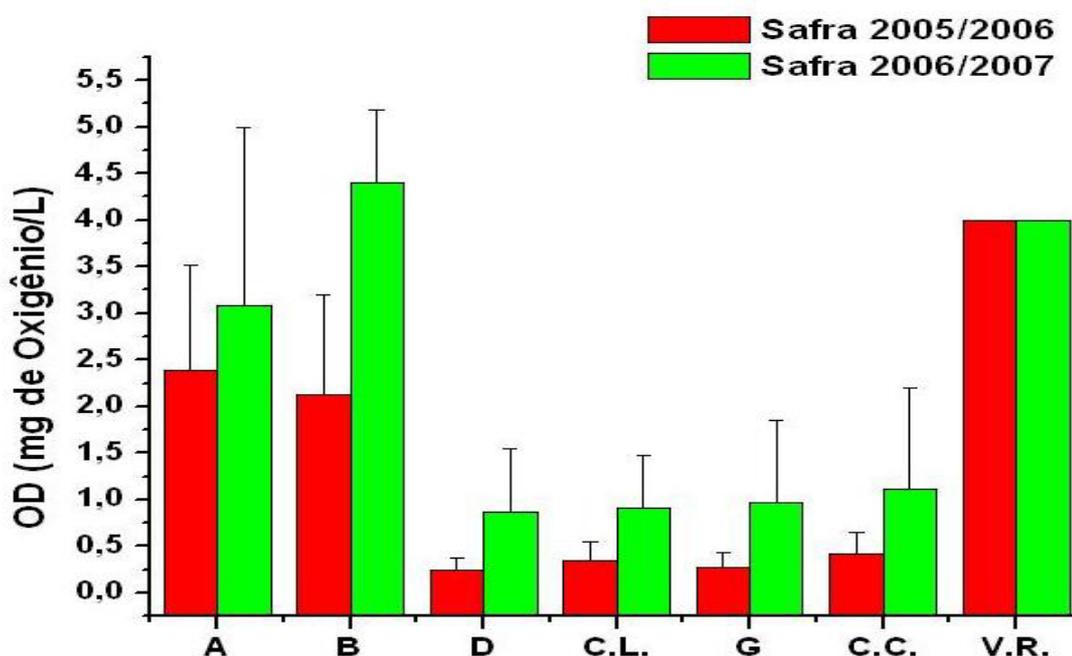


Figura 52. Média (\pm desvio padrão) da concentração de Oxigênio Dissolvido (OD) em águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última 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).

A baixa concentração de OD costuma ser constatada em comportas/elevatórias de corpos receptores onde ocorrem lançamentos de águas residuárias com alta carga contaminante. Tal redução drástica de OD nessas partes é frequentemente associada à mortandade de peixes e outras formas de vida aquática nesses cursos hídricos (ALBINATI *et al.*, 2003). Apenas as bactérias

anaeróbicas conseguem sobreviver quando as concentrações de OD são inferiores a 2 mg/L. Além disso, concentrações de OD iguais ou mesmo próximas às recomendadas pela legislação vigente (4 mg/L para águas de Classe 3) auxiliam na prevenção da formação de substâncias com odores indesejáveis, como amônia e gás sulfídrico, por exemplo, provenientes de oxidações biológicas anaeróbicas (SILVA *et al.*, 2004).

Quanto ao pH (**Figura 53**), quando considerou-se o desvio padrão positivo, apenas a média das amostragens da lagoa “B” durante a safra 2005/06, encontrou-se fora do limite estipulado pela resolução CONAMA 357/2005 (5,0-9,0). Na safra 2006/07 todas as amostras encontraram-se dentro da faixa de referência de pH.

Ao comparar os valores de pH de todas as 12 amostragens efetuadas na lagoa do tratamento por bioaumentação “D” e aquelas da CC, durante cada safra, verificou-se que não houve variação acentuada deste parâmetro ao longo desse trecho da ETE.

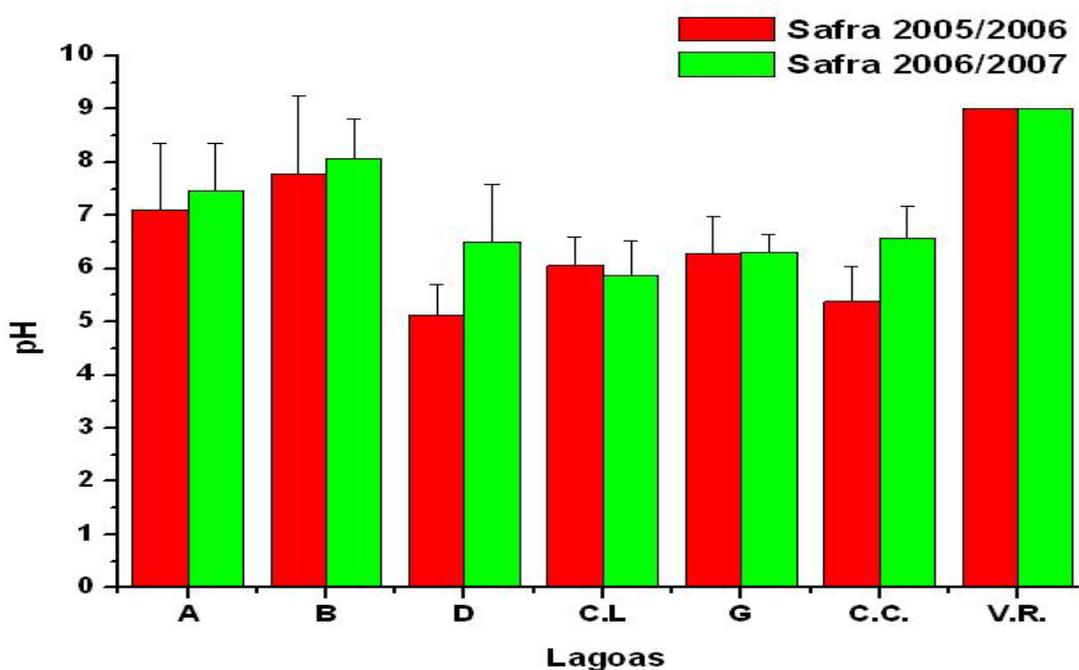


Figura 53. Média (\pm desvio padrão) dos valores de pH em águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; C.L. = 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).

O pH é influenciado pela quantidade de matéria orgânica a ser decomposta, produzindo ácidos tais como os húmicos e fúlvicos, ou pelas altas concentrações de vegetais em geral, os quais podem provocar a acidificação do meio pelo processo de fotossíntese (de TOLEDO & CASTRO, 2001). Segundo PORTO *et al.* (1991), a faixa de pH entre 6 e 9 corresponde ao limite para a manutenção e proteção da vida aquática, sendo que valores de pH abaixo de 6 ou próximos a 5 podem solubilizar os metais pesados, aumentando as possibilidades de toxidez. Apenas em poucas ocasiões as águas da lagoa “D” e da CC apresentaram pH abaixo de 5, conforme observado pelo desvio negativo das médias de pH (**Figura 53**).

Com relação à medida da Condutividade Elétrica (**Figura 54**), apenas as médias das 12 amostragens da lagoa “A” na safra 2005/06, e das 12 amostragens da lagoa “B” na safra 2006/07, encontravam-se acima do valor recomendado de 750 $\mu\text{S/mL}$.

Porém, se considerados os desvios positivos de todas as médias das amostragens nos diferentes pontos, somente as águas da CC, especialmente na safra 2005/06, é que nunca excedeu esse limite. Ocorreu uma redução de 36 % entre os valores médios de condutividade elétrica das águas do início do tratamento por bioaumentação (lagoa “D”) e as do final da ETE (captação central) durante a safra 2005/06. Na safra 2006/07 a redução foi de apenas cerca de 10 %.

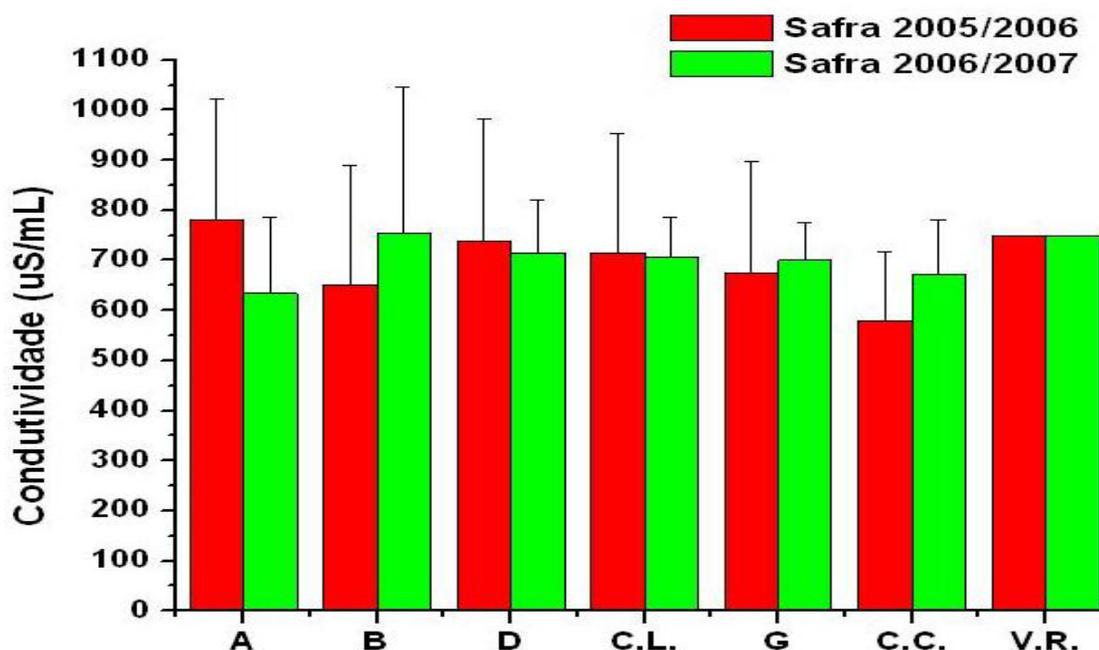


Figura 54. Média (\pm desvio padrão) dos valores de Condutividade Elétrica das águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaugmentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa 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).

Assim, embora a Condutividade Elétrica não determine quais são os íons presentes nas amostras de águas residuárias, pode auxiliar no reconhecimento dos impactos que a presença destes causa em corpos receptores (de FARIAS, 2006).

Todas as médias da concentração de Sólidos Totais Dissolvidos (STD) nas águas amostradas durante a safra 2005/06 apresentaram-se acima do valor recomendado pela legislação vigente (**Figura 55**). Apesar disso, durante a safra 2005/06 houve redução de 36 % dos valores médios deste parâmetro do ponto inicial do tratamento (lagoa “D”) até o último sítio de coleta CC. Na safra 2006/07 a redução observada foi de aproximadamente 10 %, embora todas as amostras nos diferentes pontos se apresentassem com a concentração de STD próxima ou no limite máximo recomendado pela legislação para qualidade de águas de classe 3, especialmente as amostras da lagoa “B” e da CC.

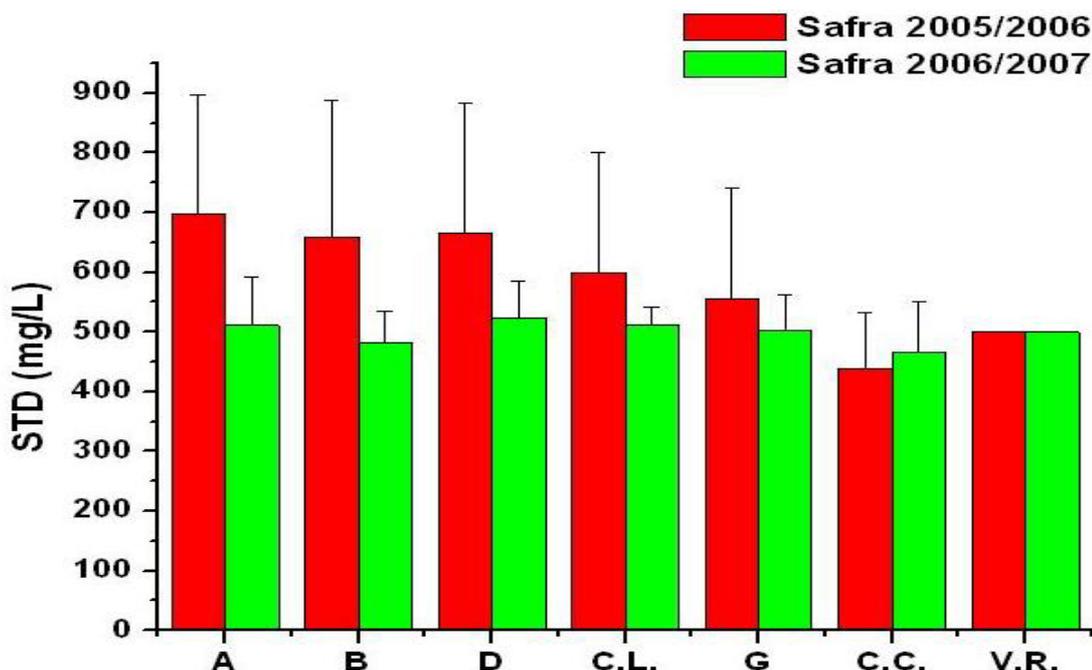


Figura 55. Média (\pm desvio padrão) da concentração de Sólidos Totais Dissolvidos (STD) de águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/2006 e 2006/2007, após tratamento por bioaugmentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = 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).

Quando a água apresenta concentração de STD em excesso, especialmente concentração de minerais acima de 1000 mg/L, os quais conferem sabor desagradável, é considerada de qualidade limitada para diversos fins (CARVALHO & OLIVEIRA, 2003 *appud* de FARIAS, 2006). Porém, se os valores encontrados forem menores que 500 mg/L, é considerada satisfatória para usos domésticos e industriais. A sedimentação dos sólidos orgânicos pode criar depósitos de lodos no fundo dos mananciais ou lagoas das ETE's, gerando assoreamento com curto-circuito para o tratamento, além de áreas com alta DQO com ou sem produção de gases, e o soterramento de pequenos animais, vegetais e ovos de peixes (von SPERLING, 1996; MOTA, 1995; ESTEVES, 1999).

Os valores médios das amostragens para Turbidez (**Figura 56**) indicaram que apenas as águas da lagoa "G" (safra 2006/07) e da CC na safra 2005/06 apresentaram-se abaixo do valor recomendado (100 NTU). Ocorreu uma redução de

81 % da Turbidez entre os pontos de aplicação do tratamento (lagoa “D”) e final da ETE (CC) durante tal safra. Já na safra 2006/07, a redução da turbidez das águas nesse trecho foi de 63 %.

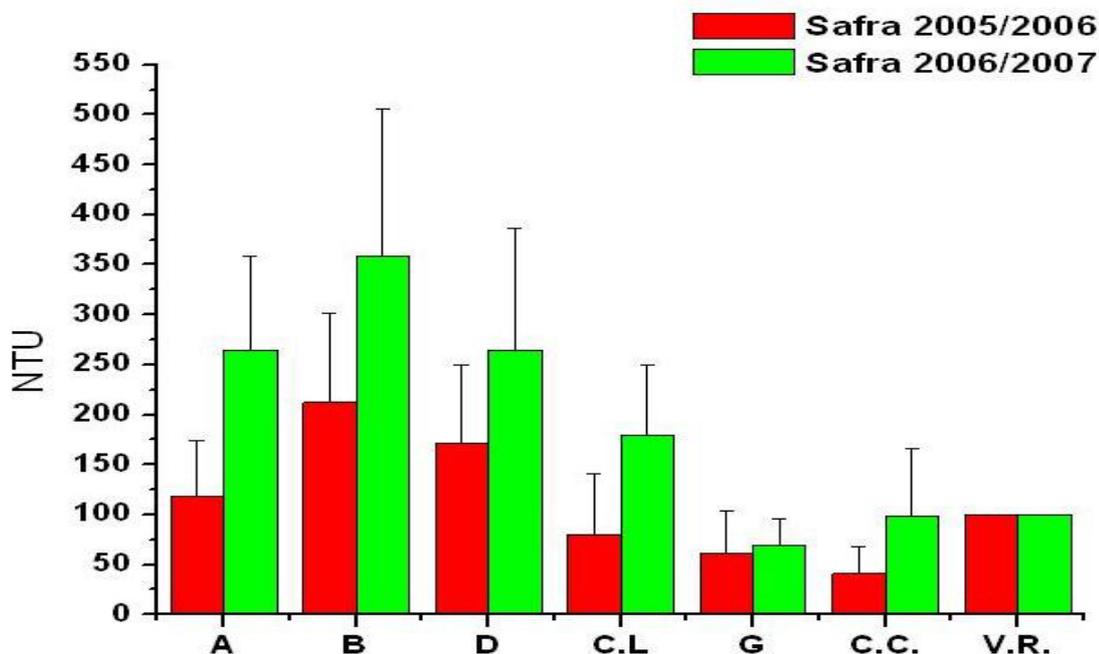


Figura 56. Média (\pm desvio padrão) dos valores de Turbidez de águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaugmentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa facultativa; 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).

Elevações quantitativas na Turbidez podem ser ocasionadas pela introdução de partículas em suspensão ou de substâncias pigmentadas (MOTA, 1995). Valores muito acima do recomendado influem negativamente na produção de algas e outros organismos fotossintetizantes submersos, afetando a oxigenação dos ecossistemas aquáticos (von SPERLING, 1996; MOTA, 1995; ESTEVES, 1999).

Embora as médias de DQO ao longo do experimento (**Figura 57**) tenham se apresentado acima do valor recomendado (150 mg/L) para águas de Classe 3, isto é, para lançamento direto em cursos de água fluvial para abastecimento, durante a safra 2005/06 ocorreu uma remoção de 56,5 % de DQO entre o ponto inicial (lagoa “D”) e final (CC) e uma taxa de remoção de 71,4 % no mesmo trecho de tratamento durante a safra 2006/07.

