



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA E FISIOLOGIA
MICROBIANA

Isolamento, seleção e estudo de microrganismos ligninolíticos degradadores de chorume

DOUTORANDO

Hamilton Roberto Fortes Bavutti

*Farmacêutico-Bioquímico, Professor, Mestre em Ciência de Alimentos pela
Universidade Estadual de Campinas*

ORIENTAÇÃO

Lucia Regina Durrant

*Engenheira de Alimentos, Professora, Doutora em Engenharia de Alimentos pela
Universidade Estadual de Campinas*

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Hamilton Roberto Fortes Bavutti**, aprovada pela Comissão Julgadora em 14 de agosto de 2002.

UNICAMP

Campinas, julho de 2002

Campinas, 14 de agosto de 2002.

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
Presidente da Banca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

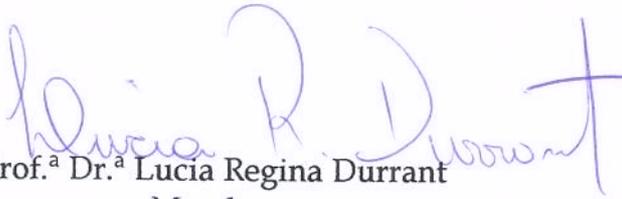
Bavutti, Hamilton Roberto Fortes

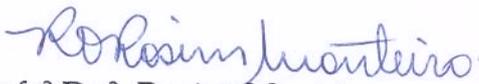
~~B328i~~
B 328i Isolamento, seleção e estudo de microrganismos ligninolíticos
degradadores de chorume / Hamilton Roberto Fortes Bavutti . –
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

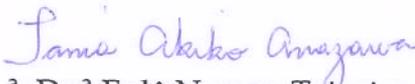
1.Chorume. 2.Resíduos orgânicos. I.Durrant, Lúcia Regina.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

banca examinadora


Prof.^a Dr.^a Lucia Regina Durrant
Membro


Prof.^a Dr.^a Regina Monteiro
Membro


Prof.^a Dr.^a Tânia Akiko Anazawa
Membro


Prof.^a Dr.^a Eglê Novaes Teixeira
Membro


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Membro

Prof.^a Dr.^a Helia Harumi Sato
Membro

Prof. Dr. Fumio Yokoya
Membro

856642007

*À minha família, especialmente meus pais e avó,
pelo incentivo e carinho*

Dedico

AMIGOS

Quando a solidão nos pega desprevenidos e, chegando sem mais avisos, se instala, começando a abrir e remexer baús antigos, descobrindo fantasmas esquecidos e espanando a poeira das amarguras, transportamo-nos para fora de nosso corpo; e, entre devaneios e dúvidas, refletimos sobre a vida. Ah! A vida! Quantas vezes nossas queixas beiram o insuportável, quantos problemas nos parecem insolúveis e as esperanças (Ah! As esperanças!), como se assemelham a pálidas chamas de velas em final de patio... Nestes instantes, questionamo-nos sobre os tantos porquês de nossa existência, sobre tantos porquês...

Mas a incômoda visitante vai-se embora; recompomo-nos das desilusões e mágoas e um sorriso de paz volta a abrir nossos lábios cerrados. Retomamos o cotidiano largado e, num suspiro de alívio, voltamos a viver, com a certeza de que vale a pena estar vivo.

Pablo Picasso

É muito bom chegar este momento em que posso demonstrar todo o sentimento por pessoas que me ajudaram ao longo deste trabalho. Foram períodos de dificuldades e de alegrias, sempre compartilhados com os amigos. Cada um contribuiu de uma forma diferente, com seu otimismo, palavras de carinho, confiança, paixão e amor, por isso agradeço:

- ▶ A Deus
- ▶ À professora Lúcia Regina Durrant pela sua orientação, incentivo e apoio constantes.
- ▶ À FEA, através de sua direção, biblioteca e coordenadoria e secretaria de pós-graduação, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento desta pesquisa.
- ▶ À banca examinadora pela leitura e sugestões para a elaboração e enriquecimento desta tese.
- ▶ À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.
- ▶ A todos os funcionários da secretaria do departamento de Ciência de Alimentos.
- ▶ A todos os amigos do laboratório, em especial à Andréa, Claudinha, Eliane, Erika, Fabiana, Fúlvia, Isis, Karla, Lara, Luciana e Márcia, pelo convívio e apoio constantes. Vocês são muito especiais e ficarão guardados pra sempre no meu coração.
- ▶ Ao Jean, Débora e Gabriela pelas horas de descontração, meu sincero obrigado. Como essas horas são necessárias...
- ▶ À minha família que tanto amo.
- ▶ Aos amigos de Londrina, por se fazerem presentes em minha vida.
- ▶ A você - ♪ *"I can't believe a year ago I was alone, I didn't know you, I hadn't seen or heard your name. And even now, I'm so amazed, it's like a dream, it's like a rainbow, it's like the rain (Shawn Colvin)."*

Sumário

<i>Lista de tabelas.....</i>	xi
<i>Lista de figuras.....</i>	xiii
<i>Lista de abreviaturas.....</i>	xxiii
<i>Resumo.....</i>	xxiv
<i>Abstract.....</i>	xxv
<i>PARTE I – INTRODUÇÃO.....</i>	1
<i>PARTE II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</i>	4
<i>2.1. HISTÓRICO.....</i>	<i>5</i>
<i>2.2. CONCEITOS.....</i>	<i>7</i>
<i>2.3. GERENCIAMENTO DA COLETA DE RESÍDUOS SÓLIDOS NO BRASIL.....</i>	<i>8</i>
<i>2.4. COLETA DE RESÍDUOS SÓLIDOS NO BRASIL, ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO E A LIMPEZA URBANA, NA IMPRENSA BRASILEIRA, NOS ÚLTIMOS ANOS.....</i>	<i>9</i>
<i>2.5. RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS: ASPECTOS AMBIENTAIS E DE SAÚDE PÚBLICA.....</i>	<i>16</i>
<i>2.6. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DECORRENTES DA DISPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS DOMÉSTICOS.....</i>	<i>17</i>
<i>2.7. TIPOS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS SÓLIDOS.....</i>	<i>20</i>
<i>2.7.1. Incineração.....</i>	<i>20</i>
<i>2.7.2. Triagem e compostagem.....</i>	<i>22</i>
<i>2.7.3. Aterros sanitários, controlados e lixões.....</i>	<i>24</i>

2.8.	<u>GERAÇÃO DE CHORUME</u>	25
2.9.	<u>PROCESSOS TECNOLÓGICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE ÁREAS DEGRADADAS POR RESÍDUOS SÓLIDOS</u>	28
2.9.1.	Remediação.....	28
2.9.1.1.	<u>Tecnologias de remediação</u>	28
2.9.2.	Biorremediação.....	29
2.10.	<u>ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DO CHORUME</u>	35
2.10.1.	Estudos cromatográficos.....	42
2.11.	<u>BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E COMPOSTOS DO CHORUME</u>	43
2.11.1.	Enzimas participantes da biodegradação de lignina e compostos poluentes do chorume.....	44
2.11.1.1.	<u>Lignina-peroxidase (LIP; EC 1.11.1.7)</u>	45
2.11.1.2.	<u>Manganês-peroxidase (MNP; EC 1.11.1.7)</u>	47
2.11.1.3.	<u>Lacases (benzenediol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)</u>	49
2.11.1.4.	<u>Peroxidases</u>	50
2.11.1.5.	<u>Enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio</u>	51
	PARTE III – METODOLOGIA	53
3.1.	<u>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CHORUME</u>	54
3.1.1.	Determinação do pH.....	55
3.1.2.	Alcalinidade total.....	56
3.1.3.	Temperatura.....	56
3.1.4.	Demanda bioquímica de oxigênio (DBO).....	56
3.1.5.	Demanda química de oxigênio (DQO).....	57
3.1.6.	Dureza (cálcio e magnésio).....	58
3.1.7.	Sólidos totais.....	59
3.1.8.	Sólidos suspensos.....	59

3.1.9.	<i>Sólidos dissolvidos.....</i>	59
3.1.10.	<i>Nitritos.....</i>	59
3.1.11.	<i>Nitratos.....</i>	60
3.1.12.	<i>Nitrogênio orgânico e amoniacal.....</i>	60
3.1.13.	<i>Fósforo.....</i>	61
3.1.14.	<i>Cloretos.....</i>	61
3.1.15.	<i>Sulfatos.....</i>	62
3.1.16.	<i>Fenóis totais.....</i>	62
3.2.	<i>ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS.....</i>	62
3.3.	<i>TRIAGEM DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS.....</i>	65
3.4.	<i>BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA.....</i>	67
3.4.1	<i>Crescimento das linhagens isoladas, em lignina.....</i>	67
3.5.	<i>ESTUDO DA DESCOLORIZAÇÃO DO CHORUME.....</i>	68
3.5.1.	<i>Estudo da degradação de xenobióticos.....</i>	68
3.5.1.1.	<i>Obtenção de filtrados, determinação da massa seca e pH.....</i>	71
3.5.1.2.	<i>Determinações enzimáticas.....</i>	71
3.5.1.3.	<i>Degradação de fenóis.....</i>	73
3.5.1.4.	<i>Cromatografia gasosa.....</i>	73
3.6.	<i>IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....</i>	75
<i>PARTE IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</i>		76
4.1.	<i>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CHORUME.....</i>	77
4.2.	<i>ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS.....</i>	79
4.3.	<i>TRIAGEM DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS.....</i>	80

4.4.	<u>BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E COMPOSTOS POLUENTES DO CHORUME.....</u>	81
4.4.1.	<i>Crescimento das linhagens isoladas, em lignina.....</i>	82
4.4.2.	<i>Estudo da descolorização do chorume.....</i>	86
4.4.3.	<i>Determinação da massa seca e pH.....</i>	94
	4.4.3.1. <u>Massa seca.....</u>	94
	4.4.3.2. <u>pH.....</u>	99
4.5.	<u>DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E QUANTIFICAÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO).....</u>	104
4.6.	<u>DEGRADAÇÃO DE FENOL.....</u>	125
4.7.	<u>CROMATOGRAFIA GASOSA.....</u>	126
4.8.	<u>IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM BACTERIANA 254.....</u>	132
4.9	<u>IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS.....</u>	135
	<u>PARTE V – CONCLUSÃO.....</u>	137
	<u>PARTE VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	140

lista de tabelas

<u>Tabela 1:</u>	<i>Composição física percentual dos resíduos urbanos de várias localidades.....</i>	16
<u>Tabela 2:</u>	<i>Tempo médio de estabilização dos vários tipos de resíduos encontrados nos aterros sanitários.....</i>	18
<u>Tabela 3:</u>	<i>Tempo estimado de sobrevivência de microvetores no lixo.....</i>	19
<u>Tabela 4:</u>	<i>Vários tipos de remediação utilizados na descontaminação de poluentes e de locais contaminados.....</i>	29
<u>Tabela 5:</u>	<i>Alguns exemplos de microrganismos presentes nos sistemas de lodos ativados.....</i>	34
<u>Tabela 6:</u>	<i>Características dos substratos utilizados no teste de degradação de lignina.....</i>	68
<u>Tabela 7:</u>	<i>Condições utilizadas nos oito experimentos de degradação.....</i>	70
<u>Tabela 8:</u>	<i>Procedimentos para determinação das enzimas lignina peroxidase (LIP), manganês-peroxidase (MNP) e peroxidases (PER).....</i>	72
<u>Tabela 9:</u>	<i>Média e faixa de variância de valores de parâmetros físico-químicos do chorume nos tanques de coleta, em duas coletas diferentes.....</i>	78
<u>Tabela 10:</u>	<i>Teste de resistência dos microrganismos que resistiram simultaneamente ao fenol, catecol e pirazole.....</i>	80

<i><u>Tabela 11:</u> Média da porcentagem de perda de matéria orgânica (PMO) e da perda de lignina (em % do total de lignina sobre o peso seco), de palha de arroz e fibra de trigo em fermentação sólida (90 dias, 30 - 37°C) de 44 linhagens selecionadas do chorume.....</i>	84
<i><u>Tabela 12:</u> Linhagens selecionadas resistentes a fenol, pirazole e catecol e degradadoras de lignina.....</i>	87
<i><u>Tabela 13:</u> Porcentagem de redução da DQO pelas linhagens nº 74, 100, 108 e 184.....</i>	125
<i><u>Tabela 14:</u> Degradação de fenol obtida após os experimentos realizados com as linhagens nº 74,100,108 e 184.....</i>	126
<i><u>Tabela 15:</u> Resultados dos testes de identificação da linhagem 254.....</i>	133

Índice da lista de figuras

<i>Figura 1:</i>	<i>Expectativa de geração de lixo por um indivíduo brasileiro ao longo de sua vida.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2:</i>	<i>Gerenciamento correto e sustentável dos resíduos sólidos.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3:</i>	<i>Usina desativada de caju. 23 milhões de dólares mal aplicados....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4:</i>	<i>Vazamento de chorume do aterro de Gramacho atingindo manguezais.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5:</i>	<i>Vista panorâmica do aterro de Gramacho.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 6:</i>	<i>Diagrama das vias de acesso de agentes patogênicos para o homem através do lixo disposto inadequadamente.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 7:</i>	<i>Incinerador Vergueiro (A) inaugurado em 1968, em operação até hoje; e, B) Incinerador do Araçá, na região de Sumaré, zona oeste de São Paulo, inaugurado em 1913 e desativado em 1940.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 8:</i>	<i>Esquema de operação realizada para a compostagem de resíduos domésticos.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 9:</i>	<i>Implantação de um aterro sanitário. A) identificação do lençol freático e nascentes da região, B e C) drenagem das nascentes, D) terraplanagem para desmatamento e regularização da área, E e F) camada de regularização e instalação da manta, G) drenos para coleta do líquido percolado (chorume), e H) Acumulação do chorume para tratamento.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 10:</i>	<i>Esquema da formação do chorume, em aterros sanitários.....</i>	<i>26</i>

<i>Figura 11:</i>	<i>Princípios gerais do metabolismo microbiano em processos de biorremediação.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 12:</i>	<i>Esquema que representa o fluxo de carbono durante a decomposição anaeróbia da matéria orgânica complexa a metano.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 13:</i>	<i>Ciclo catalítico da Lignina-peroxidase.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 14:</i>	<i>Ciclo catalítico da Manganês peroxidase.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 15:</i>	<i>Representação de uma reação catalisada por Lacase.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 16:</i>	<i>Esquema representativo da produção de H₂O₂ extracelular, através da atuação das enzimas aril-álcool oxidase, aril-álcool desidrogenase e aril-aldeído desidrogenase.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 17:</i>	<i>Esquema representativo da determinação da demanda química de oxigênio.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 18:</i>	<i>Esquema de isolamento dos microrganismos utilizados nos estudos de biodegradação de chorume.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 19:</i>	<i>Fluxograma e detalhamento do experimento de degradação de xenobióticos, por linhagens isoladas do chorume.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 20:</i>	<i>Fórmulas estruturais dos compostos que compõem o padrão na análise do chorume por cromatografia gasosa.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 21:</i>	<i>Crescimento das linhagens 251(sensível) e 79 (resistente), em meio PDA, com deposição de quadrados de agar impregnados com fenol.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 22:</i>	<i>Crescimento das linhagens 265 (sensível) e 254 (resistente), em meio PDA, com deposição de quadrados de agar impregnados com pirazole.....</i>	<i>81</i>

<i>Figura 23:</i>	<i>Crescimento das linhagens 178 (sensível) e 248 (resistente), em meio PDA, com deposição de quadrados de agar impregnados com catecol.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 24:</i>	<i>Controle branco (a), Linhagem 74 (b), Linhagem 100 (c), Linhagem 108 (d), Linhagem 184 (e) e Linhagem 203 (f) em Erlenmeyer contendo casca de arroz e água destilada, após 60 dias em estufa a 30°C, ambiente aeróbio.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 25:</i>	<i>Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da linhagem 74 durante a realização do experimento I.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 26:</i>	<i>Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da linhagem 184 durante a realização do experimento II.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 27:</i>	<i>Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da linhagem 184 durante a realização do experimento III.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 28:</i>	<i>Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da linhagem 100 durante a realização do experimento IV.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 29:</i>	<i>Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da linhagem 184 durante a realização do experimento IV.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 30:</i>	<i>Curva de descoloração do chorume após crescimento da linhagem 108 durante a realização do experimento V.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 31:</i>	<i>Curva de descoloração do chorume após crescimento da linhagem 184 durante a realização do experimento V.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 32:</i>	<i>Curva de descoloração do chorume após crescimento da linhagem 100 durante a realização do experimento VI.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 33:</i>	<i>Curva de descoloração do chorume após crescimento da linhagem 100 durante a realização do experimento VII.....</i>	<i>93</i>

<i>Figura 34:</i>	<i>Curva de descoloração do chorume após crescimento da linhagem 184 durante a realização do experimento VIII.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 35:</i>	<i>Quantificação da massa seca das linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 durante a realização do experimento I.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 36:</i>	<i>Quantificação da massa seca das linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 durante a realização do experimento II.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 37:</i>	<i>Quantificação da massa seca das linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 durante a realização do experimento III.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 38:</i>	<i>Quantificação da massa seca das linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 durante a realização do experimento IV.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 39:</i>	<i>Quantificação da massa seca das linhagens 74, 100, 108 e 184 durante a realização do experimento V.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 40:</i>	<i>Quantificação da massa seca das linhagens 74, 100, 108 e 184 durante a realização do experimento VI.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 41:</i>	<i>Quantificação da massa seca das linhagens 74, 100, 108 e 184 durante a realização do experimento VII.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 42:</i>	<i>Quantificação da massa seca das linhagens 74, 100, 108 e 184 durante a realização do experimento VIII.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 43:</i>	<i>Variação do pH durante o crescimento das linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254, no experimento I.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 44:</i>	<i>Variação do pH durante o crescimento das linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254, no experimento II.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 45:</i>	<i>Variação do pH durante o crescimento das linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254, no experimento III.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 46:</i>	<i>Variação do pH durante o crescimento das linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254, no experimento IV.....</i>	<i>101</i>

<i>Figura 47:</i>	<i>Variação do pH durante o crescimento das linhagens 74, 100, 108 e 184 no experimento V.....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 48:</i>	<i>Variação do pH durante o crescimento das linhagens 74, 100, 108 e 184 no experimento VI.....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 49:</i>	<i>Variação do pH durante o crescimento das linhagens 74, 100, 108 e 184 no experimento VII.....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 50:</i>	<i>Variação do pH durante o crescimento das linhagens 74, 100, 108 e 184 no experimento VIII.....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 51:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 74 no experimento I.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 52:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (per) apresentadas pela linhagem 100 no experimento I.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 53:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (per) apresentadas pela linhagem 108 no experimento I.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 54:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 184 no experimento I.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 55:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 74 no</i>	

	<i>experimento II.....</i>	107
<i>Figura 56:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 100 no experimento II.....</i>	108
<i>Figura 57:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 108 no experimento II.....</i>	108
<i>Figura 58:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 184 no experimento II.....</i>	109
<i>Figura 59:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 74 no experimento III.....</i>	110
<i>Figura 60:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 100 no experimento III.....</i>	110
<i>Figura 61:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 108 no experimento III.....</i>	111
<i>Figura 62:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e</i>	

<i>peroxidases (per) apresentadas pela linhagem 184 no experimento III.....</i>	111
<i>Figura 63: Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 74 no experimento IV.....</i>	112
<i>Figura 64: Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 100 no experimento IV.....</i>	113
<i>Figura 65: Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 108 no experimento IV.....</i>	113
<i>Figura 66: Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (per) apresentadas pela linhagem 184 no experimento IV.....</i>	114
<i>Figura 67: Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 74 no experimento V.....</i>	115
<i>Figura 68: Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 100 no experimento V.....</i>	115

<i>Figura 69:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 108 no experimento V.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 70:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 184 no experimento V.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 71:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 74 no experimento VI.....</i>	<i>117</i>
<i>Figura 72:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 100 no experimento VI.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 73:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidase (PER) apresentadas pela linhagem 108 no experimento VI.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 74:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 184 no experimento VI.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 75:</i>	<i>Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 74 no experimento VII.....</i>	<i>120</i>

<i>Figura 76:</i> Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 100 no experimento VII.....	120
<i>Figura 77:</i> Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 108 no experimento VII.....	121
<i>Figura 78:</i> Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 184 no experimento VII.....	121
<i>Figura 79:</i> Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 74 no experimento VIII.....	122
<i>Figura 80:</i> Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 100 no experimento VIII.....	123
<i>Figura 81:</i> Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 108 no experimento VIII.....	123
<i>Figura 82:</i> Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de manganês-peroxidase (MNP), lignina-peroxidase (LIP) e	

	<i>peroxidases (PER) apresentadas pela linhagem 184 no experimento VIII.....</i>	124
<i>Figura 83:</i>	<i>Cromatograma dos padrões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs).</i>	127
<i>Figura 84:</i>	<i>Cromatograma da amostra de chorume puro, sem tratamento.....</i>	128
<i>Figura 85:</i>	<i>Cromatograma do chorume após degradação pela linhagem 100, experimento IV.....</i>	129
<i>Figura 86:</i>	<i>Cromatograma do chorume após degradação pela linhagem 100, experimento V.....</i>	130
<i>Figura 87:</i>	<i>Cromatograma do chorume após degradação pela linhagem 184, experimento IV.....</i>	131
<i>Figura 88:</i>	<i>Cromatograma do chorume após degradação pela linhagem 184, experimento V.....</i>	131
<i>Figura 89:</i>	<i>A) Crescimento da linhagem bacteriana 254 em placa de Petri contendo meio R2A.....</i>	134
<i>Figura 90:</i>	<i>Observação de esfregaço da colônia pura da Linhagem 254 ao microscópio ótico.....</i>	134
<i>Figura 91:</i>	<i>Crescimento da Linhagem fúngica 100 em placa de Petri contendo meio R2A.....</i>	135
<i>Figura 92:</i>	<i>Observação da Linhagem 100 ao microscópio ótico após crescimento sob microcultivo.....</i>	135
<i>Figura 93:</i>	<i>A) Observação macroscópica de placa contendo crescimento da Linhagem 184; e, B) Observação da Linhagem 184 ao microscópio ótico após crescimento em placa de microcultivo, utilizando meio PDA.....</i>	136

Lista de Abreviaturas

AAO	Enzima Aril Álcool – Oxidase
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	American Public Health Association
AVO	Enzima Álcool Veratrílico Oxidase
AWWA	American Water Works Association
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Ozigênio
EC	Enzyme Classification
EPA	Environmental Protection Agency
FID	Flame Ionization Detector
HAPs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAC	Lacase
LIP	Lignina Peroxidase
MNP	Manganês Peroxidase
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
PER	Peroxidases
RBC	Rotating Biological Contactor
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
WEF	Water Environment Federation

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estabelecer parâmetros para a degradação biológica de várias amostras de chorume obtidas de um aterro sanitário da região metropolitana de Campinas, determinar os tipos de microrganismos mais comumente encontrados nestas amostras e estudar o metabolismo dos mesmos. Inicialmente 323 linhagens foram isoladas utilizando-se o meio de cultura R2A. Estas linhagens foram testadas quanto a sua resistência frente a compostos tóxicos e crescimento sobre lignina. Foram realizados 8 experimentos mudando-se as características de cultivo e alguns parâmetros foram observados, tais como degradação de fenol, degradação de compostos tóxicos presentes no chorume, redução da demanda química de oxigênio (DQO) e diminuição da cor. Do total de linhagens analisadas, 4 linhagens fúngicas mostraram-se mais adequadas para conseguir degradar os compostos altamente poluentes presentes no chorume. As linhagens 74, 100, 108 e 184 foram testadas e a linhagem 184 destacou-se como sendo a melhor em quase todos os testes. Uma linhagem bacteriana (254) também atingiu bons resultados em alguns testes e merece outros estudos. O máximo de redução da DQO foi conseguido pela linhagem 184 nos experimentos IV (51,8%) e V (50,4%). As melhores taxas de degradação do fenol também foram atingidos pela linhagem 184 nos mesmos experimentos (72,9% e 63,7% respectivamente). A linhagem 100 também apresentou bons resultados e reduziu a DQO em 36,8% no experimento III e 38,6% no experimento IV. Quanto à degradação do fenol, a mesma linhagem conseguiu taxas de degradação de 50,1% no experimento IV. O chorume não autoclavado serviu melhor aos experimentos, bem como a adição de glicose e extrato de leveduras como nutrientes de crescimento.

Palavras-chave: chorume, destoxificação, resíduo urbano, enzimas ligninolíticas.

abstract

The purpose of this work was to establish parameters for the biological degradation of several leachate samples from a Campinas region's municipal sanitary landfill, to determine the kind of microorganisms commonly found on these samples and to study their metabolism. Initially 323 strains were isolated using R2A medium. These strains were tested to toxic compounds resistance and ability to grow on lignin. Degradation of total leachate compounds, phenol degradation, DQO reduction and colour reduction were analysed in eight different culture conditions. Four (4) fungal strains were more prepared to degrade the highly toxic leachate compounds. Strains 74, 100, 108 and 184 were tested and the strain 184 appeared to be the best in almost all the conditions. One bacterial strain (254) also showed good results in some tests and deserves a detailed study. The maximum of DQO reduction was reached by the 184 strain in the experiments IV (51,8%) and V (50,4%). The best rates of phenol degradation were also reached by the strain 184 in the same experiments (72,9% and 63,7% respectively). Strain 100 also presented good results and reduced the DQO around 36,8% in experiment III and 38,6% in experiment IV. The same strain degraded about 50,1% of phenol in the experiment IV. Non sterilized leachate added with glucose and yeast extract was better metabolized compared to non-added and sterilized leachate.

Key words: leachate, detoxification, municipal solid waste (MSW), ligninolytic enzymes.

PARTE I

Introdução

O aumento descontrolado da densidade populacional nos grandes centros urbanos favorece a produção de grande quantidade de lixo e dejetos que são habitualmente despejados em lixões rudimentares ou em aterros sanitários mais elaborados. Vários são os produtos que compõem o lixo urbano e, como consequência, muitos problemas podem surgir dependendo da forma como esses materiais orgânicos ou inorgânicos são devolvidos à natureza.

Pode-se definir um aterro sanitário como sendo a reintrodução ao meio natural, e isso nas melhores condições possíveis, dos resíduos sólidos que não foram objeto de outros tratamentos de valorização ou de eliminação (CASTILHOS Jr., 1991). As regras de disposição nos aterros sanitários, escolha do local, condições de operação e natureza dos resíduos admissíveis têm se tomado cada vez mais rígidas na tentativa de minimizar os efeitos negativos destes aterros sobre a natureza, uma vez que vários compostos quimicamente tóxicos são gerados durante a estabilização do conteúdo total de carbono presente nos lixões e aterros sanitários.

Hoje é grande a preocupação em torno do lixo urbano, não só pelo aumento crescente de sua produção, mas também pela sua complexidade estrutural. Nele são encontradas desde substâncias inertes até substâncias altamente tóxicas, que podem ser carregadas pela água das chuvas, gerando uma grande quantidade de chorume, ou seja, um líquido lixiviado colorido e rico em substâncias tóxicas que podem contaminar os lençóis de águas subterrâneas trazendo sérios riscos à saúde humana, bem como contaminar rios ou córregos, invadindo a cadeia alimentar do homem (REITZEL et al., 1992).

A degradação dos resíduos urbanos quando dispostos nos aterros sanitários ou nos lixões é muito lenta devido à complexidade dos substratos encontrados e à variação das condições atmosféricas (ROSS, 1990). As características do chorume variam de acordo com a idade do aterro sanitário, assim o chorume da fase acídica (chorume jovem) é caracterizado por altos níveis de poluentes orgânicos, principalmente ácidos graxos voláteis. Esse ambiente ácido também gera grandes quantidades de metais pesados (DIAMADOPOULOS, 1994). Na fase metanogênica do período de decomposição anaeróbia, bactérias formadoras de gás metano degradam os ácidos graxos voláteis diminuindo a força orgânica do chorume

produzindo grandes quantidades de biogás. O carbono orgânico que sobra após esta biodegradação encontra-se na forma de substâncias com alto peso molecular, como por exemplo a lignina, celulose e derivados de lignocelulose que são menos suscetíveis à degradação biológica microbiana, resultando então num chorume “velho”.

Vários são os tipos de tratamento destinados a diminuir a toxicidade dos resíduos e do líquido percolado, sendo os mais utilizados a recirculação do chorume (DIAMADOPOULOS, 1994), métodos eletroquímicos (CHIANG et al., 1995), e métodos biodegradativos (WALL & ZEISS, 1995; KUPFERLE et al., 1995; MANOHARAN et al., 1992; ZINEBI et al., 1994 e NEDWELL & REYNOLDS, 1996).

Uma vez conhecido o problema do chorume, os objetivos principais a serem esclarecidos com este trabalho foram:

- ▶ Caracterização bioquímica temporal do chorume, ou seja, a monitoração e doseamento dos compostos presentes no chorume em duas estações climáticas distintas (verão e inverno), para verificação do efeito da constituição do chorume sobre a biodegradabilidade;
- ▶ Seleção de fungos, bactérias e leveduras naturalmente presentes no chorume e locais por ele contaminados e estudo do possível envolvimento destes microrganismos na biodegradação dos compostos tóxicos presentes no chorume;
- ▶ Utilização de microrganismos ligninolíticos reconhecidos como degradadores de poluentes já isolados no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Unicamp;
- ▶ Estudo do sistema ligninolítico destes microrganismos quando crescidos em meios de cultura contendo compostos do chorume, sob condição aeróbia e microaerofílica; e,
- ▶ Estudo da descolorização e biodegradação do chorume.

PARTE II

Revisão
Bibliográfica

2.1. HISTÓRICO

Do ponto de vista histórico, os problemas relacionados aos resíduos sólidos surgiram no dia em que os homens passaram a viver em grupo, fixando-se em determinados locais e abandonando os hábitos de andar de lugar em lugar à procura de alimentos ou pastoreando rebanhos. Os resíduos produzidos neste período eram, sobretudo, excrementos e biomassa morta. Os materiais utilizados nas diversas atividades eram substancialmente de origem natural e o ambiente não tinha maiores dificuldades em reabsorvê-los. Além disso, uma vez que a população e as concentrações das substâncias eram pequenas, não existiam problemas específicos com cargas pontuais excessivas, como por exemplo, nas grandes metrópoles modernas. A partir daí, processos para eliminação dos resíduos sólidos passaram a ser motivo de preocupação, embora as soluções visassem unicamente transferir os resíduos produzidos para locais afastados das aglomerações humanas primitivas (PRODAM, 2000).

GANDOLLA et al. (1997) afirmam que o crescente desenvolvimento de tecnologias para o tratamento de resíduos, como aterros sanitários, incineradores e outros, são um exemplo evidente das afirmações anteriores.

Atualmente, com o aumento exagerado da densidade demográfica mundial, a problemática dos resíduos sólidos transformou-se, juntamente com a falta de água potável, a geração de alimentos e a destruição da camada de ozônio, nos maiores desafios do homem contemporâneo.

Oito em cada dez seres humanos vivem nas cidades. Se a proporção assusta, mais espantoso ainda é constatar que, neste novo milênio, todos os caminhos levarão a um planeta mais urbano. Atualmente 80% da população brasileira tem água encanada, mas o resíduo urbano ainda é um problema. Muitos municípios nem sequer contam com aterros sanitários. “Nos próximos anos precisaremos concentrar esforços para combater o problema do lixo” (GANDOLLA et al. 1997).

Os problemas criados por uma estrutura urbana típica de cidades de países em desenvolvimento são inúmeros. O poder público se vê afligido por falta de recursos humanos e financeiros para atender as demandas dos centros urbanos,

quanto aos equipamentos de infra-estrutura, comunicação, energia elétrica, abastecimento de água, rede de esgoto, serviço de limpeza pública, tratamento do lixo, entre outros. Segundo OGATA (1983), o papel dos resíduos sólidos, no amontoado de problemas de metrópoles de países em desenvolvimento não passa de um mero detalhe, sendo relegado a segundo plano, o que lhe confere um tratamento não adequado, quando observado, de um modo geral, sob o ponto de vista econômico: “Eliminar a maior quantidade possível de detritos sólidos ao mais baixo custo”. Deste modo, pouco valor se dá ao prisma estético e sanitário, de grande importância para a qualidade de vida da população urbana.