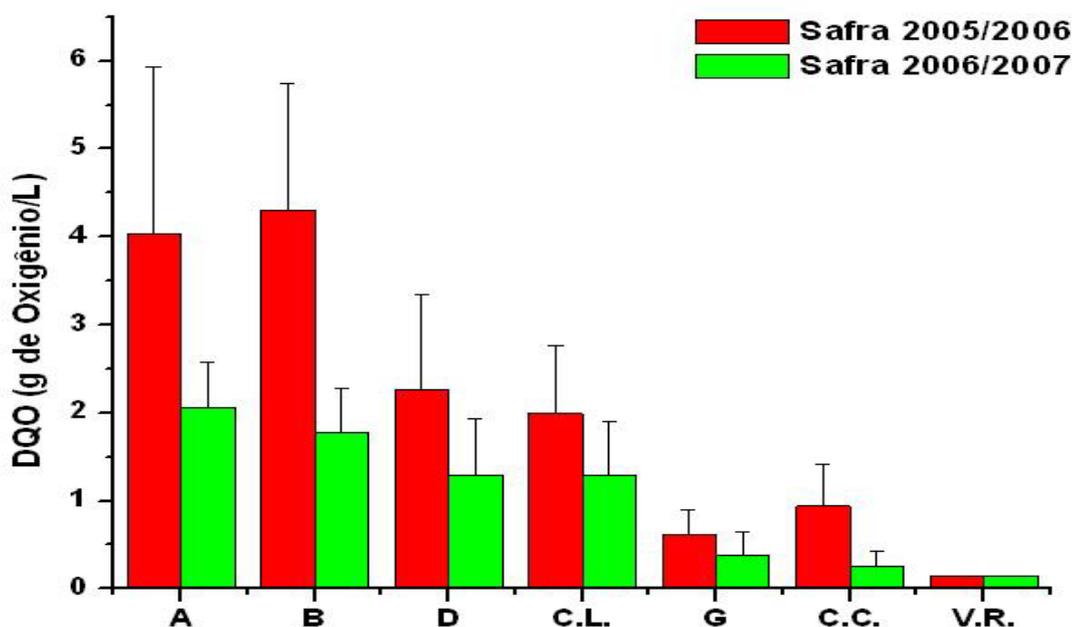


Figura 57. Média (\pm desvio padrão) da concentração da Demanda Química de Oxigênio (DQO) das águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída 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).

Conforme PORTO *et al.* (1991), altos valores de DQO são indicativos de elevada carga orgânica, biodegradável ou não, consumindo oxigênio dissolvido em meio ácido, o que pode acarretar diversos problemas para os corpos receptores se o seu lançamento ocorrer sem tratamento prévio (de MATOS *et al.*, 2006). Alta concentração da fração inerte (DQO) nas lagoas indica a necessidade também de um melhor tratamento físico-químico aliado ao tratamento biológico, isto é, a melhoria do processo de remoção dos resíduos sólidos no início do processo.

Segundo WOLMARANS & VILLIERS (2002), os efluentes de destilaria costumam apresentar valores de DQO próximos de 30 g/L e baixos valores de pH (3-4). Por isso avaliaram o tratamento desse tipo de efluente através de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB), verificando uma remoção de cerca de 90 % da DQO.

RAGEN *et al.* (2001) utilizaram o mesmo tipo de reator (UASB) para avaliar a

remoção de DQO em efluente sintético baseado na constituição de vinhaça com DQO inicial de 1 g/L. Os resultados revelaram que um tempo de retenção hidráulica acima de 4 h e uma taxa de carregamento de matéria orgânica abaixo de 6,7 g de DQO.L⁻¹.d⁻¹, levam a uma eficiência de remoção de DQO de aproximadamente 76 %. Os autores mostraram que nesse tipo de reator o tempo de retenção hidráulica ótimo para o tratamento desse tipo de efluente está compreendido entre 4 e 6 horas.

Comparando-se tais resultados de remoção de DQO com efluentes sintéticos e em ensaios piloto de bancada, com aqueles obtidos durante os experimentos aqui relatados, considerando-se todas as variáveis apontadas, no presente trabalho, isto é, acidentes com geradores e bombas captadoras de águas para irrigação, elevando o volume das lagoas, altas temperaturas ambientais e baixa umidade relativa do ar em certos períodos, ou chuvas intensas imprevistas e outros, etc, revelaram o potencial de aplicação desse consórcio para a remoção de DQO dos efluentes estudados, cuja taxa foi de cerca de 56 % (safra 2005/06) e 71 % (safra 2006/2007).

Com relação à concentração de Fosfatos Totais (**Figura 58**) das amostras, verificou-se que todas elas, durante ambas as safras estudadas, apresentaram médias muito acima do valor recomendado (0,15 mg/L) para águas de Classe 3. Após o tratamento (lagoa "D"), tais concentrações foram reduzidas em 29 % no final da ETE (CC) durante a safra 2005/06, e 23 % na safra seguinte. Ainda assim, as concentrações de fosfato permaneceram muito altas.

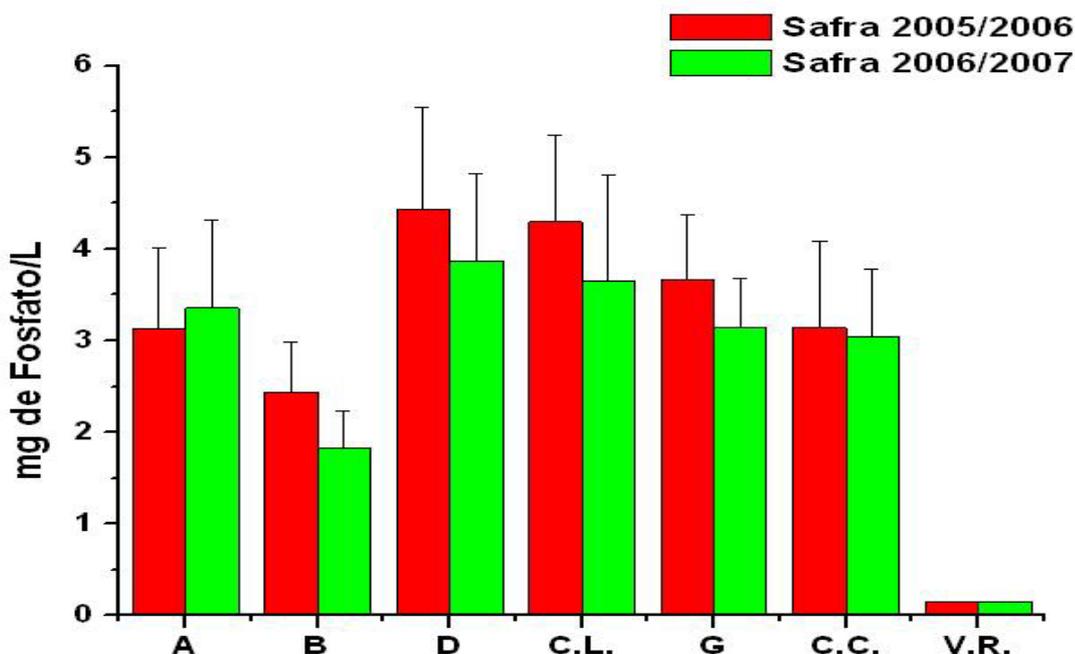


Figura 58. Média (\pm desvio padrão) da concentração de Fostatos Totais das águas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, durante as safras 2005/06 e 2006/07, após tratamento por bioaumentação. (A, B = entrada das lagoas de decantação; D = saída da lagoa facultativa; G = saída da última lagoa 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).

O monitoramento da concentração de fósforo total e ortofosfato é de suma importância para controlar as taxas de crescimento de algas e cianobactérias (eutrofização) nos corpos de água (SAWYER *et al.*, 1994), visto que estas são dependentes desse grupo de nutrientes (CEBALLOS *et al.*, 1998).

Mesmo com os altos teores de fosfato presentes nos efluentes, durante as safras avaliadas, o risco de eutrofização das lagoas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool não pode ser considerado, uma vez que tais efluentes apresentaram, também, durante o período, teores de nitrato e nitrito muito baixos ou até não detectáveis, o que desfavorece o processo eutrófico (GRASSI, 2001; ISOLDI & KOETZ, 2004).

As análises dos parâmetros de qualidade do efluente indicam que, apesar de diversas variáveis estarem constantemente sendo introduzidas no experimento de campo, a estratégia utilizada de bioaumentação das lagoas pode ser considerada

promissora, visto haver alterado para melhor alguns valores de parâmetros de qualidade de águas como pH, Condutividade, STD, Turbidez, DQO, temperatura e fosfatos totais. Alguns dos parâmetros avaliados ainda não obedecem à legislação para lançamento em rios (OD, DQO, fosfatos), principalmente devido ao descontrole da vazão, à grande quantidade de material residual que se acumula gradativamente nas lagoas e que formam colóides com ácidos húmicos e fúlvicos, e aos curto-circuitos que reduzem a área das lagoas (tempo de retenção hidráulica) e dificultam a ação homogênea da microflora do ambiente bioaumentado. Embora os teores de fosfato ainda encontrem-se muito acima do recomendado para águas de Classe 3, isso não afeta a irrigação do solo caso essa concentração seja considerada durante o manejo do mesmo na fertirrigação.

A necessidade da melhoria física das lagoas da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool deve ser enfatizada, em especial a remoção do material suspenso (bagacilho) por peneiras mais eficientes (*cush-cush* com malhas mais finas).

6. CONCLUSÕES

Através da revisão bibliográfica, do levantamento de informações junto à matriz da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, e dos ensaios realizados, o presente estudo permitiu concluir que:

1. Foram isolados 23 microrganismos nas lagoas de decantação da estação de tratamento dos efluentes da unidade industrial da agroindústria estudada, sendo 8 fungos filamentosos (2AMB, XXI, BF, G2, C1, E1, O1 e V1), uma levedura e 14 bactérias (GP, GN, aeróbias, anaeróbias facultativas ou estritas). Em função de todas as análises morfológicas, fisiológicas e enzimáticas, além do crescimento em 18 diferentes agroquímicos, foi possível selecionar 3 bactérias para ensaios de biorremediação (3MB, 6MB e T) e identificá-las respectivamente como *Pseudomonas putida*, *Corynebacterium* sp e *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Quanto aos fungos isolados, também em função de todas as análises morfológicas, fisiológicas e enzimáticas avaliadas, foram identificados como pertencentes aos gêneros *Penicillium* (G2 e O1), *Aspergillus* (C1 e E1), *Mucor* (2AMB), *Cladosporium* (XXI) e *Trichosporon* (BF). O isolado V1 não foi identificado.

3. Verificou-se que todos os fungos testados produziram lipases e amilases, sendo que 90 % deles apresentaram atividade proteolítica, 70 % secretaram xilanase e urease e 20 % deles produziram pectato-liase.

4. *Cladosporium* sp foi considerado o melhor produtor de fenoloxidase dentre os fungos isolados e aqueles cedidos pela Fundação André Toselo (Gc e Pc), por ser o único a apresentar halo de descoloração maior do que diâmetro da colônia em quatro diferentes azocorantes (azure B, azul de metileno, cristal de violeta e verde malaquita). O mesmo ocorreu com relação à degradação de ácido tânico, após 30 dias de incubação, embora os isolados BF (*Trichosporon* sp), G2 (*Penicillium* sp), Gc (*Geotrichum candidum*) e V1 tenham apresentado maior crescimento micelial nesse

substrato.

5. *Cladosporium* sp também removeu os teores de glicídios redutores, proteínas, fenóis totais e DQO em meio contendo serragem de madeira como fonte de substrato fenólico natural.

6. Em todos os ensaios, surgiram indícios de que a fenoloxidase produzida nas culturas de *Cladosporium* sp foi a lacase.

7. O isolado de *Mucor* sp apresentou as melhores taxas de remoção de DQO e fenóis, seguido pelos isolados de *Cladosporium* sp, *P. chrysosporium* e *G. candidum*, quando utilizou-se efluente agroindustrial suplementado com 1 % da constituição de carbono e nitrogênio do meio Ágar Sabouraud.

8. Durante as safras 2005/06 e 2006/07, as águas residuárias das lagoas facultativas mantiveram os valores de temperatura e pH dentro do limite estipulado pela legislação para águas de classe 3, após o tratamento diário por bioaugmentação com o consórcio microbiano composto por *Phanerochaete chrysosporium*, *Geotrichum candidum*, *Mucor* sp, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Corynebacterium* sp.

9. Os valores médios de Condutividade Elétrica, STD e Turbidez, também mantiveram-se próximos aos recomendados, sendo que a remoção de matéria orgânica, medida como DQO, foi de cerca de 56,5% na safra 2005/06 e 71,4% na safra 2006/07, e as concentrações de fosfato ainda apresentaram-se elevadas em todos os pontos avaliados na ETE.

10. Embora os teores de OD, DQO e fosfatos estivessem fora do limite para águas de classe 3, a estratégia de bioaugmentação utilizada para a correção dos efluentes das lagoas não só pode ser considerada promissora, visto que, durante o período avaliado, conseguiu melhorar muito a qualidade das águas, mas tornou-a disponível e adequada para uso em fertirrigação, uma vez que a concentração de STD encontra-se num nível apropriado para isso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, O.; YAMADA, H.; WATANABE, M. Studies on fungal tannase. Inhibition of tannase by diisopropylfluorophosphate. **Journal of Fermentation Technology**, v. 49, n. 3, p. 230-234, 1971.

AGUILAR, C.; AUGUS, C.; GONZÁLEZ, G.; FAVELA, E. A comparison of Methods to Determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 3, p. 355-361, 1999.

AHMED, Z.; BANU, H.; RAHMAN, M. M.; AKHTER, F.; HAQUE, M. S. Microbial activity on the degradation of lignocellulosic polysaccharide. **OnLine Journal of Biological Science**, v. 1, n. 10, p. 993-997, 2001.

AINSWORTH, C. C.; SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S. **The Fungi, IVB. A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi**. Academic press, New York and London, 1973. 504 p.

AISSAM, H.; ERRACHIDI, F.; PENNINGCKX, M. J.; MERZOUKI, M.; BENLEMLIH, M. Production of tannase by *Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and Olive Mill Waste Waters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 609-614, 2005.

AKBAR, N. M.; KHWAJA, M. A., **Study on Effluents from Selected Sugar Mills in Pakistan: Potential Environmental, Health, and Economic Consequences of an Excessive Pollution Load**, Sustainable Development Policy Institute, Islamabad, Paquistão, 2006. 42 p.

ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; MEDEIROS, Y. D. Utilização de águas desprezadas para a produção de alimentos no semiárido. **In: XV Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos: desafios à gestão da água no limiar do século XXI, Curitiba – Paraná, 23 a 27 de novembro de 2003**, disponível em: <http://www.grh.ufba.br/Publicacoes/Artigos/Artigos%202003/utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20%C3%81guas%20xv%20simp%C3%B3sio%20brasileiro%20de%20rec%20hid%20-%20desafio%20%C3%A0%20gest%C3%A3o%20da%20%C3%A1gua%20no%20li%20miar%20do%20s%C3%A9culo%20XXI.pdf>

ALBORÉS, S.; PIANZZOLA, M. J.; SOUBES, M.; CERDEIRAS, M. P.

Biodegradation of agroindustrial wastes by *Pleurotus* spp for its use as ruminant feed. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, disponível em <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue3/full/2/2.pdf>, 2006.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**, 2nd ed. California: Academic Press, 1999. 453 p.

ALLISON, D. S.; REY, M. W.; BERKA, R. M.; ARMSTRONG, G.; DUNN-COLEMAN, N. S. Transformation of the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* and overproduction of *Humicola* glucoamylase. **Current Genetics**, v. 21, n. 3, p. 225-229, 1992.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325-330, 2002.

AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Purification and Some Properties of yeast Tannase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 79-85, 1976.

APHA (American Public Health Association). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 17th ed., 1995. 1155 p.

ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 3110–3116, 1992.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7, p. 602–605, 2001.

BAJPAI, B.; PALTI, S. Tannin acyl hydrolase activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 217-220, 1996.

BALDRIAN, P. Fungal laccases: occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BARBOSA, D. S.; de OLIVEIRA, M. D.; NASCIMENTO, F. L.; SILVA, E. L. V. Avaliação da qualidade da água na piscicultura em tanques-rede, Pantanal, MS, *In: III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal – Os Desafios do Novo Milênio*, disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congresso/ABIOTICOS/BARBOSA-018.pdf>, 2000.

BARKER, A. V.; BRYSON, G. M. Bioremediation of heavy metals and organic toxicants by composting, **The Scientific World Journal**, v. 2, p. 407-420, 2002.

BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms of white rot fungi used to degrade pollutants. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 1, p.78A-87A, 1994.

BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H., Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF8, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 3, p. 320-323, 1994.

BAUMGARTEN, M.G.Z.; POZZA, S. A. **Qualidade de águas: descrição de parâmetros químicos referidos na legislação ambiental**. Rio Grande do Sul, Ed. FURG, 2001. 166p.

BEARY, T. P.; BOOPATHY, R.; TEMPLET, P., Accelerated Decomposition of Sugarcane Crop Residue Using a Fungal-Bacterial Consortium, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p. 41-46, 2002.

BEEKMAN, G. B. Water conservation, recycling and reuse. **International Journal of Water Resources Development**, v. 14, n. 3, p. 353-364, 1998.

BENNET, J. W.; WUNCH, K. G.; FAISON, B. D. Use of Fungi in Biodegradation, Cap. 87, p. 960-971, *In*: HURST, C. J., ed. **Manual of Environmental Microbiology**, ASM Press, Washington, 2002. 1138 p.

BERGAMIN F°, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3°ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, v. 1, 1995. 373 p.

BERTOLINI, M. C.; LARAMEE, L.; THOMAS, D. Y.; CYGLER, M.; SCHRAG, J. D.; VERNET, T. Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, n. 1-2, p. 119-125, 1994.

BEVERINI, M.; METCHE, M. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus niger*. **Sciences des Aliments**, v. 10, p. 807-816, 1990.

BEZALEL, L.; HADAR, Y.; CERNIGLIA, C. E. Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 292-295, 1996.

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, n. 5, p. 343-357, 1998.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia, em suas aplicações à medicina e à higiene**. 17 ed. rev. ampl., Rio de Janeiro, p. 789-832, 1976.

BOGAN, B. W.; LAMAR, R. T. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2631-2635, 1995.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as Emulsifying Agents for Hydrocarbons. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p.41-52, 1999.

BOLLAG, J. M. Bioremediation of contaminated environmental sites. *In*: **Proceedings of the International Workshop on Biodegradation. Anais do workshop sobre biodegradação**, Campinas: EMBRAPA – CNPMA, p. 40-51, 256 p., 1996.

BOOMINATHAN, K.; REDDY, C. A., Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. *In*: ARORA, D. K.; ELANDER, R. P.; MUKERJI, K. G., eds. **Handbook**

of applied mycology. Marcel Dekker, New York, v. 4, p. 763-822, 1992. 1114 p.

BORJA, R.; BANKS, C. J.; SANCHEZ, E. Anaerobic treatment of palm oil mill effluent in a two-stage up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) system. **Journal of Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 125-135, 1996.

BORJA, R.; MARTIN, A.; MAESTRO, R.; ALBA, J. A.; FIESTAS, J. A. Enhancement of anaerobic digestion of olive mill wastewater by removal of phenolic inhibitors. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 231–237, 1992.

BORRERO, M. A. V.; PEREIRA, J. T. V.; MIRANDA, E. E. An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil. **Biomass & Bioenergy**, v. 25, n. 3, 287-299, 2003.

BOSSIS, E.; LEMANCEAU, P.; LATOUR, X.; GARDAN, L. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. **Agronomie**, v. 20, p. 51-63, 2000.

BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Screening of extracellular tannase producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 325-329, 1996.

BRAY, H. G.; THORPE, W. V. Analysis of Phenols Compounds of Interest in Metabolism. **Method Biochemical Analysis**, v.1, p.27-52, 1954.

BREGA F°, D.; MANCUSO, P. C. S. Conceito de reuso de água. *In*: MANCUSO, P. C. S.; dos SANTOS, H. F., eds. **Reuso de água**. Universidade de São Paulo – Faculdade de Saúde Pública, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES. Capítulo 2, p. 21-36, São Paulo, 2002. 588 p.

BRODSKY, M. H.; NIXON, M. C. Rapid method for detection of *Pseudomonas aeruginosa* on McCONKEY-Agar under ultraviolet light. **Applied Microbiology**, v. 26, p. 219-220, 1973.

BROWN, M. A.; ZHAO, Z.; MAUK, A. G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 331, n. 1, p. 232-238, 2002.

BROWN, M. R. W.; FOSTER, J. H. S. A simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 23, n. 2, p. 172-177, 1970.

BRUYNE, T. D.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical and Systematic Ecology**, v. 27, n. 4, p. 445-459, 1999.

BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of DDT [1,1,1]-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2001-2008, 1987.

BUMPUS, J. A.; BROCK, B. J., Biodegradation of Crystal Violet by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, **Applied and Environmental**

Microbiology, v. 54, n. 5, p. 1143-1150, 1988.

CALERO, C. X.; MARA, D. D.; PEÑA, M. R. Anoxic ponds in the sugar cane industry: a case study from Colômbia. **Water Science & Technology**, v. 42, n. 10, p. 67-74, 2000.

CALVO, A. M.; TERRON, M. C.; FIDALGO, M. L.; PELAYO, J. M.; GALLETTI, G. C.; GONZALEZ, A. E. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry characterization of wheat straw alkaline-cooking effluents after biological treatment with the fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Ganoderma australe*. **Analytica Acta**, v. 309, p. 145-152, 1995.

CARRERA-FERNANDEZ, J.; GARRIDO, R. J. O instrumento de cobrança pelo uso da água em bacias hidrográficas: teorias e metodologias. **Economia**, v. 2, n. 2, p. 604-628, 2000.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, T. M.; SILVA, D. M. Aplicação de Lipases Microbianas na Obtenção de Concentrados de Ácidos Graxos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

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, p. 146-156, 2004.

CEBALLOS, B. S. O.; KÖNIG, A.; OLIVEIRA, J. F. Dam reservoir eutrophication. A simplified technique for a diagnosis of environmental degradation. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 11, p. 3477-3483, 1998.

CEZARINO, V. Isoxaflutole Nova molécula herbicida para as culturas de cana-de-açúcar e do milho. *In: Anais do Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*. Viçosa, MG: SBCPD, p. 79-84, 1997.

CGER (COMMISSION ON GEOSCIENCES, ENVIRONMENTAL AND RESOURCES), **Issues in potable reuse: The viability of augmenting drinking water supplies with, reclaimed water**. Overview of relevant federal guidelines and state regulations, 1998. Disponível em: <http://books.nap.edu/books/0309064163/html/31.html>

CHA, C.; DOERGE, D. R.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of Malachite Green by the Fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4358-4360, 2001.

CHAE, S. K., YU, T. J., KUM, B. M. Experimental manufacture of acorn wine by fungal tannase. **Hanguk Siphum Kwahakhoechi**, v. 15, n. 4, p. 333-334, 1983.

CHANG, L. J.; YANG, P. Y.; WHALEN, S. A. Management of sugarcane mill wastewater in Hawaii. **Water Science and Technology**, v. 22, n. 9, p. 131-140, 1990.

CHAVEZ-LOPEZ, R., PETERSON, M. S.; BROWN-PETERSON, N. J. A. MORALES-GOMEZ, A.; FRANCO-LOPEZ J. Ecology of the Mayan cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* Gunther, in the Alvarado lagoonal system, Veracruz,

México. **Gulf and Caribbean Research**, v. 16, n. 2, p. 123-132, 2005.

CHEN, C. I.; CHANG, H. M. Chemistry of lignin biodegradation. *In: Biosynthesis and biodegradation of wood components*. HIGUCHI, T. (ed.). Academic Press, Orlando, Florida, p. 535-556, 1985. 679 p.

CLAUS, H.; FABER, G.; KOENIG, H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 672-678, 2002.

CLEMENTE, A. R.; DURRANT, L. R. Biodegradation of PAHs in soil by two deuteromycete fungi. **Contaminated Soils, Sediments and Water: Science in the Real World**, v. 9, p. 13-20, 2005.

COHEN, S. Z.; WAUCHOPE, R. D.; KLEIN, A. W.; EADSPORTH, C. V.; GRANCY, R. Offsite transport of pesticides in water: mathematical models of pesticide leaching and runoff. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 2109-2148, 1995.

COLLINS, P. J.; DOBSON, A. D. W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3444-3450, 1997.

COLOMBO, S. Aspectos conceituais do princípio do poluidor-pagador. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 13, p. 16-51, 2004.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), Avaliação da safra agrícola de cana-de-açúcar 2005-2006: Segundo levantamento – Agosto/2005. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/safracana_de_acucaragosto2005.pdf

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), Avaliação da safra agrícola de cana-de-açúcar 2006-2007: Terceiro levantamento – Novembro/2006. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BoletimCana-Novembro2006-07.pdf>

CONCEIÇÃO, D. M.; de ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; de ANGELIS, F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1 p. 99-106, 2005.

CONNELLY, A.; SMYTH, W. F.; MCMULLAN, G. Metabolism of the phthalocyanine textile dye remazol turquoise blue by *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 333-337, 1999.

COPERSUCAR (Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo LTDA), **Pró-Álcool: Fundamentos e Perspectivas**, São Paulo, 1989. 121 p.

COULIBALY, L.; NAVEAU, H.; AGATHOS, S. N. A tanks-in-series bioreactor to simulate macromolecule-laden wastewater pretreatment under sewer conditions by *Aspergillus niger*. **Water Research**, v. 36, n. 16, p. 3941-3948, 2002.

COULIBALY, L.; GOURENE, G.; AGATHOS, N. S. Utilization of fungi for

biotreatment of raw wastewaters. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 620-630, 2003.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. Gasoline Biodegradation in Different Soil Microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 45-49, 2000.

CUTRIM, F. A.; OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; SILVA, R. L. X. Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 85-88, 2006.

DALY, J. S.; DELUCA, B. A.; HEBERT, S. R.; DODGE, R. A.; SOJA, D. T. Imipenem stability in a predried susceptibility panel. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2584-2587, 1994.

DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, S. A. Microbial diversity in mangrove and deep sea ecosystems. **Seshaiyana**, v. 12, n. 1, p. 9-11, 2004.

de FARIAS, M. S. S. **Monitoramento da qualidade da água na bacia hidrográfica do rio Cabelo**, Campina Grande, 2006. 152 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Campina Grande, Engenharia Agrícola.

DE KOKER, T. H.; ZHAO, J.; ALLSOP, S. F.; JANSE, B. J. H. Isolation and enzymic characterisation of South African white-rot fungi. **Mycological research**, v. 104, n. 7, p. 820-824, 2000.

de MATOS, A. T.; MAGALHÃES, M. A.; FUKUNAGA, D. C., Remoção de sólidos em suspensão na água residuária da despulpa de frutos do cafeeiro em filtros constituídos por pergaminho de grãos de café submetido a compressões, **Engenharia Agrícola**, v. 26, n. 2, p. 610-616, 2006.

DE MOT, R.; VERACHTERT, H. Enhanced production of extracellular α -amylase and glucoamylase by amylolytic yeasts using β -cyclodextrin as carbon source, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 459-462, 1986.

de PAULA, E. H.; CAMPOS, L.; AZEVEDO, M. O. Biodegradação de resíduos agroindustriais pelo fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*: análise da atividade celulolítica em condições de indução. Disponível em: http://www.deq.uem.br/biblioteca/deq/Anais/shebVI/V%20Sheb/Oral/Oral_02.pdf, acessado em: 12/06/2005.

de TOLEDO, J. J.; CASTRO, J. G. D. Parâmetros físico-químicos da água em viveiros da estação de piscicultura de Alta Floresta, Mato Grosso. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 1, n. 3, 9 p., 2001.

der MERWE, M. P. R.; BADENHORST, J.; BRITZ, T. J. Fungal treatment of an edible-oil-containing industrial affluent **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 947-953, 2005.

DESCHAMPS, A. M.; OTUK, G.; LEBEAULT, J. M. Production of Tannase and degradation of chestnut tannins by bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v. 61, n. 1, p. 55-59, 1983.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D. K. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1984.

DHOUIB, A.; HAMZA, M.; ZOUARI, H.; MECHICHI, T.; H'MIDI, R.; LABAT, M.; SAYADI, S. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes, **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 431-436, 2005.

DIAS, A. E. X. O. Biorremediação de áreas afetadas por resíduos tóxicos. *In*: SISSINO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M., eds. **Resíduos sólidos, ambiente e saúde: uma visão multidisciplinar**, 1ª ed., Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 138 p., 2000.

DONNISON, L. M.; GRIFFITH, G. S.; HEDGER, J.; HOBBS, P. J.; BARDGETT, R. D. Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of Northern England and Wales. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 253-263, 2000.

DORES, E. F. G.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - Análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

DUCROS, V.; BRZOZOWSKI, A. M.; WILSON, K. S.; ØSTERGAARD, P.; SCHNEIDER, P.; SVENDSON, A.; DAVIES, G. J., Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms, **Acta Crystallographica**, v. 57, n. 2, p. 333-336, 2001.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, n. 2, p. 81-99, 2000.

EL-MORSY, E. S. *Cunninghamella echinulata* a new biosorbent of metal ions from polluted water in Egypt. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1183-1189, 2004.

ENGUITA, F. J.; MARTINS, L. O.; HENRIQUES, A. O.; CARRONDO, M. A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p.19416-19425, 2003.

ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology: three approaches to reduce the environmental impact of the pulp and paper industry. **Science Progress**, v. 75, p. 175-189, 1991.

ERIKSSON, K. E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer-Verlag, New York, 1990. 416 p.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de limnologia**, 2ª ed., Rio de Janeiro, Interciência, 1998. 602 p.

EXTOXNET. Pesticide information profile for temephos. Disponível em: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/pyrethrins-ziram/temephos-ext.html>.

Accessado em 5 de dezembro de 2002.

FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A.; MORAN, P. J. S. Bioreduction of a-haloacetophenones by *Rhodotorula glutinis* and *Geotrichum candidum*. **ARKIVOC**, v.10, p. 404-410, 2003.

FARIAS, G. M.; ELKINS, J. R.; GRIFFIN, G. J. Tannase activity associated with growth of *Cryphonectria parasitica* on American and Chinese chestnut extracts and properties of the enzyme. **European Journal of Forest Pathology**, v. 22, n. 6-7, p. 392-402, 1992.

FERREIRA, A.; CUNHA, C. Sustentabilidade ambiental da água consumida no Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública /Pan American Journal of Public Health**, v. 18, n. 2, p. 93-99, 2005.

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**, Recife, PE, Revista Fitopatologia Brasileira (R.256), Brasília: SBF, v. 27, p. S109-S110, 2002.

FERREIRA, V. S.; MAGALHÃES, D. B.; KLING, S. H.; DA SILVA, J. G.; BON, E. P. S. N-demethylation of methylene blue by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: Stoichiometric relation for H₂O₂ consumption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 255-265, 2000.

FERREIRA-LEITÃO, V. S.; SILVA, J. G.; BOM, E. P. S. Methylene blue and azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II e class III peroxidases. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 42, n. 2, p. 213-221, 2003.

FINK, D. R.; SANTOS, H. F., A legislação de reuso da água, In: **Reuso de água**; MANCUSO, P. C. S., dos SANTOS, H. F. (eds.), Universidade de São Paulo – Faculdade de Saúde Pública, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES. Capítulo 8, p. 261-290, São Paulo, 2002. 588 p.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On Tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p.627-650, 1927.

GABY, W. L.; HADLEY, C. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 74, p. 356-358, 1957.

GANGA, P. S.; NANDY, S. C.; SANTAPPA, M. Effect of environmental factors on the production of fungal tannase: Part I. **Laether Science**, v. 24. p. 8-16, 1977.

GARCIA, I. G.; VENCESLADA, J. L. B.; PENA, P. R. J.; GOMEZ, E. R. Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 2005-2011, 1997.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-26, 1999.

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, n. 4, p. 463-470, 2004.

GILARDI, G. L. Characterization of *Pseudomonas* Species Isolated from Clinical Specimens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 414-419, 1971.

GILL, P. K.; ARORA, D. S.; CHANDER, M. Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia spp.* **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 201–203, 2002.

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

GLASS, M. B., POPOVIC, T. Preliminary Evaluation of the API 20NE and RapID NF Plus Systems for Rapid Identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 479-483, 2005.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial technology: fundamentals of applied microbiology**. Freeman and company, 1998. 662 p.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 242, p. 329–341, 1985.

GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; MAYFIELD, M. B.; KUWAHARA, M.; GOLD, M. H. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, v. 114, n. 3, p. 1077-1083, 1983.

GOLD, M. H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 605-622, 1993.

GOODING, G. V.; LUCAS, G. B. Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica* v. *nicotianae*. **Phytopathology**, v. 49, p. 277-281, 1959.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119–126, 2005.

GRASSI, M. T. As águas do Planeta Terra. **Química Nova na Escola**. Caderno Temático 4, p. 31-40, 2001.

GUIDOLIN, J. C. **Reuso de efluentes**, Secretaria de Recursos Hídricos, Ministério do Meio Ambiente, 2000.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BUDDINGTON, R.; BEELLEN,

R. Efeitos de taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.

GUPTA, R., BRADDOO, S., SAXENA, R. K. Rapid purification of extracellular tannase using polyethylene glycol-tannic acid complex. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 253–255, 1997.

HADI, T. A.; BANERJEE, R.; BHATTARCHARYYA, B. C. Optimization of Tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 11, n. 6, p. 239-243, 1994.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of Solid Media for Identification of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HARKIN, J. M.; OBST, J. R. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. **Experientia**, v. 29, p. 381–387, 1973.

HASLAM, E. Plant polyphenols (syn. Vegetable tannins) and chemical defense – a reappraisal. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 10, p. 1789–1805, 1998.

HASLAM, E. **Plant polyphenols**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 230 p.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 125-135, 1994.

HAWORTH, R. D.; JONES, K.; ROGERS, H. J. Ion-exchange chromatography of *Aspergillus niger* extract, **Proceedings of the Chemical Society**, p. 8–9, 1985.

HEINFLING, A.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 261-266, 1997.

HESPANHOL, I. Potencial de reuso de água no Brasil: agricultura, indústria, municípios, recarga de aquíferos, **Bahia análise & dados**, v. 13, n^o especial, p. 411-437, 2003.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP), **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454–466, 2002.

IIBUCHI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, p.1553–1568, 1972.

ISOLDI, L. A., KOETZ, P. R. Tratamentos biológicos para remoção de matéria carbonada e nitrogenada. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 12, 2004.

ITEM (Irrigação & Tecnologia Moderna), **Reciclagem da água, uma alternativa**

real, ABID, v. 51, p. 55-56, 2001.

ITO, S.; KOBAYASHI, T.; ARA, K.; OZAKI, K.; KAWAI, S.; HATADA, Y. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. **Extremophiles**, v. 2, p. 185-190, 1998.

JEAN, D.; POURRAT, H.; POURRAT, A.; CARNAT, A. Assay of tannase (tannin acylhydrolase EC 3.1.1.20) by gas chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 110, n. 2, p. 369-372, 1981.

JIMENEZ, A. M.; BORJA, R. Influence of aerobic pretreatment with *Penicillium decumbens* on the anaerobic digestion of beet molasses alcoholic fermentation wastewater in suspended and immobilized cell bioreactors. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 193-202, 1997.

JORNAL O ESTADO DE SÃO PAULO. JORNAL O ESTADO DE SÃO PAULO. **Água de reuso**. São Paulo, 2002. Disponível em: www.moraisengenharia.kit.net/agua_de_reuso.html. Acessado em: 29 Out. 2005.

JUANG, D. F.; MORGAN, J. M. The applicability of the API 20E and API Rapid NFT systems for the identification of bacteria from activated sludge. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2001.

KAHMARK, K. A.; UNWIN, J. P. Pulp and paper effluent management. **Water Environmental Research**, v. 71, n. 5, p. 836-852, 1999.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; de ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KAPICH, A. N.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Peroxil radicals are potencial agents of lignin biodegradation. **FEBS letters**, v. 461, n. 1-2, p. 115-119, 1999.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 61, n. 3, p. 221-227, 1997.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENA NADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1121-1127, 1997.

KERN, E. A.; VEEH, R. H.; LANGNER, H. W.; MACUR, R. E.; CUNNINGHAM, A. B. Characterization of Methyl ter-Butyl Ether-Degrading Bacteria from a Gasoline-Contaminated Aquifer. **Biorremediation Journal**, v. 6, n. 2, p. 113-124, 2002.

KHINDARIA, A.; YAMAZAKI, I.; AUST, S. D. Veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16860-16869, 1995.

KIISKINEN, L. L.; RATTO, M.; KRUUS, K. Screening for novel laccase-producing

microbes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 640–646, 2004.

KIM, S. J.; SHODA, M. Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1029-1035, 1999.

KIM, S. J.; SUZUKI, N.; UEMATSU, Y.; SHONDA, M. Characterization of aryl alcohol oxidase produced by dye-decolorizing fungus, *Geotrichum candidum* Dec1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 166-172, 2001.

KING, E.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301–307, 1954.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin, **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KLUCZEK-TURPEINEN, B.; TUOMELA, M.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Lignin degradation in compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 4, p. 374–379, 2003.

KOHLMEYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B. Marine Ascomycetes from algae and animal hosts. **Botanica Marina**, v. 46, n. 3, p. 285-306, 2003.

KONONOVA, S. V.; NESMEYANOVA, M. A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 184-195, 2002.

KOZLOVSKII, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; VINOKUROVA, N. G.; OZERSKAYA, S. M. Effect of microelements on the biosynthesis of secondary metabolites by the fungus *Penicillium citrinum* thom VKM F-1079. **Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 536-540, 2000.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, v. 1, 1984. 660 p.

KRUMHOLZ, L. R.; CRAWFORD, R. L.; HEMLING, M. E.; BRYANT, M. P. Metabolism of gallate and phloroglucinol in *Eubacterium oxidoreducens* via 3-hydroxy-5-oxohexanoate. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 1886–1890, 1987.

KUMAR, V.; WATI, L.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; YADAV, B. S.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Decolorization and Biodegradation of Anaerobically Digested Sugarcane Molasses Spent Wash Effluent from Biomethanation Plants by White-Rot Fungi. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p.83-88, 1998.