Sabe-se que no Brasil, a cada 24 horas são produzidas 240.000 toneladas de resíduos sólidos – sujeira que seria suficiente para lotar 1.160 aviões Boeing 747. O volume de resíduos sólidos domésticos duplicou nos últimos quinze anos em virtude do aumento do poder aquisitivo e do perfil de consumo dos brasileiros. Hoje, compram-se muito mais produtos industrializados que na década passada, incluindo alimentos e bebidas. São toneladas de embalagens do tipo longa vida, montanhas de copos de iogurte, de garrafas de plástico e fraldas descartáveis entre outros. O problema é que, enquanto a população brasileira adquire hábitos de Primeiro Mundo e consome produtos de melhor qualidade, o tratamento de lixo continua sendo de país pobre. Hoje, 95% de tudo o que é jogado fora não recebe nenhum tipo de tratamento e vai parar em lixões, onde irá alimentar ratos e urubus, poluirá o solo e as águas subterrâneas (REVISTA VEJA, 1997). Do nascimento à morte um indivíduo brasileiro irá gerar 25 toneladas de lixo. Dessa forma curiosa, o lixo tomou-se um indicador de desenvolvimento da nação, ou seja, quanto mais pujante for a economia, mais sujeira o Brasil irá produzir (Figura 1).

Os resíduos urbanos acumulados de maneira contínua no meio natural não são inativos. Esta mistura de grande variedade química, sob a ação de agentes naturais como as chuvas e os microrganismos, sofre evoluções muito complexas. De fato, a degradação dos componentes orgânicos e inorgânicos dos resíduos urbanos é um fenômeno constituído essencialmente pela superposição de mecanismos físicos, químicos e microbiológicos (CASTILHOS Jr, 1991).



(Fonte: REVISTA VEJA, 1999)

Figura 1: Expectativa de geração de lixo por um indivíduo brasileiro ao longo de sua vida.

Para a minimização desses problemas faz-se necessário conhecer os vários agentes causadores e utilizar-se do saneamento básico e outros métodos corretivos, ou ainda melhor, utilizar-se de metodologias de disposição final de resíduos preventivas no que diz respeito ao impacto ambiental e ao impacto social, uma vez que, quando o lixo é descartado de forma inconseqüente, pode trazer sérios riscos à saúde humana.

2.2. CONCEITOS

Segundo ODUM (1988), impactos ambientais são modificações sofridas pelo ambiente em tal profundidade que desenvolvam forças que impeçam seu retorno às condições de equilíbrio.

A resolução do CONAMA nº01/86 define impacto ambiental como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam a saúde, a segurança e o bem-estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota; as condições estéticas e sanitárias do

meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais. O relatório da HIGESA (Conder/Higesas 2000) conceitua impacto ambiental como qualquer alteração das condições ambientais existentes ou criação de um novo conjunto de condições ambientais, adversas ou benéficas, causada ou induzida por uma ação ou ainda, de um conjunto de ações sob consideração (empreendimentos, políticas, programas, projetos de lei, entre outros).

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS, saneamento é o controle de todos os fatores do meio físico onde o homem habita, que exercem ou podem exercer efeitos prejudiciais ao seu bem estar físico, mental ou social (MANSUR & MONTEIRO, 2000).

2.3. GERENCIAMENTO DA COLETA DE RESÍDUOS SÓLIDOS NO BRASIL

No Brasil, o gerenciamento eficaz do resíduo urbano é um dos mais importantes desafios a serem enfrentados para se evitar estes impactos ambientais. Só para se ter uma idéia, a pesquisa nacional do IBGE indica que 23,4% dos municípios da Região Norte não contam com nenhum sistema de coleta de lixo. Além disso, em 1990, a coleta de lixo atingia 78,4% de todo o país e em 1995, ao invés de avançar, o sistema apresentou uma queda de 9,2%, caindo para 69,2%. O que mais preocupa os ambientalistas e especialistas da área é que nesta década tem sido evidente a tendência de crescimento da geração de resíduos sólidos, não apenas em termos absolutos (toneladas/dia), mas também em termos relativos (kg/hab/dia) (CEMPRE/IPT, 1995).

Como maneira de evitar problemas decorrentes do mau gerenciamento da limpeza pública no Brasil, na Figura 2 são propostas ações corretivas e preventivas.

As ações do topo da pirâmide devem prevalecer sobre as outras, sendo que as ações da base servem como forma de se evitar o aumento da geração de resíduos sólidos e dos problemas decorrentes do mau gerenciamento destes resíduos.



(Fonte: PRODAM, 2000)

Figura 2: Gerenciamento correto e sustentável dos resíduos sólidos.

2.4. COLETA DE RESÍDUOS SÓLIDOS NO BRASIL, ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO E A LIMPEZA URBANA, NA IMPRENSA BRASILEIRA, NOS ÚLTIMOS ANOS

Enquanto cidades como Belo Horizonte, Curitiba e Porto Alegre iniciaram há cerca de dez anos programas bem sucedidos de coleta seletiva de lixo e reciclagem, São Paulo ainda despacha tudo o que produz para dois aterros com os dias contados. No aterro de Bandeirantes, a sucata gerada pela cidade de São Paulo levará 500 anos para se decompor e custará aos cofres públicos R\$60,00 por tonelada. Se cair nas mãos clandestinas de catadores, renderá R\$ 1.000,00/ton e voltará reciclada à prateleira dos supermercados em 45 dias. Com o dinheiro que poderia ser aproveitado do lixo gerado diariamente na cidade (R\$ 1,3 milhão) daria para se construir 30 escolas num período de um mês (REVISTA ÉPOCA, 2001).

Um dado alarmante é o número de menores que trabalham nos lixões. De acordo com a UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância), no Brasil, 50 mil

crianças e adolescentes tiram o seu sustento e o de suas famílias do lixo. Dessas, 30% não estudam e recebem de um a seis reais por dia, vendendo o lixo coletado (UNISANTA, 1999).

O hábito, ou a necessidade, de sobreviver da catação de lixo é um fato presente na região do aterro que gerou o chorume deste trabalho. Além de economicamente providencial – há quem diga que se ganhe até R\$ 1 mil mensais com o lixo, a dependência em relação ao aterro já é enraizada no próprio cotidiano da comunidade local. É junto ao mau cheiro e à matéria em decomposição do aterro que os jovens do bairro fazem a catação e também passam o tempo livre, empinando pipas ou consumindo drogas. Neste ambiente, os catadores têm dezenas de barracas permanentemente montadas junto ao lixo. Nestas instalações, feitas de lona e arestas de madeira, pais, mães e filhos, muitas vezes pequenos, fazem a seleção do material coletado (CORREIO POPULAR, 2000). Por outro lado, no lixão de São Vicente, pessoas disputam espaço com cães e urubus. A concorrência é grande, e aumenta ainda mais com a descarga do hipermercado Carrefour. De lá surge grande quantidade de alimentos aproveitáveis, pois não estão com o prazo de validade vencido, mas apresentam defeitos na embalagem, por exemplo. O ruim é que o lixão recebe cerca de 200 ton/dia de detritos domésticos misturados aos resíduos sépticos de farmácias e hospitais da cidade (UNISANTA, 1999), podendo trazer sérios riscos à saúde dos que trabalham na área contaminada.

Em Campinas, na área de um aterro encerrado (Parque Santa Bárbara), no início de 2001 estava havendo deposição não autorizada de detritos provenientes das obras de prolongamento da Rodovia dos Bandeirantes (SP-348), o que poderia causar supressão de lençóis de águas subterrâneas. Após o encerramento das atividades deste aterro, toda a disposição final do lixo coletado em Campinas passou a ser feita no Delta 1 que se encontra na região sudoeste. A partir de então, o local passou a ser alvo de diversas denúncias de irregularidades, entre elas a de despejo clandestino de lixo industrial, sendo que o aterro era destinado, inicialmente apenas à deposição de detritos urbanos. Hoje a situação do Delta 1 não é nada confortável e a prefeitura está tendo que procurar um local para construção de outro aterro, conforme parecer da CETESB (CORREIO POPULAR, 2001).

No Rio de Janeiro, a Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos estima que, diariamente, 400 toneladas de matéria orgânica são depositadas na área que vai de São Gonçalo à cidade do Rio. Outras 64 toneladas de lixo industrial seguem o mesmo caminho, além de 300 quilos de metais pesados e 6 toneladas de lixo doméstico “in natura”. Não há nenhum programa coordenado para controlar essas emissões de poluentes. Por conta disso, todos os dias são despejados 800 metros cúbicos de chorume diretamente na Baía de Guanabara (ÉPOCA, 2000).

Outro problema que surge da má destinação do lixo é o acúmulo de metais pesados provenientes de lâmpadas fluorescentes e de baterias de telefones celulares. Falando recentemente na Firjan – Federação das Indústrias do Rio de Janeiro, um engenheiro ambientalista advertiu para o risco que apresentam estas lâmpadas fluorescentes, talvez o produto mais consumido no Brasil de hoje, o país de poucas luzes. Ele diz: “Será que as prefeituras têm conhecimento de que, se forem lançadas em aterros sanitários, o mercúrio nelas contido não se decompõe, contamina o solo e, mais tarde, os cursos d’água, chegando a cadeia alimentar?”. Pergunte-se a um usuário comum se ele sabe os riscos que corre tentando atarraxar uma lâmpada dessas num bocal (ÉPOCA, 2001). Outra pergunta que se faz constantemente é: “O que fazer com os milhões de baterias velhas de telefone celular?”. O Ministério do Meio Ambiente calcula que 11 toneladas de baterias são depositadas por ano em lixões – o ideal seria a reciclagem destes resíduos. Sabe-se que os metais pesados não são degradados pelos microrganismos e se acumulam no ambiente. Com o passar do tempo, as baterias descartadas deixam vaziar um líquido que pode contaminar rios e lençóis freáticos. Existe lei específica para o destino correto destes resíduos, mas o que se vê é que continua o descaso da população. Empresas como a Motorola recolhem as baterias de seus clientes (ÉPOCA, 1999). Atualmente estas baterias estão sendo enviadas a França para reciclagem.

Os incineradores também merecem atenção especial. As fumaças oriundas de incineradores antigos e mal operados também representam um impacto ambiental importante. No caso do incinerador Vergueiro, uma enorme chaminé expelle diariamente e sem qualquer filtragem a fumaça da queima de 170 toneladas de lixo

hospitalar da cidade de São Paulo. “Um dos seus subprodutos são as dioxinas”, afirma Anthony Wong, do Centro de Assistência Toxicológica do Hospital das Clínicas de São Paulo. Os efeitos das dioxinas são muito perigosos, podendo causar câncer nos rins, fígado, pulmões e seios, endometriose (tecido igual ao do útero aparece em outros órgãos), cloracne (erupções semelhantes à acne surgem pelo corpo) e a produção de insulina é alterada, podendo causar Diabetes (ÉPOCA, 1999). Em fevereiro de 1998, por uma falha da Prefeitura de São Paulo, mais de 400 toneladas de lixo hospitalar deixaram de ser recolhidas e incineradas. O risco de proliferação de doenças aumentou consideravelmente, pois o material ficou exposto ao ar livre. O Hospital das Clínicas, o maior complexo hospitalar da América Latina, chegou a ficar com quase 30 toneladas de material contaminado em sua lixeira. Esse assunto gerou uma discussão em torno do incinerador, que gera poluição, mas que não pode parar, pois os transtornos seriam enormes (ISTO É, 1998)

Até na Antártida o problema do lixo tem preocupado as autoridades. Representantes de 24 países se reuniram em janeiro de 1999, no local, para discutir os problemas ambientais do continente, e futuras políticas de preservação. De acordo com o texto, as principais ameaças são: o lixo gerado em excesso, a pesca predatória e o buraco da camada de ozônio que aumenta o risco da calota polar se derreter. O Brasil não pôde participar deste encontro, mesmo tendo sido convidado, devido à contenção de despesas do governo (ISTO É, 1999).

Enquanto se discute a melhor destinação dos resíduos domésticos o governo brasileiro gasta milhões de dólares em projetos mal acabados ou com problemas técnicos. Nove anos atrás, o sopro ecológico da Rio 92 fez nascer a maior usina de tratamento de lixo do mundo. Situada no Caju e orçada em 23 milhões de dólares, teria capacidade para receber 25% do lixo da cidade do Rio de Janeiro, o que totaliza 8.300 toneladas por dia. Mal fora inaugurada, a Usina do Caju (Figura 3) fechou devido a problemas técnicos. Resultado: as lixeiras cariocas continuam sendo despejadas diretamente nos aterros de Gramacho, em Duque de Caxias e Bangu. Não é só. Financiado pelo Banco Interamericano de Desenvolvimento (BID) e pelo fundo japonês The Overseas Economic Cooperation Fund, desde 1997 o Programa de Despoluição da Baía de Guanabara (PDBG) destinou 4 milhões de reais para

erguer usinas de tratamento de lixo em Niterói, São Gonçalo e Magé. A previsão era de começarem a funcionar em março de 1999, mas até agora, nada: estão abandonadas. O total de 1.400 toneladas de detritos dos três municípios jamais passou por uma esteira de tratamento (VEJA, 2001).



(Fonte: REVISTA VEJA, 2001)

Figura 3: Usina desativada de Caju. 23 milhões de dólares mal aplicados.

Mesmo com toda esta situação, os governantes parecem não se incomodar com a situação do aterro de Gramacho. A poluição causada pelo aterro está na mira do Ministério Público Federal. Segundo um documento interno da Queiroz Galvão - administradora do aterro, a capacidade de recebimento de lixo está esgotada. Segundo a empresa Geoprojetos, que realiza uma auditoria no local, existe o risco de um acidente geotécnico (por exemplo, um deslizamento), com graves conseqüências ambientais (Figuras 4 e 5). O aterro de Gramacho está localizado sobre um solo pouco resistente – característico das regiões de manguezal. O despejo de lixo na área, de 1200 metros quadrados, começou em 1977. Desde então, Gramacho já recebeu 37,6 milhões de toneladas. “O peso do lixo já afundou o solo em 27 metros. A superfície naquela área não tem como sustentar o peso brutal existente. O terreno está no limite”, avalia Luiz Mário Queiroz Lima, especialista em engenharia hidráulica e saneamento (VEJA, 2001).

Mas boas notícias também estão surgindo. O Brasil está começando a resolver um de seus mais sérios problemas de saúde pública: o tratamento do lixo retirado dos hospitais, como seringas e outros produtos contaminados.



Figura 4: Vazamento de chorume do aterro de Gramacho atingindo manguezais.



Figura 5: Vista panorâmica do aterro de Gramacho.

Os sanitaristas estimam que 80% dos resíduos hospitalares são hoje despejados em aterros ou lixões a céu aberto, sem nenhum tratamento especial,

algo que não deveria ser feito nem com dejetos comuns. No entanto, em 1998 chegou ao país uma nova tecnologia, considerada na época a mais eficaz para resolver o problema. A unidade está em funcionamento e tem capacidade de tratar até 90 toneladas de lixo hospitalar por dia. Trata-se de um tipo de forno microondas gigante que esquenta e destrói a estrutura molecular dos microrganismos sem queimar o lixo nem produzir fumaça. Na verdade, este tipo de tecnologia acaba com o potencial patogênico do lixo, mas não resolve o problema de sua destinação final (VEJA, 1998).

Curitiba novamente deu exemplo quando estendeu o programa de coleta seletiva e reciclagem de lixo implantado na capital para metade dos municípios do estado. Mais de 150 cidades receberam os equipamentos necessários para a reciclagem e tiveram seus lixões substituídos por aterros sanitários, num investimento de 23 milhões de reais. Com essa iniciativa atingiu-se a marca de 3.000 toneladas de lixo reciclado por dia, levando o Paraná, sozinho, a reciclar mais lixo que o resto do país junto (VEJA, 1999).

Em Belford Roxo, uma das cidades mais pobres da Baixada Fluminense, o projeto Vida Limpa recicla o lixo e o entulho que os moradores recolhem das ruas, numa iniciativa da prefeitura. Os moradores fazem as trocas e recebem alimentos de acordo com uma tabela idealizada pelos organizadores do projeto. Em janeiro de 2000, o projeto já havia beneficiado 3 mil pessoas de baixa renda e recolhido mais de 250 toneladas de entulho, e o que é melhor, não ocorreram mais enchentes decorrentes de entulhos jogados no córrego que passa pela cidade (ISTO É, 2000).

Em Brasília, jogar papel no chão deixou de ser apenas falta de educação. O corriqueiro ato de sujar ruas e calçadas passou a ser ilegalidade punida com multas em dinheiro, assim como ocorre em São Paulo. A punição atinge motoristas e pedestres e já está mudando os velhos hábitos dos moradores da cidade. Alguns shoppings que distribuíram panfletos, bem como organizadores de um show tiveram que pagar multas de R\$ 900,00 a R\$ 3.000,00 reais pela poluição visual causada (ISTO É, 1996).

2.5. RESÍDUOS SÓLIDOS : ASPECTOS AMBIENTAIS E DE SAÚDE PÚBLICA

Normalmente, os resíduos sólidos são definidos segundo sua origem e classificados de acordo com o seu risco em relação ao homem e ao meio ambiente e o impacto ambiental causado por estes vai depender da sua composição. Dentre os materiais que formam o lixo, estão presentes a madeira, papel e papelão, tecidos, couro e borracha, folhas, mato e restos de árvores, metais (latas, alumínio), louça, cerâmica e pedras, restos orgânicos de comida, vidros, e pós (terra, areia, pequenos grãos, etc).

Na Tabela 1 vê-se a distribuição destes tipos de resíduos sólidos na formação do lixo doméstico, nas principais cidades brasileiras e do mundo.

Tabela 1 : Composição física percentual dos resíduos urbanos de várias localidades.

Localidade	Vidro	Metal	Plástico	Papel	Outros
São Paulo	1,1	3,2	12,1	14,4	69,2
Rio de Janeiro	2,0	3,0	13,0	27,0	55,0
Salvador	4,0	4,0	11,0	19,0	62,0
Fortaleza	3,3	7,3	8,2	22,6	58,6
Belo Horizonte	2,1	3,2	1,9	16,9	76,0
Nova York	9,0	13,0	10,0	35,0	26,0
Londres	8,0	8,0	2,0	37,0	38,0
Roma	4,0	3,0	4,0	18,0	71,0
Singapura	1,0	3,0	6,0	43,0	37,0
Brasil	3,0	4,0	3,0	25,0	65,0
Estados Unidos	8,2	8,7	6,5	41,0	35,6
Holanda	14,5	6,7	6,0	22,5	50,3
Alemanha	10,4	3,8	5,8	18,8	61,2

(Fonte: INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS, 1995)

Segundo LIMA (1991), os resíduos sólidos produzidos diariamente, quando dispostos de forma inadequada, podem trazer conseqüências graves para o

ambiente e a saúde da população. Provocam a poluição do solo, da água superficial e subterrânea e do ar, através de processos naturais, como a biodigestão e a combustão espontânea dos resíduos.

O lixo doméstico possui características que irão determinar a sua capacidade de degradação biológica e química (MANSUR & MONTEIRO, 2000). Estas características podem ser divididas em:

- ▶ Físicas: composição gravimétrica, peso específico, teor de umidade, compressibilidade e geração per capita;
- ▶ Químicas: poder calorífico, potencial de hidrogênio, teor de cinzas, matéria orgânica, carbono, nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, resíduo mineral total, resíduos minerais solúveis, gorduras, relação C/N e outros. É muito importante conhecer estes parâmetros quando o lixo vai ser destinado à algum tipo de tratamento disponível; e,
- ▶ Biológicas: Estudo da população microbiana e dos agentes patogênicos presentes no lixo urbano.

Com base nas características citadas acima, os resíduos urbanos poderão sofrer deterioração biológica e química, na área dos aterros, num tempo que poderá variar de poucos dias, no caso de resíduos orgânicos, até vários anos e décadas, como o plástico. Na Tabela 2 estão citados os tempos médios de degradação biológica de cada tipo de resíduo.

2.6. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DECORRENTES DA DISPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS DOMÉSTICOS

CARVALHO (1980) afirma que o lixo pode se transformar em uma perigosa peça da estrutura epidemiológica de um aglomerado humano. NAIM, citado por MACHADO & PRATA (1999) propõe um esquema das vias de contato lixo-homem, que, resumidamente explica as trajetórias pelas quais pode ocorrer a transmissão de doenças oriundas da disposição inadequada dos resíduos sólidos urbanos.

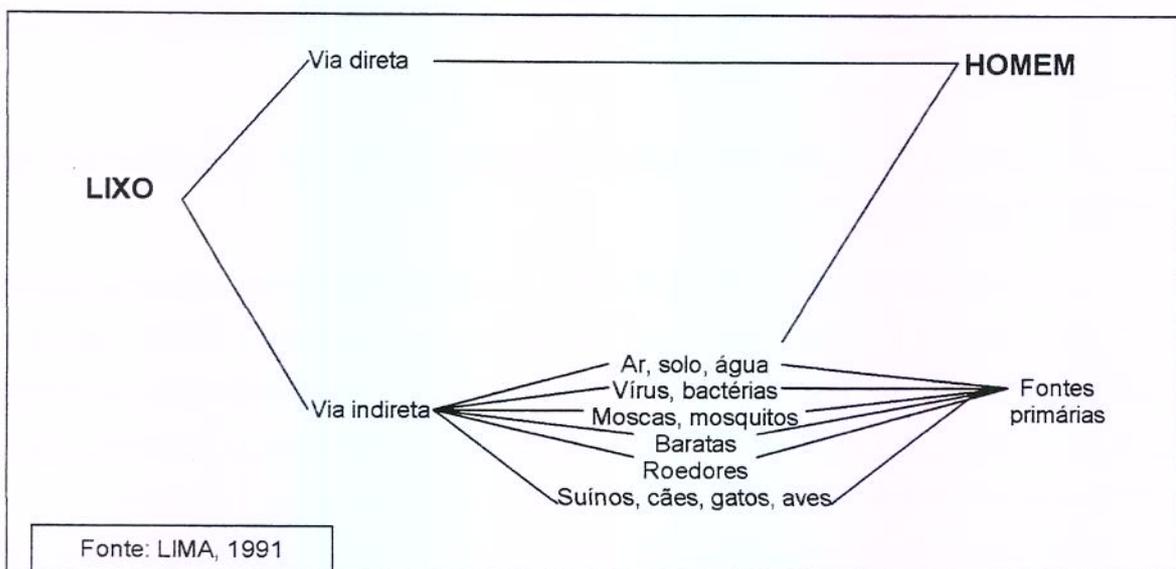
Em função da diversidade de vias, e, especialmente, a ação de vetores biológicos e mecânicos, o raio de influência e os agravos sobre a saúde mostram-se de difícil identificação.

Tabela 2: Tempo médio de estabilização dos vários tipos de resíduos encontrados nos aterros sanitários.

<i>Tipo de resíduo</i>	<i>Tempo de Degradação</i>
Jornais	2 a 6 semanas
Embalagens de papel	1 a 4 meses
Cascas de frutas	3 meses
Guardanapos	3 meses
Pontas de cigarro	2 anos
Fósforos	2 anos
Chicletes	5 anos
Nylon	30 a 40 anos
Latas de alumínio	100 a 500 anos
Pilhas	100 a 500 anos
Copos plásticos	200 a 450 anos
Garrafas: vidro/plástico	Tempo indeterminado

(Fonte: <http://www.geocities.com/Yosemite/Gorge/7224/lixo.html>)

LIMA (1991) destacando as muitas possibilidades de comprometimento do meio ambiente que colocam em risco a vida do homem moderno, apresenta a figura 6, ilustrando a relação lixo-ambiente-saúde.



Fonte: LIMA, 1991

Figura 6: Diagrama das vias de acesso de agentes patogênicos para o homem através do lixo disposto inadequadamente.

Ainda, segundo LIMA (1991), o lixo exerce uma forte atração sobre algumas espécies que o utilizam como nicho ecológico, por oferecer disponibilidade simultânea de água, alimento e abrigo. Observa-se a predominância de vetores transmissores de doenças entre os seres que habitam o lixo, como ratos, baratas, suínos, etc. Outro aspecto importante é a presença de microrganismos patogênicos e parasitas no lixo. Na Tabela 3 é apresentado o tempo de sobrevivência de alguns destes organismos no lixo.

Tabela 3: Tempo estimado de sobrevivência de microvetores no lixo.

Organismo	Tempo (Dias)
<i>Salmonella typhi</i>	29 – 70
<i>Entamoeba histolytica</i>	8 – 12
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2000 – 2500
<i>Leptospira interrogans</i>	15 – 43
<i>Poliovírus</i>	20 – 170
<i>Micobacterium tuberculosis</i>	150 – 180
Larvas de vermes	25 - 40

(Fonte: Suberkropp & Klug citados por LIMA, 1991)

WESTLAKE et al. (1995) isolaram 37 bactérias celulolíticas obtidas de um aterro sanitário. Destas, nove linhagens foram diferenciadas por suas características morfológicas. As bactérias isoladas apresentaram crescimento ótimo numa faixa de pH próximo ou superior a 7, e sob temperatura termofílica (próxima de 50°C). Os gêneros encontrados foram *Eubacterium* e *Clostridium*.

Na cidade de Recife, SILVA et al. (2000), realizaram uma pesquisa de levantamento da contaminação de águas residuárias do aterro de Muribeca, durante o ano de 1998. Em 14 pontos de amostragem de águas residuárias foram determinados, em três períodos diferentes, coliformes totais e termotolerantes por testes de tubos múltiplos e número de bactérias aeróbias heterotróficas mesófilas. Quarenta e dois por cento das amostras (42%) apresentaram-se inodoras e límpidas enquanto todas as outras apresentavam-se pútridas. Foi detectado em 66% das amostras analisadas a mesma variação no número mais provável de coliformes

totais e fecais por 100 mL da amostra (NMP), atingindo valores de 10^4 a 10^7 UFC. Apenas em 34% das amostras, a ordem de grandeza dos coliformes fecais foi 10 vezes menor que dos coliformes totais. Sob condição climática ensolarada durante o período de coleta, as amostras apresentaram alto índice de contaminação, com relação aos coliformes encontrados.

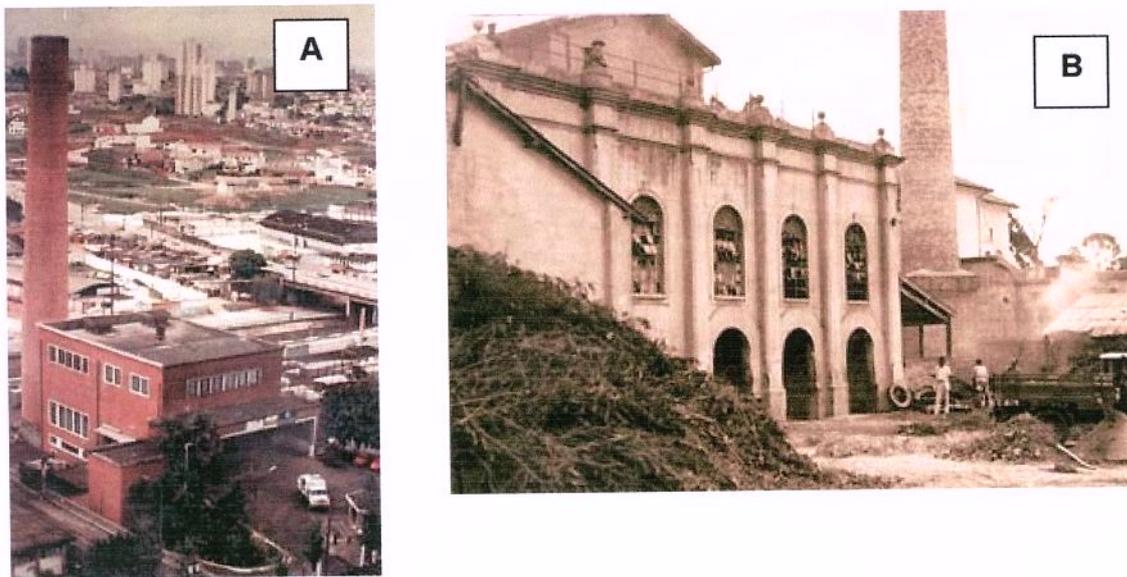
Ainda como consequência do armazenamento inadequado dos resíduos sólidos nos aterros, surgem os problemas de incidência de câncer em pessoas moradoras das redondezas desses locais. GOLDBERG et al., (1999) destacaram os riscos de se desenvolver câncer quando se passa a maior parte do tempo perto de locais contaminados por chorume. Neste trabalho foi determinado o quanto pode ser prejudicial ao homem conviver com o chorume. Em Montreal, Canadá, foi provado que a incidência de câncer foi menor em pessoas que moravam em locais mais remotos do aterro da cidade. Nas áreas mais próximas, houve pequena incidência de risco de câncer de fígado, pâncreas e próstata. Também houve casos de risco de linfoma de Hodgkins. Os riscos estavam associados aos compostos presentes no chorume, e foram estatisticamente estudados.

2.7. TIPOS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

2.7.1. Incineração

Segundo a ABNT, a incineração de resíduos sólidos é o processo de oxidação a altas temperaturas, que destrói, reduzindo o volume, ou recuperando materiais ou substâncias neles presentes (Figura 7). Alguns fatores importantes no custo da incineração são a forma física do resíduo, a concentração de compostos orgânicos (pentaclorofenóis, dioxinas), o calor de combustão, a umidade, a concentração de compostos halogenados, sulfatados e fosforados, e a presença de metais. Também a viabilidade do processo é influenciada pela infraestrutura para transporte e instalação, tais como disponibilidade de espaço para instalação, fonte de energia e água necessários para o processo e consumo humano. (McCORMICK & DUKE, 1989).

O método de incineração apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos de disposição final dos resíduos, uma vez que diminui consideravelmente a quantidade de lixo (as cinzas resultantes do processo representam 25% no máximo do peso total). O calor obtido através da queima mantém-se e não há gastos de energia para a manutenção da queima. A simples introdução de lixo no incinerador alimenta a combustão. Neste processo a temperatura chega a atingir 850°C em média, o que é muito importante para a inativação de patógenos, tais como bactérias e vírus. Seus custos operacionais são altos em relação aos aterros sanitários, e os gases gerados após a combustão podem conter furanos e dioxinas, que são altamente indesejáveis, por se tratar de compostos carcinogênicos e teratogênicos (PRODAM, 2000).



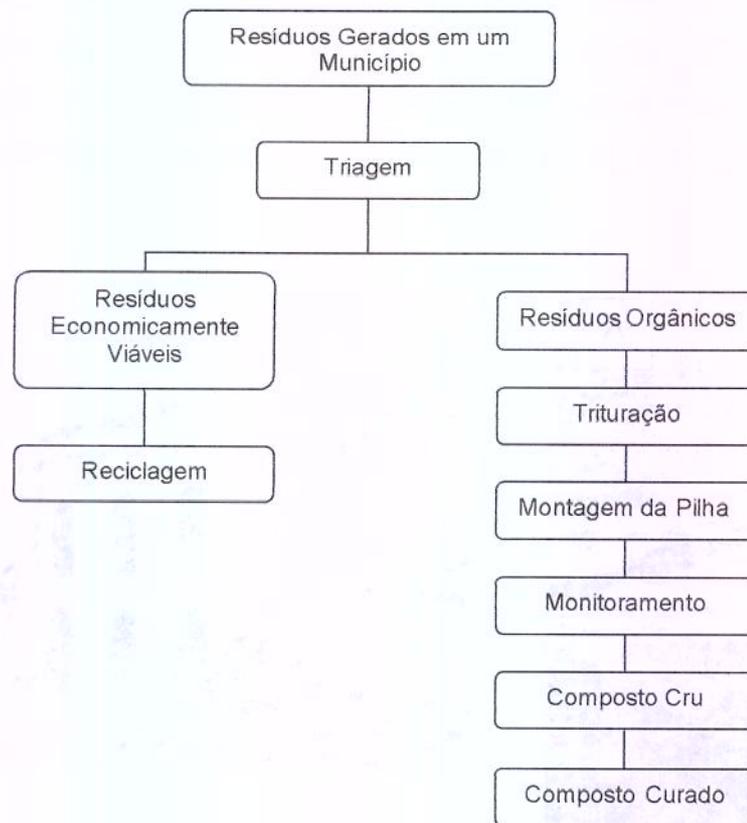
(Fonte: PRODAM/SP)

Figura 7: Incinerador Vergueiro (A) inaugurado em 1968, em operação até hoje; e, B) Incinerador do Araçá, na região de Sumaré, zona oeste de São Paulo, inaugurado em 1913 e desativado em 1940.