KUNZ, A.; ZAMORA, P. P.; MORAIS, S. G.; DURÁN, N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LAMAR, R. T.; DIETRICH, D. M. In Situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n. 10, p. 3093-3100, 1990.

LAMBE, D. W.; STEWART, P. Evaluation of pseudosel agar as an aid in the

identification of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology**, v. 23, p. 377-381, 1972.

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods of measuring proteins. In: COLOWICK, S. P. e KAPLAN, N. O. (eds.) **Methods in enzymology**, New York, Academic Press, v. 3, p. 447-454, 1957.

LEATHAM, G. F.; KIRK, T. K. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. **FEMS Microbiology Letters**, v.16, n. 1, p. 65-67, 1983.

LECOCQ, J.; GUEGUEN, M. Effects of pH and sodium chloride on the interections between *Geotrichum candidum* and *Brevibacterium linens*. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 10, p. 2890-2899, 1994.

LEKHA, P.; LONSANE, B. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied and Microbiology**, v. 44, p. 215–260, 1997.

LIMA, I. F. **Mapa Político do Estado de Alagoas**. Serplan – Al. 1993.

LOVLEY, D. R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 35-44, 2003.

LUDEMANN, V.; POSE, G.; POLLIO, M. L.; SEGURA, J. Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from argentinean salami, **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 13-18, 2004.

MACARIE, H. ; LE MER, J. Overview of the biological processes available for the treatment of sugarcane mill wastewater. **International Sugar Journal**, v. 108, n. 1292, p. 431-439, 2006.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência Agrotécnica**, v. 29, n. 4, p. 833-838, 2005.

MACÊDO, J. A. B. **Águas & águas**. Juiz de Fora: Ortofarma, 2000. 505 p.

MACÊDO, J. A. B. **Métodos Laboratoriais de Análises – Físico-químicas e Microbiológicas – Águas & Águas**. Juiz de Fora, 2001. 302 p.

MARQUES, S.; PALA, H.; ALVES, L.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; GAMA, F. M.; GÍRIO, F. M. Characterisation and application of glycanases secreted by *Aspergillus terreus* CCMI 498 and *Trichoderma viride* CCMI 84 for enzymatic deinking of mixed office wastepaper. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 209-219, 2003.

MARTÍNEZ, A. T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 425-444, 2002.

MARTÍNEZ, Á. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.,

CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A., del RIO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195-204, 2005.

MATTIASON, B.; KAUL, R. 'One-pot' protein purification by process integration, **Biotechnology**, v. 12, n. 11, p. 1087-1089, 1994.

McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R. Effect of the tropical forage *calliandra* on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 78-88, 2001.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed), **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 1997. 440 p.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO J. R., A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**, Rio de Janeiro, 2004, 158 p., Tese (Doutorado)- COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

METCALF; EDDY, I. **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse**. 3rd edition, New York: McGraw Hill, 1991. 1334 p.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MILLER, R. M. Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. *In*: SKIPPER, H. D.; TURCO, R. F. (eds.), **Bioremediation: science and applications**. Soil Science Society of America, Madison, p. 33-54. 1995.

MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 223-232, 2000.

MONTEIRO, J. M.; de ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; de AMORIM, E. L. C. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de saúde pública**, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, Editora UFLA. 2002. 626 p.

MORENO, A. A Indústria sucro-alcooleira utiliza em média 20 m³ de água por tonelada de cana. **Jornal da Cana** (31/03/2003), 2003.

MOTA, M. B. R.; MANZANARES, M. D.; SILVA. R. A. L. Viabilidade de reutilização de água para vasos sanitários. **Revista Ciências do Ambiente On-Line**, v. 2, n. 2,

p. 24-29, 2006.

MOTA, S. **Preservação e conservação de recursos hídricos**, 2^a ed., Rio de Janeiro, ABES, 1995. 187 p.

MUELLER, J. G.; CERNIGLIA, C. E.; PRITCHARD, P. H. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *In*: R. L. CRAWFORD AND D. L. CRAWFORD (ed.) **Bioremediation: Principles and applications**. Cambridge University Press, New York, p. 125–194, 1996. 412 p.

NAIME, R.; FAGUNDES, R. S. Controle da Qualidade da Água do Arroio Portão, Portão, RS. **Pesquisas em Geociências**, v. 32, n. 1, p. 27-35, 2005.

NEDER, R. N. **Microbiologia: Manual de laboratório**. São Paulo, Nobel. 1992. 137 p.

NIETO, L. M.; CORMENZANA, A. R.; PAREJA, P. G.; HOYOS, S. E. G. Phenolic compounds biodegradation of olive mill wastewater with *Aspergillus terreus*. **Grasas y Aceites**, v. 43, p. 75-81, 1992

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

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, n. 4, p.1025-1033, 2001.

OGAWA, N.; OKAMURA, H.; HIRAI, H.; NISHIDA, T. Degradation of the Antifouling Compound Irgarol 1051 by Manganese Peroxidase from the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Chemosphere**, v. 55, p.487-491, 2004.

OLLIKKA, P.; HARJUNPAA, T.; PALMU, K.; MANTSALA, P.; SUOMINEN, I. Oxidation of Crocein Orange G by lignin peroxidase isoenzymes. Kinetics and effect of H₂O₂. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 75, n. 2-3, p. 307-321, 1998.

OSAWA, R. O. Formation of clear zone on tannin treated Brain Heart Infusion Agar by a *Streptococcus* sp. isolated from faeces of Koalas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 829–831, 1990.

OSAWA, R.; KUROIISO, K.; GOTO, S.; SHIMIZU, A. Isolation of tannin-degrading *Lactobacilli* from humans and fermented foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3093-3097, 2000.

PALLERONI, N. J. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. **Microbiology**, v. 149, p.1-7, 2003.

PALLERONI, N. J. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of Microbiology**, v. 64, p. 231-251, 1993.

PAZ, V. P. S.; TEODORO, R. E. F.; MENDONÇA, F. C. Recursos hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 3, p. 465-473, 2000.

PAZARLIOGLU, N. K.; UREK, R. O.; ERGUN, F. Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1923–1929, 2005.

PEREIRA, J. A. R. **Geração de resíduos industriais e controle ambiental**, disponível em: http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011213_01.pdf, **2001**, acessado em 25/03/2006.

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, p. 53-63, 2002.

PEROVANO Fº, N., **Biorremediação e Monitoramento de Parâmetros Físico-Químicos de Águas Residuárias da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool**, Maceió, 2004. 103 p. Monografia (Licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas, Departamento de Química.

PILDAIN, M. B.; NOVAS, M. V.; CARMARÁN, C. C. Evaluation of anamorphic state, wood decay and production of lignin-modifying enzymes for diatrypaceous fungi from Argentina. **Journal of Agricultural Technology**, v. 1, n. 1, p. 81-96, 2005.

PINTO, G. A. S.; COURI, S.; LEITE, S. G. F.; de BRITO, E. S. Tanase: Conceitos, Produção e Aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 435-462, 2005.

PORTO, M. F. A.; BRANCO, S. M.; de LUCA, S. J. Caracterização da qualidade das águas. *In*: BRANCO, S. M. & R. L. L. (eds.) **Hidrologia Ambiental**. Coleção ABRH de Recursos Hídricos, EDUSP, São Paulo, p. 27-165, 1991. 411 p.

QUEIROZ, C. R. A. A.; de MORAIS, S. A. L.; do NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p.485-492, 2002.

RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASILCHENKO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1-17, 2004.

RACKE, K. D. Pesticides in the soil microbial ecosystem. *In*: RACKE, K. D. & COATS, J. R., eds. Enhanced biodegradation of pesticides in the environment. **American Chemical Society (ACS Symposium Series, 426)**, p.1-12, 1990.

RAGEN, K.; HOI, L. W. S.; RAMJEAWON, T. **Pilot plant investigation of the treatment of synthetic sugar factory wastewater using the upflow anaerobic sludge blanket (uasb) process**, AMAS 2001. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius. Disponível em:

<http://www.gov.mu/portal/sites/ncb/moa/farc/amas2001/pdf/s45.pdf>. Acessado em: 20 de março de 2006.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Pleurotus* spp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 389–393, 2004.

RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN, J.; KORKOUTAS, Y.; MARCHANT, I. P. R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of *n*-alcane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003.

RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN, J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**, v. 85, p. 257–261, 2002.

RAJKUMAR, S.; NANDY, S. C. Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 525-527, 1983.

RAMJEAWON T.; BAGUANT J. Evaluation of critical BOD loadings from Mauritian sugar factories to streams and standards setting. **Journal of Environmental Management**, v. 45, n. 2, p. 163-176, 1995.

RAY, R. R. Production of *alpha*-amylase and xylanase by an alkalophilic strain of *Penicillium griseoroseum* RR-99. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 50, n. 3-4, p. 305-309, 2001.

REID, I. D. Biodegradation of lignin. **Canadian Journal of Botany**, v. 1, n. 1, p. S1011-S1018, 1995.

RHODES, A.; FLETCHER, D. L. Principles of industrial microbiology. **New Phytologist**, v. 66, n. 4, p. 829-830, 1967.

RODIONOVA, N. A.; DUBOVAYA, N. V.; MARTINOVICH, L. I.; BEZBORODOV, A. M. Formation of extracellular enzyme systems during the growth of *Geotrichum candidum* 3C on Cell walls isolated from cereal grain coats. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 480–482, 2001.

ROLDAN-CARRILLO, T. R.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R.; DIAZ-CERVANTES, D.; VAZQUEZ-TORRES, H.; MANZUR-GUZMAN, A.; TORRES-DOMINGUEZ, A. Starch-based plastic polymer degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse pith: enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 1, p. 1–5, 2003.

ROLDÁN-CARRILLO, T.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. DÍAZ-CERVANTES, D.; VÁZQUEZ-TORRES, H.; MANZUR-GUZMÁN, A.; TORRES-DOMÍNGUEZ, A. Starch-based plastic polymer degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse pith: enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 1-5, 2003.

RÖSCH, R.; LIESE, W. Untersuchungen über die enzyme von Bläuepilsen –

Phenoloxidasen-Aktivität. **Archivoc Mikrobiology**, v.76, p.212-218, 1971.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

RYAN, S. M.; FITZGERALD, G. F.; van SINDEREN, D. Screening for and Identification of Starch-, Amylopectin-, and Pullulan-Degrading Activities in Bifidobacterial Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5289–5296, 2006.

SANTIAGO, M. F.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Seleção de Cepas Produtoras de Sideróforos e Sua Aplicação no Tratamento de Efluentes Têxtil e Papeleiro. *In: Anais da II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente*, Florianópolis, v. 2, n. 16, 1998.

SAWYER, C. N.; MCCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. **Chemistry for Environmental Engineering**. 4th edition. New York: McCarty–Hill Book Company, 1994.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v. 279, n. 1, p. 85-89, 2000.

SILVA, A. C.; DEZOTTI, M.; SANT'ANNA JR., G. L. Treatment and detoxification of a sanitary landfill leachate. **Chemosphere**, v. 55, p. 207-214, 2004.

SILVA, M. R.; da SILVA, M. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos, **Revista de Nutrição**, V. 12 (1), p. 5-19, 1999.

SILVA, N. **Testes Bioquímicos Para Identificação de Bactérias em Alimentos**, Informes Técnicos Nº1. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. 87 p.

SILVA, W.P.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.G.M. Biochemical characteristics of typical *Staphylococcus aureus* in mastitis milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 103-106, 2000.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**, 5ª ed., Âmbito cultural editora, 1995. 336 p.

SINGH, H. Theoretical basis for medical geology, disponível em: <http://www.medicalgeology.org/PDF/MedGeo.pdf>, 2003, acessado em: 30/11/2005.

SINGH, P.; THAKUR, I. S. Colour removal of anaerobically treated pulp and paper mill effluent by microorganisms in two steps bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 218–223, 2006.

SOARES, G. M. B.; AMORIM, M. T. P.; HRDINA, R.; FERREIRA, M. C. Studies on the Biotransformation of Novel Disazo Dyes by Laccase. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 581-587, 2002.

SPIERS, A. J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v. 146, p. 2345–2350, 2000.

STIRLING, M. Soil biology and its importance in soil health, *In: Soil health: the foundation of sustainable agriculture. Proceedings of a workshop on the importance of soil health in agriculture*. Wollongbar Agricultural Institute. June 20-21 2001. LINES-KELLY, R., ed., p.14-19, 2001. 149 p.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; van RENSBURG, D P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces*, *Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 182-190, 2001.

SUSLOW, T.; SCHROTH, M.; ISAKA, M. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. **Phytopathology**, v. 72, n. 2, p. 917-918, 1982.

SUZZI, G.; SCHIRONE, M.; MARTUSCELLI, M.; GATTI, M.; FORNASARI, M. E.; NEVIANI, E. Yeasts associated with Manteca, **FEMS yeast research**, v. 3, n. 2, p. 159-166, 2003.

TEIGHEN V. Sur la fermentation gallyque. **Compte Rendus de l'Academie des Science**, v. 65, p. 1091-1094, 1867.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**, v. 221, p. 661-663, 1983.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre:Artmed, 2000. 827p.

TOUR, U.; WARIISHI, H.; SCHOEMAKER, H. E.; GOLD, M. H. Oxidation of phenolic arylglycerol β -aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound. **Biochemistry**, v. 31, p. 4986-4995, 1992.

TREEN-SEARS, M. E.; MARTIN, S. M.; VOLESKY, B. Propagation of *Rhizopus* *vanicus* biosorbent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 137-141, 1984.

TRUPKIN, S.; LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; VIALE, A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 682-690, 2003.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Z. Naturforsch**, v. 57, p. 356-360, 2002.

TUNDISI, J.G. **Água no Século XXI – Enfrentando a Escassez**. Instituto Internacional de Ecologia, Rima Editora, São Carlos, 2003. 248 p.

TUOMELA, M. **Degradation of lignin and other 14C-labelled compounds in**

compost and soil with an emphasis on white-rot fungi. Helsinque, 2002. 82 p. dissertação acadêmica em Microbiologia. Universidade de Helsinque, Departamento de Química Aplicada e Microbiologia, Divisão de Microbiologia.

UNICA (União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo). http://www.unica.com.br/pages/cana_origem.asp. Acessado em: 15/08/2005.

van HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VARES, T. **Ligninolytic enzymes and lignin-degrading activity of taxonomically different white-rot fungi.** Dissertação (Mestrado). University of Helsinki, Helsinki, 1996.

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

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VIJAYARAGHAVAN, K.; MURTHY, D. V. S. Effects of toxic substances in anaerobic treatment of tannery wastewater. **Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 152-155, 1997.

von SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 2ª ed. Minas Gerais: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. 243 p.

WELLINGHAUSEN, N.; KOTHE, J.; WIRTHS, B.; SIGGE, A.; POPPERT, S. Superiority of Molecular Techniques for Identification of Gram-Negative, Oxidase-Positive Rods, Including Morphologically Nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from Patients with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4070-4075, 2005.

WEN, L.; MIAO, Z. W.; QING, W. D. Chemical Modification of Xylanase from *Trichosporon cutaneum* Shows the Presence of Carboxyl Groups and Cysteine Residues Essential for Enzyme Activity, **Journal of Protein Chemistry**, v. 18, n. 6, 677-686, 1999.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1-2, p. 161-187, 2003.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1001-1013, 1995.

WOLMARANS, B.; de VILLIERS, G. H. Start-up of a UASB effluent treatment plant on distillery Wastewater. **Water SA**, v. 28, n. 1, p. 63-68, 2002.

WONG, S. S. Y.; HO, T. Y. C.; NGAN, A. H. Y.; WOO, P. C. Y.; QUE, T.; YUEN, K. Biotyping of *Penicillium marneffe* Reveals Concentration-Dependent Growth

Inhibition by Galactose, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1416–1421, 2001.

WONG, Y. X.; YUNH, J. Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.

WORLD BANK GROUP, **Pollution prevention and abatement handbook: toward cleaner production**, p. 401-403, 1999. 472 p.

WU, J.; XIAO, Y.; YU, H. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 12, p. 1357–1363, 2005.

YAMADA, H.; ADACHI, O.; WATANABE, M.; SATO, N. Studies of fungal tannase. Part I. Formation, purification and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 1070-1078, 1968.

YAMAOKA-YANO, D. M.; VALARINI, P. J. Métodos de identificação de bactérias. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 369-390, 1998.

YANG, S. S.; WEI, C. B.; KOO, K.; TSAI, S. S. Food and agricultural wastes produced in Taiwan area. **Journal of the Biomass Energy Society of China**, v. 10, p. 70–87, 1991.

YEE, D. C.; WOOD, T. K. 2,4-Dichlorophenol degradation using *Streptomyces viridosporus* T7A lignin peroxidase. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 1, p. 53-59, 1997.

YESILADA, O.; ÖZCAN, B. Decolorization of Orange II Dye With the Crude Culture Filtrate of White rot Fungus, *Coriolus versicolor*. **Turkish Journal of Biology**, v. 22, n. 4, p. 463-476, 1998.

YESILADA, O.; SIK, S.; SAM, M. Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia troglitii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 37-42, 1998.

YOUNG, L.; YU, J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 1187-1193, 1997.

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.

ZHAO, X.; HARDIN, I. R.; HWANG, H. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 57, n. 1, p. 1–6, 2006.

ZHENG, Z.; LEVIN, R. E.; PINKHAM, J. L.; SHETTY, K. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 31-37, 1999.

APÊNDICE 1:

COLORAÇÕES E TESTES PARA AVALIAR CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS ISOLADOS

COLORAÇÕES

Foram utilizadas as seguintes colorações:

1. Coloração de Gram (NEDER, 1992)

Inicialmente, preparou-se a solução de Cristal de Violeta. Para tanto, dissolveu-se 4 g de cristal de violeta em 20 mL de álcool a 95 % e misturou-se esse volume com outra solução contendo 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada. Também preparou-se uma solução de Safranina, dissolvendo-se 0,5 g desse corante em 50 mL de álcool e 50 mL de água destilada.

Para a identificação das formas e da constituição da parede celular das bactérias e leveduras, empregou-se essa coloração conforme descrito por NEDER (1992). Essa coloração classifica os microrganismos em Gram positivos (não possuem envoltório lipopolissacarídico) e Gram negativos (possuem envoltório lipopolissacarídico). Assim, sobre uma lâmina de vidro previamente asséptica e deslipidizada, portanto, depositou-se uma gota de água estéril. Com a alça flambada, coletou-se parte de uma unidade formadora de colônia em meio sólido (repetido para cada cultura), e friccionou-se o material sobre a gota de água na lâmina. Em seguida, fixou-se o esfregaço fino ao fogo do bico de Bunsen. Cobriu-se o esfregaço com a solução de cristal de violeta (corante básico) durante um minuto. Fez-se, então, o esgotamento da lâmina e cobriu-se a mesma com solução de Lugol, também por um minuto. Novamente, esgotou-se a lâmina e gotejou-se o esfregaço até o desprendimento total do corante, inclinando-se, com álcool a 95 %. Cada lâmina foi lavada em água corrente e coberta com solução de safranina, esperando-se cerca de trinta segundos antes do esgotamento total dessa solução. Finalmente, efetuou-se a secagem de cada lâmina assim tratada, com papel de filtro e depois utilizou-se um microscópio trinocular Coleman (magnitudes de 64 a 1600 X), para observação das células.

2. Confirmação da coloração de Gram (SUSLOW *et al.*, 1982)

Com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada ao fogo e

resfriada, transferiu-se parte de uma colônia bacteriana ou leveduriforme para uma gota (cerca de 30 µL) de solução de KOH a 3 % (p/v) depositada sobre lâmina de vidro asséptica e deslipidizada. Durante 15 segundos, realizou-se a rotação circular do material com a alça, observando a ocorrência da formação de um fio viscoso da emulsão de microrganismos. Em caso positivo estes foram considerados Gram-negativos.

3. Coloração de esporos (verde malaquita) (NEDER,1992)

Primeiramente, preparou-se uma solução de verde malaquita pela dissolução de 0,5 g desse corante em 20 mL de água destilada.

O esfregaço de células foi corado com solução de verde malaquita e fixado pelo aquecimento da lâmina até o desprendimento de vapores sem que o material ferve-se ou seca-se. Após resfriada, a lâmina foi lavada com água corrente e tratada com solução de safranina durante 20-30 min. Depois de seca a mesma foi examinada ao microscópio com objetiva de imersão. Certos microrganismos formam esporos (ou endósporos) que se desenvolvem em determinadas posições e tamanhos, que servem de característica na identificação.

4. Coloração de Bactérias Álcool-Ácido Resistente (BIER, 1976)

Preparou-se, inicialmente uma solução A pela dissolução de 0,3 g de fucsina básica em 10 mL de álcool 95°. Em seguida, a solução B foi preparada dissolvendo-se 5 g de fenol fundido em 95 mL de água destilada. Feito isso, misturou-se as duas soluções.

O esfregaço foi corado com essa mistura chamada de Fucsina de Ziehl concentrada, e fixado até emissão de vapores. O corante foi esgotado e o esfregaço submetido à cobertura álcool-clorídrico a 1 %, após 15-30 s, lavou-se o mesmo em água corrente e corou-se novamente com solução de azul de metileno de Loeffler. Células álcool-ácido resistentes coraram em vermelho e as demais coraram em azul.

5. Vermelho Neutro

Uma alíquota de 100 µL de uma suspensão bacteriana foi depositada em uma lâmina (limpa e deslipidada), em seguida depositou-se sobre a suspensão uma alíquota de 100 µL da solução de vermelho neutro (1 %), após isso, cobriu-se o material com uma lamínula e o mesmo foi examinado ao microscópio. As células

viáveis não são coradas com o vermelho neutro, enquanto as células inviáveis são coradas de vermelho escuro (VERMELHO *et al.*, 2006).

6. Anilina Azul Algodão de Lactofenol

A solução de lactofenol azul algodão foi preparada com seguinte composição: 20 g de ácido láctico, 20 g de cristais de fenol, 20 g de glicerina, 0,05 g de azul algodão e 20 mL de água destilada. Primeiramente, fundiu-se o fenol e, então, juntou-se o restante dos materiais, após 24 h de repouso, a solução foi filtrada e armazenada em frasco âmbar. O corante azul algodão pode ser substituído por outros corantes, sem maiores problemas, tais como azul anilina. Numa lâmina (limpa e deslipizada) depositou-se uma gota da solução de azul algodão e com uma alça retirou-se uma parte do micélio e depositou-se sobre a gota. Após, colocou-se uma lamínula e procedeu-se a observação microscópicas das estruturas reprodutivas das espécies fungicas estudadas (ABBAS *et al.*, 1995).

7. Azul de Toluidina

A solução de azul de toluidina foi preparada pela adição de 0,5 g de azul de toluidina, 15 mL de álcool a 95° GL. 3 g de ácido fênico e 100 mL de água destilada.

Numa lâmina (limpa e deslipizada) depositou-se uma gota da solução de azul de toluidina e com uma alça retirou-se uma parte do micélio e depositou-se sobre a gota. Após, colocou-se uma lamínula e procedeu-se a observação das estruturas reprodutivas das espécies fúngicas estudadas (SIQUEIRA *et al.*, 1984).

PROVAS BIOQUÍMICAS

Em cada cultura sólida a seguir descrita, foram avaliadas características como o 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.

Todos os testes foram realizados em triplicada para cada microrganismo.

1. Teste de Catalase

Dissolveu-se o reagente dicloro N,N-dimetil-p-fenilenodiamônio (solução aquosa 1 %) em papel de filtro (Whatman nº 1), friccionando-se sobre o mesmo papel uma porção de um cultivo jovem (24h) com o auxílio de uma alça de platina. O desenvolvimento de uma cor azul intensa no intervalo de 10 s indicou síntese da enzima citocromo c-oxidase (SILVA, 1996).

2. 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).

3. Meio Eosina Azul de Metileno (EMB)

Dissolveu-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.

4. 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 (2000).

5. 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 59**).

6. Meio Citrato-Simons

Acrescentou-se 0,75 g de Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 0,05 g de glucose, 0,1 g de cloridrato de cisteína, 0,125 g de extrato de levedura, 0,25 g de KH₂PO₄, 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 59**).

7. Meio SIM (Sulfito–Indol–Motilidade)

Suspendeu-se 30 g do meio comercial desidratado (Merk KGaA – pH = 7,3 ± 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 59**), conforme VERMELHO *et al.* (2006).

8. Meio Motilidade, Manitol, Redução de Nitrato

Para determinação da fermentação de manitol foi utilizado o meio sintético Caldo Vermelho de Fenol-Manitol que contém 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 (VERMELHO *et al.*, 2006).

9. Meio Agar-Uréia (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 KH₂PO₄; 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)



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 +).

10. Meio para Redução de Nitrato

Dissolveu-se 5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 1 g de KNO₃, 4 g de ágar para 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 (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). 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-

Dissolveu-se 2 g de triptona, 5 g de NaCl, 0,3 g de K₂HPO₄, 0,08 g de azul de bromotimol, 2 g de ágar em 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 μ m). 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+

Dissolveu-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, 2 g de ágar em 1 L de água destilada. Após homogeneização dos reagentes (pH ajustado para 7), o meio foi esterilizado em autoclave 120°C, 1 atm, durante 15 min. Após resfriamento adicionou-se a solução de glicose, inoculou-se e incubou-se o meio conforme descrito no item 4.4.5. O teste foi realizado em triplicada para cada microrganismo (SILVA, 1996).

13. Meio para Atividade Gelatinolítica – em Tubos

Dissolveu-se 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 120 g de gelatina em 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).

14. Meio de Rugai (BIER, 1976)

Dissolveu-se 10 g de peptona, 2 g de extrato de carne, 5 g de cloreto de sódio, 2 g de fosfato di-sódico, 1 g de L.-triptofano, 11 g de ágar, 2 mL de solução alcoólica 15 % de azul de bromotimol, em 1 L de água destilada. Em seguida, aqueceu-se o meio para a dissolução, ajustou-se o pH para 7,4 (25 °C) com NaOH a 4 %, filtrou-se em algodão, e completou-se o volume novamente para 1 L com água destilada. Esse material foi autoclavado (120 °C, 1 atm, 20 min). Paralelamente, preparou-se o indicador para H₂S, dissolvendo-se 2 g de extrato de sódio, 2 g de sulfato ferroso amoniacal, 2 g de tiosulfato de sódio, 80 g de sacarose, 10 g de glicose e 40 g de uréia em 850 mL de água destilada.

Esse material foi disposto em frasco Erlenmeyer (250 mL) esterilizado. Após cerrar o frasco com rolha de cortiça também esterilizada, o material foi aquecido em banho Maria a 65 °C, por 1 h, até sua dissolução completa e esterilização.

Para o preparo do meio final, adicionou-se a 800 mL do meio básico fundido 14 mL da solução de indicador de H₂S, com a devida assepsia. Homogeneizou-se e distribuiu-se volumes de cerca de 4 mL em tubos de ensaio estéreis, cujas rolhas de algodão foram previamente fixadas com uma fita de papel de filtro estéril impregnada com ácido oxálico saturado (reativo para indol). Os meios foram solidificados de forma inclinada e incubados a 30 ± 1 °C durante 48 h para observação de possível contaminação. Comprovando-se a esterilidade, efetuou-se a inoculação com colônias dos microrganismos, por estria e por picada, incubando-se as culturas (48 h, 30 ± 1 °C). Nas culturas em tubo foi possível verificar: desaminação do L-triptofano (ápice verde), produção de indol (fita de papel vermelha), fermentação de sacarose (ápice ácido amarelo), fermentação da glicose (base ácida=amarela), hidrólise de uréia (base alcalina = azul), produção de gás

(bolhas), de H₂S (pigmento negro).

15. Meio Caldo-Bromocresol Púrpura

O meio foi composto de: 10 g de triptona, 10 g de glicose, 1,5 g de extrato de levedura, 0,04 mg de púrpura de bromocresol, 2 g de ágar e 1000 mL de água destilada. O mesmo foi distribuído em tubos de ensaio e esterilizado (121 °C, 1 atm, 20 min). Após, deixou-se solidificar na posição vertical.

A inoculação foi por picada profunda, e cubriu-se um dos tubos com uma camada de vasilina, nos tubos para avaliação em anaerobiose, e incubou-se a 30 °C. Os tubos foram avaliados, depois de 1, 3, 5 e 10 dias após a inoculação, quanto a formação de gás e ácido, que foi evidenciado pela viragem a amarelo.

Meio destinado a estudos de utilização de açúcares ou aminoácidos. Adiciona-se o substrato desejado em concentração e observa-se ou não a mudança da coloração inicial. A reação final positiva com açúcares é de cor amarela, com aminoácidos é qualquer cor diferente do amarelo (BIER, 1976).

16. Meio Ágar-Tirosina

O meio continha: 15 g de glicerol, 0,5 g de L-tirosina, 0,5 g de L-asparagina, 1 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g de NaCl, 0,01 g de Fe₂SO₄, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada. O meio foi autoclavado (121 °C, 1 atm, 20 min) e distribuído em tubos de ensaio e deixado solidificar de forma inclinada.

Os isolados foram repicados com estrias de uma alçada da cultura na rampa dos tubos e incubados a 30 °C, por até 10 dias. Observou-se, periodicamente, se houve desenvolvimento de uma zona clara e transparente de decomposição e dissolução dos cristais de tirosina, na região abaixo da rampa (teste positivo), ou não formação dessa zona, mantendo o meio opaco inalterado (teste negativo) (RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

17. Confirmação de Provas Enzimáticas/Fisiológicas pelo Sistema API

Para confirmação/comparação dos resultados para as diversas características fisiológicas/enzimáticas examinadas nos testes acima descritos, para os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, os mesmos foram inoculados 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 60a**).

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 60c**). 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).

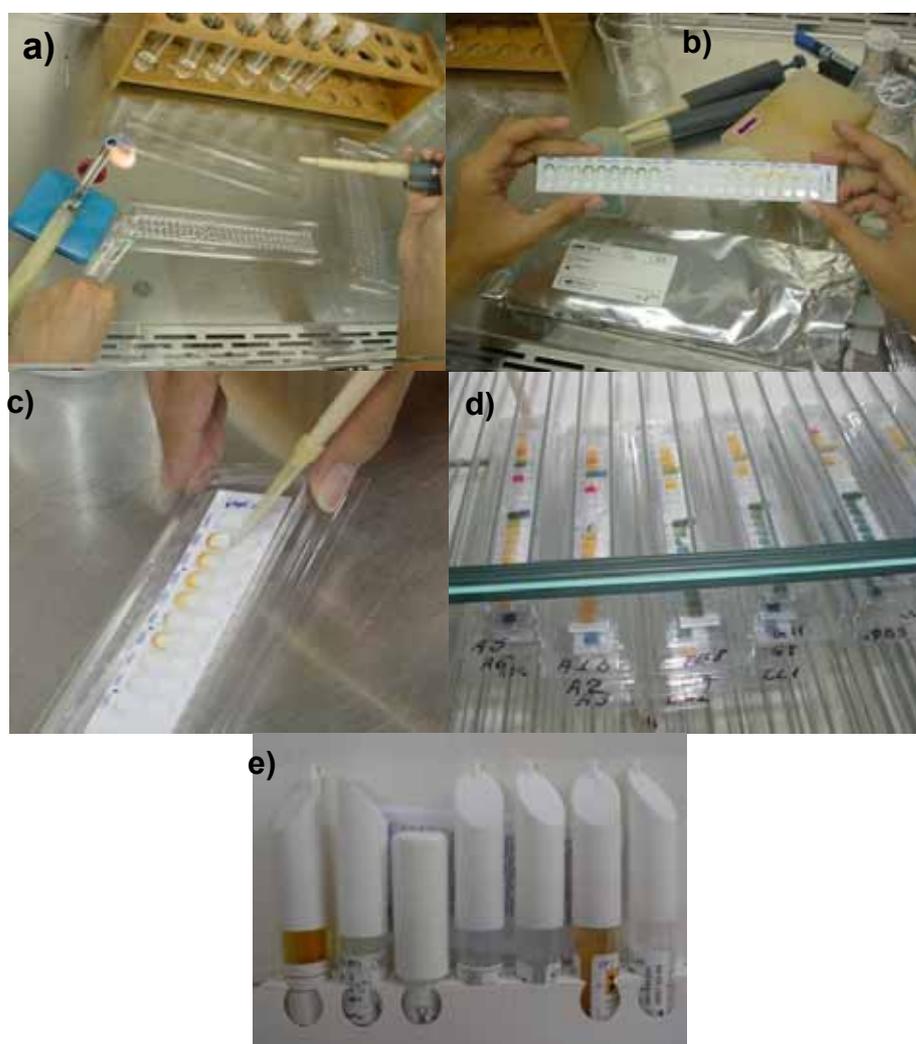


Figura 60. a) Caixa de incubação do sistema API 20E (b), usado para identificação de microrganismos G⁻, com 5 mL de água destilada esterilizada. c) Inoculação da suspensão de microrganismos nas galerias do sistema. d) Sistema API 20E inoculado e incubado por 24 h a 37 °C. e) Reveladores do kit API.

Finalmente, o conjunto foi incubado aerobicamente a 35 ± 1 °C, por 24 h (**Figura 60d**). As leituras foram traduzidas por alterações de cor ou reveladas pela adição de reagentes específicos do *kit* API (**Figura 60e**). 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 Biomerieux SA).

APÊNDICE 2:

MEIOS E PROVAS BIOQUÍMICAS UTILIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Pseudomonas*

1. Meio King A

Utilizado para detectar e diferenciar *Pseudomonas aeruginosa* de outras *Pseudomonas*, e baseia-se na produção de piocianina e inibição da fluoresceína (pioverdina).

Assim, dissolveu-se 20 g de gelatina, 1,4 g de cloreto de magnésio, 10 g de sulfato de potássio e 13,6 g de ágar bacteriológico em 1000 mL de água destilada. Após a esterilização em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min), o meio foi vertido em tubos de ensaio e deixado solidificar de forma inclinada. Em tubos, o meio foi inoculado com 100 µL de suspensão de isolados com características de *Pseudomonas* sp (concentração $1,81 \times 10^7$ células/mL), a partir de culturas com 24 h, e incubados a 30 ± 1 °C por 72 h.

Quando presente, o pigmento se difunde no meio e a cor azul é observada. A confirmação da produção da piocianina é realizada pela extração com clorofórmio. Para tanto, adicionou-se 2 mL de clorofórmio ao tubo do meio e agitou-se levemente para a remoção do pigmento (KING *et al.*, 1954).

2. Meio King B

Este meio é utilizado para bactérias do gênero *Pseudomonas*, visando à diferenciação entre os grupos fluorescentes e não fluorescentes.

Assim, dissolveu-se 5 g de peptona, 0,375g de difosfato de potássio, 2,5 mL de glicerol e 3,750 g de Agar bacteriológico em 250mL de água destilada, sob aquecimento. Em seguida, ajustou-se o pH para 7,2 (25 °C) e adicionou-se lentamente 0,375g de sulfato de magnésio heptahidratado.

Após a esterilização em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min), o meio foi vertido em tubos de ensaio e deixado solidificar de forma inclinada. Em tubos, o meio foi inoculado com 100 µL de suspensão de isolados com características de *Pseudomonas* sp (concentração $1,81 \times 10^7$ células/mL), a partir de culturas com 24 h, e incubados a 30 ± 1 °C por 72 h.

Em seguida, as culturas foram expostas à luz ultravioleta como descrito por BERGAMIN F^o *et al.* (1995). As colônias que manifestaram fluorescência azul foram

consideradas *P. aeruginosa*, enquanto a fluorescência amarelo-esverdeada é característica de *P. fluorescences* e *P. putida*, em muito menor intensidade nesta última.

3. Meio Ágar Leite

Espécies de *Pseudomonas* crescem abundantemente no ágar leite a 30 °C, enquanto que seu crescimento é inibido a 6,5 °C.

A avaliação foi feita utilizando-se o meio ágar leite com a seguinte composição: 1 g de leite em pó desnatado, 5 g de caseína, 2,5 g de extrato de levedura, 1 g de glicose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada.

Após a dissolução do material, o meio foi esterilizado, em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 min). Quando resfriado (\pm 45 °C), o meio foi vertido em placas de petri e deixado solidificar.

As placas foram, então, inoculadas com uma alçada de colônia das culturas a serem avaliadas e incubadas a 30 °C e 6,5 °C, no escuro. Em 24 e 48 h, as colônias foram avaliadas quanto ao crescimento, e as respostas foram classificadas como abundante, moderada, escassa ou inibido.

4. Produção de caseinase

Na avaliação da produção de caseinase utilizou-se o meio descrito acima (ágar Leite). As culturas foram incubadas a 30 °C por 5 dias. A presença dessa enzima é evidenciada facilmente pela visualização de zonas translúcidas ao redor das colônias, em contraste com o restante do meio que continua turvo (NEDER, 1992).