PINTO (1979) citado por FERRUCIO (1997) relata como vantagens da incineração a necessidade de uma área menor do que o aterro ou usina de compostagem, permite a recuperação de calor e metais e não é afetada por condições meteorológicas, que são a maior causa da formação do chorume nos aterros sanitários.

2.7.2. Triagem e compostagem

Este tipo de metodologia consiste na segregação dos diversos componentes do lixo. Os resíduos orgânicos, compostos por restos de podas de árvores, alimentos e folhas, são separados dos resíduos inertes ou de difícil biodegradação. Estes resíduos orgânicos seguem o proposto no fluxograma apresentado na Figura 8:



(Fonte: DIAS & VAZ, 1998)

Figura 8: Esquema de operação realizada para a compostagem de resíduos domésticos.

O monitoramento da compostagem consiste na verificação constante da temperatura. Nos primeiros 35 dias, as leiras de compostagem atingem de 50°C a 65°C, período chamado de fase de oxidação ou termofílica. Após este período, na fase de maturação, ocorre uma estabilização e conseqüente abaixamento da temperatura, para faixas de 30 a 45°C. Qualquer desajuste nestas temperaturas pode ser letal para o processo. Enquanto isso, a umidade é um dos parâmetros básicos da vida, e deve ser rigidamente controlada, uma vez que o processo de

compostagem é realizado por bactérias, fungos e actinomicetos, em sua grande maioria, muito dependentes de umidade e aeração adequados. O reviramento das leiras permite a entrada de oxigênio em camadas mais profundas de composto, e desfaz a condição anaeróbia, responsável pelo desprendimento de odores desagradáveis (DIAS & VAZ, 1998).

2.7.3. Aterros sanitários, controlados e lixões

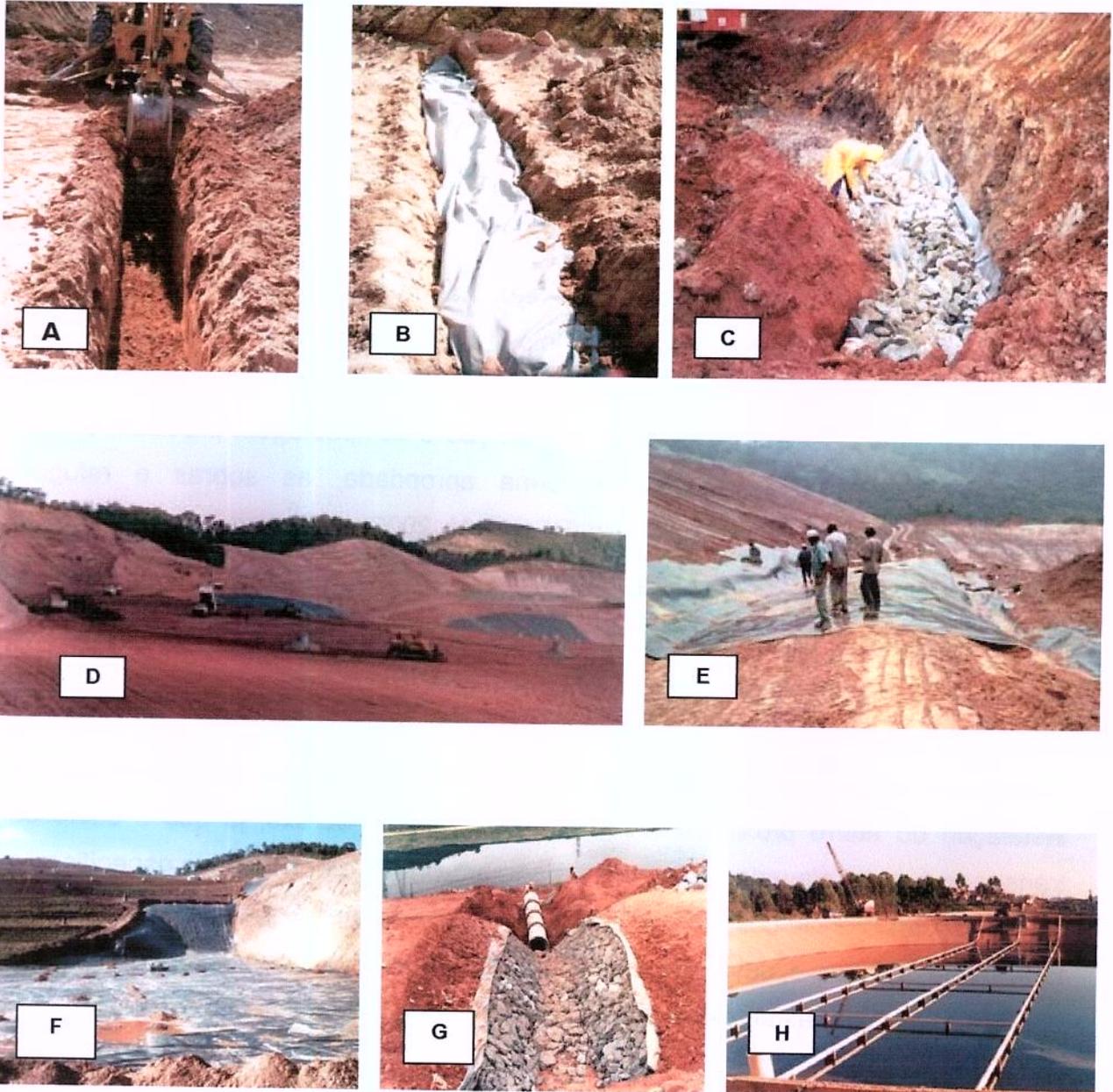
Os aterros são métodos de disposição final de lixo bastante empregados. A técnica consiste na utilização de princípios de engenharia para se espalhar e compactar o lixo no menor volume possível, recobrando-o com material inerte, terra. Mesmo as instalações de reciclagem, incineração e compostagem precisam de um local onde sejam descartados, de forma apropriada, as sobras e refugos provenientes do processamento do lixo (PRODAM, 2000).

Os maiores problemas para a boa implantação de aterros são: a) a possibilidade de se poluir o solo e cursos d'água superficiais ou subterrâneos; b) a necessidade de supervisão constante de modo a garantir a manutenção das mínimas condições ambientais e de salubridade; c) a geração de gases a partir da decomposição do lixo aterrado; d) a necessidade de terrenos disponíveis para a instalação do aterro próximos aos locais de produção de lixo, já que o custo de transporte é muito elevado na limpeza urbana em virtude do baixo peso específico do lixo; e, e) a resistência dos moradores nas cercanias do aterro que, muitas vezes, por não serem ouvidos e devidamente esclarecidos quanto ao problema, acabam por criar impasses desgastantes para a Administração Municipal (PRODAM, 2000).

O processo de elaboração e operação de um aterro sanitário é bastante conhecido, e pode ser visualizado na Figura 9.

Existem algumas poucas, mas importantes diferenças entre o que vem a ser um aterro sanitário, um aterro controlado e um lixão. Aterro sanitário é um processo utilizado para a disposição de resíduos sólidos no solo, particularmente, lixo domiciliar que fundamentado em "critérios de engenharia e normas operacionais

específicas, permite o confinamento seguro em termos de controle de poluição ambiental e proteção à saúde pública” (PRODAM, 2000).



(Fonte: PRODAM, 2000)

Figura 9: Implantação de um aterro sanitário. A) Identificação do lençol freático e nascentes da região, B e C) Drenagem das nascentes, D) Terraplanagem para desmatamento e regularização da área, E e F) Camada de regularização e instalação da manta, G) Drenos para coleta do líquido percolado (chorume); e, H) Acumulação do chorume para tratamento.

O lixão caracteriza-se pela disposição inadequada de resíduos sólidos, por simples descarga sobre o solo, sem medidas de proteção ao ambiente. Recebe também o nome de descarga à céu aberto. Já os aterros controlados preocupam-se com a minimização dos impactos ambientais. Utiliza-se dos mesmos princípios de engenharia dos aterros sanitários, mas não dispõe de impermeabilização de base e nem drenos para o chorume, o que acarreta contaminações de águas subterrâneas, do ar e das águas superficiais, controlando somente os vetores.

2.8 GERAÇÃO DE CHORUME

O lixo representa um sério problema ambiental e pode provocar efeitos negativos devido a aspectos físicos (no caso das enchentes, onde se acumula em canais de drenagem da água, causando inundações), aspectos químicos (a queima do lixo em plantas de incineração pode levar à formação de gases poluentes e compostos químicos nocivos à saúde); e agentes biológicos (pois quando o lixo é mal acondicionado pode atrair ratos e outros animais transmissores de doenças).

Segundo FERREIRA (1999), a definição de chorume é a seguinte: **Chorume**. **S. m. 1.** Banha, gordura, pingue: “e os olhos, os olhos como grandes pingos de chorume amarelo sobrenadando, sobressaindo, trementes como uma geléia”. (João Guimarães Rosa / Corpo de Baile / II, p.531). **2.** Fig. Abundância, opulência. Uma definição bastante romântica, tendo em vista todos os riscos decorrentes do contato do homem com o chorume. Do ponto de vista ambiental, o chorume pode ser definido como a fase líquida da massa de lixo aterrada que lixivia através desta, removendo materiais dissolvidos ou suspensos (Figura 10). Na maioria dos aterros sanitários, o chorume é composto basicamente pelo líquido que entra na massa aterrada de lixo, advindo de fontes externas, tais como sistemas de drenagem superficial, chuva, lençol freático, nascentes e aqueles resultantes da decomposição do lixo (HAMADA, 1998).

Devido à presença de diferentes tipos de materiais, o chorume vai se apresentar de formas variadas entre diversos lixões e aterros, conservando assim sua característica peculiar de ser uma matriz totalmente diferenciada em cada lugar que se forma.

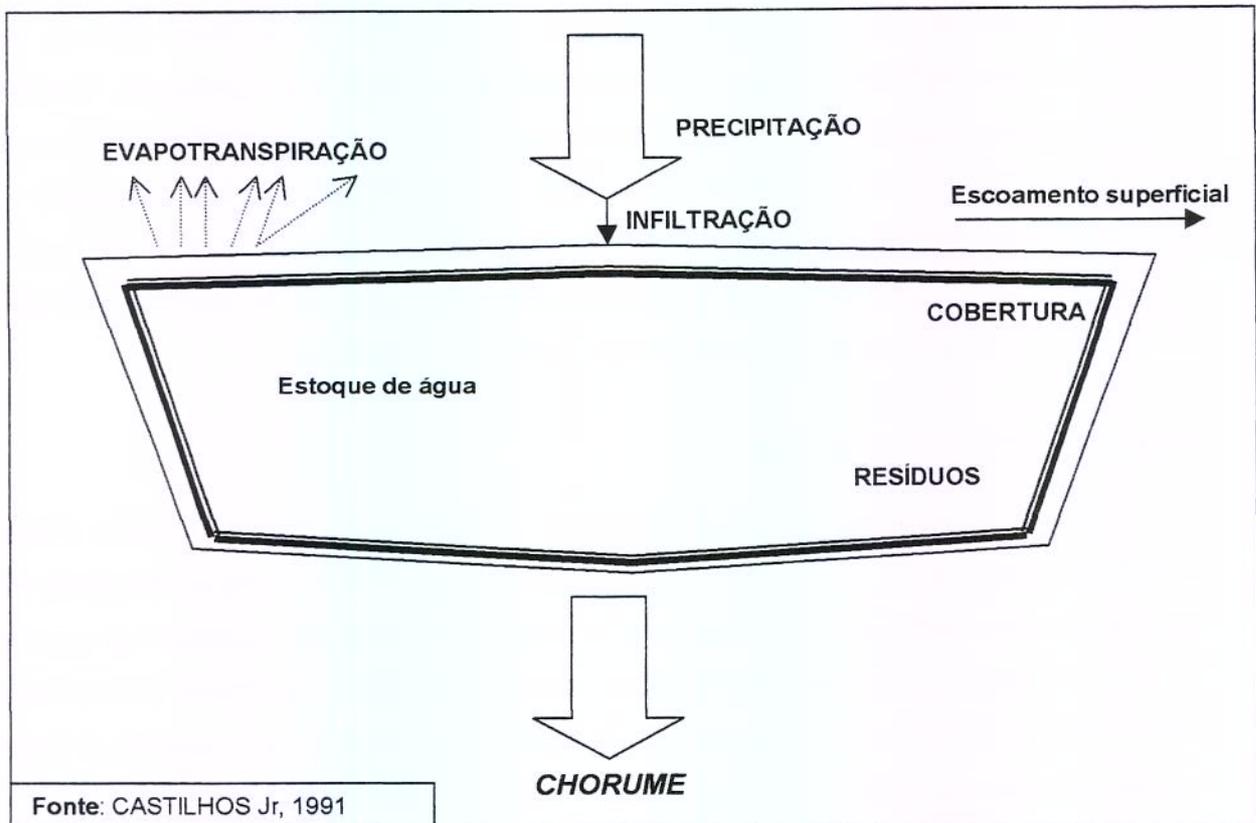


Figura 10: Esquema da formação do chorume em aterros sanitários.

O chorume é gerado por líquidos contidos nos resíduos urbanos assim que são introduzidos no aterro e é aumentado pela água das chuvas, ou ainda, pela neve em derretimento, nos países de inverno rigoroso e antes que seja feita a cobertura final da massa de resíduos. O chorume, como substância química, carrega os componentes do resíduo sólido enquanto o lixivia. Dessa forma, não existe um chorume “típico”, e suas características serão as mesmas do tipo de resíduo armazenado (KOERNER & SOONG, 2000).

Atualmente, um dos maiores problemas associados ao lixo é o tratamento deste líquido lixiviado, ou chorume, produzido nos aterros. Na cidade de São Paulo, considerando os processos já conhecidos, a Prefeitura Municipal implantou e experimentou quase todas as técnicas disponíveis para o tratamento do chorume: lagoas de estabilização, aeradores de lagoa, construiu uma usina piloto para tratamento pelo método biológico, testou a osmose reversa, porém a legislação ambiental acaba inviabilizando os sistemas devido à relação custo / benefício. No momento os aterros possuem lagoas de estabilização que procuram dar um pré-

tratamento aeróbio, mas como a estabilização demanda tempo e a vazão é contínua, isso requer áreas de lagoas que nos aterros acabam sendo escassas. A opção é o transporte de chorume para as estações de tratamento de esgoto da SABESP que o dilui no esgoto que está recebendo tratamento (PRODAM, 2000).

Segundo PACHECO E MATOS (2000), DENT & KNIGHT (1998), e MARINHO (1998), os cemitérios também podem ser fonte geradora de chorume, causador de impactos ambientais. A localização e operação inadequadas de necrópoles em meios urbanos podem provocar a contaminação de mananciais hídricos por microrganismos que proliferam no processo de decomposição dos corpos. Estudos de investigação dos cemitérios Vila Nova Cachoeirinha e Vila Formosa, em São Paulo, mostraram que o aquífero livre encontra-se contaminado por microrganismos. Em alguns locais, o nível freático encontra-se próximo da superfície ($\cong 0,50\text{m}$), fazendo com que alguns corpos fiquem imersos nas águas subterrâneas, propiciando a saponificação dos mesmos.

A polêmica em torno da possível contaminação que os cemitérios causam ao ambiente fez com que a Promotoria de Defesa do Meio Ambiente voltasse a fiscalizar os cemitérios de Curitiba e região metropolitana. A intenção é avaliar se eles se enquadram nas exigências de preservação ambiental que prevê a instalação de poços de monitoramento de águas, além de drenagem e de coleta do lixo. A questão é tão grave que há cerca de um ano a Promotoria já havia notificado vários cemitérios localizados próximos das margens de rios que se encontravam com túmulos mal conservados e até abertos expondo cadáveres e com vazamento de chorume para o lençol freático. Segundo o cientista americano Payal Sampat, do World-Watch Institute, 97% da água doce do mundo está armazenada em aquíferos freáticos. A taxa de recarga dos aquíferos é muito lenta em comparação com a das águas superficiais, o tempo médio de reciclagem dos lençóis freáticos é de 1.400 anos, contra apenas 20 dias para as águas dos rios (FOLHA DO MEIO AMBIENTE, internet).

2.9. PROCESSOS TECNOLÓGICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE ÁREAS DEGRADADAS POR RESÍDUOS SÓLIDOS

2.9.1. Remediação

LIMA (1991) cita que a remediação de um lixão compreende os processos que visam reduzir, o máximo possível, os impactos negativos causados pela disposição inadequada do lixo urbano no solo, considerando-se a decisão de terminar a operação no local.

A técnica de remediação a ser empregada em um sítio contaminado depende fortemente da natureza, concentrações e estado físico dos poluentes presentes, assim como do tipo de solo e aspectos específicos do sítio. Os poluentes podem ser subdivididos em dois grupos: metais pesados e poluentes orgânicos, podendo se apresentar como partículas separadas no líquido, adsorvidos nas partículas do solo, formando um filme em torno das partículas do solo ou estarem agregadas a substâncias orgânicas contidas no mesmo. No tocante à remediação, os poluentes podem ser removidos do solo e do sítio de acordo com quatro diferentes princípios: separação molecular, separação de fases, destruição química e biodegradação. Todas as técnicas fazem uso das diferenças nas propriedades específicas entre poluentes (ou partículas poluídas). As propriedades dos poluentes nas quais uma técnica de remediação pode ser baseada, incluem: volatilidade, solubilidade em água ou solvente orgânico, instabilidade química/térmica, biodegradabilidade, propriedades magnéticas ou elétricas, comportamento absorvente/adsorvente, propriedades superficiais e tamanho, forma ou densidade das partículas poluentes (RULKENS et al. 1998).

2.9.1.1. Tecnologias de remediação

A Environmental Protection Agency – Agência de Proteção do Meio Ambiente, (EPA, 1990) criada pelo governo dos Estados Unidos para monitorar os processos de poluição do meio ambiente, classifica as tecnologias de remediação em 6 grandes grupos, conforme a Tabela 4:

Tabela 4: Vários tipos de remediação utilizados na descontaminação de poluentes e de locais contaminados.

Classificação dos Processos	Descrição
Tratamento térmico	<ul style="list-style-type: none"> - incinerador de leito fluidizado - incinerador de fluido rotativo - pirólise - desgaseificação - oxidação catalítica
Extração	<ul style="list-style-type: none"> - lavagem do solo com água - lavagem com produtos químicos - extração de vapor de solo com ar - extração de vapor de solo com vapor d'água - dessorção de compostos voláteis da água com ar, "air stripping" - dessorção de compostos voláteis da água com vapor d'água, "steam stripping"
Processos químicos	<ul style="list-style-type: none"> - oxidação - redução - descloração com glicolato - ozonização
Estabilização/solidificação	<ul style="list-style-type: none"> - polimerização - microencapsulamento com termoplásticos - sorção - vitrificação
Contenção	<ul style="list-style-type: none"> - cobertura superficial - cobertura sub-superficial - barreiras verticais - métodos hidráulicos
Biorremediação	<ul style="list-style-type: none"> - aeróbio - anaeróbio

(Fonte: EPA - Environmental Protection Agency, 1990)

Com o passar dos anos, as técnicas foram sendo aprimoradas e substituídas por processos menos agressivos ao ambiente. A biodegradação ou biorremediação é um processo bastante utilizado atualmente, ecologicamente correto e ainda bastante inexplorado.

2.9.2. BIORREMEDIAÇÃO

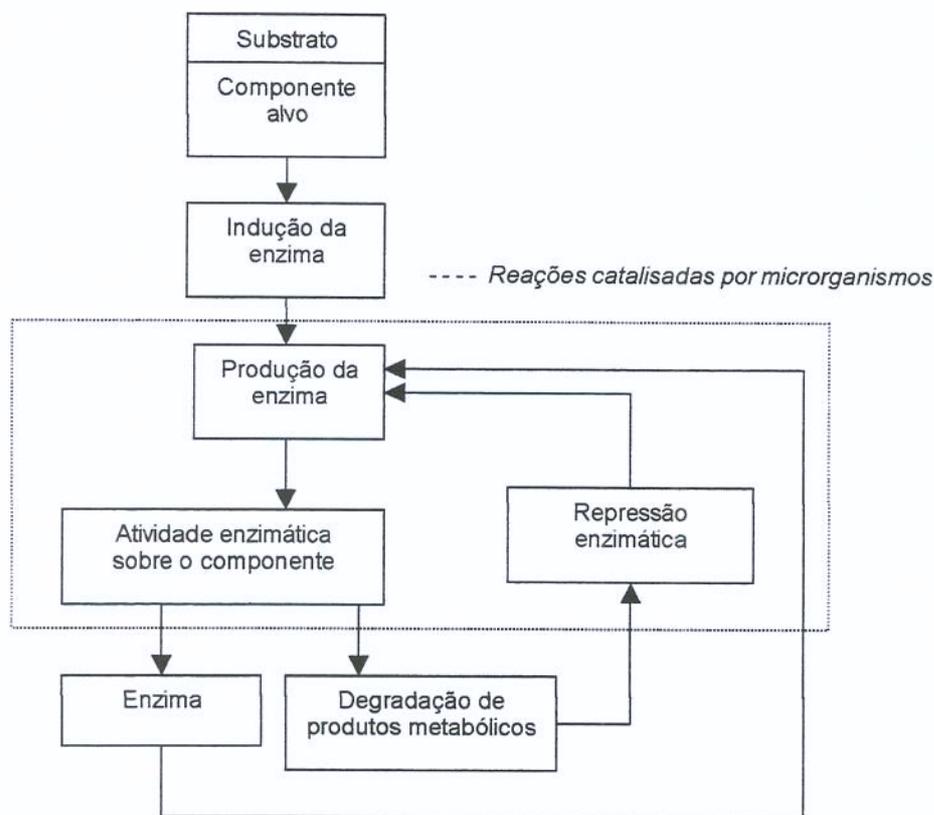
Os problemas ambientais são decorrentes, principalmente, do grande avanço tecnológico e do crescimento populacional, sendo a contaminação do solo um dos grandes problemas da sociedade moderna. Segundo dados de 1991, no Brasil, 99% dos resíduos sólidos são dispostos no solo, 0,9% são compostados e 0,1%

incinerados, sendo que em muitos municípios a disposição é realizada a céu aberto (IBGE, 2001). Devido a grande problemática existente com a contaminação dos solos (com possível contaminação de águas subterrâneas), foram desenvolvidos vários métodos de remediação dos mesmos (como descrito anteriormente na Tabela 4), sendo a biorremediação uma reconhecida alternativa para este propósito.

A mineralização ou completa biodegradação de uma molécula orgânica em água ou solos contaminados quase sempre resulta de atividade microbiana. Poucos mecanismos abióticos de importância na natureza conseguem converter compostos com algum grau de complexidade como a lignina e poluentes em produtos inorgânicos. Quando convertem o substrato orgânico em produtos inorgânicos, as populações responsáveis fazem uso de alguns dos carbonos do substrato e transformam-nos em constituintes de organelas celulares. Ao mesmo tempo, energia é liberada e as populações crescem em número e biomassa uma vez que assimilam o carbono e adquirem energia para a biossíntese. Como consequência, a mineralização é tipicamente um processo decorrente do crescimento microbiano (ALEXANDER, 1981).

A biorremediação utiliza um catalisador (enzima) que é fornecida por microrganismos para realizar a destruição de compostos tóxicos específicos (Figura 11) Este tratamento pode ocorrer no próprio local – “in situ”, ou pode-se remover a área contaminada para tratamento em outro local – “ex situ”. Nestes processos as principais reações são as de oxi-redução, pois fornecem energia para os microrganismos. Os microrganismos apresentam regras específicas para mineralização de compostos orgânicos, sua habilidade de degradar compostos orgânicos é um reflexo primário de sua versatilidade metabólica. No entanto, para ocorrer a biorremediação, é necessário adequar as condições para ação dos microrganismos. Em outras palavras, a biorremediação requer compreensão, otimização e controle biológico e químico do sistema (COOKSON, 1995).

Segundo COOKSON (1995), biorremediação é a aplicação de um processo com princípio biológico para o tratamento de águas subterrâneas, solo e lama contendo substâncias tóxicas.



(Fonte: COOKSON, J.T. 1995)

Figura 11: Princípios gerais do metabolismo microbiano em processos de biorremediação

A EPA (EPA – 1990) define biorremediação como um processo natural de limpeza de compostos tóxicos presentes no ambiente. Microrganismos presentes no solo ou águas subterrâneas se alimentam de certas substâncias tóxicas, como as encontradas nos derramamentos de petróleo e gasolina. Quando os microrganismos as digerem, estas substâncias são transformadas em água e gases inofensivos como o dióxido de carbono.

BITTAR (2000) explica que biorremediação consiste no uso de microrganismos naturais como bactérias, fungos e leveduras para degradar substâncias muitas vezes perigosas para os seres humanos, transformando-as em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade. Estes microrganismos, da mesma forma que seres humanos, metabolizam substâncias orgânicas, das quais obtêm nutrientes e energia. Depois de degradar os contaminantes (combustíveis, choro, solventes, petróleo), a população de microrganismos volta aos níveis normais, uma

vez que se esgota seus substratos para crescimento. Os processos biológicos de tratamento estão intrinsecamente relacionados ao metabolismo dos microrganismos presentes no reator (COOKSON, 1995). Em outras palavras, os biorreatores que operam sob condições de aeração selecionam o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, que através da respiração aeróbia oxidam as moléculas orgânicas. Nos biorreatores anaeróbios, por sua vez, são selecionados microrganismos capazes de crescer através do metabolismo fermentativo ou respiração anaeróbia. Portanto, a oxidação dos compostos orgânicos pode ocorrer por diferentes vias do metabolismo microbiano, possibilitando o desenvolvimento de vários aspectos da engenharia dos biorreatores e resultando em variantes dos processos tradicionais aeróbios e anaeróbios.

As tecnologias de biorremediação utilizadas para o chorume resultam em efeitos benéficos para o ambiente, porém, alguns fatores afetam a biodegradabilidade do chorume, tais como: a) composição do lixo doméstico, b) idade do aterro, c) tipo de operação do aterro, d) clima, e) condições hidrogeológicas, e) atividades químicas e biológicas no aterro, como temperatura, mistura dos componentes, grau de estabilização, etc (FARQUHAR, 1987). Devido a essas inconveniências, são propostos alguns métodos convencionais de tratamento.

Os três tipos mais conhecidos de tratamento de chorume são: a) retirada de amônia (air stripping), b) lagoas aeradas, c) colunas de carvão ativado; e, d) recirculação do chorume. A retirada de amônia do chorume pode se dar por processo físico, utilizando calor proveniente da queima do biogás gerado no próprio aterro, e sua remoção pode ser facilitada pelo ajuste do pH. Este tipo de tratamento é desejado quando se quer remover grandes quantidades de amônia, sem a retirada concomitante de metais pesados e outros nutrientes (ORGANICS, 1997).

As lagoas aeradas são simples de operar e removem DBO, DQO e amônia. Existem dois tipos de bactérias envolvidas no tratamento aeróbio do chorume. As heterotróficas e as autotróficas. As bactérias heterotróficas, além de consumirem os compostos orgânicos para produzirem CO_2 e água, também realizam uma reação entre o carbono e a amônia, em ambientes com ausência de oxigênio, produzindo nitrogênio gasoso, CO_2 e água. As espécies autotróficas irão converter a amônia em

nitrito (*Nitrosomonas*) e nitrito em nitrato (*Nitrobacter*), combinando-o com o oxigênio. Geralmente este tipo de tratamento é limitado pelo pouco espaço existente nos aterros. E, por fim, as colunas com carvão ativado são utilizadas primeiramente para a redução da DQO, diluindo o chorume, retirando elementos tóxicos em pequenas quantidades. Colunas de carvão são utilizadas também após o tratamento biológico, para uma limpeza final do chorume antes de devolvê-lo à natureza (ORGANICS, 1997).

Os sistemas biológicos de tratamento são operados sob condições aeróbias ou anaeróbias, dependendo da natureza dos resíduos orgânicos a serem degradados, da dimensão dos reatores, além de outros requerimentos específicos. Além disso, nos processos biológicos que ocorrem dentro dos sistemas é possível observar mais de um metabolismo microbiano ativo, como pode ser observado nos Lodos Ativados, pela existência da respiração aeróbia e nitrificação por diferentes espécies bacterianas (VAZOLLER et al., 1989).

Os sistemas biológicos mais comumente utilizados como exemplo dos processos aeróbios são conhecidos como Lodos Ativados. No entanto, sua descrição microbiana é bastante semelhante para outros sistemas, como os filtros biológicos, as lagoas aeradas e os valos de oxidação. A característica principal da massa celular produzida nos Lodos Ativados é a formação de aglomerados bacterianos (flocos), que possibilitam a separação das células floculadas do meio líquido no tanque de aeração. Nas estações de tratamento, a floculação do lodo é consequência direta da operação do reator, que promove condições de estresse nutricional, conduzindo a menor atividade de parte das células no sistema, ou induzindo o metabolismo endógeno celular. A baixa atividade das bactérias favorece a floculação no reator, bem como a auto-oxidação das células, o que em certo ponto auxilia na diminuição da massa celular (COOKSON, 1995).

Ainda segundo COOKSON (1995), os fungos não são comuns aos sistemas de Lodos Ativados, mas quando presentes, pertencem ao grupo dos Deuteromicetos (fungos imperfeitos). No entanto, podem predominar quando o tratamento de águas residuárias de origem industrial, ou do chorume, resultam em valores extremos de pH no meio, ou limita a disponibilidade de fontes nitrogenadas.

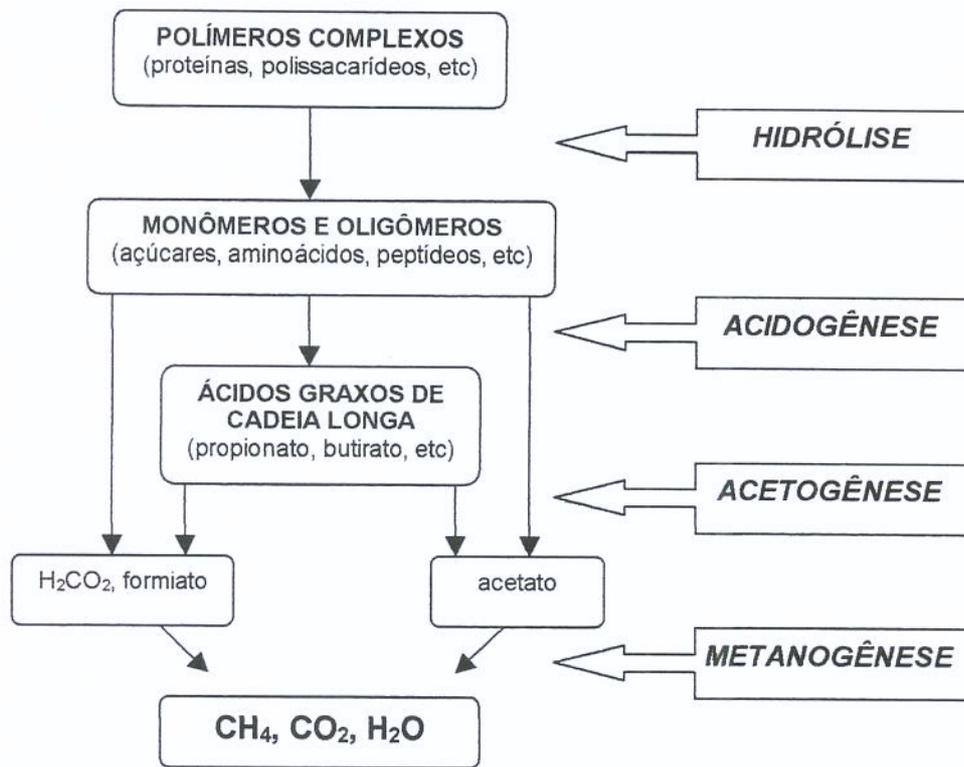
Os microrganismos mais facilmente encontrados em lodos ativados estão representados na Tabela 5:

Tabela 5: Alguns exemplos de microrganismos presentes nos sistemas de lodos ativados.