APÊNDICE 3:

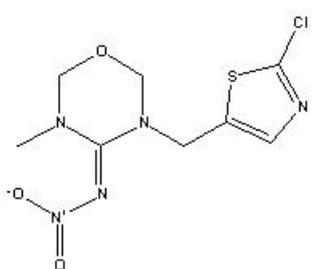
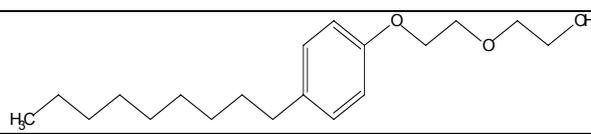
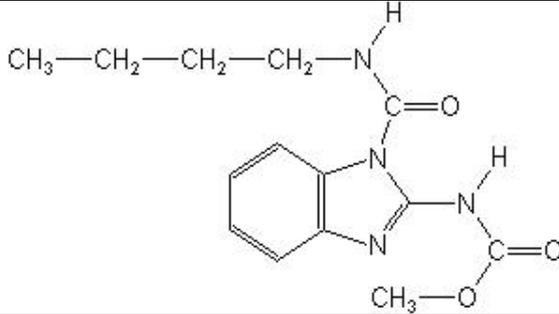
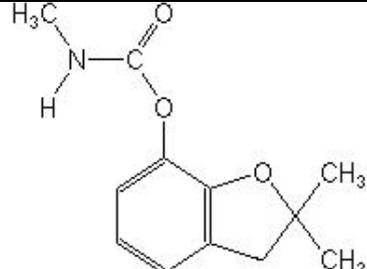
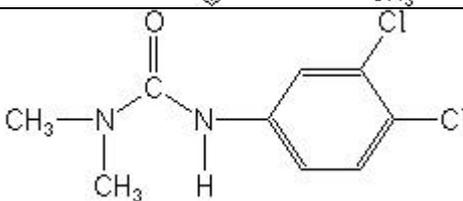
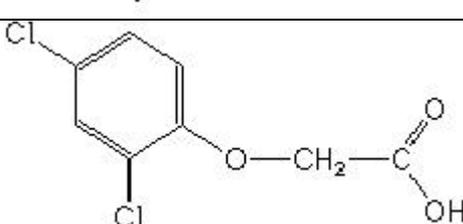
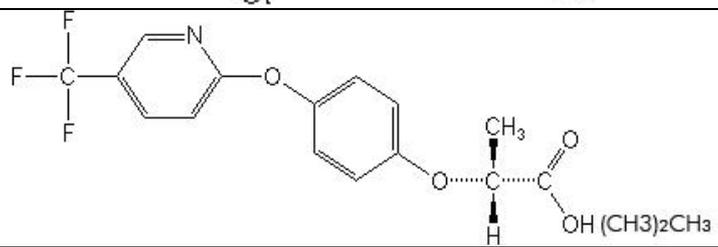
AGROQUÍMICOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA TESTES DE BIODEGRADAÇÃO

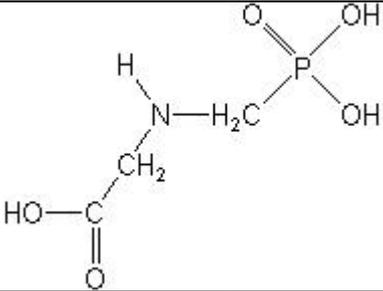
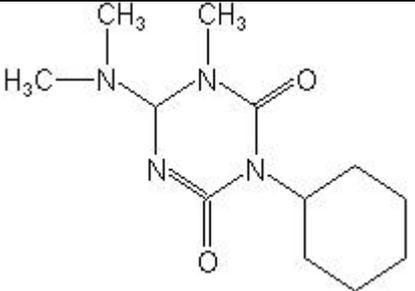
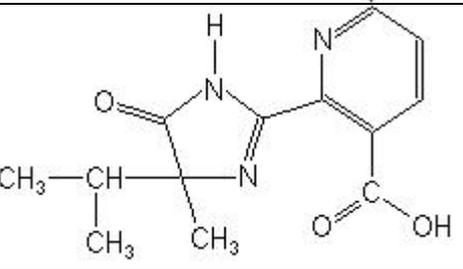
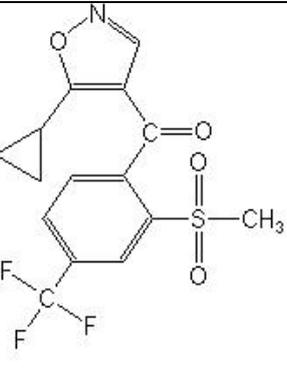
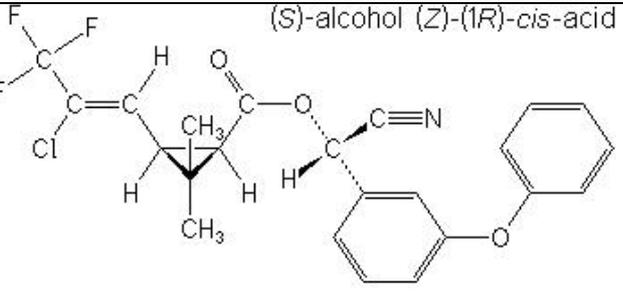
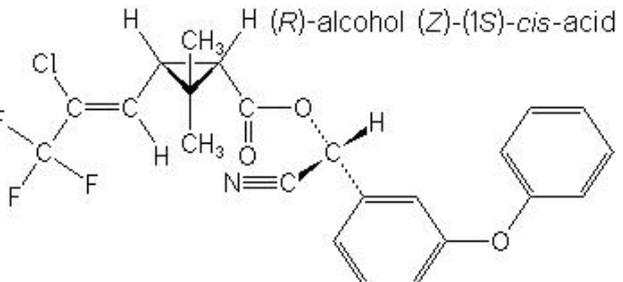
Os insumos mais utilizados no cultivo da cana da Usina Coruripe são fertilizantes e herbicidas (**Quadro 5**). Para o controle de pragas, a Usina Coruripe adotou o controle biológico.

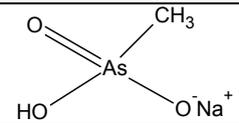
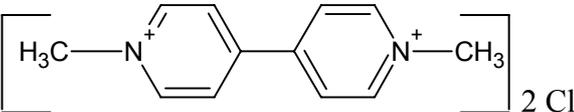
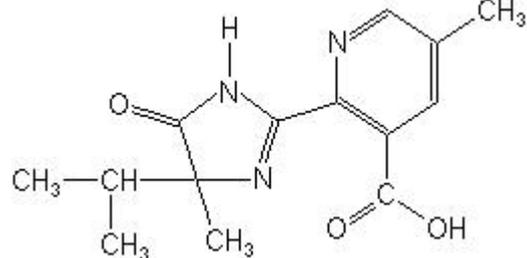
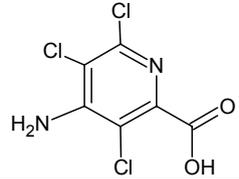
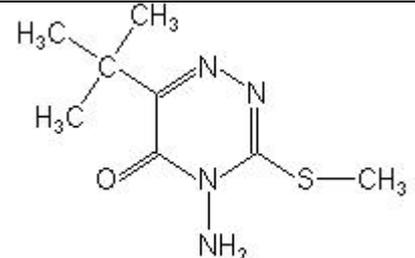
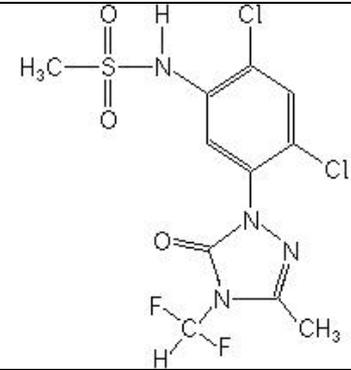
Quadro 5. Agroquímicos utilizados nos plantios de cana da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool.

AGROQUÍMICO	AÇÃO	CLASSE	APLICAÇÃO NA MATRIZ DE ALAGOAS
ACTARA	INSETICIDA	III	antes da época chuvosa, de fevereiro a julho; 200-400 g/ha, 1.250 ha
AGRAL-ETILENOX	ESPALHANTE ADESIVO	IV	capaz de romper cerose das folhas, aplicado o ano todo; 0,1L/ha, 20.000 ha
BENOMIL	FUNGICIDA	III	não mais usado
CARBOFURAN	INSETICIDA	I	durante o plantio, no fundo do sul-co, de julho a fevereiro; 6 L/ha, 1.000 ha
DIURON 800	HERBICIDA	II	aplicado de fevereiro a setembro; para potencializar o efeito do PARAQUAT; 1L/ha, 6.000 ha
2,4-D AMINA	HERBICIDA	I	eventualmente; 1 L/ha, 500 ha
FLUAZIFOP BUTIL	HERBICIDA	III	aplicado como maturador de campo, de julho a agosto; em subdoses de 0,4 L/ha, 500 ha
GLIFOSATO	HERBICIDA	II	aplicado durante o ano todo; 0,3-0,5 L/ha, 12.000 ha
HEXAZINONE + DIURON	HERBICIDA	III	durante o ano todo exceto abril a julho, 2-3 Kg/ha, 12.000 ha
IMAZAPHYR	ESPALHANTE ADESIVO	III	durante o ano todo nos canais; 2 L/ha, 50 ha
ISOXAFLUTOLE	HERBICIDA	II	durante o ano todo; em especial de abril-julho; 0,05-0,1 Kg/ha, 18.000 ha
LAMBDA-CIALO TRIN	INSETICIDA	III	aplicado de abril a julho, 0,15 L/ha, 2.000 ha
MSMA ou DECANOTE	HERBICIDA	II	durante o ano todo; 3 L/ha, 330 ha
PARAQUAT	HERBICIDA	I	aplicado de fevereiro a setembro; 200g/L, 1,2 L/ha, 8.000 ha
PLATEAU	HERBICIDA	III	durante o ano todo; 0,12-0,18 g/ha, 3.000 ha
PLENUM	HERBICIDA	II	durante o ano todo; 1-1,5 L/ha, 10.000 ha
SENCOR	HERBICIDA	IV	radicular aplicado durante o ano todo; exceto abril-julho; 2-3 L/ha, 6.000 ha
SULFENTRAZONE	HERBICIDA	III	durante o ano todo; 1,2-1,8 L/ha, 1.250 ha

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

AGROQUÍMICO	NOMENCLATURA QUÍMICA	
ACTARA	3-[(2-cloro-5-tiazil)methyl]tetra-hidro-5-metil-N-nitro-4H-1,3,5-oxadiazin-4-imina	
AGRAL-ETILENOX	2-[2-(4-nonilfenoxi)etoxi]etanol	
BENOMIL	metil 1-(butilcarbamoil) benzimidazol-2-il carbamate	
CARBOFURAN	2,3-dihidro-2,2-dimethylbenzofuran-7-il metilcarbamate	
DIURON	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea	
2,4-D	Ácido (2,4-diclorofenoxi) acético	
FLUAZIFOP-BUTIL	Ácido 2-[4-[[5-(trifluorometil)-2-piridinil]oxi]fenoxi]propanóico	

GLIFOSATO	[N(fosfonometil)glicina]	
HEXAZINONE + DIURON	3-ciclohexil-6-dimetilamino-1-metil-1,3,5-triazina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona	
IMAZAPHYR	Ácido (<i>RS</i>)-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) nicotínico	
ISOXAFLUTOLE	5-ciclopropil-1,2-oxazol-4-il α,α,α-trifluoro-2-metil- <i>p</i> -tolil cetona	
LAMBDA-CIALO TRIN	<p>Constituído de partes iguais de</p> <p>(<i>S</i>)-α-ciano-3-fenoxibenzil (<i>Z</i>)-(1<i>R</i>,3<i>R</i>)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato</p> <p>E</p> <p>(<i>R</i>)-α-ciano-3-fenoxibenzil (<i>Z</i>)-(1<i>S</i>,3<i>S</i>)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato</p>	<p>(<i>S</i>)-alcohol (<i>Z</i>)-(1<i>R</i>)-<i>cis</i>-acid</p>  <p>(<i>R</i>)-alcohol (<i>Z</i>)-(1<i>S</i>)-<i>cis</i>-acid</p> 

MSMA ou DECANOTE	Hidrógeno metil-arseniato de sódio	
PARAQUAT	1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio dicloreto	
PLATEAU = IMAZAPIC	Ácido [(<i>RS</i>)-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metil] nicotínico	
PLENUM	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro picolínico	
SENCOR = METRIBUZIN	4-amino-6- <i>tert</i> -butil-4,5-dihidro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-ona	
SULFENTRAZONE	N-{2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il]metanosulfonamida}	

O conhecimento dos grupos funcionais de agroquímicos, da acidez ou basicidade desses grupos, e o tamanho, forma, carga e polaridade da molécula é importante para se estudar seu destino, solubilidade (GUS) e a tendência de adsorve-se na superfície das partículas do solo. A maioria dos princípios ativos dos agroquímicos utilizados na Usina Coruripe (67 %) pertence às classes toxicológicas II e III, e suas propriedades físico-químicas diferem grandemente entre si, tornando difícil generalizar seus destinos e impactos no ambiente (**Tabela 11-13**). Compostos classificados na faixa de transição e de lixiviação, de acordo com o índice de solubilidade (1,8<GUS<2,8: faixa de transição; GUS >2,8: provável lixiviação)

requerem mais estudos, e compostos classificados como improváveis de serem lixiviados (GUS < 1,8: não sofre lixiviação), não são contaminantes de águas subterrâneas (COHEN *et al.*, 1995).

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

Princípio Ativo	Pressão De Vapor	Solubilidade em água (mg/L)	Koc (cm ³ /g) ⁽²⁾	DT ₅₀ no solo (dias)	GUS
2,4-D Amina	5,5 x 10 ⁻⁷	600	20	28-42	4,46 ⁽⁵⁾
Sulfentrazone	1 x 10 ⁻⁹	490	43	360-490	5,86 ⁽⁵⁾
Imazaphyr	< 10 ⁻⁷	11.272		180-640	
MSMA	1	1.040.000	7000	180	0,34 ⁽⁵⁾
Isoxaflutole	7,5 x 10 ⁻⁹	300	123	45	3,06 ⁽⁵⁾
Glifosato	desprezível	900.000	24.000	47	2,81
Diuron	6,9 x 10 ⁻⁸	42	420	90	2,57 ⁽⁵⁾

Koc = coeficiente de adsorção à matéria orgânica; **DT₅₀** = meia-vida; e Índice de solubilidade (GUS) calculados. **Obs.:** Os dados foram obtidos nas seguintes publicações: CEZARINO (1997); RODRIGUES & ALMEIDA (1998); DORES & DE-LAMONICA-FREIRE, (2001); EXTOUNET (2002).

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.

Princípio Ativo	Solubilidade	Koc	DT ₅₀ solo	GUS	Resultado ³
2,4-D Amina	A	A	IN	A	CP
Sulfentrazone	A	A	A	A	CP
Imazaphyr	A		A		I
MSMA	A	N	A	N	NC
Isoxaflutole	A	A	IN	A	CP
Glifosato	A	N	A	N	IN
Diuron	A	N	A	A	CP

Obs.: N – não atende ao critério; A- substância atende ao critério mencionado; CP contaminante em potencial; NC – não contaminante; IN – intermediário; I – inconclusivo; em branco – dado não disponível na literatura consultada; DT₅₀ – meia vida.

Tabela 13. Classificação dos princípios ativos de alguns agroquímicos usados nos plantios de cana da S. A. Usina Coruripe.

Alto potencial de contaminação de águas superficiais	
<i>Dissolvidos em água</i>	<i>Associados ao sedimento em suspensão</i>
Sulfentrazone	Glifosato
Isoxaflutole	-
Diuron	-
Médio potencial de contaminação de águas superficiais	
<i>Dissolvidos em água</i>	<i>Associados ao sedimento em suspensão</i>
2,4-D Amina	-
Glifosato	-
MSMA	-
Baixo potencial de contaminação de águas superficiais	
<i>Dissolvidos em água</i>	<i>Associados ao sedimento em suspensão</i>
-	2,4-D Amina
-	Isoxaflutole
-	Diuron

Dos herbicidas utilizados no trabalho, os que apresentam maior mobilidade em água são Sulfentrazone, Isoxaflutole e Diuron, e os que apresentam alto transporte associado ao sedimento são Glifosato e MSMA, destacando-se o segundo devido à elevada meia-vida e baixa solubilidade. Agroquímicos com solubilidade em água superior a 10 mg/L tendem a se mover muito na fase líquida, enquanto aqueles menos solúveis em água tendem a se mover associados à matéria orgânica solúvel ou adsorvidos em partículas de solos (RACKE, 1990).

ANEXO 1: PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA

Cor – a coloração da água deve-se à quantidade de material dissolvido, podendo ser de origem natural (decomposição de matéria orgânica, gerando ácidos húmicos e fúlvicos ou mesmo pela presença de ferro e manganês) ou de origem antropogênica (resíduos industriais ou esgotos) (BAUMGARTEN & POZZA, 2001).

Condutividade – quantifica a transmissão de corrente elétrica pela presença de íons (ânions e cátions). A origem está ligada à dissociação de substâncias dissolvidas na água.

DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) – quantifica o oxigênio necessário à oxidação biológica da matéria orgânica presente em amostras de corpos de água ou efluentes. A estabilização da matéria orgânica demora vários dias (cerca de 20 dias), porém, o teste pode ser simplificado para leitura em cinco dias. Seu conhecimento é importante para a avaliação da quantidade de matéria orgânica presente no efluente, embora de forma indireta. (BAUMGARTEN & POZZA, 2001).

DQO (Demanda Química de Oxigênio) – utilizada para a caracterização da parte orgânica de um efluente ou corpo de água. O teste quantifica o consumo de oxigênio durante a oxidação química da matéria orgânica, indicando, assim, o teor de matéria orgânica presente no corpo de água ou efluente (MACÊDO, 2001).

Fósforo – detectado nas formas de ortofosfato, pirofosfato e fósforo orgânico. Todos os fosfatos são hidrolisados gradualmente na água até a forma orto. A quantificação é realizada com a finalidade de verificar se há fósforo suficiente para o crescimento microbiano, já que alguns tipos de efluente são deficientes em nutrientes em função das altas concentrações de carboidratos. Os valores de concentração de fosfato presente nas amostras são utilizados para avaliar o nível de eutrofização das águas: com valores abaixo de 0,01 até 0,02 mg/L é considerado como não eutrófico, entre 0,02 – 0,05 mg/L, estágio intermediário e acima de 0,05 mg/L é considerado como eutrófico (BAUMGARTEN & POZZA, 2001).

Microrganismos – a detecção dos coliformes fecais (enterobactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Erwina*, *Enterobacteria* e *Citrobacter*,

capazes de fermentar a lactose), indica a contaminação fecal primária de um ambiente aquático (BAUMGARTEN & POZZA, 2001).

Nitrogênio – as formas de nitrogênio encontrados no meio aquoso são: a) N_2 ; b) NH_3^+ ; c) NO_2^- e NO_3^- . As análises dos lançamentos industriais envolvem frequentemente a avaliação das concentrações de nitrogênio e fósforo, para assegurar níveis suficientes de nutrientes para o sistema biológico. Nas águas, a amônia é tóxica para os peixes, e os nitratos e nitritos são utilizados pelas plantas para a fotossíntese. Altas concentrações de nitrogênio podem, também, causar uma proliferação exagerada das plantas e algas (eutrofização). A origem antropogênica está relacionada com lançamentos de despejos domésticos e industriais, excrementos de animais e fertilizantes. A clorofila e proteínas são fontes naturais de nitrogênio. Conversões de amônia a nitrito e deste a nitrato ocorrem através de processos bioquímicos com consumo concomitante de oxigênio dissolvido. A determinação da forma de nitrogênio presente pode indicar se a poluição é recente (nitrogênio amoniacal) ou remota (nitrato e nitrito) (MACÊDO, 2001).