Tipos de Microrganismos	Espécies
Bactérias heterótrofas	<i>Pseudomonas sp</i> , <i>Zooglea ramigera</i> , <i>Achromobacter sp</i> , <i>Flavobacterium sp</i> , <i>Bdellovibrio sp</i> , <i>Mycobacterium sp</i> , <i>Alcaligenes sp</i> , <i>Arthrobacter sp</i> e <i>Citromonas sp</i> .
Bactérias filamentosas	<i>Sphaerotillus natans</i> , <i>Beggiatoa sp</i> , <i>Thiothrix</i> , <i>Leucothrix sp</i> , <i>Microthrix parvicella</i> , <i>Nocardia sp</i> , <i>Nostocoida limicola</i> , <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> e <i>Flexibacter sp</i>
Bactérias nitrificantes	<i>Nitrobacter sp</i> e <i>Nitrosomonas sp</i> .
Fungos	<i>Aspergillus sp</i> , <i>Penicillium sp</i> , <i>Fusarium sp</i> e <i>Geotrichum sp</i> .
Protozoários	<i>Amebas</i> , <i>Arcella discóides</i> , <i>Aspidisca costata</i> , <i>Trachelophyllum sp</i> , <i>Paramecium sp</i> , <i>Didinium sp</i> , <i>Chilodenella sp</i> , <i>Spiromonas sp</i> , <i>Bodo sp</i> , <i>Euglena sp</i> , <i>Monas sp</i> , <i>Cercobodo sp</i> .

(Fonte: VAZOLLER et al., 1989 e JENKINS et al., 1993).

Já nos processos anaeróbios ou, nos sistemas de biodigestão anaeróbia, a degradação da matéria orgânica envolve a atuação de microrganismos procarióticos anaeróbios facultativos e obrigatórios, cujas espécies pertencem ao grupo de bactérias hidrolíticas fermentativas, acetogênicas produtoras de hidrogênio e metanogênicas (Figura 12). A bioconversão da matéria orgânica poluente com produção de metano requer a cooperação entre culturas bacterianas. Na atividade microbiana anaeróbia em biodigestores, como também em habitats naturais com formação de metano (sedimentos aquáticos, sistema gastrintestinal de animais superiores, pântanos, etc), o que se observa é a ocorrência da oxidação de compostos complexos, resultando nos precursores do metano, acetato e hidrogênio.



(Fonte: VAZOLLER et al., 1989)

Figura 12: Esquema que representa o fluxo de carbono durante a decomposição anaeróbica da matéria orgânica complexa a metano.

2.10. ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DO CHORUME

ROBINSON & GRANTHAM (1988) operaram um dos primeiros experimentos “on site” de tratamento aeróbico de chorume. Uma planta piloto de tratamento de líquidos percolados foi construída no distrito de Montgomery, Inglaterra. A planta foi projetada por uma empresa particular – Aspinwall & Co , e colheu dados altamente positivos tanto no aspecto técnico quanto no econômico, em três anos de operação. A estação de tratamento era centrada em uma lagoa aerada com um longo período de retenção (maior que 10 dias); e um sistema de controle que podia ser acompanhado de maneira quase automática, com atenção mínima do pessoal técnico da estação. Durante os primeiros 30 meses de operação contínua da estação, incluindo dois verões e três invernos, a demanda bioquímica de oxigênio do chorume antes do tratamento excedia 10.000 mg/L, e após o tratamento, raramente, atingiu um valor maior que 50 mg/L. Quanto à DQO, cerca de 97% de redução foi

conseguida, também com grande redução das quantidades de amônia, manganês, ferro e zinco.

HWANG et al., (1993), demonstraram a atividade de biodegradação em água subterrânea. As análises revelaram que a água subterrânea obtida de um local contaminado por chorume proveniente de um aterro sanitário da Geórgia continha altas dosagens de tolueno (6,9 mg/L), xileno (2,3 mg/L) e cloreto de metila, além de outros como o naftaleno (150 µg/L), formaldeído (41 mg/L), benzeno (15 mg/L) e clorofórmio (40 mg/L). Amostras desta água subterrânea foram transferidas para garrafas de vidro previamente lavadas tomando-se o cuidado de encher as garrafas por completo, para evitar ou minimizar a degaseificação de voláteis. Antes de se completar o volume, foi adicionado p-cresol marcado com C¹⁴. Durante o período de incubação, o número de bactérias presentes na amostra foi monitorado e verificou-se que este permanecia constante. O ¹⁴CO₂ formado foi coletado e a radioatividade foi medida com um contador de cintilografia ou espectrofotômetro de cintilação líquida. A degradação microbiana de p-cresol nas amostras controle e em amostras de água atingiu 0,1 e 0,01 µg/L h⁻¹, respectivamente.

DIAMADOPOULOS (1994) investigou a caracterização e o tratamento de chorume de aterro sanitário estabilizado por recirculação. O chorume obtido de resíduos sólidos dispostos recentemente no aterro foi tratado pela recirculação através de áreas com deposição de resíduos antigos. O efluente estabilizado formou uma lagoa no ponto mais baixo do aterro. Este chorume foi caracterizado, obtendo-se DQO de 1141 mg/L, valor médio de DBO₅ de 85 mg/L e razão DBO₅:N:P de 100/312/0,3. A razão DBO/DQO atingiu valor abaixo de 0,1, o que excluiu a possibilidade de tratamento biológico. Alguns métodos físico-químicos foram empregados no tratamento do chorume recirculado, tais como coagulação, adsorção em carvão ativado e "air stripping" de amônia. Após a coagulação com alumínio, atingiu-se o máximo de redução de DQO (35%) com dosagem de alumínio de 15 mmol/L. Nas provas de adsorção com carvão ativado a DQO diminuía à medida que se aumentava a concentração do carvão ativado. E, por fim, nos experimentos com "air stripping" de amônia, 95% de remoção de amônia foi atingida, ainda que o alto nível de remoção tenha exigido 24 horas de experimentação.

O uso de condicionamento de chorume e recirculação “in situ” é um processo muito utilizado e tem transformado os aterros sanitários convencionais em sistemas de biorreatores controláveis. Estes sistemas são operados para promover o sinergismo do consórcio microbiano existente naturalmente no chorume e controlado para acelerar as fases seqüenciais de estabilização dos resíduos. As principais transformações em biorreatores de chorume são similares àquelas que ocorrem em outros processos anaeróbios, mas são mais evidentes por causa de suas zonas reacionais mais controladas e contato maior, particularmente quando há recirculação do chorume (POHLAND & KIM, 1999).

Uma vez que os aterros sanitários ocupam, freqüentemente, uma área de 10 a 25 hectares, estes apresentam grande capacidade de armazenamento de líquidos, o que favorece o sistema de recirculação. Desta forma, espera-se que os engenheiros responsáveis por aterros sanitários nos vários países do mundo, utilizem-se da recirculação do chorume pelo menos quando sua geração estiver alta em decorrência de época de chuvas e derretimento de neve (KOERNER & SOONG, 2000).

LEE et al. (1986), POHLAND & HARPER (1987), OTIENO (1994) e REINHART & TOWNSEND (1998), citados por JONES-LEE & LEE (2000) discutem que o chorume recirculado tem sido utilizado por muitos anos como um meio de disposição final do chorume nos aterros municipais e também na tentativa de melhorar a “fermentação” da fração orgânica nos resíduos sólidos municipais. Estes pesquisadores recomendam que a recirculação do chorume seja uma prática diária, visando aumentar as taxas de estabilização do chorume, diminuindo sua carga orgânica e os riscos para a saúde humana.

Cientistas britânicos do meio-ambiente estão experimentando um novo método de destoxificação do chorume através de biorreatores com imobilização de bactérias que convertem a amônia ao nitrogênio gasoso. WHEATLEY et al. (2000) estão trabalhando com três gêneros de bactérias, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* e *Pseudomonas*. O primeiro gênero oxida a amônia até nitrito; o segundo oxida nitrito a nitrato e o último converte o nitrato a nitrogênio gasoso. O processo todo é anaeróbio. O primeiro grande obstáculo é fornecer os nutrientes necessários ao bom

desenvolvimento das bactérias. Uma vez encontradas as concentrações ótimas de nutrientes, foram construídos 4 reatores em seqüência, com 5 m³ cada, no aterro sanitário de Nuneaton, Reino Unido.

No Aterro Sanitário de São Giácomo, em Caxias do Sul/RS, os líquidos percolados são tratados utilizando-se um filtro biológico anaeróbio associado à técnica de recirculação de líquidos para o interior das células de aterramento. A adoção desse procedimento tem o objetivo de reduzir a concentração de matéria orgânica degradável por meio de atividade biológica desenvolvida no interior da célula de aterramento. Paralelamente, a recirculação dos líquidos destina-se ao favorecimento da manutenção de condições ambientais (pH, umidade e nutrientes) adequadas ao desenvolvimento das espécies anaeróbias presentes no interior das células (PESSIN et al., 1998). A recirculação do chorume favorece os processos físicos, químicos e físico-químicos associados à neutralização, adsorção e precipitação das espécies inorgânicas presentes nos líquidos. Embora de difícil execução e requerendo cuidados especiais para sua realização, a recirculação apresenta-se de forma benéfica ao sistema, uma vez que auxilia na redução de carga orgânica do percolado, e conseqüentemente, viabiliza a etapa posterior de tratamento (físico-químico) dos líquidos percolados.

BIDONE et al. (1998) estudaram, em escala laboratorial, o tratamento de lixiviado de aterro sanitário antigo, utilizando filtros biológicos ou percoladores precedidos de pré-filtros. O meio suporte dos pré-filtros foi constituído de brita granítica, anéis PALL 1" e cacos de tijolos maciços com granulometria semelhante à da brita granítica. Nos filtros percoladores utilizou-se areia regular, carvão ativado, argila nodulizada, brita granítica e aparas de couro curtido "wet blue". As taxas de aplicação de lixiviado foram de 28,5 cm/dia para os pré-filtros e 16 cm/dia para os filtros percoladores. O sistema foi operado com esgoto bruto durante os 45 dias iniciais da experimentação, objetivando-se a formação prévia do biofilme ativo; após este período, o sistema recebeu lixiviado proveniente do Aterro Sanitário Zona Norte, de Porto Alegre/RS, por mais 120 dias. Os resultados obtidos mostraram que os pré-filtros tiveram pequena interferência no processo; já, os filtros percoladores mostraram altas eficiências na remoção da carga orgânica e nitrogênio amoniacal,

com significativos níveis de nitrificação, notadamente nos filtros de carvão ativado e aparas de couro curtido “wet blue”, o que recomenda estas últimas como excelente alternativa de baixo custo para meio suporte de filtros.

A princípio, todos os resíduos, quer sejam de origem animal ou vegetal, são bioestabilizados anaerobiamente. No caso dos resíduos de origem vegetal, somente os componentes contendo lignocelulose não podem ser estabilizados anaerobiamente, ou são estabilizados microbiologicamente com muita dificuldade (BAADER,1991). LEITE et al. (1998) fizeram uma pesquisa apresentando modelos de bioestabilização anaeróbia da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos e da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos inoculada com lodo de esgoto sanitário. Os modelos foram estabelecidos tomando-se como referência a DQO, pH, ácidos graxos voláteis (no chorume) e percentual e volume de CH₄ (no biogás). A fração putrescível dos resíduos sólidos urbanos apresentou tempo de estabilização anaeróbia superior a 600 dias. Como o parâmetro de composição físico-química do percolado foi padronizado, atribui-se ao inóculo a redução no tempo de bioestabilização da matéria orgânica, favorecida possivelmente por uma relação mais equilibrada de nutrientes e por um ecossistema mais favorável ao desenvolvimento das atividades metanogênicas.

KUPFERLE et al. (1995) desenvolveram um sistema de pré-tratamento anaeróbio para chorume contaminado por resíduos perigosos. O sistema foi projetado para minimizar muitos dos problemas associados com o tratamento aeróbio convencional ou de outros tipos de resíduos contendo compostos perigosos diluídos. Neste estudo utilizou-se um estágio que consistia de um leito de carvão ativado granular com biomassa anaeróbia imobilizada. Dois sistemas em escala laboratorial, com vazão de 87 L/dia, foram operados por 332 dias; um tratando o efluente primário e outro tratando o efluente primário misturado com 5% de chorume e 14 compostos orgânicos perigosos. Neste último sistema, cinco dos seis compostos aromáticos adicionados foram removidos, atingindo taxa de remoção de 95%, e o sexto (fenol) apresentou queda de 85%. A remoção de compostos alifáticos clorados atingiu 52% para cloreto de metila e 95% para tricloroetileno. A remoção de ftalatos atingiu aproximadamente 60% e cetonas, 24%. A demanda química de

oxigênio caiu cerca de 40 a 50% em todo o ano do experimento. Em todo o trabalho não houve preocupação em se determinar os microrganismos presentes no sistema.

A digestão anaeróbia de chorume juntamente com lodo digerido de tanques sépticos foi estudada por LIN et al. (1999) em reator de mistura completa. Este lodo foi misturado ao chorume, nas proporções de 1:0, 1:1, 2:1 e 3:1., com base nos valores de demanda química de oxigênio nos digestores. Para cada digestor, os tempos de retenção de sólidos foram controlados a 20, 10 e 5 dias. A fração orgânica e o teor de sólidos voláteis foram reduzidos à média de 0,3 – 1,4 kg DQO/m³/dia a 1,79 – 3,7 kg DQO/m³/dia, respectivamente. A presença do lodo digerido melhorou o decréscimo da concentração de amônia no chorume em 40%. A produção de metano aumentou consideravelmente com o aumento da fração séptica em relação ao chorume.

Dando continuidade aos trabalhos, LIN et al. (2000) experimentaram uma co-digestão do chorume com lodo de tanques sépticos utilizando um reator anaeróbio de fluxo ascendente. O reator foi operado a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. O lodo e o chorume foram misturados nas proporções de 3:1, 2:1 e 1:1 com base nos valores de demanda química de oxigênio. Num tempo de retenção hidráulica de 1,5 dias e uma alimentação orgânica de 6,73 kg DQO/m³/dia (mistura na proporção 1:1), a eficiência de redução da DQO foi de 42,2%; da DQO solúvel, 58,1%, sólidos totais, 45,3%; sólidos voláteis, 68,2%; ácidos graxos voláteis, 73,4%; fósforo total, 44,3%; amônia, 47,8%; carboidratos, 53,7; e, proteínas, 44,4%. Com base nos valores obtidos pelo reator UASB, chegou-se à conclusão que este reator poderia ser empregado com êxito no tratamento de chorume misturado aos lodos de tanques sépticos.

Em Montevideu, foi desenvolvido um trabalho de remoção de matéria orgânica utilizando um sistema misto com um reator anaeróbio (UASB) e um aeróbio como pós-tratamento (RBC ou "rotating biological contactor"). A eficiência do reator UASB atingiu valor aproximado de 80% de redução da DQO enquanto o reator aeróbio atingiu valor de 72%. Durante os experimentos, mudanças ocorreram no chorume, levando a um aumento exagerado do pH. Na investigação da acumulação de metais dentro do reator UASB, alguns experimentos adicionais foram realizados. Como resultado, o reator operando com adição de fósforo apresentou diminuição no

acúmulo de sólidos e aumento de desempenho, provavelmente pela precipitação na entrada do reator ou complexação dos metais dentro do reator. O sistema (UASB + RBC) operou com eficiência de remoção de DQO de 94% (BORZACCONI et al., 1999).

OZTURK et al. (1999) estudaram o potencial de tratamento anaeróbio do chorume “novo” de um aterro sanitário de Istambul, utilizando um reator em escala laboratorial UASBR. O reator operou com uma concentração de DQO de 10.250 mg/L e tempo de retenção de 2,84 dias. A taxa de remoção atingiu o máximo de 94%, como no experimento realizado pelo grupo uruguaio.

NEDWELL & REINOLDS (1996) relataram seu trabalho de tratamento de chorume por digestão metanogênica e redutora de sulfato. O chorume foi tratado num sistema híbrido de reatores anaeróbios do tipo metanogênico e redutor de sulfato. Sob digestão metanogênica, a redução da DQO foi de 81 a 97%, dependendo da alimentação orgânica. No digestor com redução de sulfato, o sulfato foi convertido estequiometricamente em gás sulfídrico dissolvido, levando a mineralização da matéria orgânica. Concentrações de sulfato na amostra de 35, 105 e 175 mM resultaram em eficiência de remoção de sulfato da ordem de 92%, 52% e 35%, respectivamente. Ambos os digestores (metanogênico e redutor de sulfato) removeram completamente os 100 ppm de cobre, manganês, zinco e níquel adicionados às amostras, indicando que mesmo o reator metanogênico produziu suficiente quantidade de sulfeto para precipitar estes metais completamente.

BAE et al. (1999) aplicaram a tecnologia de radiação no chorume obtido do aterro sanitário de Kimpo para tratar as substâncias remanescentes após tratamento biológico com lodo ativado. O chorume foi analisado em termos de distribuição do peso molecular e substâncias húmicas, antes e após o processo do lodo ativado e da radiação. Quando o chorume bruto com DBO inicial de 1370 mg/L foi tratado pelo lodo ativado, houve remoção de 98% da DBO, com tempo de residência de 72 h. Porém, a biodegradabilidade do chorume, definida como razão DBO/DQO diminuiu de 1,3 para 0,1 devido à presença de matéria orgânica recalcitrante. O fracionamento da matéria orgânica usando um aparato de ultrafiltração revelou que compostos orgânicos com peso molecular acima de 30.000 D. foram os componentes mais

persistentes. Porém, estes compostos foram bastante reduzidos em presença da radiação, que só foi afetada pelo pH, o principal parâmetro.

WENZEL et al. (1999) construíram uma unidade piloto de tratamento de pequeno volume de chorume com alta força iônica através de processos de oxidação avançada, tais como: UV/O₃, UV/H₂O₂ e UV/O₃/H₂O₂. A unidade é equipada com uma coluna para dissolver o ozônio e um foto-reator de filme fino especialmente projetado, o qual capacita a degradação foto iniciada de compostos orgânicos de alta densidade ótica sem qualquer contato com a fonte de radiação. O chorume em estudo possuía alta concentração de compostos tóxicos como fenóis clorados, hidrocarbonetos poliaromáticos, bifenila policlorada, dioxinas e furanos. A aplicação de UV/O₃ provou ser uma técnica efetiva para o tratamento do chorume resultando em taxas de degradação de 100% para fenóis e hidrocarbonetos, 23-96% para bifenilas e, ao menos, 74% para dioxinas e furanos.

Como pode ser observado, várias técnicas de degradação são utilizadas para tratar o chorume, sendo que a degradação microbiana é a técnica que mais cresce atualmente no meio científico.

2.10.1. Estudos cromatográficos

A cromatografia é um importante método para o estudo do resultado da degradação do chorume após tratamento por remediação química ou físico-química, bem como após processos biotecnológicos utilizando microrganismos.

Em 1999, BENFENATI et al. determinaram a constituição química de chorume industrial através da utilização de vários métodos químicos e físico-químicos, tais como: cromatografia gasosa - espectrometria de massa, cromatografia líquida – ressonância magnética nuclear e cromatografia líquida – espectrometria de massa. O estudo ressaltou a importância, nos dias de hoje, de se obter qualidade no estudo do chorume, uma vez que vários impactos ambientais podem decorrer deste tipo de resíduo. A cromatografia gasosa foi a melhor técnica para a determinação dos compostos voláteis termicamente estáveis, devido a sua eficiência de separação, sua

especificidade e sensibilidade de detecção. Este método só não apresentou bons resultados na determinação de compostos polares.

BRÁS et al., (2000) também se utilizaram da cromatografia gasosa na identificação de pesticidas organoclorados presentes no chorume.

HARMSSEN (1983), um dos pioneiros no estudo do chorume, também utilizava a cromatografia gasosa nos seus estudos. Daqueles tempos até hoje muita coisa mudou, mas a cromatografia continua sendo uma ferramenta de trabalho bastante utilizada na determinação de compostos em águas residuárias.

2.11. BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E COMPOSTOS DO CHORUME.

Vários são os microrganismos descritos na literatura que possuem a habilidade de degradar compostos poluentes e recalcitrantes encontrados no ambiente, sendo que os mais estudados são os fungos de decomposição branca, principalmente da espécie *Phanerochaete chrysosporium* (BUMPUS et al., 1985; HAMMEL et al., 1986). A habilidade do *Phanerochaete chrysosporium* em degradar poluentes é, evidentemente, conectada com sua capacidade de degradar a lignina, um polímero vegetal de ligações aleatórias de sub-unidades de fenilpropanos, principalmente, álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool cumarílico, que resistem à metabolização por diferentes microrganismos (MATHIAS et al., 1995). Por ser um polímero insolúvel, os passos iniciais da biodegradação devem ser extracelulares. A etapa final da mineralização da lignina, culminando com a liberação de CO₂ é realizada no interior das hifas fúngicas, portanto, as reações extracelulares devem “quebrar” a lignina em fragmentos pequenos capazes de se difundir através das hifas e cruzar as membranas celulares. Evidências químicas e fisiológicas mostram que a degradação da lignina, bem como a sua biossíntese são, predominantemente, oxidativas, embora reações de redução possam, também, participar desses processos (CHEN & CHANG, 1985).

Estes fungos, em geral, caracterizam-se por apresentar um sistema enzimático complexo formado por várias enzimas ligninolíticas responsáveis pela degradação da lignina presente na madeira, e estas enzimas seriam as principais

responsáveis pelo ataque oxidativo aos poluentes orgânicos, tais como os encontrados no chorume (LAMAR et al., 1990; LAMAR & DIETRICH, 1990).

2.11.1. Enzimas participantes da biodegradação de lignina e compostos poluentes do chorume

Sendo a lignina um polímero complexo, sua biodegradação requer interações entre enzimas, para que ocorra uma completa mineralização até CO₂ e H₂O (BONO et al., 1990). As diferenças estruturais e químicas no substrato não homogêneo de lignina conduzem a uma especialização na produção das enzimas ligninolíticas dos microrganismos capazes de degradá-las, que são classificados assim em cinco grupos (TUOR et al., 1995):

1. Fungos de decomposição branca que expressam Lignina-peroxidase (LiP), Manganês-peroxidase (MnP) e lacase. Este grupo contém os mais conhecidos fungos de decomposição branca *Coriolus versicolor*, *P. chrysosporium* e *Phlebia radiata*. O *P. chrysosporium* está neste grupo desde que a produção de lacase foi reportada (ANDER et al., 1980; ERIKSSON et al., 1983). Entretanto, este fungo não é considerado produtor de lacase. Todos colonizam madeiras decíduas, e somente *P. radiata* degrada coníferas.
2. Fungos de decomposição branca que produzem MnP e lacase, não secretam níveis detectáveis de LiP. São potentes degradadores de lignina. *Dichomitus squalens* e os fungos comestíveis *Lentinula edodes* e *Pleurotus spp.* pertencem a este grupo.
3. Fungos de decomposição branca que apresentam produção de LiP e outra fenol-oxidase. Lacase é a fenol-oxidase mais produzida, mas no caso do *Coriolus pruinosum* foi detectada a produção de MnP. Estes fungos crescem em madeiras duras. Excetuando-se *Phlebia tremellosus* que também degrada coníferas.
4. Quatro fungos de decomposição branca que secretam somente LiP. *Bjerkandera adusta*, *Daedaleopsis confragosa*, *Phallus impudicus* e *Polyporus varius*. São degradadores de madeiras duras.

5. O último grupo consiste de fungos que não estão completamente caracterizados. *Fomes lignosus* e *Trametes cingulata* são de decomposição branca, mas não foram detectados quaisquer das enzimas.

Aparentemente, os fungos de decomposição branca degradam a lignina por diversas combinações de peroxidases e oxidases. A degradação da lignina por fungos que secretam principalmente LiP envolve, provavelmente, diferentes vias e diferentes mediadores, oposto aos fungos que secretam MnP e lacase. Os fungos podem também expressar diferentes produções de enzimas em culturas agitadas e estacionárias (TUOR et al., 1995).

O grupo das enzimas fenol-oxidases inclui, principalmente, três tipos de enzimas: peroxidase, lacase e tirosinase. As peroxidases e lacases estão diretamente envolvidas na degradação da lignina e compostos com estruturas semelhantes, sendo produzidas extracelularmente, enquanto a tirosinase é produzida intracelularmente, não possuindo importante papel na degradação destes compostos (SZKLARZ et al., 1989).

As enzimas extracelulares envolvidas na degradação do polímero de lignina são lignina-peroxidase (LiP), manganês-peroxidase (MnP), como também lacase e enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (FIELD et al., 1993). Existem, ainda, microrganismos que degradam, preferencialmente, os carboidratos da madeira, sem portanto despolimerizar a lignina (BLANCHETTE, 1995).

2.11.1.1. Lignina-peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)

Anteriormente conhecida como ligninase, esta enzima é uma heme peroxidase com alto potencial redox e pH ótimo de atividade baixo. É capaz de oxidar anéis aromáticos metoxilados sem a presença de um grupo fenólico livre, gerando radicais catiônicos que podem reagir posteriormente por diferentes vias metabólicas, incluindo o rompimento da ligação $C_\alpha-C_\beta$, com conseqüente ruptura do anel aromático (BONNEN et al., 1994).

Esta enzima foi isolada por TIEN & KIRK (1983) e por GLENN et al. (1983), trabalhando independentemente. É uma glicoproteína, contendo 20-30% de açúcar, ferro como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica (HATAKKA, 1994; REDDY & D'SOUZA, 1994). A LiP é produzida por quase todos os fungos de decomposição branca. Juntamente com outras enzimas, a LiP é considerada a maior constituinte do sistema que degrada lignina em *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN et al., 1983; TIEN & KIRK, 1983). Sua massa molecular é de aproximadamente 38-43 KDa, apresentando ponto isoelétrico entre 3,2 - 4,0 e pH ótimo de atividade próximo a 3,0.

Diversas isoenzimas já foram isoladas do fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*, sendo que sua produção é regulada geneticamente em condições limitantes de nitrogênio e carbono. Sua produção ocorre durante o metabolismo secundário, em resposta à falta desses nutrientes. Na presença desses nutrientes ocorre completa repressão de sua síntese (REDDY, 1993; REDDY & D'SOUZA, 1994).

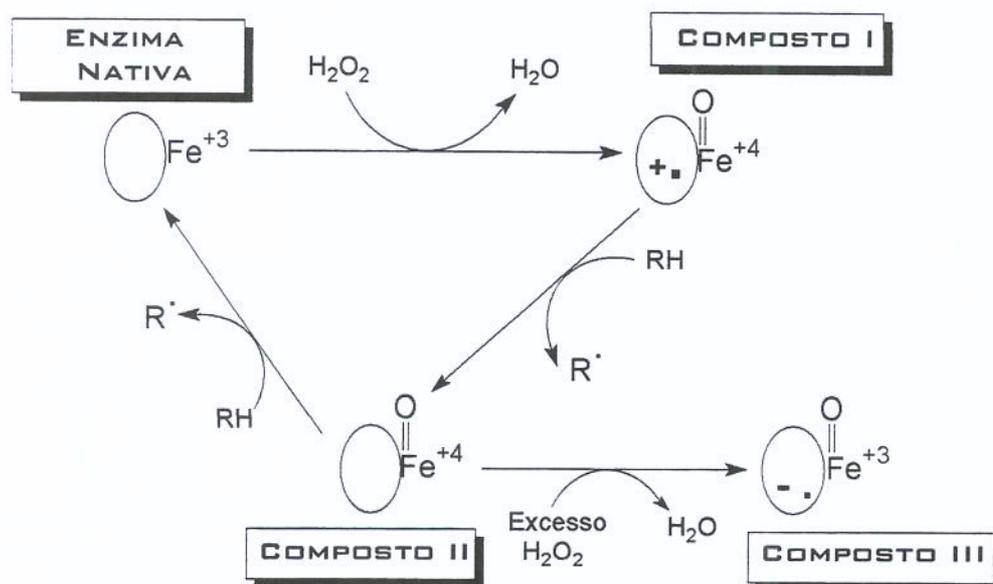
A LiP catalisa uma grande variedade de compostos modelos de lignina e poluentes aromáticos, na presença de H₂O₂ (BUSWELL & ODIER, 1987; HIGUCHI, 1990; VALLI & GOLD, 1991). Essas reações incluem oxidação do álcool benzílico, quebra das cadeias laterais, reações de abertura de anéis aromáticos, demetilações e desclorações oxidativas. Todas essas reações são compatíveis com o mecanismo envolvido na degradação não específica desta enzima (RENGANATHAN & GOLD, 1986; KIRK & FARREL, 1987).

O mecanismo de atuação da LiP se dá através de oxidação pela abstração de um elétron da molécula de lignina e compostos semelhantes, resultando na formação de radicais catiônicos arila (Figura 13). Posteriormente, através de uma série de reações não enzimáticas os radicais dão origem a uma variedade de produtos finais (HIGUCHI, 1990; REDDY & D'SOUZA, 1994).

O álcool veratrílico, um metabólito produzido por diversos fungos de decomposição branca sob condições ligninolíticas, desempenha papel importante no ciclo catalítico desta enzima. Ele atua como agente redutor da enzima e

aparentemente, a protege da inativação por excesso de H_2O_2 (TIEN & KIRK, 1983; WARIISHI & GOLD, 1990; FIELD et al., 1993).

Atualmente, existe um interesse crescente no estudo desta enzima e também dos fungos que a produzem, devido ao seu potencial de aplicação industrial em processos de descontaminação de ambientes (ERIKSSON, 1990).



RH representa o substrato da enzima em sua forma reduzida, R^\bullet representa o substrato da enzima em sua forma radicalar oxidada.

Figura 13: Ciclo catalítico da lignina-peroxidase. (GOLD et al., 1989).

2.11.1.2. Manganês-peroxidase (MnP; EC 1.11.1.7)

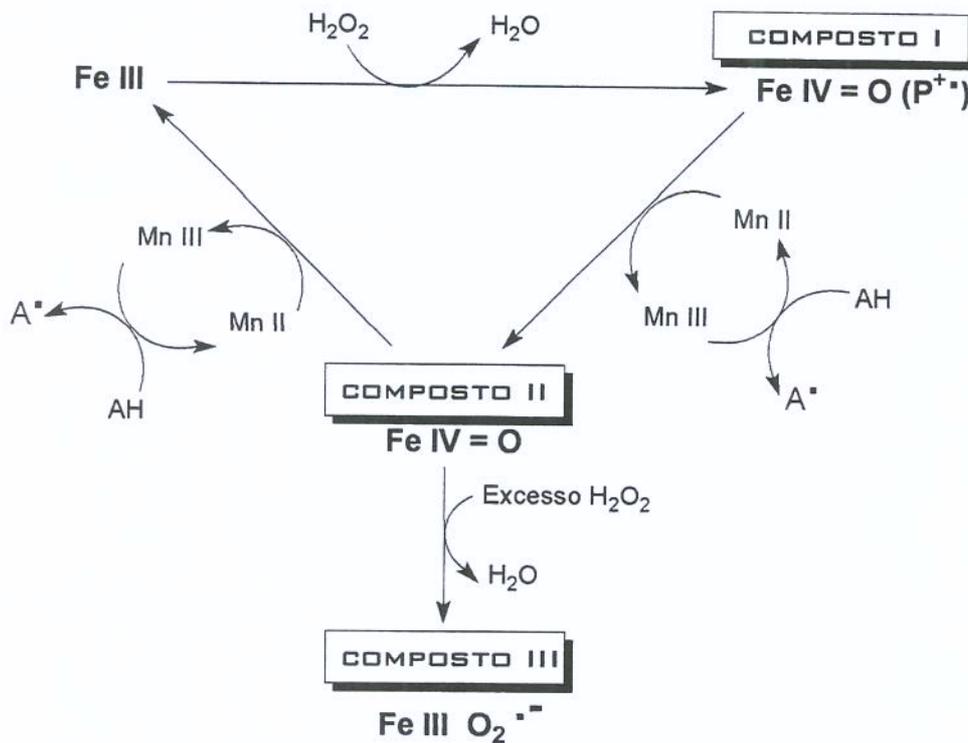
Esta enzima é outra heme peroxidase, porém com alta especificidade por Mn (II) como seu substrato redutor (GLENN & GOLD, 1985). O íon Mn (III) forma um complexo com ácidos orgânicos que se difunde oxidando outros materiais. O potencial redox desta enzima é menor que o da lignina peroxidase e, conseqüentemente, pode não oxidar modelos de lignina não-fenólicos. Os substratos fenólicos são oxidados a radicais fenóxi, os quais podem reagir posteriormente por desmetilação, clivagem da ligação alquil-fenil, clivagem da ligação $C_\alpha-C_\beta$, ou oxidação do C_α (REID, 1995). O peróxido de hidrogênio produzido pode ser utilizado

como co-substrato para a enzima lignina peroxidase ou outras peroxidases oxidando compostos modelo de lignina (PASZCZYNSKI et al., 1985).