Oxigênio dissolvido – parâmetro importante à sobrevivência dos seres aquáticos e decomposição biológica da matéria orgânica. Os processos aeróbicos são controlados pelo nível de oxigênio dissolvido, minimizando os desperdícios de energia. Reações anaeróbicas são realizadas, quando há falta de oxigênio, liberando maus odores. A introdução mecânica de ar gera concentrações de oxigênio dissolvido antropogenicamente, enquanto que pode ser obtidos naturalmente pela dissolução do ar atmosférico e pela produção por organismos fotossintéticos presentes na água (von SPERLING, 1996).

pH – concentração de íons hidrogênio, indicando as condições de acidez, basicidade ou neutralidade da água. A origem natural está associada à dissolução de rochas, adsorção de gases da atmosfera, oxidação da matéria orgânica e a fotossíntese. A origem antropogênica deve-se a despejos domésticos (oxidação de matéria orgânica) e industriais (lavagem de tanques) (MACÊDO, 2001).

Temperatura – intensidade de calor originada, seja de forma natural, através da transferência de calor do solo e ar (convecção e condução), ou pela radiação solar direta. Com o aumento da temperatura, a solubilidade dos gases diminui e a

dos sais minerais aumenta. Influencia, ainda, no crescimento microbiológico, pois cada microrganismo possui uma faixa ideal de temperatura. As fontes antropogênicas podem ser lançamentos de águas utilizadas em torres de resfriamento ou despejos industriais (MACÊDO, 2000; BAUMGARTEN & POZZA, 2001).

Turbidez – indica o nível de interferentes na transmissão da luz através da água. Os sólidos em suspensão são a principal fonte, que podem ser gerados a partir de fontes antropogênicas (esgotos, microrganismos e erosão) e de origem natural (areia, partículas de rochas, algas e minerais) (MACÊDO, 2001).

ANEXO 2:
RESOLUÇÃO CONAMA 357/05

O art. 4º da seção I do Capítulo II da Resolução CONAMA 357/05 define as seguintes classes para água doce:

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

CLASSE ESPECIAL
<ul style="list-style-type: none"> a) abastecimento para consumo humano, com desinfecção; b) preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; c) preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.
CLASSE 1
<ul style="list-style-type: none"> a) abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; b) proteção das comunidades aquáticas; c) recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho), segundo CONAMA 274/00; d) irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rente ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e) proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.
CLASSE 2
<ul style="list-style-type: none"> a) abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; b) proteção das comunidades aquáticas; c) recreação de contato primário, segundo CONAMA 274/00 (Balneabilidade); d) irrigação de hortaliças e plantas frutíferas, parques e jardins; e) aqüicultura e pesca.
CLASSE 3
<ul style="list-style-type: none"> a) abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; b) irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; c) pesca amadora; d) recreação de contato secundário; e) dessedentação de animais.
CLASSE 4
<ul style="list-style-type: none"> a) navegação; b) harmonia paisagística.

Quanto maior o número da classe, menos nobres são os usos destinados para a água, e conseqüentemente os padrões ambientais de qualidade da água serão menos exigentes. No quadro abaixo constam alguns parâmetros ambientais de qualidade de água doce, e os respectivos padrões de qualidade variando em função da classe de uso da água.

CAPÍTULO III DA RESOLUÇÃO CONAMA 357/05 – DAS CONDIÇÕES E PADRÕES DE QUALIDADE DAS ÁGUAS

Seção I - Das Disposições Gerais

Art. 7º Os padrões de qualidade das águas determinados nesta Resolução estabelecem limites individuais para cada substância em cada classe.

Parágrafo único. Eventuais interações entre substâncias, especificadas ou não nesta Resolução, não poderão conferir às águas características capazes de causar efeitos letais ou alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida, bem como de restringir os usos preponderantes previstos, ressalvado o disposto no § 3º do art. 34, desta Resolução.

Art. 8º O conjunto de parâmetros de qualidade de água selecionado para subsidiar a proposta de enquadramento deverá ser monitorado periodicamente pelo Poder Público.

§ 1º Também deverão ser monitorados os parâmetros para os quais haja suspeita da sua presença ou não conformidade.

§ 2º Os resultados do monitoramento deverão ser analisados estatisticamente e as incertezas de medição consideradas.

§ 3º A qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas.

§ 4º As possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados nesta Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos.

§ 5º Na hipótese dos estudos referidos no parágrafo anterior tornarem-se necessários em decorrência da atuação de empreendedores identificados, as despesas da investigação correrão as suas expensas.

§ 6º Para corpos de água salobras continentais, onde a salinidade não se dê por influência direta marinha, os valores dos grupos químicos de nitrogênio e fósforo serão os estabelecidos nas classes correspondentes de água doce.

Art. 9º A análise e avaliação dos valores dos parâmetros de qualidade de água de que trata esta Resolução serão realizadas pelo Poder Público, podendo ser utilizado laboratório próprio, conveniado ou contratado, que deverá adotar os procedimentos de controle de qualidade analítica necessários ao atendimento das condições exigíveis.

§ 1º Os laboratórios dos órgãos competentes deverão estruturar-se para atenderem ao disposto nesta Resolução.

§ 2º Nos casos onde a metodologia analítica disponível for insuficiente para quantificar as concentrações dessas substâncias nas águas, os sedimentos e/ou biota aquática poderão ser investigados quanto à presença eventual dessas substâncias.

Art. 10. Os valores máximos estabelecidos para os parâmetros relacionados em

cada uma das classes de enquadramento deverão ser obedecidos nas condições de vazão de referência.

§ 1º Os limites de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), estabelecidos para as águas doces de classes 2 e 3, poderão ser elevados, caso o estudo da capacidade de autodepuração do corpo receptor demonstre que as concentrações mínimas de oxigênio dissolvido (OD) previstas não serão desobedecidas, nas condições de vazão de referência, com exceção da zona de mistura.

§ 2º Os valores máximos admissíveis dos parâmetros relativos às formas químicas de nitrogênio e fósforo, nas condições de vazão de referência, poderão ser alterados em decorrência de condições naturais, ou quando estudos ambientais específicos, que considerem também a poluição difusa, comprovem que esses novos limites não acarretarão prejuízos para os usos previstos no enquadramento do corpo de água.

§ 3º Para águas doces de classes 1 e 2, quando o nitrogênio for fator limitante para eutrofização, nas condições estabelecidas pelo órgão ambiental competente, o valor de nitrogênio total (após oxidação) não deverá ultrapassar 1,27 mg/L para ambientes lênticos e 2,18 mg/L para ambientes lóticos, na vazão de referência.

§ 4º O disposto nos §§ 2º e 3º não se aplica às baías de águas salinas ou salobras, ou outros corpos de água em que não seja aplicável a vazão de referência, para os quais deverão ser elaborados estudos específicos sobre a dispersão e assimilação de poluentes no meio hídrico.

Art. 11. O Poder Público poderá, a qualquer momento, acrescentar outras condições e padrões de qualidade, para um determinado corpo de água, ou torná-los mais restritivos, tendo em vista as condições locais, mediante fundamentação técnica.

Art. 12. O Poder Público poderá estabelecer restrições e medidas adicionais, de caráter excepcional e temporário, quando a vazão do corpo de água estiver abaixo da vazão de referência.

Art. 13. Nas águas de classe especial deverão ser mantidas as condições naturais do corpo de água.

Seção II - Das Águas Doces

Art. 14. As águas doces de classe 1 observarão as seguintes condições e padrões:

I - Condições de qualidade de água:

- a) não verificação de efeito tóxico crônico a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, ou, na sua ausência, por instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método cientificamente reconhecido.
- b) materiais flutuantes, inclusive espumas não naturais: virtualmente ausentes;
- c) óleos e graxas: virtualmente ausentes;
- d) substâncias que comuniquem gosto ou odor: virtualmente ausentes;
- e) corantes provenientes de fontes antrópicas: virtualmente ausentes;
- f) resíduos sólidos objetáveis: virtualmente ausentes;
- g) coliformes termotolerantes: para o uso de recreação de contato primário deverão ser obedecidos os padrões de qualidade de balneabilidade, previstos na Resolução CONAMA no 274, de 2000. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite

de 200 coliformes termotolerantes/100 mL em 80 % ou mais, de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A *E. Coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente;

h) DBO 5 dias a 20°C até 3 mg/L O₂;

i) OD, em qualquer amostra, não inferior a 6 mg/L O₂;

j) turbidez até 40 unidades nefelométricas de turbidez (UNT);

l) cor verdadeira: nível de cor natural do corpo de água em mg Pt/L; e

m) pH: 6,0 a 9,0.

II - Padrões de qualidade de água:

Quadro 8. Classe 1 de águas doces – padrões

PARÂMETROS - VALOR MÁXIMO	
Clorofila a 10 µg/L	
Densidade de cianobactérias 20.000 cel/mL ou 2 mm ³ /L	
Sólidos dissolvidos totais 500 mg/L	
PARÂMETROS INORGÂNICOS- VALOR MÁXIMO	
Alumínio dissolvido 0,1 mg/L Al	Fósforo total (ambiente lótico e tributários de ambientes intermediários) 0,1mg/L P
Antimônio 0,005mg/L Sb	Lítio total 2,5 mg/L Li
Arsênio total 0,01 mg/L As	Manganês total 0,1 mg/L Mn
Bário total 0,7 mg/L Ba	Mercúrio total 0,0002 mg/L Hg
Berílio total 0,04 mg/L Be	Níquel total 0,025 mg/L Ni
Boro total 0,5 mg/L B	Nitrato 10,0 mg/L N
Cádmio total 0,001 mg/L Cd	Nitrito 1,0 mg/L N
Chumbo total 0,01mg/L Pb	Nitrogênio amoniacal total:
Cianeto livre 0,005 mg/L CN	-3,7mg/L N (p/ pH >= 7,5);
Cloreto total 250 mg/L Cl	-2,0 mg/L N (p/ pH= 7,6-8,0);
Cloro resid.total (combinado + livre) 0,01 mg/L Cl	-1,0 mg/L N (p/ pH=8,1-8,5);
Cobalto total 0,05 mg/L Co	- 0,5 mg/L N (p/ pH > 8,5)
Cobre dissolvido 0,009 mg/L Cu	Prata total 0,01 mg/L Ag
Cromo total 0,05 mg/L Cr	Selênio total 0,01 mg/L Se
Ferro dissolvido 0,3 mg/L Fe	Sulfato total 250 mg/L SO ₄
Fluoreto total 1,4 mg/L F	Sulfeto (H ₂ S não dissociado) 0,002 mg/L S
Fósforo total (ambiente lântico) 0,020 mg/L P	Urânio total 0,02 mg/L U
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência de 2-40 dias, e tributários diretos de ambiente lântico) 0,025 mg/L P	Vanádio total 0,1 mg/L V
	Zinco total 0,18 mg/L Zn
PARÂMETROS ORGÂNICOS - VALOR MÁXIMO	
Acrilamida 0,5 µg/L	Glifosato 65 µg/L
Alacloro 20 µg/L	Gution 0,005 µg/L
Aldrin + Dieldrin 0,005 µg/L	Heptacloro epóxido +Heptacloro 0,01 µg/L
Atrazina 2 µg/L	Hexaclorobenzeno 0,0065 µg/L
Benzeno 0,005 mg/L	Indeno(1,2,3-cd)pireno 0,05 µg/L
Benzidina 0,001 mg/L	Lindano (g-HCH) 0,02 µg/L
Benzo(a)antraceno 0,05 µg/L	Malation 0,1 µg/L

Benzo(a)pireno 0,05 µg/L	Metolacloro 10 µg/L
Benzo(b)fluoranteno 0,05 µg/L	Metoxicloro 0,03 µg/L
Benzo(k)fluoranteno 0,05 µg/L	Paration 0,04 µg/L
Carbaril 0,02 µg/L	PCBs - Bifenilas policloradas 0,001 µg/L
Clordano (cis + trans) 0,04 µg/L	Pentaclorofenol 0,009 mg/L
2-Clorofenol 0,1 µg/L	Simazina 2,0 µg/L
Criseno 0,05 µg/L	Substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno 0,5 mg/L LAS
2,4-D 4,0 µg/L	2,4,5-T 2,0 µg/L
Demeton (Demeton-O + Demeton-S) 0,1 µg/L	Tetracloreto de carbono 0,002 mg/L
Dibenzo(a,h)antraceno 0,05 µg/L	Tetracloroeteno 0,01 mg/L
1,2-Dicloroetano 0,01 mg/L	Tolueno 2,0 µg/L
1,1-Dicloroeteno 0,003 mg/L	Toxafeno 0,01 µg/L
2,4-Diclorofenol 0,3 µg/L	2,4,5-TP 10,0 µg/L
Diclorometano 0,02 mg/L	Tributilestanho 0,063 µg/L TBT
DDT (p,p'-DDT + p,p'-DDE + p,p'-DDD) 0,002 µg/L	Triclorobenzeno (1,2,3-TCB + 1,2,4-TCB) 0,02 mg/L
Dodecacloro pentaciclododecano 0,001 µg/L	Tricloroeteno 0,03 mg/L
Endossulfan (a + . + sulfato) 0,056 µg/L	2,4,6-Triclorofenol 0,01 mg/L
Endrin 0,004 µg/L	Trifluralina 0,2 µg/L
Estireno 0,02 mg/L	Xileno 300 µg/L
Etilbenzeno 90,0 µg/L	
Fenóis totais (substâncias que reagem com 4- aminoanti-pirina) 0,003 mg/L C ₆ H ₅ OH	

III - Nas águas doces onde ocorrer pesca ou cultivo de organismos, para fins de consumo intensivo, além dos padrões estabelecidos no inciso II deste artigo, aplicam-se os seguintes padrões em substituição ou adicionalmente:

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

PARÂMETROS INORGÂNICOS- VALOR MÁXIMO	
Arsênio total 0,14 µg/L As	
PARÂMETROS ORGÂNICOS - VALOR MÁXIMO	
Benzydina 0,0002 µg/L	Hexaclorobenzeno 0,00029 µg/L
Benzo(a)antraceno 0,018 µg/L	Indeno(1,2,3-cd)pireno 0,018 µg/L
Benzo(a)pireno 0,018 µg/L	PCBs - Bifenilas policloradas 0,000064 µg/L
Benzo(b)fluoranteno 0,018 µg/L	Pentaclorofenol 3,0 µg/L
Benzo(k)fluoranteno 0,018 µg/L	Tetracloreto de carbono 1,6 µg/L
Criseno 0,018 µg/L	Tetracloroeteno 3,3 µg/L
Dibenzo(a,h)antraceno 0,018 µg/L	Toxafeno 0,00028 µg/L
3,3-Diclorobenzidina 0,028 µg/L	2,4,6-triclorofenol 2,4 µg/L
Heptacloro epóxido + Heptacloro 0,000039 µg/L	

Art 15. Aplicam-se às **águas doces de classe 2** as condições e padrões da classe 1 previstos no artigo anterior, à exceção do seguinte:

I - não será permitida a presença de corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração

convencionais;

II - coliformes termotolerantes: para uso de recreação de contato primário deverá ser obedecida a Resolução CONAMA 274/00. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes/100 mL em 80 % ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes, conforme limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente;

III - cor verdadeira: até 75 mg Pt/L;

IV - turbidez: até 100 UNT;

V - DBO 5 dias a 20°C até 5 mg/L O₂;

VI - OD, em qualquer amostra, não inferior a 5 mg/L O₂;

VII - clorofila *a*: até 30 µg/L;

VIII - densidade de cianobactérias: até 50000 cel/mL ou 5 mm³/L; e,

IX - fósforo total:

a) até 0,030 mg/L, em ambientes lênticos; e,

b) até 0,050 mg/L, em ambientes intermediários, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lêntico.

Art. 16. As águas doces de classe 3 observarão as seguintes condições e padrões:

I - condições de qualidade de água:

a) não verificação de efeito tóxico agudo a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, ou, na sua ausência, por instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método cientificamente reconhecido;

b) materiais flutuantes, inclusive espumas não naturais: virtualmente ausentes;

c) óleos e graxas: virtualmente ausentes;

d) substâncias que comuniquem gosto ou odor: virtualmente ausentes;

e) não será permitida a presença de corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais;

f) resíduos sólidos objetáveis: virtualmente ausentes;

g) coliformes termotolerantes: para o uso de recreação de contato secundário não deverá ser excedido um limite de 2500 coliformes termotolerantes/100 mL em 80 % ou mais de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. Para dessedentação de animais criados confinados não deverá ser excedido o limite de 1.000 coliformes termotolerantes/100 mL em 80 % ou mais de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 4.000 coliformes

termotolerantes/100 mL em 80 % ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com periodicidade bimestral. A *E. Coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente;

h) cianobactérias para dessedentação de animais: os valores de densidade de cianobactérias

não deverão exceder 50.000 cel/ml, ou 5mm³/L;

i) DBO 5 dias a 20°C até 10 mg/L O₂;

j) OD, em qualquer amostra, não inferior a 4 mg/L O₂;

l) turbidez até 100 UNT;

- m) cor verdadeira: até 75 mg Pt/L; e,
n) pH: 6,0 a 9,0.