A MnP foi isolada pela primeira vez de culturas de *P.chrysosporium* (KUWAHARA et al., 1984). É uma glicoproteína com ferro como grupo prostético, depende de H₂O₂ para sua atividade, seu ponto isoelétrico é de aproximadamente 4.2-4.9 e seu peso molecular entre 45-47 KDa, sendo o ciclo catalítico semelhante ao da LiP (GLENN & GOLD, 1985; PASZCZYNSKI et al., 1985). A MnP é produzida simultaneamente com a LiP, durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de nitrogênio e carbono no meio de cultura (BUSWELL & ODIER, 1987).

As MnPs participam de reações de despolimerização de ligninas e cloroligninas, desmetilação de lignina e deslignificação e branqueamento de polpa (LACKNER et al., 1991; WARIISHI et al., 1991; PEREZ & JEFFRIES, 1992; PAICE et al., 1993).

A oxidação de lignina e outros compostos fenólicos por MnP é dependente de íons de manganês (GLENN E GOLD, 1985; PASZCZYNSKI et al., 1986; GOLD et al., 1989). Como mostrado na figura 14, a redução primária do substrato no ciclo catalítico de MnP é Mn (II), que eficientemente reduz os compostos I e II, gerando Mn (III), que oxida o substrato orgânico. Ácidos orgânicos como oxalato e malonato, que são secretados por *P. chrysosporium* (WARIISHI et al., 1992), estimulam a reação de MnP por estabilizar Mn (III) e assim podendo se difundir para catalisar a oxidação via um elétron de compostos fenólicos, gerando radicais fenoxila (GLENN & GOLD, 1985; GLENN et al., 1986; GOLD et al., 1989; WARIISHI et al., 1989; WARIISHI et al., 1992).



AH representa o substrato da enzima em sua forma reduzida. A• representa sua forma radicalar oxidada.

Figura 14: Ciclo catalítico da manganês peroxidase (GOLD et al. 1989).

2.11.1.3. Lacases (Benzenediol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

A lacase é uma oxidase que contém cobre em seu grupo prostético e não requer peróxido para sua atividade, catalisa a redução de O₂ para H₂O (SZKLARZ et al., 1989; THURSTON, 1994) e foi descoberta em exsudatos de *Rhus vernicifera*, árvore japonesa, (YOSHIDA, 1883) sendo subsequente demonstrada como uma enzima fúngica (BERTRAND, 1896; LABORDE, 1896). Como a manganês peroxidase, ela normalmente oxida compostos de lignina com grupo fenólico livre, formando radicais do tipo fenóxi (Figura 15). Porém, na presença de ABTS, a lacase pode oxidar certos compostos não fenólicos, provavelmente por abstração de carbonos benzênicos (BOURBONNAIS & PAICE, 1992). A lacase é produzida por todos os fungos de decomposição branca (SZKLARZ et al., 1989), com exceção de *P. chrysosporium* (KIRK & FARRELL, 1987). Entretanto, sob condição especial, o *P.*

chryso sporium foi capaz de produzi-la (SRINIVASAN et al., 1995). As formas constitutiva e induzida são conhecidas, sendo que a forma induzida, geralmente, apresenta maior atividade (LEONOWICZ et al., 1985).

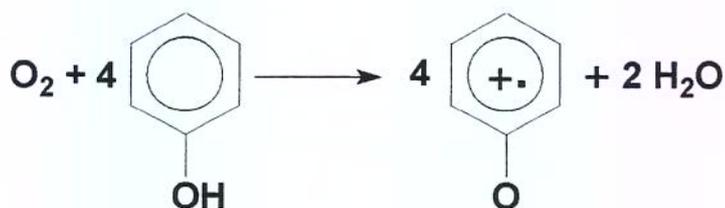


Figura 15: Representação de uma reação catalisada por lacase (SZKLARZ et al. 1989).

A lacase catalisa a oxidação via transferência de um elétron de radicais fenóis para radicais fenoxila. A especificidade da enzima ao substrato oxidado depende da origem da lacase, assim lacases de diferentes fungos podem oxidar diferentes substratos, inclusive em diferentes pH's. Algumas lacases apresentam pH ótimo em faixas ácidas (2,5 - 3,5) enquanto outras apresentam atividade ótima em pH neutro (6 - 7) (RIGLING & VAN ALFEN, 1993). A função fisiológica desta enzima não é clara e seu papel na biodegradação da lignina é incerto, uma vez que ela pode causar polimerização de lignina (GOLD & ALIC, 1993; THURSTON, 1994). Assim, foi proposto que a lacase tem um papel na redução da toxicidade dos compostos fenólicos por reações de polimerização (BOLLAG et al., 1988).

2.11.1.4. Peroxidases

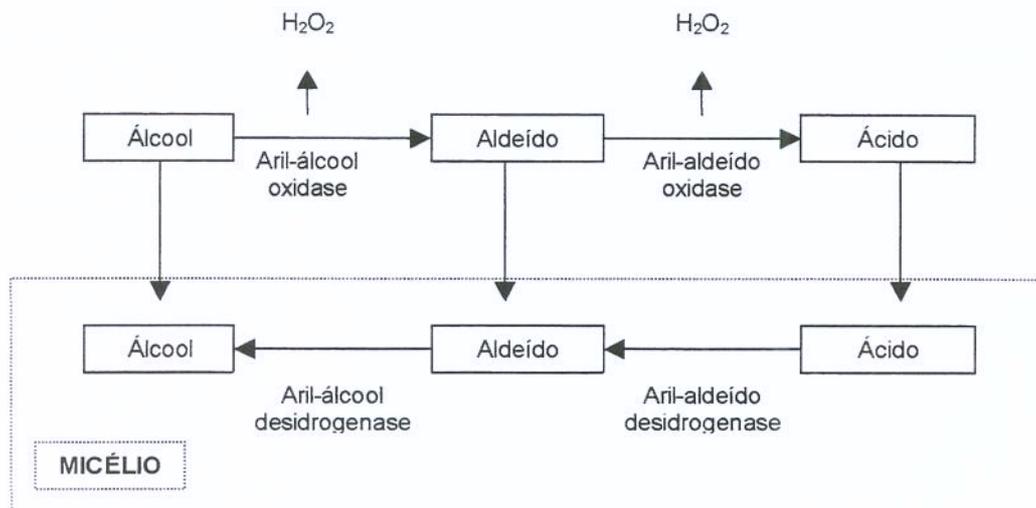
São enzimas extracelulares que contém um grupo heme e requerem peróxido de hidrogênio para atuar sobre os substratos modelo de lignina. Podem ser dependentes ou não do manganês presente no meio (SZKLARZ et al., 1989) e desempenham um papel importante durante a degradação da lignina, diminuindo a

concentração de peróxido do meio, evitando assim a toxicidade para a célula (SZKLARZ & LEONOWICZ, 1986).

2.11.1.5. Enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio

A secreção de H_2O_2 coincide com o princípio da atividade ligninolítica. Os fungos de decomposição branca produzem uma variedade de oxidases que são capazes de gerar H_2O_2 , presumivelmente, para a utilização por peroxidases extracelulares durante a degradação do polímero de lignina.

Uma das enzimas que geram H_2O_2 é intracelular e idiofásica, aril álcool oxigenase (AAO). Esta enzima oxida alcoóis aromáticos para aldeídos e reduz O_2 para H_2O_2 . Estudos com *Pleurotus eryngii* demonstraram o ciclo, representado na Figura 16:



(Fonte: EVANS et al. 1994)

Figura 16: Esquema representativo da produção de H_2O_2 extracelular, através da atuação das enzimas Aril-Álcool Oxidase, aril-álcool Desidrogenase e Aril-Aldeído Desidrogenase .

AAO não é o único sistema de fungos de decomposição branca disponível para produzir H_2O_2 extracelular. Muitas outras oxidases extracelulares e intracelulares são conhecidas por fornecer H_2O_2 . A enzima extracelular glicoxal-

oxidase é produtora de H_2O_2 (GOLD & ALIC, 1993). A MnP também pode gerar H_2O_2 quando catalisa a oxidação de NAD(P)H (ASADA et al., 1986).

Diversas enzimas intracelulares que produzem H_2O_2 tem sido reportadas incluindo glicose-1-oxidase, piranose-oxidase, metanol-oxidase e acil-COA-oxidase (GREENE & GOULD, 1984; KELLEY & REDDY, 1988; VOLC & ERIKSSON, 1988; ERIKSSON & NISHIDA, 1988; VOLC et al., 1991).

A enzima álcool veratrílico-oxidase (AVO) também parece estar envolvida na produção de H_2O_2 , além de desempenhar um papel na prevenção da polimerização dos compostos fenólicos, reduzindo, assim, o peso molecular dos lignosulfonados solúveis gerados durante a degradação da lignina (GUILLÉN et al., 1992; MARZULLO et al., 1995). Este exemplo de aril álcool oxidase tem sido detectado e isolado em diferentes culturas de fungos ligninolíticos. Estas enzimas catalisam a oxidação dos γ -alcoóis α -aril e α,β - insaturados aos seus correspondentes aldeídos com concomitante redução de O_2 a H_2O_2 e aparecem no final da etapa de crescimento, quando o metabolismo secundário está no auge de sua atividade. A AVO está envolvida na produção de peróxido de hidrogênio a ser utilizado pelas peroxidases (GUILLÉN et al., 1992) e, também, previne a polimerização dos compostos fenólicos, reduzindo assim o peso molecular dos lignosulfonatos solúveis gerados durante a degradação da lignina (MARZULLO et al., 1995).

PARTE III

Metodologia

3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CHORUME

Os métodos utilizados para determinação dos compostos presentes no chorume foram realizados segundo os manuais da MERCK (1975) e APHA (1995). Para o estudo da biodegradação do chorume, alguns parâmetros básicos devem ser observados, tais como:

- pH;
- Alcalinidade total;
- Temperatura;
- Demanda bioquímica de oxigênio (DBO);
- Demanda química de oxigênio (DQO);
- Dureza;
- Sólidos totais;
- Sólidos suspensos;
- Sólidos dissolvidos;
- Nitritos;
- Nitratos;
- Nitrogênio orgânico e amoniacal;
- Fósforo total;
- Cloretos;
- Sulfatos; e,
- Fenóis totais

É com base nas informações desta caracterização que podem ser selecionados os microrganismos aptos a desempenhar uma degradação eficiente, uma vez que alguns parâmetros da caracterização como pH, temperatura, fenóis totais e outros, fornecem dados importantes sobre os microrganismos que possam estar presentes, seu metabolismo, e as formas de utilização deste chorume como substrato de crescimento. Os vários componentes do chorume foram avaliados em duas estações climáticas diferentes - verão e inverno, na tentativa de se obter dados para o entendimento da dinâmica da formação do chorume.

A maioria dos métodos utilizados na caracterização foi retirada dos Métodos Padrão de Análise de Água e Águas Residuárias aceitos pela “American Public Health Association” (APHA), “American Water Works Association”, (AWWA) e “Water Environment Federation” (WEF), (APHA, AWWA & WEF, 1995) também descritos no manual de procedimentos do espectrofotômetro DR/2010 - HACH. Alguns métodos propostos para o espectrofotômetro já trazem modificações, que estão descritas sempre que ocorreram. Este espectrofotômetro foi utilizado para a maioria das determinações neste trabalho. A empresa responsável pelo aparelho fornece os kits de determinações de nutrientes e compostos orgânicos e inorgânicos. Os programas de leitura, comprimentos de onda e tempos de espera de reação estão todos armazenados na memória tomando o uso do aparelho bastante rápido, seguro e eficiente.

Todas as determinações foram realizadas utilizando-se amostras brutas do chorume das estações de chuvas e de seca. As determinações foram realizadas sempre que nova amostra de chorume era coletada, no início de cada teste, numa periodicidade média de 2 vezes por ano.

3.1.1. Determinação do pH

O pH de uma amostra nos indica inúmeros fatores que podem estar associados ao crescimento de microrganismos, como: número de metabólitos, atividade microbiana, presença de substratos, etc.

O método utilizado para a determinação do pH foi o potenciométrico, uma vez que o chorume apresenta uma cor bastante escura prejudicando a titulação. A determinação do pH é de utilidade, uma vez que uma brusca variação do seu valor normal pode indicar uma inibição do processo de decomposição da matéria orgânica, que pode ser causada por adição de resíduos industriais, que dificultam a estabilização normal do teor total de carbono presente no aterro sanitário. As amostras coletadas no aterro sanitário estavam necessariamente à temperatura ambiente no momento da medição e materiais sólidos grosseiros foram filtrados para evitar a contaminação do eletrodo e possível entupimento.

3.1.2. Alcalinidade total

A alcalinidade de uma amostra é a sua capacidade de neutralizar ácidos, é a medida de um agregado de propriedades de água e pode ser interpretada, em termos de substâncias específicas, somente quando a composição química da amostra é conhecida. É uma soma de todas as bases titulantes. No caso do chorume, pode ser resultado da presença de carbonatos, hidróxidos e bicarbonatos. Uma vez que a alcalinidade de muitas águas superficiais ocorre primariamente em função do conteúdo de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, estes são levados em conta como indicação de alcalinidade. Os valores medidos podem incluir, ainda, contribuições de boratos, fosfatos, silicatos e outros constituintes presentes.

Devido à elevada turbidez e colorações intensas, a alcalinidade foi determinada potenciométricamente (ÁLVARES DA SILVA, 1977).

3.1.3. Temperatura

O conhecimento da temperatura do chorume no local de coleta é importante para determinar o tipo de microrganismos que serão encontrados nas amostras, além de fornecer alguns dados como tipos de reações que possam estar ocorrendo, e a taxa destas reações. Temperaturas elevadas resultantes de descargas de água quente ou de reações podem causar impacto ambiental importante.

Para coleta de dados sobre a temperatura foi construído um aparato rudimentar, onde um termômetro com escala de mercúrio foi conectado a um frasco e este amarrado a uma corda. O aparato foi lançado vagarosamente até a superfície do poço de chorume e deixou-se então que o chorume enchesse o frasco. Logo após a coleta o chorume foi içado e a temperatura, anotada. Cinco pontos de coleta foram pesquisados.

3.1.4. Demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

A determinação da demanda bioquímica de oxigênio é um teste empírico no qual procedimentos padronizados em laboratório são utilizados para determinar o

requerimento relativo de oxigênio para a degradação de águas residuárias, efluentes, e águas poluídas quando lançadas em corpos d'água. O teste mede o oxigênio molecular utilizado durante período de incubação específico para a degradação bioquímica de material orgânico e o oxigênio usado para oxidar material inorgânico como sulfitos e íon férrico. Pode ser utilizado também para medir a quantidade de oxigênio necessária para oxidar formas reduzidas de nitrogênio (demanda de nitrogênio) a menos que esta oxidação seja evitada por um inibidor.

A demanda bioquímica de oxigênio, em termos práticos, é representada pela quantidade de oxigênio consumida pela unidade de volume de um resíduo, em determinadas condições, através da metabolização da matéria biodegradável por organismos vivos ou por suas enzimas. É, portanto, um parâmetro de medida, que determina, através de um bioensaio, a quantidade de oxigênio dissolvido consumido por microrganismos aeróbios durante a metabolização da matéria orgânica (BRANCO & HESS, 1975; GLAZER & NIKAIDO, 1995).

O método utilizado é o método padrão de análise de água contaminada apresentado no livro editado pelas entidades APHA, AWWA, WEF, órgãos fiscalizadores e normativos do controle ambiental dos Estados Unidos.

3.1.5. Demanda química de oxigênio (DQO)

Este teste utiliza o dicromato de potássio em ácido sulfúrico concentrado fervente, na presença de um catalisador de prata, e atua como poderoso agente oxidante. Sob essas condições, a maioria do carbono presente na amostra é oxidado a CO₂ e o hidrogênio presente é oxidado a água. A DQO é utilizada como uma medida do oxigênio equivalente a concentração de matéria orgânica de uma amostra que é susceptível à oxidação por um forte oxidante químico. O método utilizado (Figura 17) foi o método padrão de análise de água contaminada da APHA, AWWA, WEF (1995).

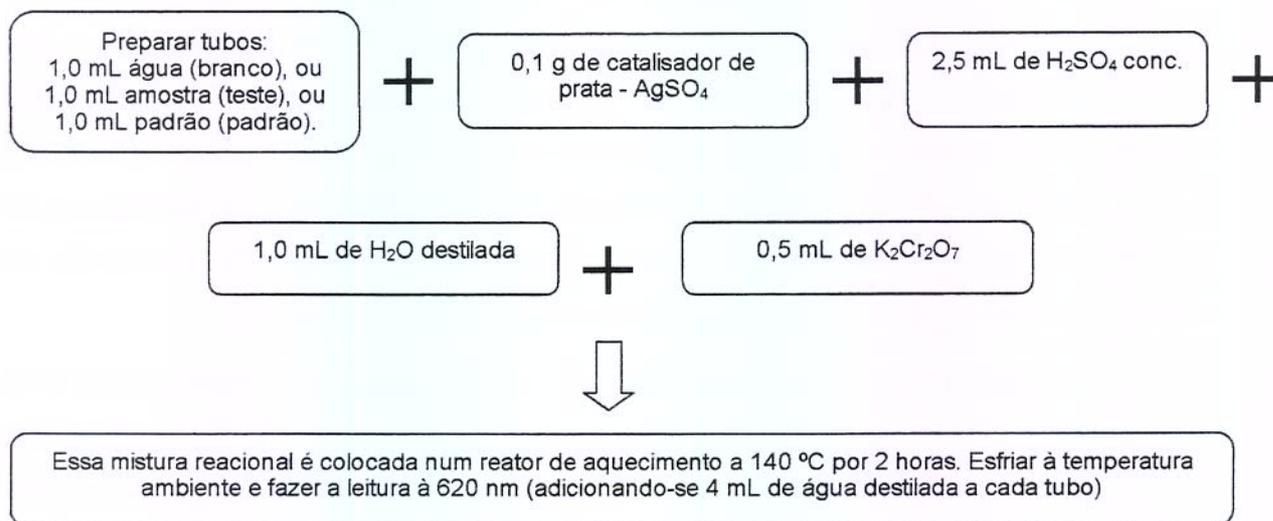


Figura17: Esquema representativo da determinação da demanda química de oxigênio.

3.1.6. Dureza (cálcio e magnésio)

Originalmente a dureza de águas era entendida como a medida da capacidade da água em precipitar sabão. Hoje, a dureza total é definida como a soma das concentrações de cálcio e de magnésio, ambas expressas como carbonato de cálcio, em miligramas por litro. É a soma dos íons alcalino terrosos (íons magnésio, cálcio, estrôncio e bário), fixados em forma de carbonatos, sulfatos, cloretos, nitratos e fosfatos. Pode variar do zero a centenas de miligramas por litro, dependendo da fonte e do tratamento que o chorume possa ter sofrido anteriormente.

O método colorimétrico para medida da dureza é mais preciso que o método de titulação convencional pois pode medir níveis baixos de cálcio e magnésio. O corante indicador é a calmagita que forma uma cor púrpura em soluções fortemente alcalinas e transforma-se em vermelho quando reage com cálcio e magnésio. As determinações de cálcio e magnésio são feitas quelando-se o cálcio com EGTA para destruir qualquer cor vermelha devida ao cálcio, e depois quela-se com EDTA para destruir qualquer cor vermelha proveniente de cálcio ou magnésio. Medindo-se a diferença de cor vermelha nos diferentes estágios, os níveis de cálcio e magnésio são determinados.

3.1.7. Sólidos totais

É o termo aplicado ao material residual do cadinho de porcelana após a evaporação de uma amostra e sua subsequente secagem a uma temperatura conhecida e controlada. Os sólidos totais incluem os sólidos suspensos, ou seja, a porção dos sólidos totais retidos por um filtro e os sólidos dissolvidos, ou seja, a porção de sólidos que passa através dos poros do filtro.

Foi seguida a metodologia apresentada em APHA / AWWA / WEF (1995).

3.1.8. Sólidos suspensos

A amostra é filtrada através de um filtro de peso conhecido e o resíduo retido é secado até seu peso constante a 103-105°C. O aumento no peso do filtro representa os sólidos suspensos totais (APHA/AWWA/WEF, 1995).

3.1.9. Sólidos dissolvidos

A amostra agitada é passada através de um filtro e o filtrado é secado até seu peso constante em cadinho de porcelana a 180°C. O aumento no peso do cadinho representa os sólidos dissolvidos totais (APHA/AWWA/WEF, 1995).

3.1.10. Nitritos

O nitrogênio aparece das interconversões metabólicas de diversos compostos. As principais formas nas quais eles se apresentam são: nitrogênio amoniacal (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Juntos, estes elementos são conhecidos como nutrientes e sua remoção é conhecida como "nutrient stripping".

O nitrito é um estado de oxidação intermediária do nitrogênio, tanto da oxidação da amônia a nitrato como da redução do nitrato. O nitrito é o agente etiológico da metahemoglobinemia. Em soluções ácidas pode formar ácido nitroso e este, então, reagir com aminas secundárias formando nitrosaminas que são

altamente carcinogênicas. É de importância extrema então, dosar estes níveis de nitrito em água ou resíduos que possam contaminar águas subterrâneas.

Neste método (APHA/AWWA/WEF, 1995) o nitrito reage com o ácido sulfanílico formando um intermediário diazotado. Este por sua vez reage com o ácido cromotrópico produzindo um complexo colorido rosa diretamente proporcional à quantidade de nitrito presente na amostra analisada.

3.1.11. Nitratos

O nitrato geralmente ocorre em quantidades traços, em águas naturais, mas pode atingir altos níveis em águas subterrâneas. Em altas quantidades pode acarretar metahemoglobinemia em crianças. Ele é um nutriente essencial para muitos microrganismos autotróficos fotossintéticos e em alguns casos, tem sido reconhecido como um nutriente limitante de crescimento de microrganismos.

A determinação de nitrato é difícil devido à interferência de vários constituintes. No método utilizado (APHA/AWWA/WEF, 1995) o cádmio reduz o nitrato presente na amostra a nitrito. Os íons nitrato reagem em um meio ácido com ácido sulfanílico formando um sal diazotado. Este sal reage com o ácido gentísico formando um produto final âmbar.

3.1.12. Nitrogênio orgânico e amoniacal

O nitrogênio orgânico é definido funcionalmente como o nitrogênio ligado organicamente no estado trivalente de oxidação. Ele não inclui todos os compostos orgânicos nitrogenados. Analiticamente, nitrogênio e amônia podem ser determinados juntos como "nitrogênio Kjeldahl", um termo que reflete a técnica usada nestas determinações. O nitrogênio orgânico inclui substâncias naturais como peptídeos e proteínas, ácidos nucleicos e uréia, e numerosos materiais sintéticos.

O nitrogênio do chorume origina-se de muitas fontes, incluindo fertilizantes, resíduos animais, efluentes industriais, etc. Sua presença na água residual causa poluição por dois meios. Um grupo de bactérias conhecidas como nitrificantes é capaz de oxidar o íon amônio a nitrato, e fazendo isso, utiliza-se do oxigênio

dissolvido na água, requerendo 4,5 mg de O₂ para oxidar cada miligrama de amônia. Como a saturação de O₂ da água é de somente 9,0 mg O₂/L a 20 °C, uma pequena quantidade de amônia já é suficiente para abaixar enormemente a saturação de oxigênio dissolvido na água, desoxigenando completamente o corpo de água (HORAN, 1991).

A amônia, por sua vez, está presente naturalmente em águas subterrâneas e residuárias. Sua concentração geralmente é baixa em águas subterrâneas, pois aparece adsorvida em partículas do solo e argila, o que torna difícil sua liberação. É produzida pela desaminação de compostos que contém nitrogênio orgânico e na hidrólise da uréia.

3.1.13. Fósforo

O fósforo ocorre em águas naturais e residuárias quase sempre na forma de fosfatos. Estes são classificados como ortofosfatos, fosfatos condensados e fosfatos ligados organicamente. Estas formas de fosfatos decorrem de uma variedade de fontes. Os ortofosfatos aplicados à agricultura ou hortas domésticas, como fertilizantes, podem ser carregados até os lençóis de águas subterrâneas e superficiais através da chuva.

Em solução altamente ácida, o molibdato de amônio reage com o ortofosfato para formar o ácido molibdofosfórico. Este complexo é então reduzido pelo aminoácido reagente para produzir um composto de molibdênio extremamente azul.

3.1.14. Cloretos

O cloreto é o ânion inorgânico em maior quantidade em águas subterrâneas, superficiais e residuárias, bem como no chorume. Neste método (APHA/AWWA/WEF, 1995) o cloreto da amostra reage com o tiocianato de mercúrio para formar o cloreto mercúrico e liberar o íon tiocianato. Os íons tiocianato reagem com íons férricos para formar um complexo tiocianato-férrico alaranjado. A quantidade deste complexo é proporcional à concentração de cloretos na amostra.

3.1.15. Sulfatos

Os sulfatos são largamente distribuídos na natureza e estão presentes no chorume em concentrações variáveis. Na presença de matéria orgânica, algumas bactérias podem reduzir o sulfato a sulfetos, gerando odores desagradáveis. Em laboratório, as amostras devem ser mantidas em geladeira a 4°C, para evitar esse tipo de reação (LEITH, 1973).

3.1.16. Fenóis totais

Fenóis, definidos como hidróxi-derivados de benzeno podem ocorrer em esgotos domésticos, chorume, água potável, águas residuárias e águas naturais, e podem trazer sérios comprometimentos à saúde humana. O método de determinação de fenóis totais utiliza extração com clorofórmio e detecção espectrofotométrica (APHA/AWWA/WEF, 1995).

O método da 4-aminoantipirina determina todos os fenóis orto- e meta-substituídos, não detectando portanto os para-substituídos. Estes fenóis reagem com a 4-aminoantipirina na presença de ferrocianeto de potássio para formar o corante colorido antipirina. O corante é então extraído da solução aquosa com clorofórmio e a cor é medida a 460 nm.

3.2. ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos foram isolados de 7 amostras de chorume e de solo impregnado por chorume. Foram também coletadas amostras de locais contaminados por lixo doméstico na região da Unicamp (esgoto, lagoa) e riachos urbanos próximos. Frascos estéreis vazios foram amarrados a cordas de nylon e então mergulhados dentro dos tanques de coleta de chorume. Estes tanques têm aproximadamente 10 metros de profundidade. Durante os preparativos para a coleta, os frascos foram abertos somente no momento exato da coleta das amostras.

Para a coleta de outras amostras de água contaminada (riacho e lagoa da UNICAMP, e córregos urbanos), os procedimentos foram os mesmos em regiões de

difícil acesso, e manualmente quando estavam ao alcance das mãos. Após a coleta, os frascos foram acondicionados em caixas de isopor e a inoculação visando o isolamento se deu imediatamente ao chegar ao laboratório, após homogeneização eficiente (Figura 18).

Para o isolamento de bactérias presentes nestas amostras foi utilizado o meio alternativo (R2A) constituído por extrato de levedura, peptona, casaminoácidos, glicose e amido solúvel na concentração de 0,5 g/L, piruvato de sódio e K_2HPO_4 0,3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g/L e agar 15 g/L em água deionizada (REASONER & GELDREICH, 1985). Para o isolamento de fungos e leveduras foi utilizado o mesmo meio de cultura, mas adicionando-se 1,0 mL/L de solução de tetraciclina (5 mg/mL etanol) e 1,0 mL/L de solução de cloranfenicol (34 mg/mL etanol) ao meio de isolamento. O isolamento foi realizado em três temperaturas diferentes - 30, 37 e 55°C, nas condições aeróbia e microaerofílica. Para os experimentos em meio microaerofílico foram utilizadas jarras hermeticamente fechadas, onde as placas eram depositadas. Imediatamente antes de se fechar as jarras, eram adicionadas placas contendo Microaerobac®, gerador de atmosfera de microaerofilia (5 a 15% O_2).

Alíquotas de 1,0 mL do chorume e das outras amostras foram diluídas em 9,0 mL de água destilada estéril. Após homogeneização destas amostras diluídas em agitador mecânico do tipo Vortex por 2 minutos, foram realizadas diluições sucessivas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), das quais foram retiradas alíquotas de 100 μ L para inoculação nos meios de cultura, conforme o esquema apresentado na Figura 18.

O isolamento de microrganismos provenientes do chorume foi realizado em coletas periódicas. Na área do aterro sanitário existem aproximadamente de 15 a 20 locais de armazenamento de chorume, que não são necessariamente lagoas de estabilização, uma vez que são praticamente fechados ao contato com o meio externo, com pouca entrada de luz natural.

Foram também reativadas algumas linhagens de microrganismos já isolados no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da FEA/UNICAMP, e utilizados em testes preliminares de degradação de lignina e outros xenobióticos que serviram somente como controle de degradação.

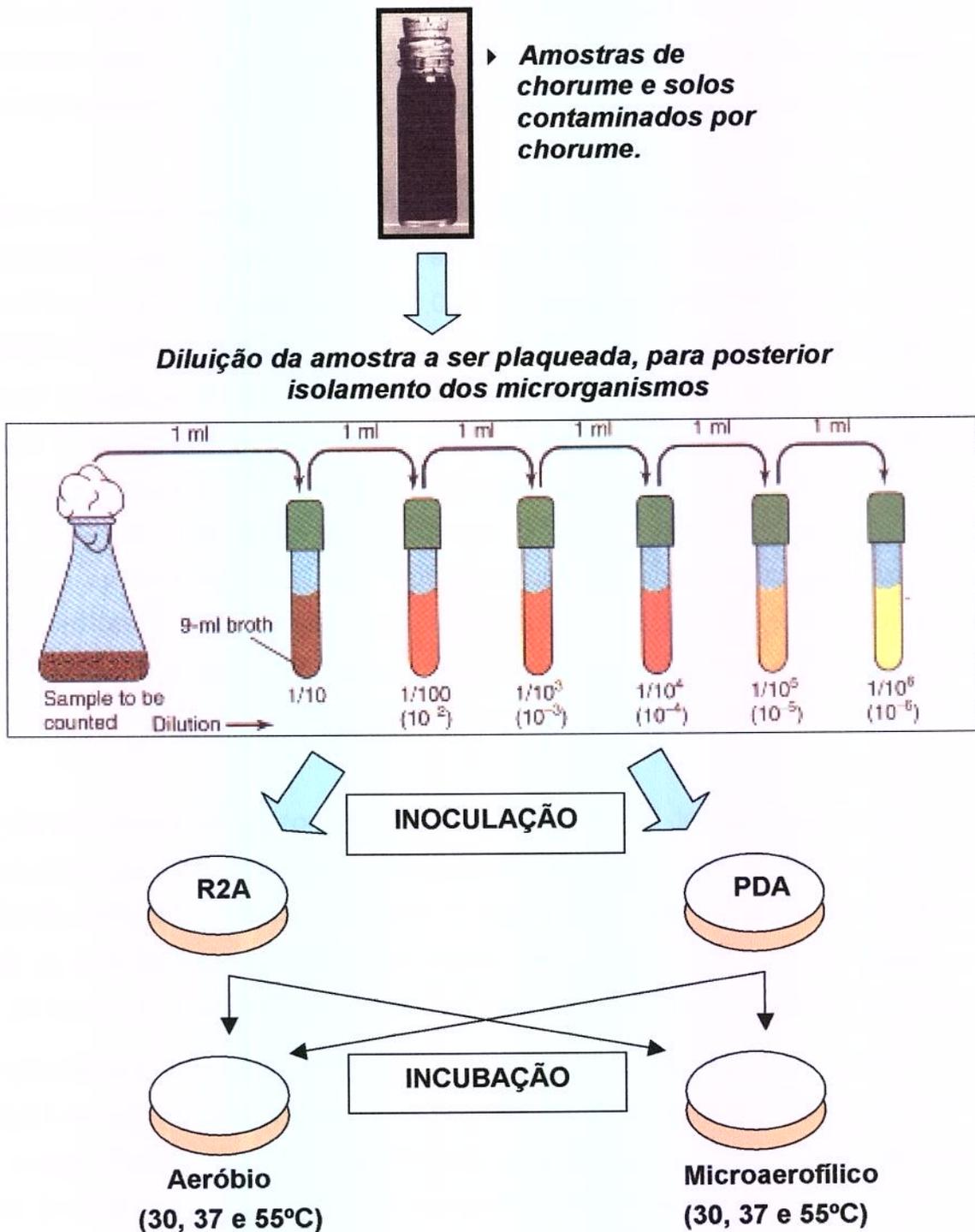


Figura 18: Esquema de isolamento dos microrganismos utilizados nos estudos de biodegradação de chorume

Todos os microrganismos foram estocados em tubos inclinados contendo meio R2A e, antes de qualquer teste, eram reativados por inoculação em placas e incubadas em meio R2A por 2 a 3 dias.