II - Padrões de qualidade de água:

Quadro 10. Classe 3 de águas doces - padrões

PARÂMETROS - VALOR MÁXIMO	
Clorofila a 60 µg/L	
Densidade de cianobactérias 100.000 cel/mL ou 10 mm ³ /L	
Sólidos dissolvidos totais 500 mg/L	
PARÂMETROS INORGÂNICOS- VALOR MÁXIMO	
Alumínio dissolvido 0,2 mg/L Al	Fósforo total (ambiente lótico e tributários de ambientes intermediários) 0,15 mg/L P
Arsênio total 0,033 mg/L As	Lítio total 2,5 mg/L Li Manganês total 0,5 mg/L Mn
Bário total 1,0 mg/L Ba	Mercúrio total 0,002 mg/L Hg
Berílio total 0,1 mg/L Be	Níquel total 0,025 mg/L Ni
Boro total 0,75 mg/L B	Nitrato 10,0 mg/L N
Cádmio total 0,01 mg/L Cd	Nitrito 1,0 mg/L N
Chumbo total 0,033 mg/L Pb	Nitrogênio amoniacal total:
Cianeto livre 0,022 mg/L CN	-13,3mg/L N (p/ pH >= 7,5);
Cloreto total 250 mg/L Cl	-5,6 mg/L N (p/ pH= 7,6-8,0);
Cobalto total 0,2 mg/L Co	- 2,2 mg/L N (p/ pH=8,1-8,5);
Cobre dissolvido 0,013 mg/L Cu	-1,0 mg/L N (p/ pH > 8,5)
Cromo total 0,05 mg/L Cr	Prata total 0,05 mg/L Ag
Ferro dissolvido 5,0 mg/L Fe	Selênio total 0,05 mg/L Se
Fluoreto total 1,4 mg/L F	Sulfato total 250 mg/L SO ₄
Fósforo total (ambiente lântico) 0,05 mg/L P	Sulfeto (como H ₂ S não dissociado) 0,3 mg/L S
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lântico) 0,075 mg/L P	Urânio total 0,02 mg/L U
	Vanádio total 0,1 mg/L V
	Zinco total 5 mg/L Zn
PARÂMETROS ORGÂNICOS - VALOR MÁXIMO	
Aldrin + Dieldrin 0,03 µg/L	Heptacloro epóxido + Heptacloro 0,03 µg/L
Atrazina 2 µg/L	Lindano (g-HCH) 2,0 µg/L
Benzeno 0,005 mg/L	Malation 100,0 µg/L
Benzo(a)pireno 0,7 µg/L	Metoxicloro 20,0 µg/L
Carbaril 70,0 µg/L	Paration 35,0 µg/L
Clordano (cis + trans) 0,3 µg/L	PCBs - Bifenilas policloradas 0,001 µg/L
2,4-D 30,0 µg/L	Pentaclorofenol 0,009 mg/L
DDT (p,p'-DDT + p,p'-DDE + p,p'-DDD) 1,0 µg/L	Substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno 0,5 mg/L LAS
Demeton (Demeton-O + Demeton-S) 14,0 µg/L	2,4,5-T 2,0 µg/L
1,2-Dicloroetano 0,01 mg/L	Tetracloroeto de carbono 0,003 mg/L
1,1-Dicloroetano 30 µg/L	Tetracloroetano 0,01 mg/L
Dodecacloro Pentaciclodecano 0,001 µg/L	Toxafeno 0,21 µg/L
Endossulfan (a + . + sulfato) 0,22 µg/L	2,4,5-TP 10,0 µg/L

Endrin 0,2 µg/L Fenóis totais (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina) 0,01 mg/L C ₆ H ₅ OH Glifosato 280 µg/L Gution 0,005 µg/L	Tributilestanho 2,0 µg/L TBT Tricloroetano 0,03 mg/L 2,4,6-Triclorofenol 0,01 mg/L
---	--

Art. 17. As **águas doces de classe 4** observarão as seguintes condições e padrões:

- I - materiais flutuantes, inclusive espumas não naturais: virtualmente ausentes;
- II - odor e aspecto: não objetáveis;
- III - óleos e graxas: toleram-se iridescências;
- IV - substâncias facilmente sedimentáveis que contribuam para o assoreamento de canais de navegação: virtualmente ausentes;
- V - fenóis totais (substâncias que reagem com 4 - aminoantipirina) até 1,0 mg/L de C₆H₅OH;
- VI - OD, superior a 2,0 mg/L O₂ em qualquer amostra; e,
- VII - pH: 6,0 a 9,0.

CAPÍTULO IV –

DAS CONDIÇÕES E PADRÕES DE LANÇAMENTO DE EFLUENTES

Art. 24. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedeam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis.

Parágrafo único. O órgão ambiental competente poderá, a qualquer momento:

- I - acrescentar outras condições e padrões, ou torná-los mais restritivos, tendo em vista as condições locais, mediante fundamentação técnica; e
- II - exigir a melhor tecnologia disponível para o tratamento dos efluentes, compatível com as condições do respectivo curso de água superficial, mediante fundamentação técnica.

Art. 25. É vedado o lançamento e a autorização de lançamento de efluentes em desacordo com as condições e padrões estabelecidos nesta Resolução.

Parágrafo único. O órgão ambiental competente poderá, excepcionalmente, autorizar o lançamento de efluente acima das condições e padrões estabelecidos no Art. 34, desta Resolução, desde que observados os seguintes requisitos:

- I - comprovação de relevante interesse público, devidamente motivado;
- II - atendimento ao enquadramento e às metas intermediárias e finais, progressivas e obrigatórias;
- III - realização de Estudo de Impacto Ambiental-EIA, às expensas do empreendedor responsável pelo lançamento;
- IV - estabelecimento de tratamento e exigências para este lançamento; e
- V - fixação de prazo máximo para o lançamento excepcional.

Art. 26. Os órgãos ambientais federal, estaduais e municipais, no âmbito de sua competência, deverão, por meio de norma específica ou no licenciamento da atividade ou empreendimento, estabelecer a carga poluidora máxima para o lançamento de substâncias passíveis de estarem presentes ou serem formadas nos processos produtivos, listadas ou não no art. 34, desta Resolução, de modo a não

comprometer as metas progressivas obrigatórias, intermediárias e final, estabelecidas pelo enquadramento para o corpo de água.

§ 1º No caso de empreendimento de significativo impacto, o órgão ambiental competente exigirá, nos processos de licenciamento ou de sua renovação, a apresentação de estudo de capacidade de suporte de carga do corpo de água receptor.

§ 2º O estudo de capacidade de suporte deve considerar, no mínimo, a diferença entre os padrões estabelecidos pela classe e as concentrações existentes no trecho desde a montante, estimando a concentração após a zona de mistura.

§ 3º Sob pena de nulidade da licença expedida, o empreendedor, no processo de licenciamento, informará ao órgão ambiental as substâncias, entre aquelas previstas nesta Resolução para padrões de qualidade de água, que poderão estar contidas no seu efluente.

§ 4º O disposto no § 1º aplica-se também às substâncias não contempladas nesta Resolução, exceto se o empreendedor não tinha condições de saber de sua existência nos seus efluentes.

Art. 27. É vedado, nos efluentes, o lançamento dos Poluentes Orgânicos Persistentes-POPs mencionados na Convenção de Estocolmo, ratificada pelo Decreto Legislativo nº 204, de 7 de maio de 2004.

Parágrafo único. Nos processos onde possa ocorrer a formação de dioxinas e furanos deverá ser utilizada a melhor tecnologia disponível para a sua redução, até a completa eliminação.

Art. 28. Os efluentes não poderão conferir ao corpo de água características em desacordo com as metas obrigatórias progressivas, intermediárias e final, do seu enquadramento.

§ 1º As metas obrigatórias serão estabelecidas mediante parâmetros.

§ 2º Para os parâmetros não incluídos nas metas obrigatórias, os padrões de qualidade a serem obedecidos são os que constam na classe na qual o corpo receptor estiver enquadrado.

§ 3º Na ausência de metas intermediárias progressivas obrigatórias, devem ser obedecidos os padrões de qualidade da classe em que o corpo receptor estiver enquadrado.

Art. 29. A disposição de efluentes no solo, mesmo tratados, não poderá causar poluição ou contaminação das águas.

Art. 30. No controle das condições de lançamento, é vedada, para fins de diluição antes do seu lançamento, a mistura de efluentes com águas de melhor qualidade, tais como as águas de abastecimento, do mar e de sistemas abertos de refrigeração sem recirculação.

Art. 31. Na hipótese de fonte de poluição geradora de diferentes efluentes ou lançamentos individualizados, os limites constantes desta Resolução aplicar-se-ão a cada um deles ou ao conjunto após a mistura, a critério do órgão ambiental competente.

Art. 32. Nas águas de classe especial é vedado o lançamento de efluentes ou disposição de resíduos domésticos, agropecuários, de aquicultura, industriais e de

quaisquer outras fontes poluentes, mesmo que tratados.

§ 1º Nas demais classes de água, o lançamento de efluentes deverá, simultaneamente:

I - atender às condições e padrões de lançamento de efluentes;

II - não ocasionar a ultrapassagem das condições e padrões de qualidade de água, estabelecidos para as respectivas classes, nas condições da vazão de referência; e

III - atender a outras exigências aplicáveis.

§ 2º No corpo de água em processo de recuperação, o lançamento de efluentes observará as metas progressivas obrigatórias, intermediárias e final.

Art. 33. Na zona de mistura de efluentes, o órgão ambiental competente poderá autorizar, levando em conta o tipo de substância, valores em desacordo com os estabelecidos para a respectiva classe de enquadramento, desde que não comprometam os usos previstos para o corpo de água.

Parágrafo único. A extensão e as concentrações de substâncias na zona de mistura deverão ser objeto de estudo, nos termos determinados pelo órgão ambiental competente, às expensas do empreendedor responsável pelo lançamento.

Art. 34. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis:

§ 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 2º Os critérios de toxicidade previstos no § 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente.

§ 3º Nos corpos de água em que as condições e padrões de qualidade previstos nesta Resolução não incluam restrições de toxicidade a organismos aquáticos, não se aplicam os parágrafos anteriores.

§ 4º Condições de lançamento de efluentes:

I - pH entre 5 a 9;

II - temperatura: inferior a 40 °C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3 °C na zona de mistura;

III - materiais sedimentáveis: até 1 mL/L em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;

IV - regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vezes a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente;

V - óleos e graxas:

1 - óleos minerais: até 20mg/L;

2- óleos vegetais e gorduras animais: até 50mg/L; e

VI - ausência de materiais flutuantes.

§ 5º Padrões de lançamento de efluentes:

Quadro 11. Lançamento de efluentes – padrões

PARÂMETROS INORGÂNICOS- VALOR MÁXIMO	
Arsênio total 0,5 mg/L As	Fluoreto total 10,0 mg/L F
Bário total 5,0 mg/L Ba	Manganês dissolvido 1,0 mg/L Mn
Boro total 5,0 mg/L B	Mercúrio total 0,01 mg/L Hg
Cádmio total 0,2 mg/L Cd	Níquel total 2,0 mg/L Ni
Chumbo total 0,5 mg/L Pb	Nitrogênio amoniacal total 20,0 mg/L N
Cianeto total 0,2 mg/L CN	Prata total 0,1 mg/L Ag
Cobre dissolvido 1,0 mg/L Cu	Selênio total 0,30 mg/L Se
Cromo total 0,5 mg/L Cr	Sulfeto 1,0 mg/L S
Estanho total 4,0 mg/L Sn	Zinco total 5,0 mg/L Zn
Ferro dissolvido 15,0 mg/L Fe	
PARÂMETROS ORGÂNICOS - VALOR MÁXIMO	
Clorofórmio 1,0 mg/L	Tetracloroeto de Carbono 1,0 mg/L
Dicloroetano 1,0 mg/L	Tricloroetano 1,0 mg/L
Fenóis totais (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina) 0,5 mg/L C ₆ H ₅ OH	

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

Parâmetros	Unidade	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Oxigênio Dissolvido	mg/L O ₂	>= 6,0	>= 5,0	>= 4,0	> 2,0
Coliformes Fecais	nmp/100ml	200	1.000	4.000	-
pH	-	Entre 6 e 9	Entre 6 e 9	Entre 6 e 9	Entre 6 e 9
DBO ₅ 20	mg/L O ₂	<= 3,0	<= 5,0	<= 10,0	-
Nitrogênio Amoniacal	mg/L N	3,7 (pH< 7,5) 2,0 (7,5<pH< 8) 1,0 (8<pH<8,5) 0,5 (pH > 8,5)	Idem Classe 1	13,3 (pH< 7,5) 5,5 (7,5<pH<8) 2,2 (8<pH<8,5) 1,0 (pH > 8,5)	-
Fósforo Total	mg/L P	Lêntico 0,02 Interm 0,025 Lótico 0,1	Lêntico 0,03 Interm 0,05 Lótico 0,1	Lêntico 0,05 Interm 0,075 Lótico 0,15	-
Turbidez	UNT	<= 40	<= 100	<= 100	-
Sólidos Totais	mg/l	500	500	500	-
Cádmio	mg/L Cd	0,001	0,001	0,01	-
Chumbo	mg/L Cd	0,01	0,01	0,033	-
Cobre	mg/L Cu	0,009	0,009	0,013	-
Cromo total	mg/L Cr	0,5	0,05	0,05	-
Mercúrio	µg/L Hg	0,2	0,2	2,0	-
Níquel	mg/L Ni	0,025	0,025	0,025	-
Zinco	mg/L Zn	0,18	0,18	5,0	-

Na CLASSE ESPECIAL, deverão ser mantidas as condições naturais do corpo de água.

Art. 35. Sem prejuízo do disposto no inciso I, do § 1º do art. 24, desta Resolução, o

órgão ambiental competente poderá, quando a vazão do corpo de água estiver abaixo da vazão de referência, estabelecer restrições e medidas adicionais, de caráter excepcional e temporário, aos lançamentos de efluentes que possam, dentre outras conseqüências:

I - acarretar efeitos tóxicos agudos em organismos aquáticos; ou

II - inviabilizar o abastecimento das populações.

Art. 36. Além dos requisitos previstos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis, os efluentes provenientes de serviços de saúde e estabelecimentos nos quais haja despejos infectados com microorganismos patogênicos, só poderão ser lançados após tratamento especial.

Art. 37. Para o lançamento de efluentes tratados no leito seco de corpos de água intermitentes, o órgão ambiental competente definirá, ouvido o órgão gestor de recursos hídricos, condições especiais.

CAPÍTULO V –

DIRETRIZES AMBIENTAIS PARA O ENQUADRAMENTO

Art. 38. O enquadramento dos corpos de água dar-se-á de acordo com as normas e procedimentos definidos pelo Conselho Nacional de Recursos Hídricos-CNRH e Conselhos Estaduais de Recursos Hídricos.

§ 1º O enquadramento do corpo hídrico será definido pelos usos preponderantes mais restritivos da água, atuais ou pretendidos.

§ 2º Nas bacias hidrográficas em que a condição de qualidade dos corpos de água esteja em desacordo com os usos preponderantes pretendidos, deverão ser estabelecidas metas obrigatórias, intermediárias e final, de melhoria da qualidade da água para efetivação dos respectivos enquadramentos, excetuados nos parâmetros que excedam aos limites devido às condições naturais.

§ 3º As ações de gestão referentes ao uso dos recursos hídricos, tais como a outorga e cobrança pelo uso da água, ou referentes à gestão ambiental, como o licenciamento, termos de ajustamento de conduta e o controle da poluição, deverão basear-se nas metas progressivas intermediárias e final aprovadas pelo órgão competente para a respectiva bacia hidrográfica ou corpo hídrico específico.

§ 4º As metas progressivas obrigatórias, intermediárias e final, deverão ser atingidas em regime de vazão de referência, excetuados os casos de baías de águas salinas ou salobras, ou outros corpos hídricos onde não seja aplicável a vazão de referência, para os quais deverão ser elaborados estudos específicos sobre a dispersão e assimilação de poluentes no meio hídrico.

§ 5º Em corpos de água intermitentes ou com regime de vazão que apresente diferença sazonal significativa, as metas progressivas obrigatórias poderão variar ao longo do ano.

§ 6º Em corpos de água utilizados por populações para seu abastecimento, o enquadramento e o licenciamento ambiental de atividades a montante preservarão, obrigatoriamente, as condições de consumo.

CAPÍTULO VI – DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 39. Cabe aos órgãos ambientais competentes, quando necessário, definir os valores dos poluentes considerados virtualmente ausentes.

Art. 40. No caso de abastecimento para consumo humano, sem prejuízo do disposto nesta Resolução, deverão ser observadas, as normas específicas sobre qualidade da água e padrões de potabilidade.

Art. 41. Os métodos de coleta e de análises de águas são os especificados em normas técnicas cientificamente reconhecidas.

Art. 42. Enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas classe 2, as salinas e salobras classe 1, exceto se as condições de qualidade atuais forem melhores, o que determinará a aplicação da classe mais rigorosa correspondente.

Art. 43. Os empreendimentos e demais atividades poluidoras que, na data da publicação desta Resolução, tiverem Licença de Instalação ou de Operação, expedida e não impugnada, poderão a critério do órgão ambiental competente, ter prazo de até três anos, contados a partir de sua vigência, para se adequarem às condições e padrões novos ou mais rigorosos previstos nesta Resolução.

§ 1º O empreendedor apresentará ao órgão ambiental competente o cronograma das medidas necessárias ao cumprimento do disposto no *caput* deste artigo.

§ 2º O prazo previsto no *caput* deste artigo poderá, excepcional e tecnicamente motivado, ser prorrogado por até dois anos, por meio de Termo de Ajustamento de Conduta, ao qual se dará publicidade, enviando-se cópia ao Ministério Público.

§ 3º As instalações de tratamento existentes deverão ser mantidas em operação com a capacidade, condições de funcionamento e demais características para as quais foram aprovadas, até que se cumpram as disposições desta Resolução.

§ 4º O descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo será objeto de resolução específica, a ser publicada no prazo máximo de um ano, a contar da data de publicação desta Resolução, ressalvado o padrão de lançamento de óleos e graxas a ser o definido nos termos do art. 34, desta Resolução, até a edição de resolução específica.

Art. 44. O CONAMA, no prazo máximo de um ano, complementarará, onde couber, condições e padrões de lançamento de efluentes previstos nesta Resolução.

Art. 45. O não cumprimento ao disposto nesta Resolução acarretará aos infratores as sanções previstas pela legislação vigente.

§ 1º Os órgãos ambientais e gestores de recursos hídricos, no âmbito de suas respectivas competências, fiscalizarão o cumprimento desta Resolução, bem como quando pertinente, a aplicação das penalidades administrativas previstas nas legislações específicas, sem prejuízo do sancionamento penal e da responsabilidade civil objetiva do poluidor.

§ 2º As exigências e deveres previstos nesta Resolução caracterizam obrigação de relevante interesse ambiental.

Art. 46. O responsável por fontes potencial ou efetivamente poluidoras das águas deve apresentar ao órgão ambiental competente, até o dia 31 de março de cada ano, declaração de carga poluidora, referente ao ano civil anterior, subscrita pelo administrador principal da empresa e pelo responsável técnico devidamente habilitado, acompanhada da respectiva Anotação de Responsabilidade Técnica.

§ 1º A declaração referida no *caput* deste artigo conterà, entre outros dados, a caracterização qualitativa e quantitativa de seus efluentes, baseada em amostragem representativa dos mesmos, o estado de manutenção dos equipamentos e dispositivos de controle da poluição.

§ 2º O órgão ambiental competente poderá estabelecer critérios e formas para apresentação da declaração mencionada no *caput* deste artigo, inclusive, dispensando-a se for o caso para empreendimentos de menor potencial poluidor.

Art. 47. Equiparam-se a perito, os responsáveis técnicos que elaborem estudos e pareceres apresentados aos órgãos ambientais.

Art. 48. O não cumprimento ao disposto nesta Resolução sujeitará os infratores, entre outras, às sanções previstas na Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e respectiva regulamentação.

Art. 49. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 50. Revoga-se a Resolução CONAMA nº 020, de 18 de junho de 1986.