3.3. TRIAGEM DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS

Os microrganismos isolados do chorume e águas contaminadas foram testados quanto a sua resistência frente a compostos tóxicos facilmente encontrados no chorume, como fenóis e pesticidas. Os compostos escolhidos para o teste foram: fenol, catecol e pirazole, sendo este a base de vários herbicidas.

- **Padronização**

Foram escolhidas, aleatoriamente, 30 linhagens entre fungos, bactérias e leveduras isoladas do chorume e locais por este contaminados. Estas linhagens foram crescidas em placas de Petri contendo meio R2A, no caso das bactérias ou meio PDA (potato dextrose agar) no caso dos fungos e leveduras. Após inoculação de cada microrganismo nas placas, foram depositados discos de agar (R2A mais composto tóxico, no caso das bactérias, e PDA mais composto tóxico, no caso das leveduras) contendo em sua composição o componente a ser testado. Estes compostos foram adicionados ao agar após a esterilização, por meio de membranas de celulose Millipore® 0,22 µm de poro, 47 mm de diâmetro, em ambiente asséptico. Inicialmente este experimento seria realizado com discos de papel impregnados com os compostos, mas os resultados preliminares foram insatisfatórios pois o papel não conseguiu reter por muito tempo os compostos, por esse motivo resolveu-se trabalhar com agar. As concentrações testadas de cada composto foram: 0,5 %, 2,0 % e 4,0 %, e os testes foram realizados nas condições do isolamento por 7 dias. Porém a concentração escolhida para os testes seguintes foi de 2,0 %, visando a seleção de um número maior de linhagens.

No caso do composto pirazólico a concentração escolhida foi a de 4,0 %.

O método utilizado foi elaborado por ALLEMAN et al. (1993). Foram desenvolvidas culturas para inóculo de fungos, bactérias e leveduras em meio contendo 20 g/L de glicose, 2,5 g/L de citrato sódico, 5 g/L de K_2SO_4 , 2 g/L de NH_4NO_3 , 0,068 g/L de $CaCl_2$, 0,2 g/L de $MgSO_4$, 1 mg/L de tiamina e 15 g/L de agar (KIRK et al., 1977). A temperatura utilizada neste experimento foi a temperatura ótima de crescimento de cada microrganismo durante o isolamento.

Para a classificação dos microrganismos como resistentes era necessário que o halo formado ao redor do disco de agar impregnado com o composto a ser testado fosse menor ou igual a 5 mm (Figura 19), de acordo com ALLEMAN et al. (1993).

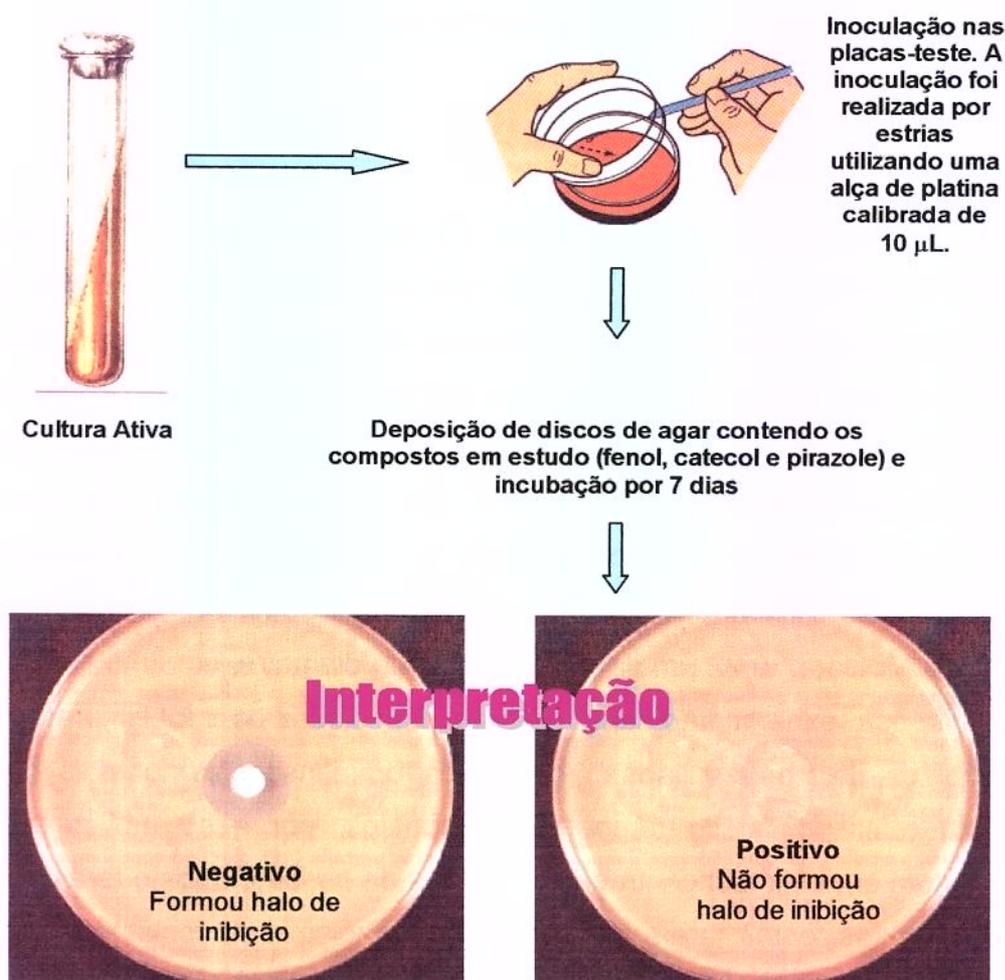


Figura 19: Fluxograma e detalhamento do experimento de degradação de xenobióticos, por linhagens isoladas do chorume.

Após a padronização todas as 323 linhagens isoladas anteriormente foram testadas quanto a sua resistência de crescimento sobre compostos tóxicos. Este teste foi realizado uma única vez, repetindo-se somente as linhagens que apresentaram alguma resistência. As outras linhagens que apresentaram halo de inibição foram automaticamente descartadas.

3.4. BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA

3.4.1. Crescimento das linhagens isoladas, em lignina

A perda de lignina, em porcentagem, foi evidenciada através de método proposto por ZADRAZIL (1980). A temperatura utilizada neste experimento foi a temperatura ótima de crescimento do microrganismo durante o isolamento. Segundo ZADRAZIL & BRUNNERT (1980), a lignina residual é determinada como sendo a parte do substrato não solúvel após tratamento com HCl e H₂SO₄.

As linhagens selecionadas na primeira etapa dos trabalhos de degradação de xenobióticos foram testadas quanto ao seu crescimento em Erlenmeyers contendo unicamente casca de arroz e água destilada; e fibra de trigo e água destilada. Amostras de 25 g destes substratos foram moídos em homogenizador de alimentos, colocados em Erlenmeyers juntamente com 75 mL de água deionizada e esterilizados a 121°C por 30 min. Os microrganismos foram inoculados em triplicata. Para cada placa foram utilizados 5 porções de 1 cm² de crescimento dos fungos e bactérias. A placa de cada microrganismo que servia de inóculo era quadriculada em seu verso, em quadrados de 1 cm² de área. Esta área demarcada no verso da placa serviu para facilitar o recorte dos quadrados de agar que foram inoculados nas placas de crescimento em lignina.

Como controle foram utilizados dois Erlenmeyers contendo unicamente a palha de arroz ou a fibra de trigo, com adição de água, porém sem o inóculo microbiano.

Os substratos, casca de arroz e fibra de trigo, utilizados neste experimento, apresentam características diferentes de composição, que estão evidenciadas na Tabela 6.

Tabela 6: Características dos substratos utilizados no teste de degradação de lignina.

Substratos	Lignina (%)	C (%)	N (%)	C:N	pH*	Cinzas (%)
Casca de Arroz	29,2	35	0.50	70	5,9	19,00
Fibra de Trigo	22,7	48	0,63	70	6,0	5,77

* = Após esterilização.

A perda de matéria orgânica é calculada pela diferença entre o peso seco das amostras no início e no final da incubação (ZADRAZIL, 1985).

3.5. ESTUDO DA DESCOLORIZAÇÃO DO CHORUME

3.5.1. Estudo da degradação de xenobióticos

Foram realizados testes de crescimento dos microrganismos (Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254) em frascos contendo chorume como substrato. Os caldos após fermentação foram centrifugados a 17000 rpm por 15 minutos a 10°C. A descolorização foi acompanhada no sobrenadante pela determinação do espectro do chorume, através de espectroscopia de absorção U.V. e espectrofotometria na região do campo visível. A espectroscopia de absorção, quando realizada sem se conhecer os constituintes de uma matriz, revela as características de cor, e um aspecto quantitativo, e não qualitativo, dos constituintes da mesma. Os caldos também foram reservados, após a centrifugação, para a realização dos outros experimentos. Os experimentos foram divididos em 8, que são os seguintes:

- *Experimento I* - Crescimento dos microrganismos em Erlenmeyers contendo 50 mL de chorume puro, sem a adição de qualquer nutriente. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, em agitador mecânico, a 30 °C. Neste teste, o chorume foi autoclavado antes da inoculação, para a eliminação de microrganismos presentes na amostra.
- *Experimento II* - Crescimento dos microrganismos em Erlenmeyers contendo 50 mL de chorume puro, sem a adição de qualquer nutriente. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, em agitador mecânico, a 30 °C. Neste teste, o chorume não foi autoclavado antes da inoculação.

- *Experimento III* – Crescimento dos microrganismos em Erlenmeyers contendo 50 mL de chorume puro, com a adição de glicose (0,5%) e extrato de leveduras (0,1%). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, em agitador mecânico, a 30 °C. Neste teste, o chorume foi autoclavado antes da inoculação, para a eliminação de microrganismos presentes na amostra.
- *Experimento IV* – Crescimento dos microrganismos em Erlenmeyers contendo 50 mL de chorume puro, com a adição de glicose (0,5%) e extrato de leveduras (0,1%). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, em agitador mecânico, a 30 °C. Neste teste, o chorume não foi autoclavado antes da inoculação, e foram ensaiadas as Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254.

Após este 4 primeiros testes, o volume de chorume foi alterado para 500 mL, utilizando-se Erlenmeyers de 1000 mL, para melhorar o crescimento dos microrganismos. Este aumento no volume com conseqüente aumento de inóculo visou uma maior degradação do chorume. Os outros 4 experimentos estão descritos abaixo:

- *Experimento V* - Crescimento dos microrganismos em Erlenmeyers contendo 500 mL de chorume puro, sem autoclavar, com adição de glicose (0,5%). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, em agitador mecânico, a 30 °C.
- *Experimento VI* - Crescimento dos microrganismos em Erlenmeyers contendo 500 mL de chorume puro, sem autoclavar, com adição de sacarose (0,5%). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, em agitador mecânico, a 30 °C.
- *Experimento VII* – Crescimento dos microrganismos em Erlenmeyers contendo 500 mL de chorume puro, sem autoclavar, com adição de sacarose (0,5%) e extrato de leveduras (0,1%). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, em agitador mecânico, a 30 °C.
- *Experimento VIII* – Crescimento dos microrganismos em Erlenmeyers contendo 500 mL de chorume puro, sem autoclavar, com adição de avicel

(0,5%). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, em agitador mecânico, a 30 °C.

Em todos os experimentos anteriores, alíquotas de 50 mL foram retiradas a cada 6 dias, assepticamente, para a realização dos diversos testes. As condições dos oito experimentos realizados podem ser visualizadas na Tabela 7. O controle branco utilizado para cada experimento consistia no chorume tratado dentro das condições de cada experimento, sem a inoculação dos microrganismos. As determinações de redução de DQO, pH e fenol foram realizadas uma vez, no início dos experimentos, no tempo zero (0), para servirem como controle testemunha.

Tabela 7: Condições utilizadas nos oito experimentos de degradação.

Teste	Autoclavagem	Adição de Nutrientes (%)	Adição de Avicel (%)	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Quantidade de chorume (mL)
1	Sim	Não	–	150	30	50
2	Não	Não	–	150	30	50
3	Sim	G (0,5) EL (0,1)	–	150	30	50
4	Não	G (0,5) EL (0,1)	–	150	30	50
5	Não	G (0,5)	–	150	30	500
6	Não	S (0,5)	–	150	30	500
7	Não	S (0,5) EL (0,1)	–	150	30	500
8	Não	Não	0,5	150	30	500

G = Glicose EL = Extrato de Leveduras S = Sacarose

A partir do sobrenadante destes 8 experimentos foram realizados os seguintes passos: determinação de massa seca, pH, enzimas ligninolíticas, descoloração do chorume, degradação de fenol, e quantificação da demanda química de oxigênio (DQO).

3.5.1.1. Obtenção de filtrados, determinação da massa seca e pH

Os caldos contendo todas as culturas utilizadas no teste de descolorização do chorume foram centrifugados a 17000 rpm por 15 minutos a 4°C para a obtenção do sobrenadante, ou caldo enzimático.

As amostras foram filtradas e então foi realizada a determinação da massa seca. O crescimento da massa celular seca foi acompanhado durante a realização dos experimentos.

O pH dos sobrenadantes foi acompanhado por potenciometria e todos os sobrenadantes foram submetidos a testes posteriores.

3.5.1.2. Determinações enzimáticas

- **Lignina Peroxidase**: Esta atividade foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ L/M} \times \text{cm}$). A reação é iniciada pela adição de H_2O_2 e o aparecimento do aldeído veratrílico é determinado pela leitura da absorvância a 310 nm. Esta atividade foi expressa em UI/L por minuto.
- **Manganês Peroxidase**: Esta atividade foi quantificada através da oxidação do vermelho de fenol ($\epsilon_{610} = 4.460 \text{ L/M} \times \text{cm}$), na presença de manganês e peróxido de hidrogênio. A absorvância é lida a 610 nm. Na preparação do branco, o sobrenadante é tratado a 100°C, durante 15 minutos. A atividade foi expressa por UI/L por minuto.
- **Peroxidases**: Esta atividade foi determinada na presença de H_2O_2 exógeno no meio de reação. Para o branco, é utilizado o caldo aquecido a 100°C / 15 min. A oxidação da siringaldazine até sua forma quinona é acompanhada durante 10 minutos a 525 nm ($\epsilon_{525} = 65.000 \text{ L/M} \times \text{cm}$). A atividade foi expressa em UI/L por minuto

Foram realizadas, durante o estudo da biodegradação de compostos do chorume, determinações em triplicata da atividade das enzimas ligninolíticas: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), e peroxidases (Per.) para todas as

linhagens testadas nos experimentos I a VIII, utilizando os sobrenadantes dos mesmos.

Na Tabela 8 estão representados os protocolos para a análise das enzimas LiP, MnP e Peroxidases.

Tabela 8: Procedimentos para determinação das enzimas Lignina-Peroxidase (LiP), Manganês-Peroxidase (MnP) e Peroxidases (Per).

LiP (310 nm)	MnP (610 nm)	Peroxidases (525 nm)
Colocar em uma cubeta de leitura: 0,2 mL de álcool veratrílico 2,0 mM em tampão tartarato de sódio 0,4 M, pH 3,0. + 0,6 mL do sobrenadante da cultura + 0,2 mL de H ₂ O ₂ 2,0 mM	Colocar em uma cubeta de leitura: 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M + 0,05 mL de sulfato de manganês 2,0 mM + 0,2 mL de albumina bovina 0,5 % + 0,5 mL do sobrenadante da cultura + 0,05 mL de H ₂ O ₂ 2,0 mM em tampão succinato de sódio 0,2 M, pH 4,5 + 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1 % em água	Colocar em uma cubeta de leitura: 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,0 + 0,6 mL do sobrenadante da cultura + 0,1 mL de siringaldazina 1,0 mM em etanol + 0,1 mL de H ₂ O ₂ 2,0 mM
↓ Agitar	↓ Agitar	↓ Agitar
↓ Ler absorbância inicial e após 10 minutos.	↓ Ler absorbância inicial	↓ Ler absorbância inicial e após 10 minutos
	↓ Após 5 minutos	
	↓ Adicionar 0,04 mL de NaOH 2N	
	↓ Ler absorbância final.	

3.5.1.3. Degradação de fenóis

As determinações foram realizadas no chorume puro e nas amostras após 30 dias de tratamento com o crescimento das linhagens, lembrando que foi utilizada uma amostra de chorume para os experimentos I a IV (concentração de fenol = 1,94 mg/L) e outra amostra para os experimentos V a VIII (concentração de fenol = 1,68 mg/L). Estas amostras foram colhidas em datas diferentes, no mesmo ponto de amostragem dentro do aterro sanitário.

3.5.1.4. Cromatografia gasosa

Nas amostras utilizadas neste trabalho, as análises cromatográficas foram realizadas somente nos sobrenadantes dos experimentos IV e V, onde houve grande atividade enzimática e considerável redução de DQO e fenol, como consequência do melhor crescimento dos microrganismos durante a realização dos mesmos. Não houve interesse em quantificar estes compostos, mas sim em obter uma análise qualitativa dos mesmos.

Para a análise cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC-14A, detector por ionização de chama (FID) a 300°C e injetor split/splitless, coluna capilar polar Omegawax™ 320, marca Supelco, 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme, gás de arraste hélio, 2,5 mL/min., integrador marca Shimadzu, modelo C-R4A Chromatopac. O método foi adaptado de YASUHARA et al. (1997). Neste método utilizado como referência, os compostos sofriam uma extração por destilação a 60°C, mas o tipo de extração foi mudado, utilizando-se extração química, com solventes.

As soluções padrões foram preparadas utilizando compostos puros de qualidade cromatográfica. Primeiramente foram feitas soluções 10 µg L⁻¹ de cada composto num volume total final de 25 mL. Estas soluções sofreram uma extração simples com 25 mL de éter etílico/metanol. Os extratos foram secados em atmosfera de Nitrogênio e cada solução foi submetida à cromatografia gasosa. Após determinação do tempo de retenção dos padrões as soluções padrões foram misturadas e foi realizada uma nova extração e nova corrida cromatográfica. As

amostras de chorume sofreram o mesmo tipo de tratamento, mas em escala menor, ou seja, cada 10 mL de chorume sofreu extração com 10 mL de éter etílico/metanol. Para a realização das corridas cromatográficas foram injetados 2 μ L dos padrões e amostras.

Os compostos escolhidos como padrão para a análise cromatográfica estão demonstrados na Figura 20. Todos são Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs), e são facilmente encontrados em chorume, principalmente quando este é coletado em aterros com contaminação por resíduos industriais.

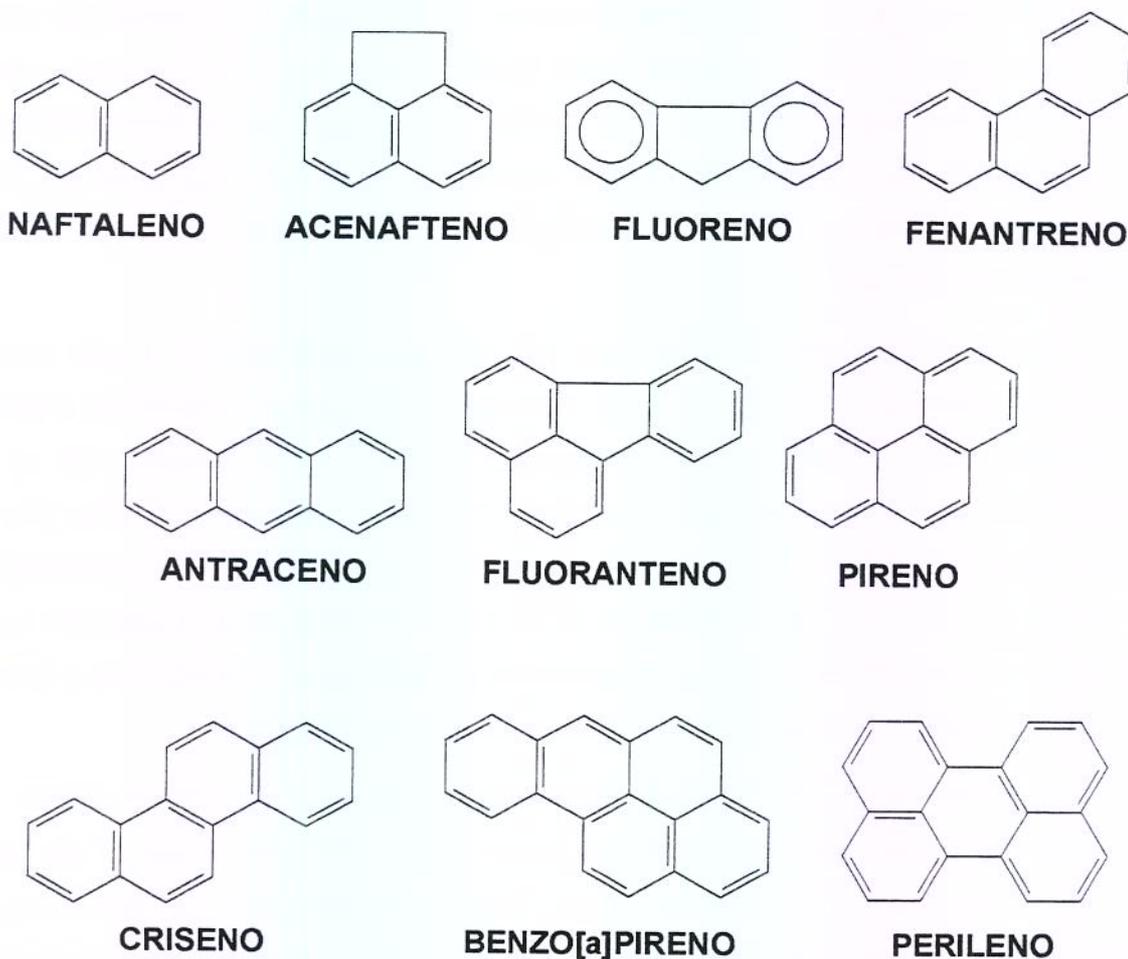


Figura 20: Fórmulas estruturais dos compostos que compõem o padrão na análise do chorume por cromatografia gasosa.

3.6. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A identificação da linhagem bacteriana 254 foi realizada através de microscopia ótica, coloração de GRAM e vários ensaios bioquímicos. Por outro lado, as linhagens fúngicas foram observadas em microscópio, utilizando a técnica do microcultivo, que consiste em crescer o microrganismo num meio de cultivo em que o microrganismo já esteja adaptado, sob lamínulas de vidro. Após o crescimento esta lamínula foi retirada vagarosamente para que não houvesse destruição das organelas e estruturas de reprodução dos fungos. Esta lamínula foi colocada cuidadosamente sobre uma gota de lactofenol azul de algodão e depositada numa lâmina de microscópio e então as estruturas do microrganismo foram observadas ao microscópio.

PARTE IV

Resultados e
Discussões

4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CHORUME

Na Tabela 9 são apresentados os resultados obtidos das determinações de pH, alcalinidade, temperatura, DBO, DQO, dureza, sólidos, nitritos, nitratos, nitrogênio amoniacal, fósforo, cloretos, sulfatos e fenóis totais, cujos testes foram realizados em quintuplicata, sendo apresentados somente a média dos resultados e a faixa de variância. Através da tabela são observadas algumas divergências entre as duas caracterizações, principalmente nos testes de pH, DBO, DQO, dureza, alcalinidade, nitritos, nitratos, fósforo e cloretos. As amostras de chorume foram coletadas em cinco diferentes reservatórios e apresentaram pH próximo da neutralidade, o que descarta a possibilidade de classificação como chorume de fase acídica, mas não permite também sua classificação como de fase metanogênica.

A razão DBO/DQO ficou próxima de 0,55 o que caracteriza que o chorume está um pouco mais próximo da fase acídica (chorume novo), porém ainda em transição da fase acídica para a metanogênica (chorume velho). Se esta razão se apresentasse próxima de 1, o chorume seria característico de fase acídica, enquanto que se a razão fosse mais próxima de 0 (zero), o chorume já estaria com características de fase metanogênica. A fase metanogênica em aterro não acelerado dura 40 anos, portanto o tratamento biológico ainda seria aconselhado neste caso.

CHIANG et al. (1995) encontraram valores de pH próximos de 8,7 em dois locais do mesmo aterro em Taiwan. Estes valores encontram-se próximos ao encontrado para o chorume deste trabalho, em uma das determinações posteriores. MEJU (2000) comparou os resultados encontrados de pH em chorume de aterros da Inglaterra (6,2 a 7,4), Alemanha (6,1 a 8,0), Estados Unidos (3,7 a 8,5), Finlândia (3,0 a 8,0) e Brasil (6,05 a 7,51). Conforme estes dados, pode-se verificar as grandes variações regionais da composição do chorume.

Ainda sobre os valores encontrados de pH, MARTIN et al. (1999), em trabalho desenvolvido no Alabama/USA, relataram valores de pH variando de 6,7 a 7,1, muito próximos da neutralidade. Já no Brasil, CASTILHOS Jr, (1991) registrou valores de pH variando de 3,7 a 8,5.

Tabela 9: Média e faixa de variância de valores de parâmetros físico-químicos do chorume nos tanques de coleta, em duas coletas diferentes.

Parâmetro	Tanques de Coleta			
	1ª Caracterização		2ª Caracterização	
	(verão)		(inverno)	
	Média	Faixa de variância	Média	Faixa de variância
pH	6,98	6,67 – 7,32	6,05	6,02 – 6,13
Alcalinidade (mg/L)	683	625 – 732	938	920 – 950
Temperatura (°C)	20,2	19,5 - 20,7	18,7	18,3 – 19,3
DBO (mg/L)	629	601 - 653	1107	1092 – 1118
DQO (mg/L)	1126	930 - 1203	2061	1564 – 2464
Dureza (mg/L)	255,8	225 - 293	337	317 – 353
Sólidos Totais (mg/L)	15,97	14,99 - 16,76	6,69	6,29 – 7,17
Sólidos Suspensos (mg/L)	11,87	10,13 - 16,68	0,69	0,59 – 1,0
Sólidos Dissolvidos (mg/L)	5,59	5,22 - 6,2	5,73	5,71 – 5,77
Nitritos (mg/L)	35,8	18,0 - 57,0	2,8	1,0 – 4,0
Nitratos (mg/L)	2,6	2,0 - 3,0	6,46	5,0 – 7,2
Nitrogênio Kjeldhal (mg/L)	1030	952 - 1076	317	312 – 320
Fósforo (mg/L)	19,88	17,3 - 21,8	2,4	1,5 – 3,0
Cloretos (mg/L)	2384	2180 - 2540	632	560 – 680
Sulfatos (mg/L)	38,34	35,2 - 40,3	40,0	20,0 – 55,0
Fenóis Totais (mg/L)	2,26	1,83 – 3,68	1,64	1,53 – 1,74

A quantidade de nitrito obtida denota grande atividade de oxidação de compostos de nitrogênio, bem como da redução de nitrato, o que demonstra uma intensa atividade microbiana no chorume formado.

A presença de formas oxidadas de nitrogênio no chorume, como o nitrato, indicam que está havendo nitrificação da amônia. As baixas concentrações de nitrito (35,8 mg/L) e nitrato (2,6 mg/L) em relação à amônia (1030 mg/L) após a primeira caracterização, de verão, indicam que o oxigênio está pouco disponível para as bactérias nitrificantes e que existe uma persistência de condições anaeróbias e potencial redox negativo. Já na segunda caracterização, de inverno, os resultados de nitritos e nitratos (2,8 e 6,46 mg/L, respectivamente) em relação à amônia (317 mg/L) denotam estágio mais avançado na decomposição dos compostos nitrogenados.

A amônia é a forma inorgânica mais reduzida de nitrogênio e inclui a amônia dissolvida ou aquosa e o íon amônio. Esta fase aquosa varia em função do pH e temperatura do chorume. Sua produção é bastante afetada por processos biológicos podendo transformar-se em compostos de nitrogênio mais tóxicos, como o nitrato (REITZEL et al., 1992).

Confrontando-se a primeira caracterização com a segunda (Tabela 9), pode-se observar que a amostra analisada na primeira caracterização apresentou valores mais baixos de DQO e DBO, bem como valores mais altos de cloretos, fósforo e pH. Isso pode estar indicando grau de degradação maior, ou seja, esta amostra já estaria bastante degradada em seu sítio de origem, talvez pelo maior calor da estação climática em comparação com a amostra da segunda caracterização, o que teria favorecido o crescimento e a multiplicação dos microrganismos. Por outro lado, o inverno no ano da caracterização foi uma estação bastante atípica, com altos índices pluviométricos, o que pode ter diluído o chorume, constituindo uma explicação mais provável para estes resultados apresentados na Tabela 9.

4.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Foram isoladas 323 linhagens de microrganismos, entre bactérias, fungos e leveduras, com maior predomínio de bactérias do tipo bacilos Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras; e, em menor quantidade, os fungos. Dentre todos os isolados, a grande maioria foi de microrganismos aeróbicos.

4.3. TRIAGEM DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS

Após a análise destes resultados, das 323 linhagens testadas, 13 linhagens apresentaram crescimento ótimo frente aos compostos em estudo, sendo 12 linhagens fúngicas e uma bacteriana, e foram previamente selecionadas para continuação dos experimentos. Na tabela 10 são mostrados os microrganismos resistentes aos três compostos em estudo.

Tabela 10 : Teste de resistência dos microrganismos que resistiram simultaneamente ao fenol, catecol e pirazole.

<i>Linhagens</i>	<i>Tipo de microrganismo</i>	<i>Temperatura de incubação (°C)</i>	<i>Condição de Incubação</i>
74	Fungo	30	Aeróbia
96	Fungo	30	Aeróbia
100	Fungo	30	Aeróbia
108	Fungo	30	Aeróbia
184	Fungo	37	Aeróbia
186	Fungo	37	Aeróbia
202	Fungo	37	Aeróbia
203	Fungo	37	Aeróbia
254	Bactéria	30	Microaerofílica
264	Fungo	30	Microaerofílica
266	Fungo	30	Microaerofílica
268	Fungo	30	Microaerofílica
269	Fungo	30	Microaerofílica

Algumas fotos referentes a este experimento podem ser vistas nas Figuras 21, 22 e 23.

Na Figura 21 pode-se verificar que o Fungo 251 foi inibido, não conseguindo crescer frente ao fenol, e, portanto, o halo de inibição foi formado. Já o Fungo 79 conseguiu crescer sem dificuldade sobre os discos de agar contendo fenol,

englobando estes discos em seu micélio, demonstrando assim um valioso poder de resistência frente aos fenóis.

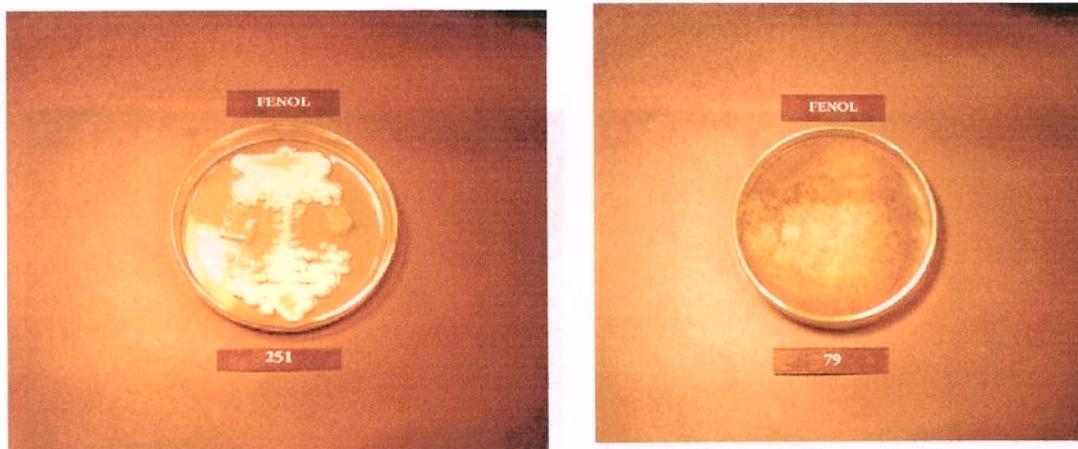


Figura 21: Crescimento das Linhagens 251(sensível) e 79 (resistente), em meio PDA, com deposição de fenol.

A Linhagem Fúngica 265 (Figura 22) apresentou o halo de inibição e por este motivo foi abandonada. Na mesma Figura observa-se que a Linhagem 254 é uma das poucas linhagens bacterianas que apresentou sucesso nos ensaios preliminares de degradação de compostos tóxicos, neste caso o pirazole, e por esse motivo especial mereceu destaque e observação mais detalhada.

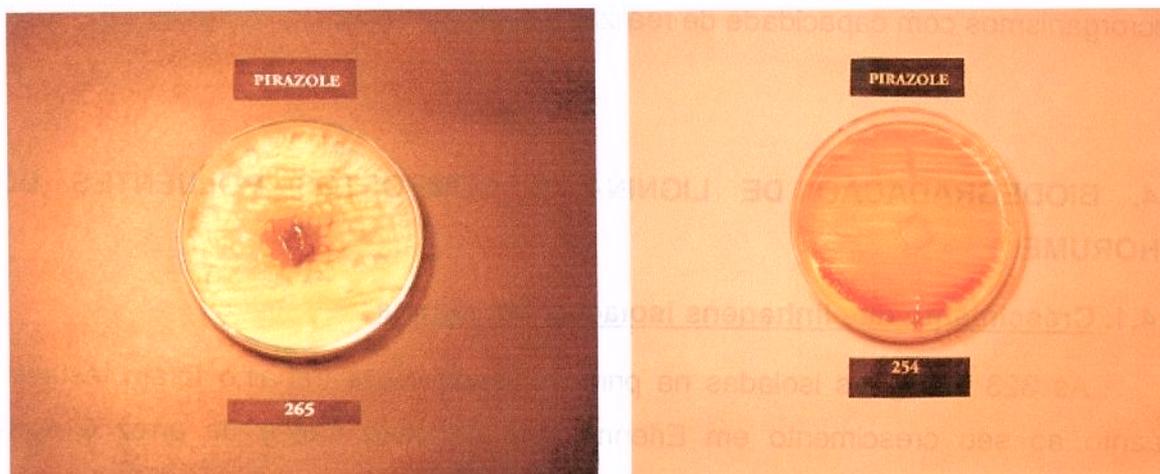


Figura 22: Crescimento das Linhagens 265 (sensível) e 254 (resistente), em meio PDA, com deposição de pirazole.

Outro exemplo pode ser observado na figura 23. Os microrganismos 178 e 248 apresentaram características de crescimento diversas, na presença de catecol. A linhagem 178 apresentou sensibilidade ao catecol enquanto a linhagem 248 foi resistente.

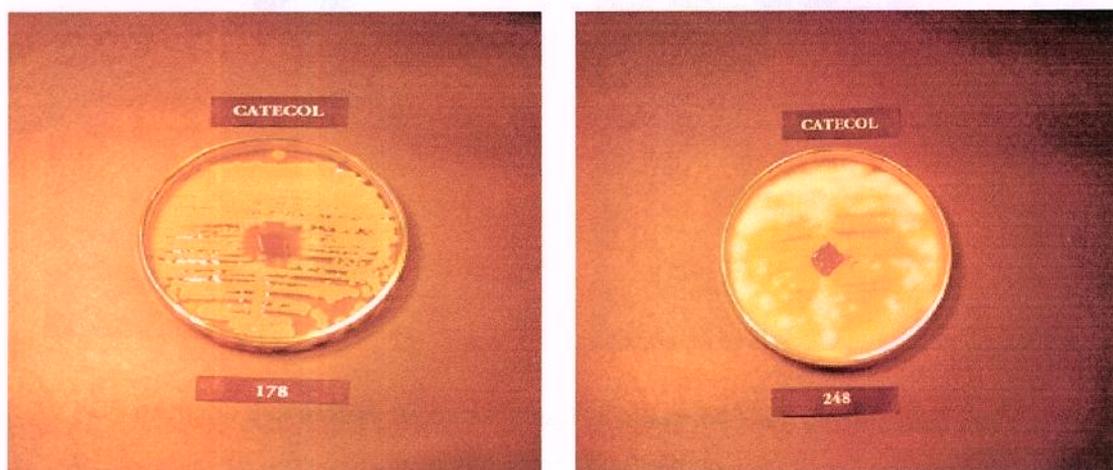


Figura 23: Crescimento das Linhagens 178 (sensível) e 248 (resistente), em meio PDA, com deposição de catecol.

Após a realização deste experimento foi possível observar quais as linhagens que apresentaram maior potencial de biodegradação e, aliando-se estes resultados com os de degradação de lignina, apresentados na Tabela 11, foram selecionados microrganismos com capacidade de realizar a biodegradação do chorume.

4.4. BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E COMPOSTOS POLUENTES DO CHORUME.

4.4.1. Crescimento das linhagens isoladas, em lignina

As 323 linhagens isoladas na primeira etapa deste trabalho foram testadas quanto ao seu crescimento em Erlenmeyers contendo casca de arroz e água destilada; ou fibra de trigo e água destilada. Das 323 linhagens, foram selecionadas 44 com maior quantidade de crescimento mensurável visualmente, e então

foram crescidas novamente nos mesmos substratos, porém, com a quantificação posterior da degradação de lignina.

A Figura 24 mostra o controle abiótico e as Linhagens 74, 100, 108, 184 e 203 crescendo nos substratos testados. A lignina residual foi determinada como sendo a parte do substrato não solúvel após tratamento com HCl e H₂SO₄. A perda de matéria orgânica foi calculada pela diferença entre o peso seco das amostras no início e no final da incubação, utilizando-se controles abióticos.

Este foi um experimento bastante demorado, por se tratar de grande quantidade de amostras crescendo em intervalos de tempo de 60 dias e em triplicata.

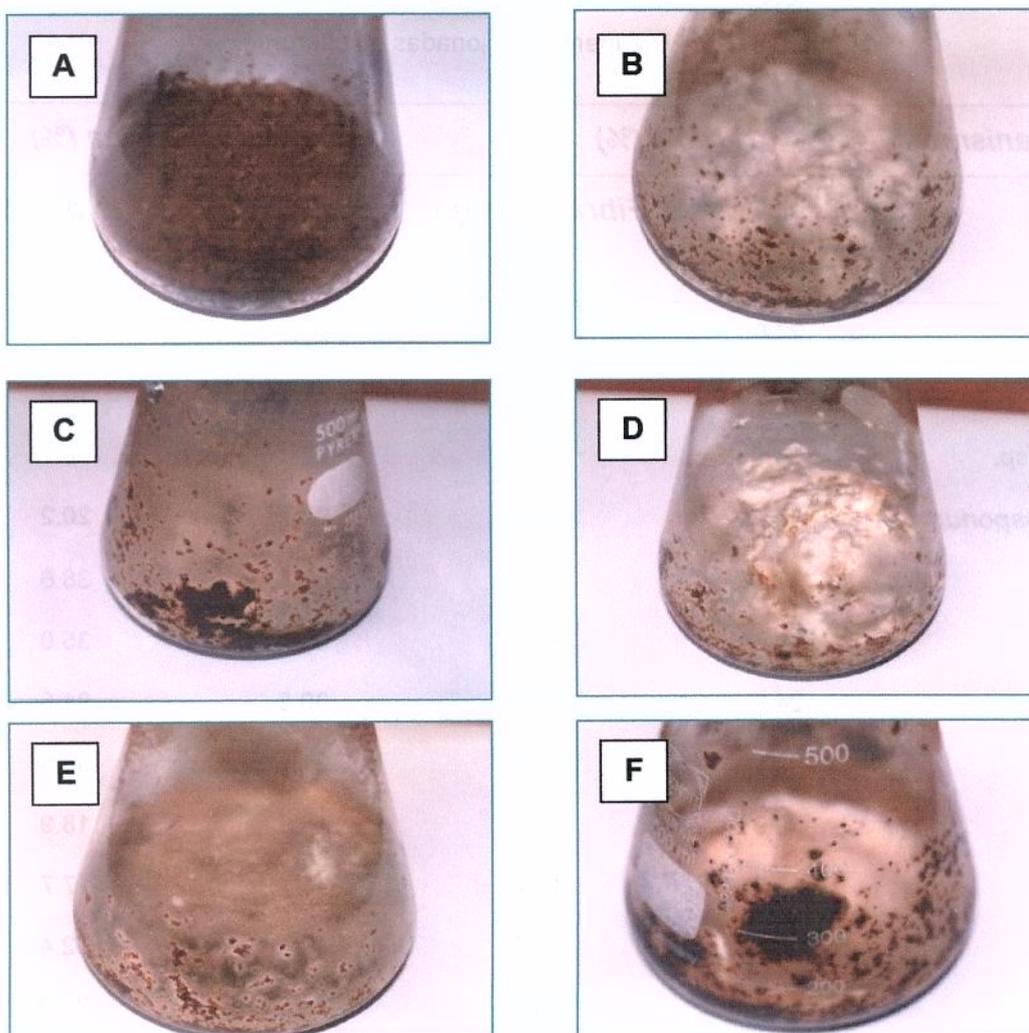


Figura 24: Controle branco (a), Linhagem 74 (b), Linhagem 100 (c), linhagem 108 (d), Linhagem 184 (e) e Linhagem 203 (f) em Erlenmeyer contendo casca de arroz e água destilada, após 60 dias em estufa a 30°C, ambiente aeróbio.

Como resultado destes experimentos, pode-se observar que entre as 44 linhagens selecionadas para este teste, as que apresentaram melhor crescimento visual nos Erlenmeyers, apresentaram também uma grande capacidade em diminuir o teor de lignina dos substratos analisados (Tabela 11). Comparativamente, as maiores taxas de degradação de lignina ocorreram quando o microrganismo cresceu sobre o substrato fibra de trigo. Do total de linhagens analisadas, 15 apresentaram melhor atividade ligninolítica, e estão apresentadas na Tabela 11. Estão realçadas em cinza as 15 linhagens com melhor atividade ligninolítica.

Tabela 11: Média da porcentagem de perda de matéria orgânica (PMO) e da perda de lignina (% do total de lignina sobre o peso seco), de palha de arroz e fibra de trigo em fermentação sólida (90 dias, 30 - 37°C) de 44 linhagens selecionadas do chorume.

<i>Microrganismos</i>	<i>PMO (%)</i>		<i>Perda de Lignina (%)</i>	
	<i>Casca de Arroz</i>	<i>Fibra de Trigo</i>	<i>Casca de Arroz</i>	<i>Fibra de Trigo</i>
<i>Fusarium sp.</i>	22.6	27.9	26.9	20.7
<i>Candida tropicalis</i>	7.92	8.4	11.7	16.3
<i>Pleurotus sp.</i>	18.5	16.7	22.4	18.4
<i>P. chrysosporium</i>	18.0	16.5	23.7	20.2
42 (F)	27.6	33.5	30.5	38.6
70 (F)	28.6	28.0	33.8	35.0
73 (F)	24.9	27.5	30.5	31.6
74 (F)	23.5	27.0	31.6	33.9
79 (F)	10.9	12.4	13.9	18.9
80 (F)	16.2	13.7	18.7	17.7
82 (F)	26.2	31.5	30.4	32.4
83 (F)	14.1	19.3	16.5	23.2
84 (F)	7.9	13.8	10.7	14.5
88 (F)	24.7	30.5	33.9	33.6

Continuação...

92 (F)	5.6	7.9	8.9	10.5
96 (F)	8.1	8.0	8.3	11.7
97 (F)	20.2	27.2	26.7	30.8
100 (F)	25.8	27.7	29.2	33.7
102 (B)	9.8	10.7	13.8	16.5
108 (F)	25.7	34.9	31.6	39.4
159 (B)	8.9	10.7	13.7	15.8
178 (F)	8.0	10.6	15.9	14.2
179 (F)	27.4	31.5	34.7	38.1
182 (F)	8.4	17.9	17.2	20.0
183 (F)	9.1	13.7	15.7	16.8
184 (F)	29.2	37.4	35.3	39.9
185 (F)	3.9	4.6	6.5	8.8
186 (F)	6.9	7.2	10.4	13.1
187 (F)	25.5	29.7	29.2	34.3
202 (F)	10.0	12.3	16.3	14.7
203 (F)	29.8	35.7	33.6	39.8
210 (B)	6.9	8.3	10.8	10.5
235 (B)	12.3	15.5	13.5	17.3
238 (B)	9.1	10.7	10.7	17.7
242 (B)	9.5	10.3	12.8	16.8
251 (B)	10.1	11.7	13.1	17.9
254 (B)	4.8	5.7	6.6	10.1
259 (B)	10.9	6.9	12.8	10.3
264 (F)	10.2	13.7	13.4	18.7
265 (F)	12.2	13.9	17.6	18.3
266 (F)	10.0	14.5	15.9	21.7

Continuação...				
270 (F)	29.1	35.3	31.7	36.2
289 (B)	14.5	18.4	20.6	23.7
306 (F)	24.61	28.8	30.8	36.3

F = FUNGO B = BACTÉRIA

Confrontando-se estes dados obtidos dos experimentos de degradação de lignina com os dados obtidos do experimento de resistência aos poluentes (Tabela 10), verificou-se que existem cinco linhagens eficientes nos dois testes. Na Tabela 12 (página 87) estes resultados podem ser melhor visualizados. Destacadas em cinza estão as linhagens eficientes nos dois experimentos.

Além das Linhagens 74, 100, 108, 184 e 203, a Linhagem bacteriana 254 continuou sendo estudada, por ser a única linhagem bacteriana com alta resistência aos compostos tóxicos: fenol, catecol e pirazole. Estes seis microrganismos foram utilizados na degradação do chorume durante a realização dos testes I a IV.

4.4.2. Estudo da descolorização do chorume

Após a realização dos experimentos I, II, III e IV, as Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 apresentaram certa dificuldade para crescer, quando o chorume foi utilizado como substrato sem a adição dos nutrientes (glicose - 0,5% e extrato de leveduras - 0,1%) ou quando o chorume foi autoclavado. A descolorização pode ser visualizada em todos os gráficos como uma curva menor de espectro em relação àquela obtida na leitura do controle branco, ou seja, sem inóculo. Como a cada seis dias em um período de 30 dias foram retiradas alíquotas, existem 5 curvas de espectro para cada linhagem testada, em cada experimento mais a curva do controle. A diminuição do espectro em relação ao controle branco mostra que os componentes do chorume podem estar sendo consumidos ou degradados, e por esse motivo não são detectados na espectroscopia de absorção. Dessa forma, desenham-se curvas diferentes daquelas obtidas do chorume sem crescimento, que apresenta maior absorção.

Tabela 12: Linhagens selecionadas resistentes a fenol, pirazole e catecol e degradadoras de lignina.

Microrganismos	Resistência a Poluentes	Degradação de Lignina
42 (F)	0	X
70 (F)	0	X
73 (F)	0	X
74 (F)	X	X
82 (F)	0	X
88 (F)	0	X
96 (F)	X	0
97 (F)	0	X
100 (F)	X	X
108 (F)	X	X
179 (F)	0	X
184 (F)	X	X
186 (F)	X	0
187 (F)	0	X
202 (F)	X	0
203 (F)	X	X
254 (B)	X	0
264 (F)	X	0
266 (F)	X	0
268 (F)	X	0
269 (F)	X	0
270 (F)	0	X
306 (F)	0	X

F = FUNGO B = BACTÉRIA

Os resultados foram apresentados em forma de gráficos, e somente as linhagens que se destacaram dentro de cada experimento foram mostradas.

Estes resultados de descolorização podem ser vistos nas Figuras 25 (Experimento I), 26 (Experimento II), 27 (Experimento III), 28 e 29 (Experimento IV), 30 e 31 (Experimento V), 32 (Experimento VI), 33 (Experimento 7) e 34 (Experimento VIII). Os experimentos III e IV apresentaram melhores resultados de descolorização. Isso pode ser explicado, pois nestes experimentos houve a adição de nutrientes, o que aumentou o crescimento microbiano. Nos outros testes o crescimento foi bem menor.

No experimento I não houve grandes mudanças em relação ao espectro de absorção do controle. Todas as linhagens cresceram pouco, indicando que o chorume autoclavado não é um bom substrato para crescimento microbiano. Após a autoclavagem, o chorume tem alguns de seus componentes “coagulados”, o que impede o acesso dos microrganismos para sua degradação. Na Figura 25, a Linhagem 74 apresenta as curvas de degradação semelhantes aos outros microrganismos no mesmo experimento. Nota-se a pouca diferença entre as curvas, o que indica que a amostra de chorume não está sofrendo grandes mudanças pela ação dos microrganismos. A falta de adição de nutrientes parece também ter colaborado para esse resultado insatisfatório.

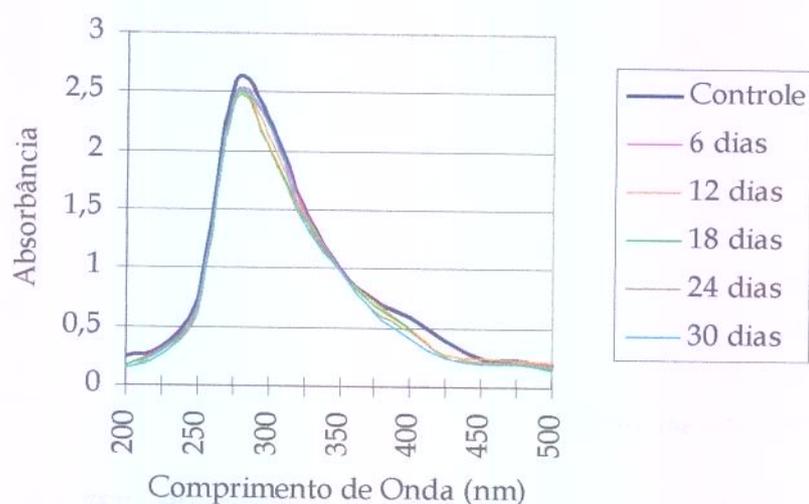


Figura 25: Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da Linhagem 74, durante a realização do experimento I.

Como resultados do experimento II, a Linhagem 184 (Figura 26) foi a que mais se destacou. As curvas de espectro estão abaixo da curva do controle. Neste caso (experimento II) o chorume não foi autoclavado. O acesso dos microrganismos aos componentes do chorume foi favorecido, o que pode explicar essa melhora da biodegradação. Além disso, por não ser autoclavado, os microrganismos naturalmente presentes no chorume atuaram num consórcio juntamente com a linhagem em teste. Os microrganismos já adaptados ao chorume podem ter interferido no crescimento dos microrganismos em teste.

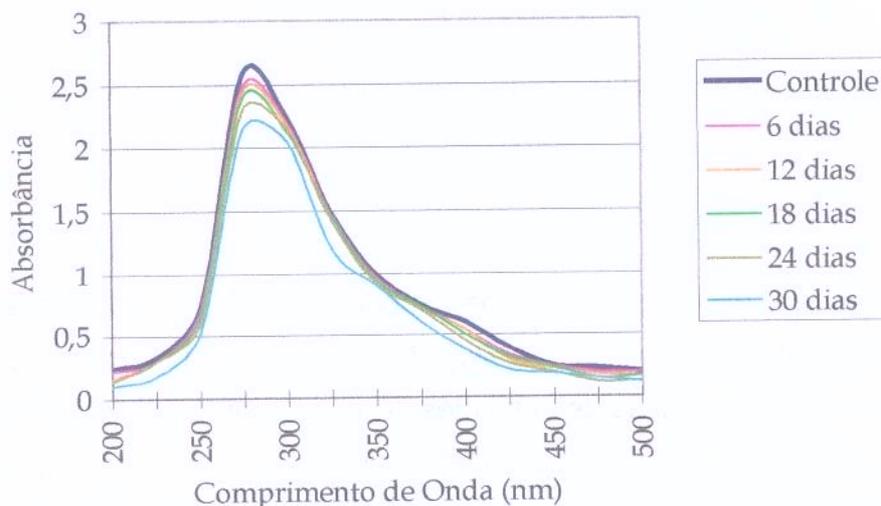


Figura 26: Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da Linhagem 184, durante a realização do experimento II.

Na Figura 27, novamente a Linhagem 184 é mostrada. Esta Linhagem mostrou melhor desempenho na degradação dos compostos do chorume, durante a realização do experimento III, atingindo um máximo de degradação de compostos da ordem de 29,6%. Neste experimento o chorume foi autoclavado. Era de se esperar que o crescimento fosse menor, mas como foram adicionados nutrientes (glicose 0,5% e extrato de leveduras 0,1%), estes parecem ter favorecido o crescimento da Linhagem 184.

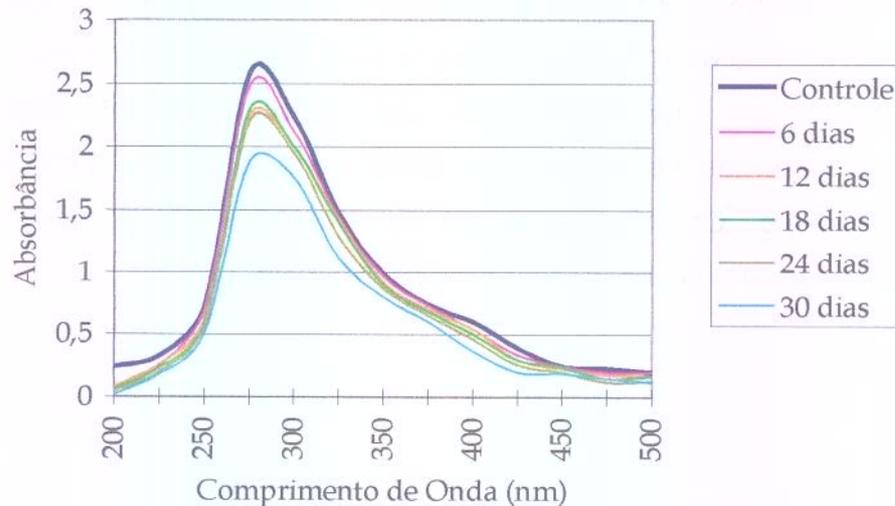


Figura 27: Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da Linhagem 184, durante a realização do experimento III.

Quanto ao experimento IV, as Linhagens 100 e 184 apresentaram os melhores resultados (Figuras 28 e 29). Neste experimento, o chorume não foi autoclavado e houve a adição de nutrientes. Nota-se, com o passar do tempo, que as curvas que representam o espectro de absorção do chorume apresentam diminuição considerável, o que indica que a amostra está sofrendo mudanças em sua composição, sendo alguns compostos degradados pelas enzimas ou ataque microbiano direto.

Quando se compara as duas Linhagens (100 e 184) num mesmo experimento, a diferença é facilmente observada (Figuras 28 e 29), e a Linhagem 184 apresenta vantagens sobre a Linhagem 100, pelo menos no que diz respeito à diminuição da cor da amostra de chorume.

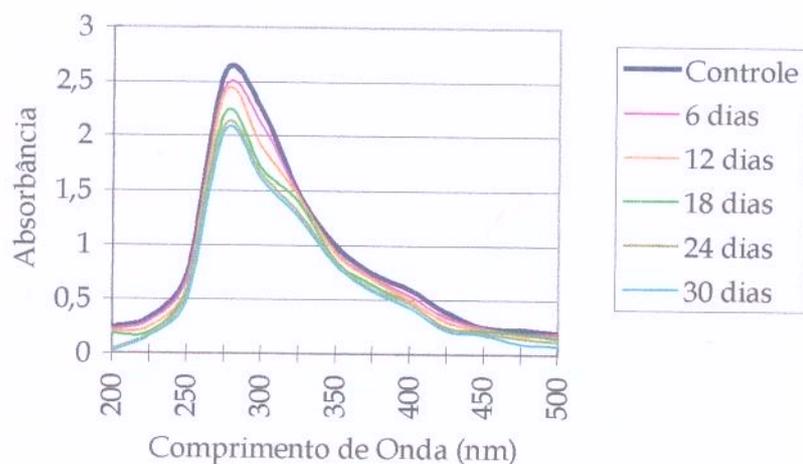


Figura 28: Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da Linhagem 100, durante a realização do experimento IV.

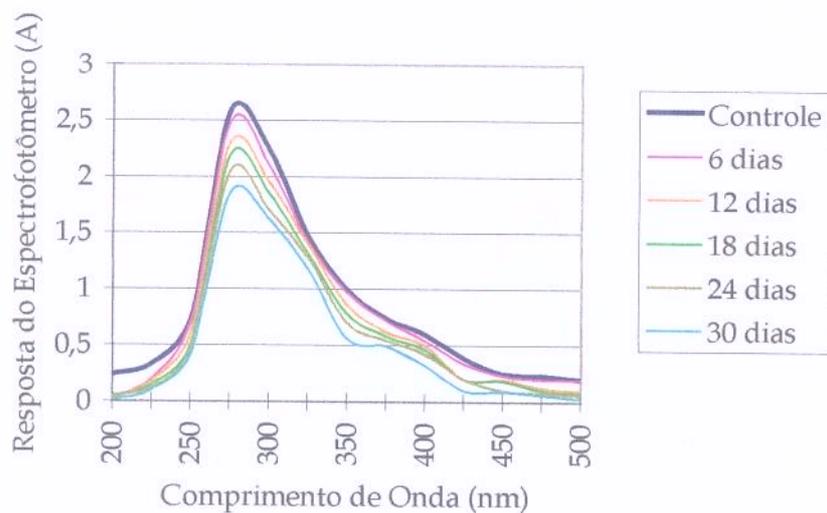


Figura 29: Espectroscopia de absorção de sobrenadante da cultura da Linhagem 184, durante a realização do experimento IV.

As figuras 30 e 31 apresentam os resultados de crescimento das melhores Linhagens (108 e 184) após a realização do experimento V. De acordo com essas Figuras, a Linhagem 184 revela-se novamente com melhor capacidade degradativa,

diminuindo os compostos que poderiam ser detectados na espectroscopia de absorção.

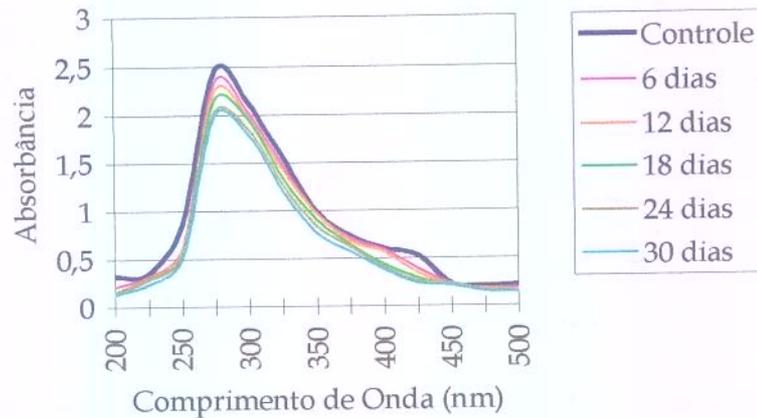


Figura 30: Espectroscopia de absorção do chorume após crescimento da Linhagem 108, durante a realização do experimento V.

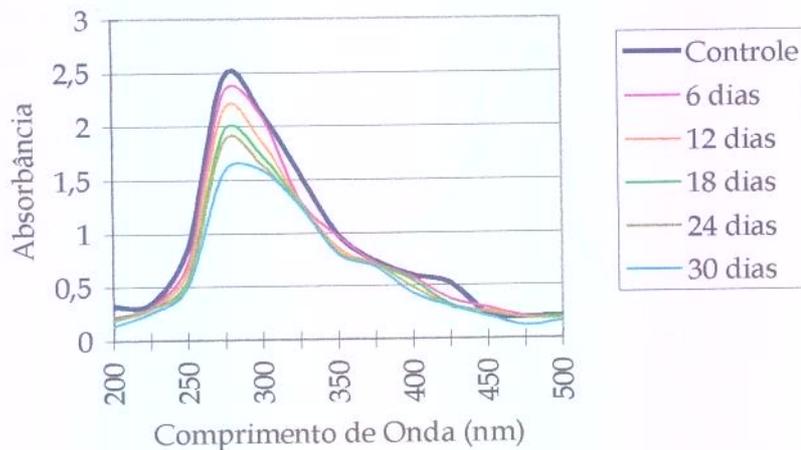


Figura 31: Espectroscopia de absorção do chorume após crescimento da Linhagem 184, durante a realização do experimento V.

A utilização de sacarose e avicel como fontes de carbono não melhoraram o crescimento das linhagens como se esperava e o que se pode observar é a formação de curvas muito parecidas entre as alíquotas retiradas a cada 6 dias e a

amostra de chorume. O crescimento microbiano foi bem menor, o que impediu ou dificultou a síntese de enzimas microbianas responsáveis pela degradação do chorume (Figuras 32, 33 e 34).

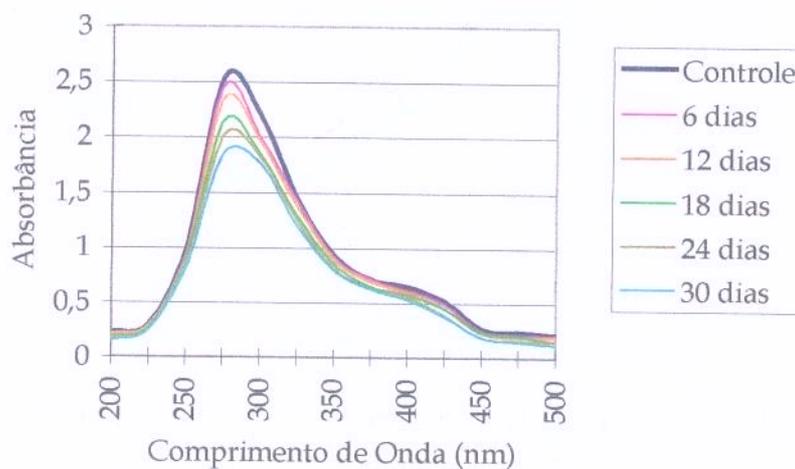


Figura 32: Espectroscopia de absorção do chorume após crescimento da Linhagem 100, durante a realização do experimento VI.

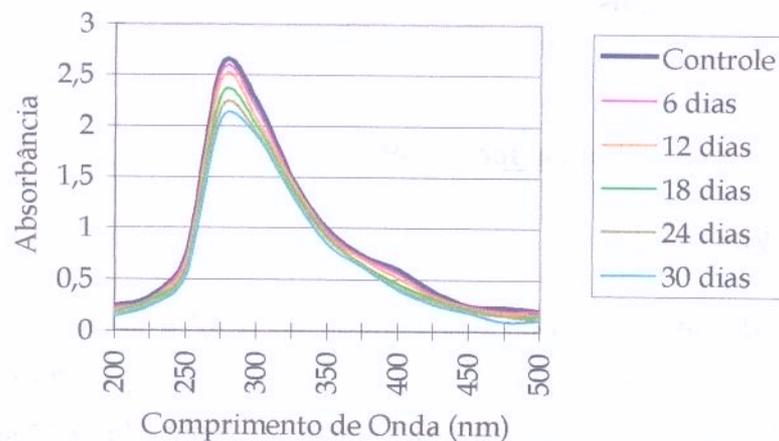


Figura 33: Espectroscopia de absorção do chorume após crescimento da Linhagem 100, durante a realização do experimento VII.

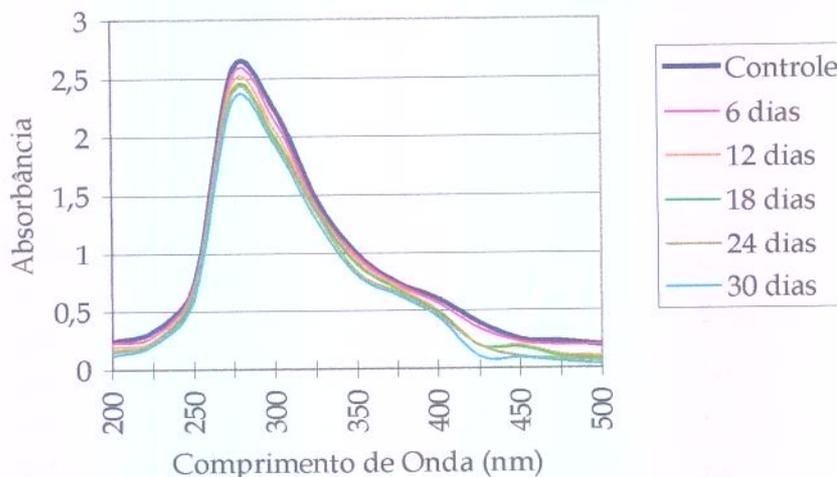


Figura 34: Espectroscopia de absorção do chorume após crescimento da Linhagem 184, durante a realização do experimento VIII.

Num aspecto geral, pode-se concluir após a realização dos experimentos de espectroscopia de absorção que as linhagens que apresentaram melhor descolorização do chorume, de um modo geral, foram as Linhagens 74, 100 e principalmente a Linhagem 184. Esta última sempre apresentou um crescimento micelial maior que as outras.

4.5.3. Determinação da massa seca e pH

4.5.3.1. Massa seca

Como pode ser observado nas Figuras 35 a 42 a seguir, as linhagens que apresentaram maior crescimento, nos diferentes experimentos, foram as linhagens 74, 100 e 184, sendo que esta última mostrou-se bastante promissora quanto à degradação do chorume. Dentre os experimentos realizados, aqueles em que houve a adição de nutrientes apresentaram maior crescimento microbiano.

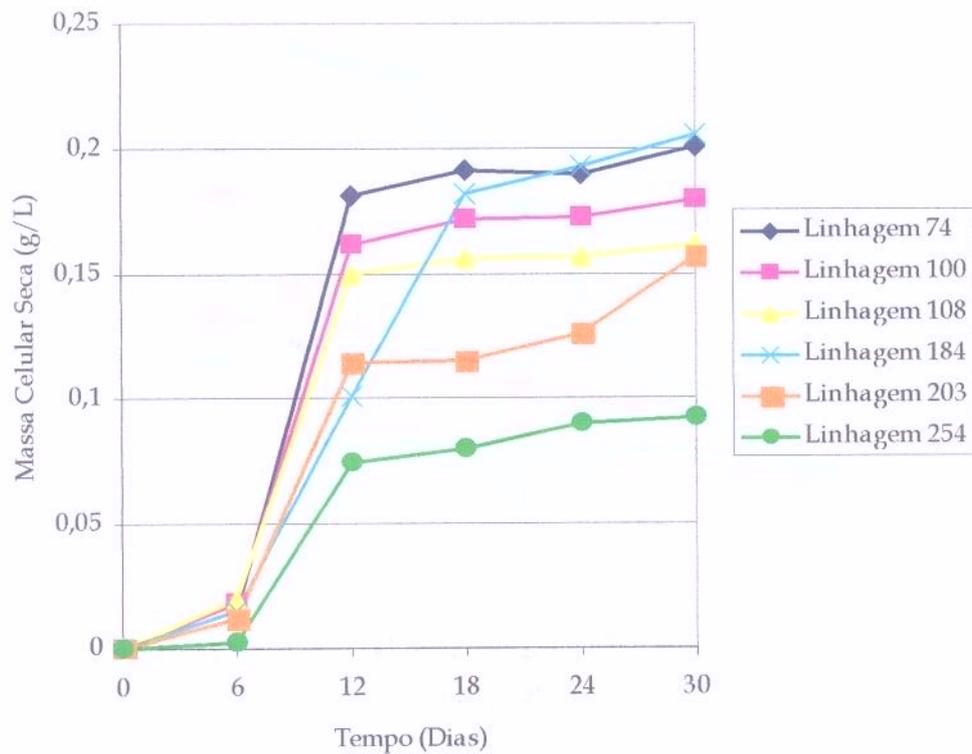


Figura 35: Quantificação da massa seca das Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 durante a realização do experimento I.

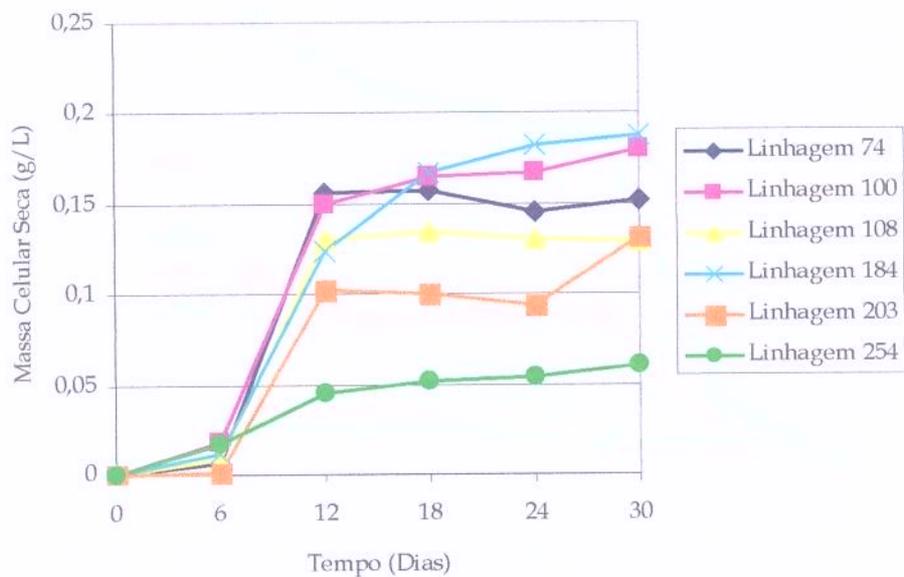


Figura 36: Quantificação da massa seca das Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 durante a realização do experimento II.

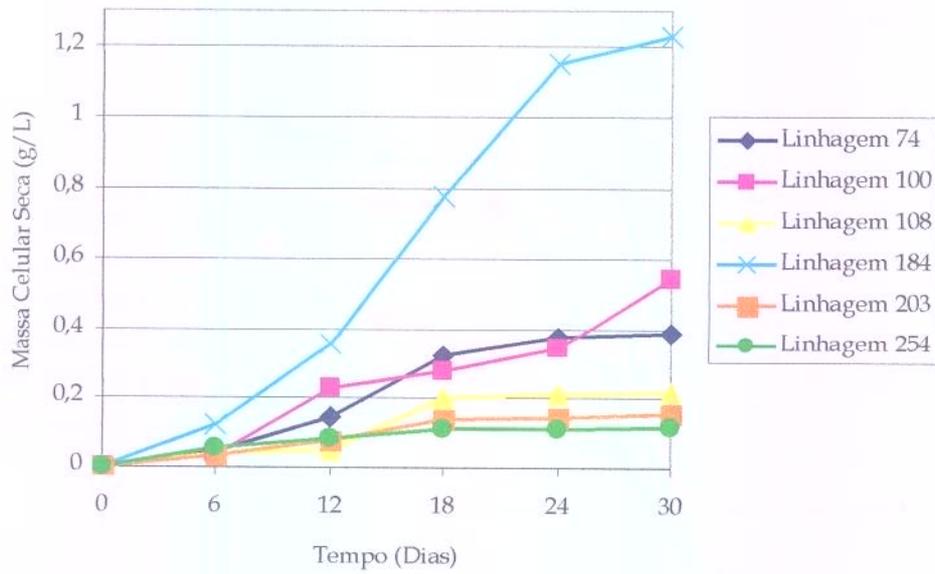


Figura 37: Quantificação da massa seca das Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 durante a realização do experimento III.

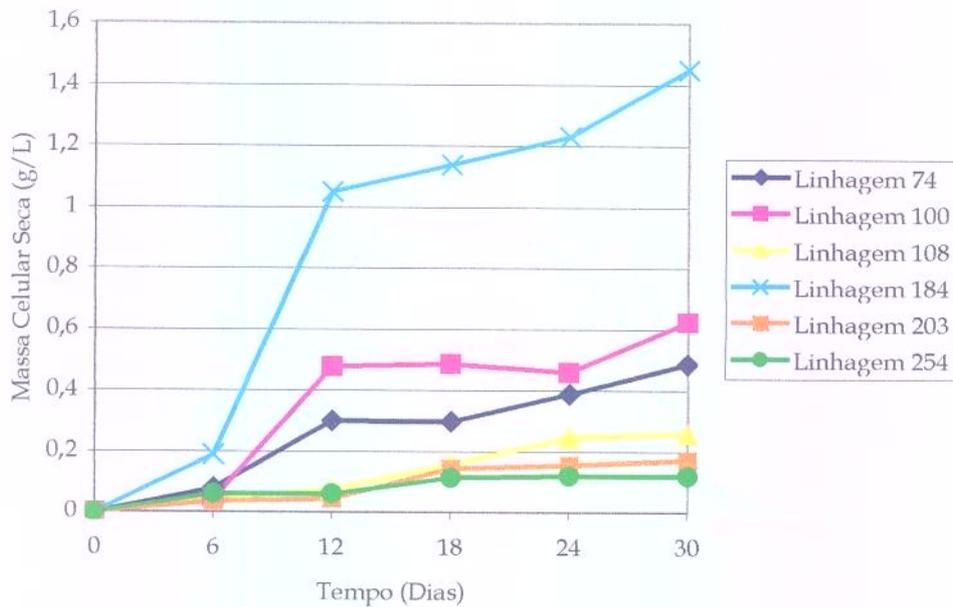


Figura 38: Quantificação da massa seca das Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254 durante a realização do experimento IV.

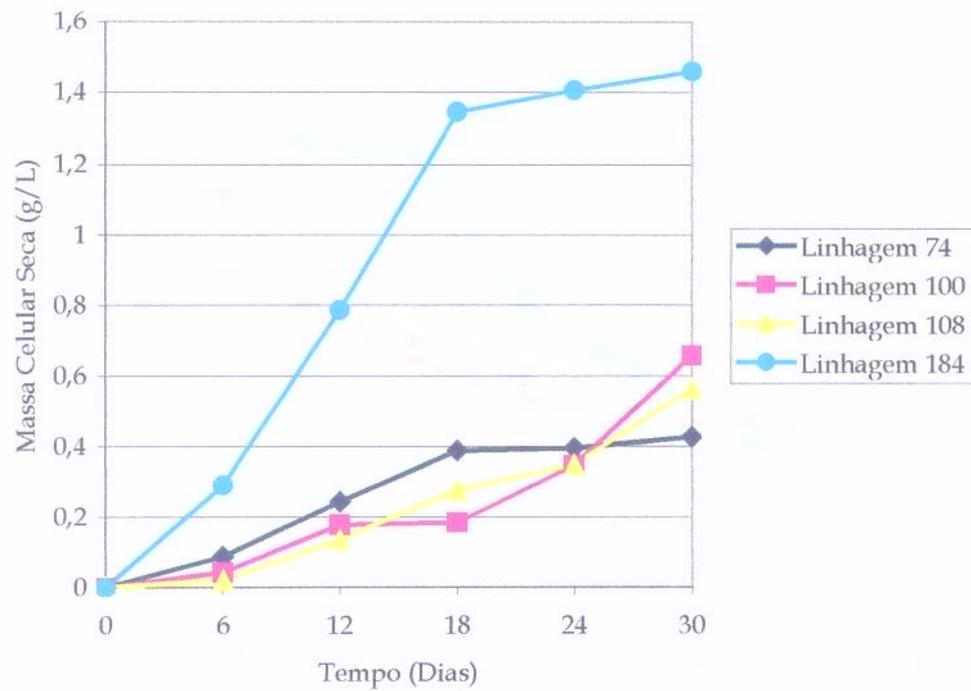


Figura 39: Quantificação da massa seca das Linhagens 74, 100, 108 e 184 durante a realização do experimento V.

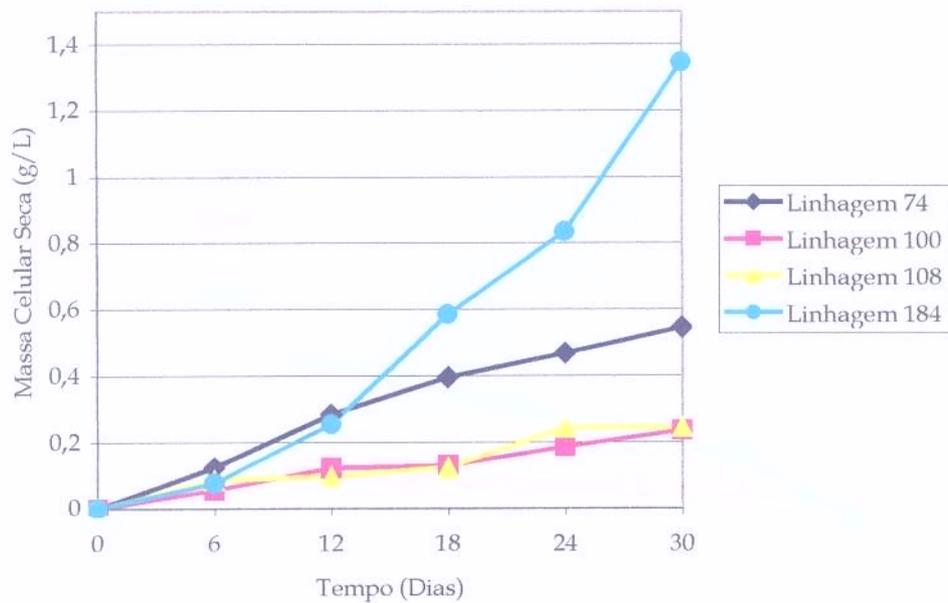


Figura 40: Quantificação da massa seca das Linhagens 74, 100, 108 e 184 durante a realização do experimento VI.

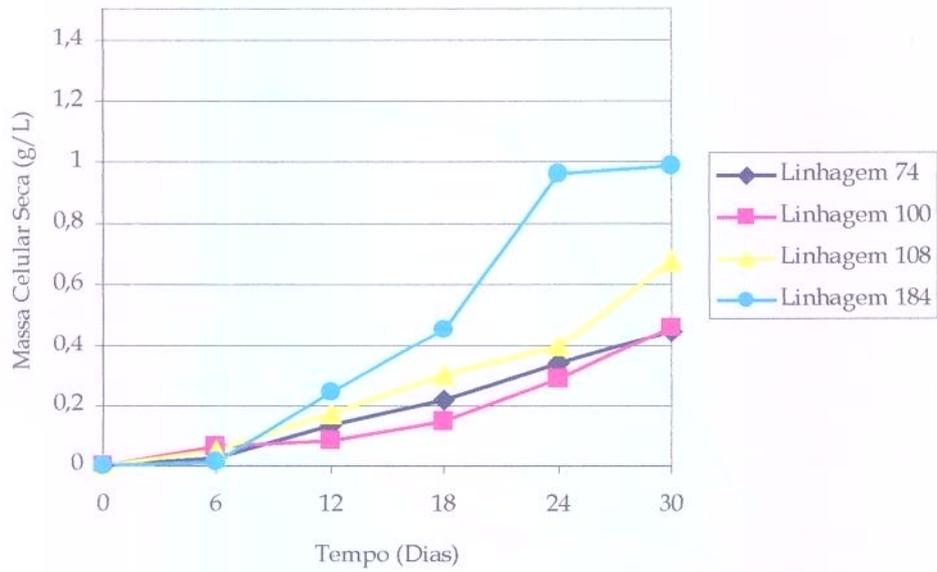


Figura 41: Quantificação da massa seca das Linhagens 74, 100, 108 e 184 durante a realização do experimento VII.

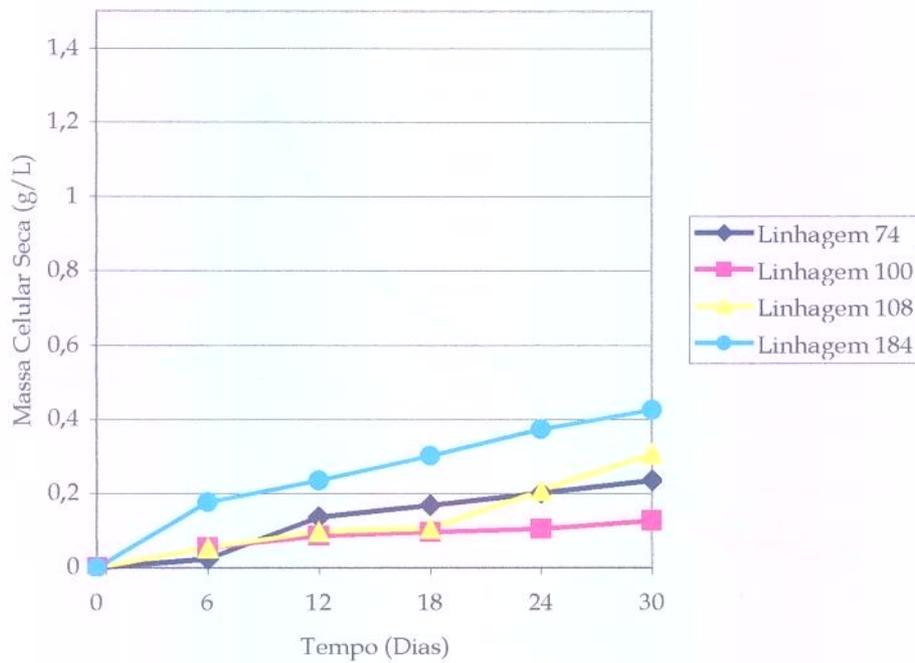


Figura 42: Quantificação da massa seca das Linhagens 74, 100, 108 e 184 durante a realização do experimento VIII.

A Linhagem 184 destaca-se das outras em todos os testes realizados. O crescimento é bem maior em relação aos outros microrganismos, o que mostra um poder de adaptação bastante grande desta quando crescida em chorume, adicionando ou não nutrientes.

A massa celular seca foi maior nos experimentos: III, (Figura 37); IV, (Figura 38); V, (Figura 39); e, VI, (Figura 40) . Nestes experimentos houve adição de nutrientes (glicose, sacarose e extrato de leveduras em proporções variáveis), e o chorume utilizado só foi autoclavado em uma das ocasiões (experimento III, Figura 37).

4.4.3.2. pH

A determinação do pH também foi acompanhada durante o crescimento das linhagens nos experimentos realizados, mas esta determinação não forneceu dados conclusivos sobre o efeito do pH na degradação do chorume. Para cada nova análise eram coletadas novas amostras de chorume, pois a conservação do chorume é bastante difícil, mesmo quando as amostras são congeladas. O chorume utilizado nestes experimentos apresentou um pH alto, de 9,04 logo após sua retirada dos poços, no aterro sanitário e é diferente daquele observado nas primeiras caracterizações físico-químicas realizadas no início do desenvolvimento deste projeto, o que mais uma vez nos mostra o quão complexa é a formação do chorume e dos vários elementos que o compõem. O que se percebe nas Figuras 43 a 50, é que a Linhagem 184 novamente apresenta comportamento diferente das outras (exceto nos experimentos V a VIII – Figuras 47 a 50), e durante o seu crescimento, os valores de pH elevam-se, alcalinizando o meio de cultura. O mesmo pode ser observado com outras linhagens (203 e 254), porém, em menor proporção.

Nas Figuras 43 a 50 estão apresentados os dados obtidos na determinação do pH. O acompanhamento foi realizado por potenciometria.

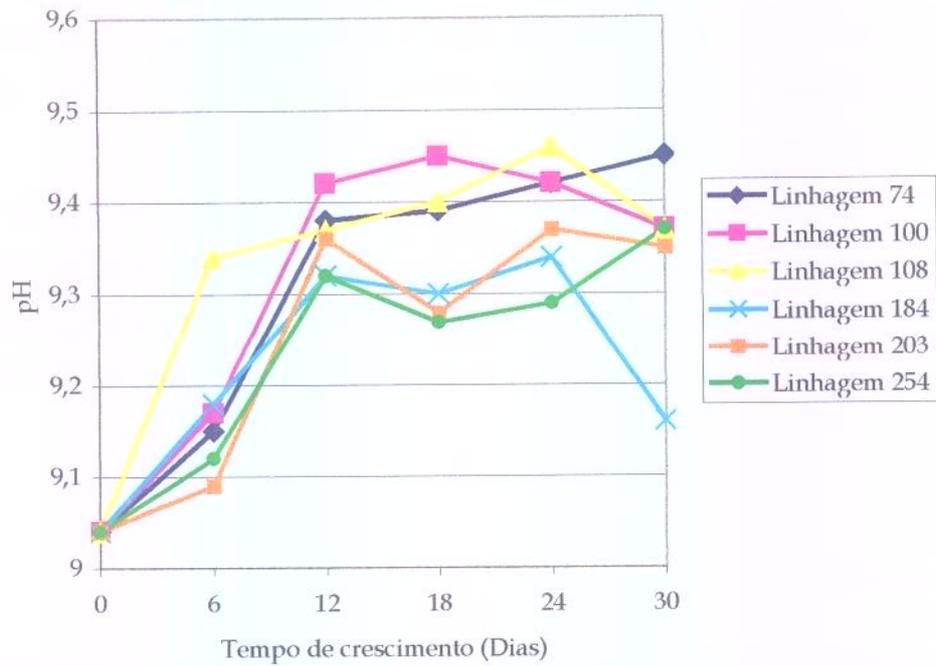


Figura 43: Variação do pH durante o crescimento das Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254, no experimento I.

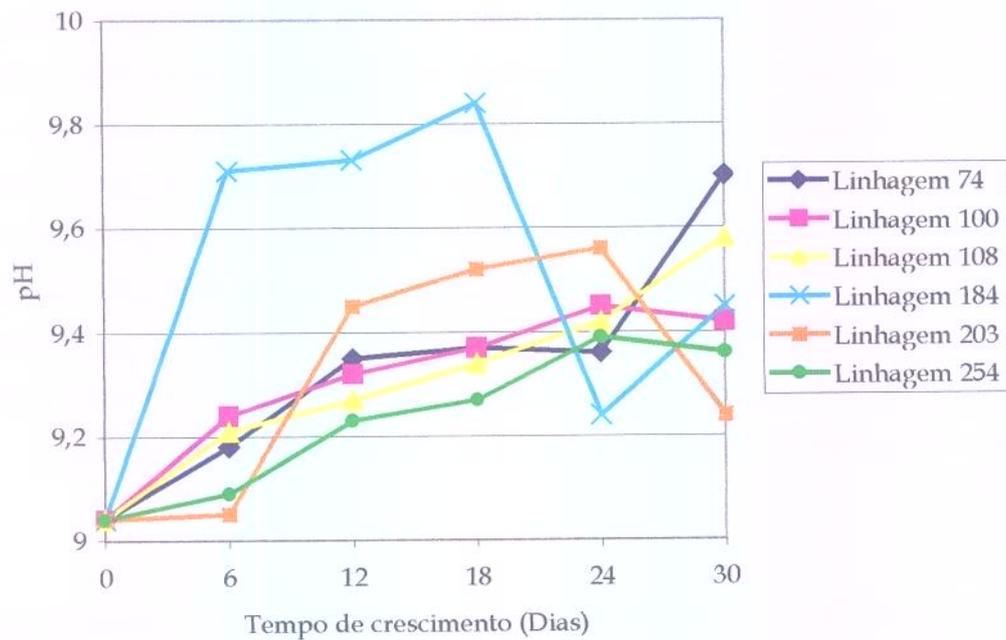


Figura 44: Variação do pH durante o crescimento das Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254, no experimento II.

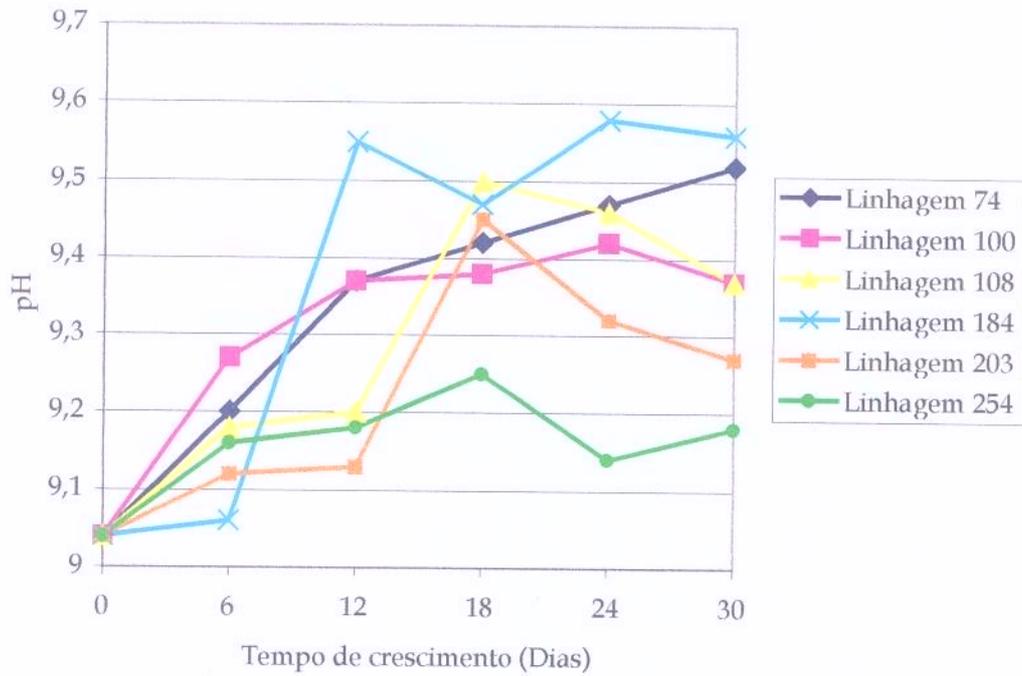


Figura 45: Variação do pH durante o crescimento das Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254, no experimento III.

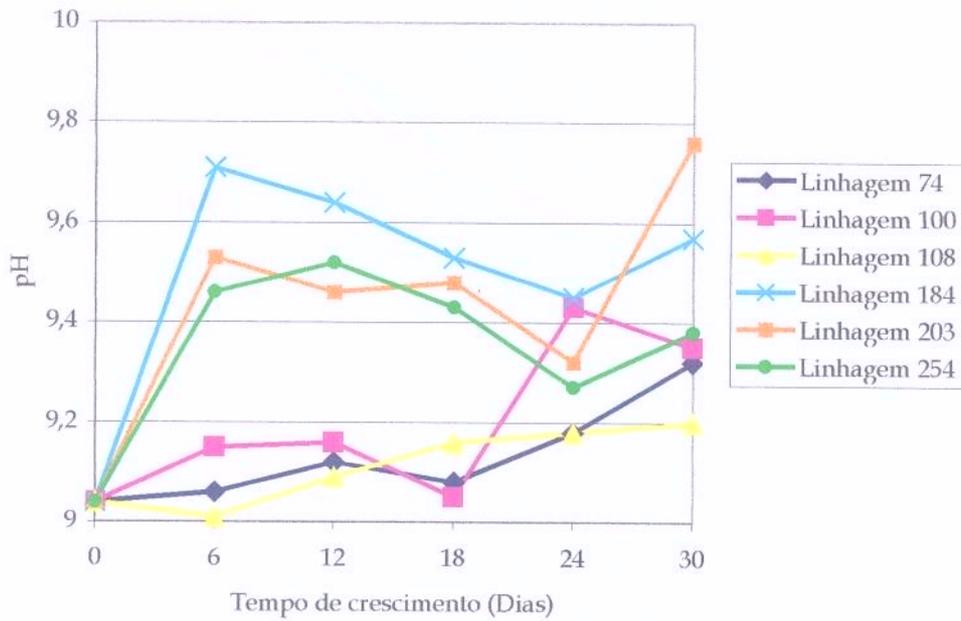


Figura 46: Variação do pH durante o crescimento das Linhagens 74, 100, 108, 184, 203 e 254, no experimento IV.

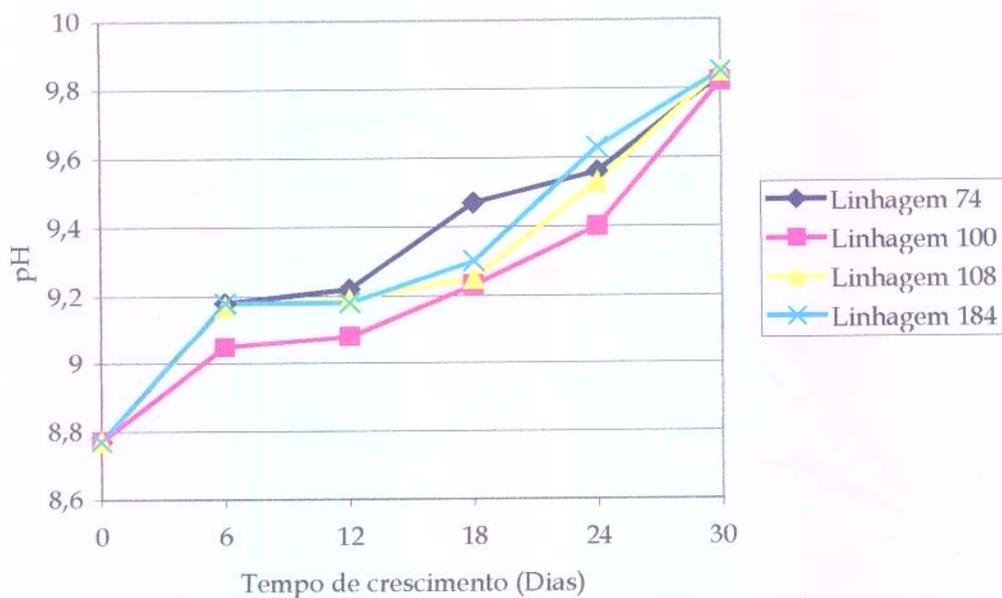


Figura 47: Variação do pH durante o crescimento das Linhagens 74, 100, 108 e 184, no experimento V.

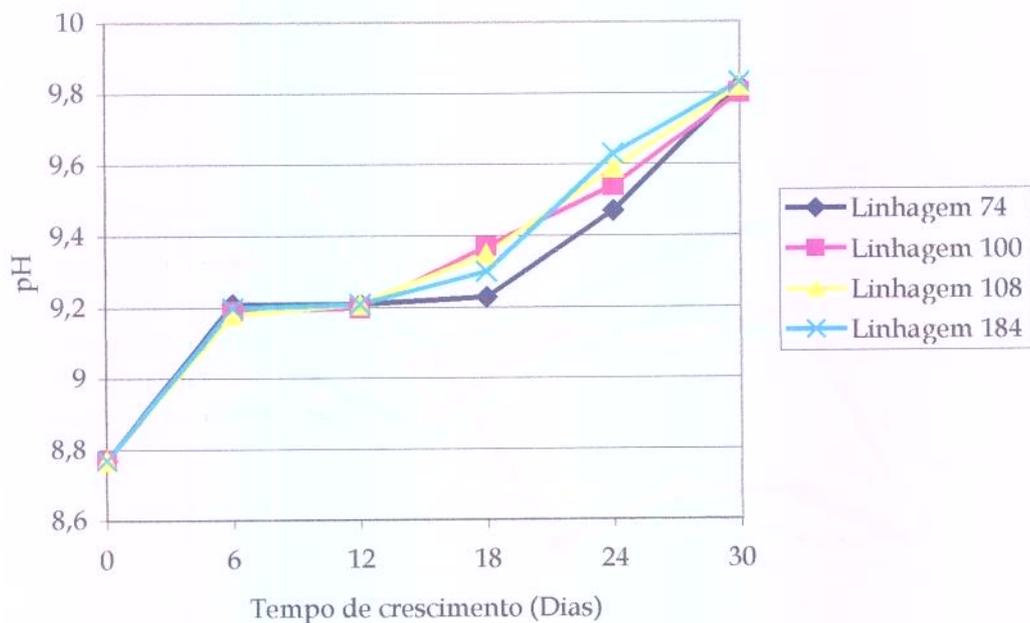


Figura 48: Variação do pH durante o crescimento das Linhagens 74, 100, 108 e 184, no experimento VI.

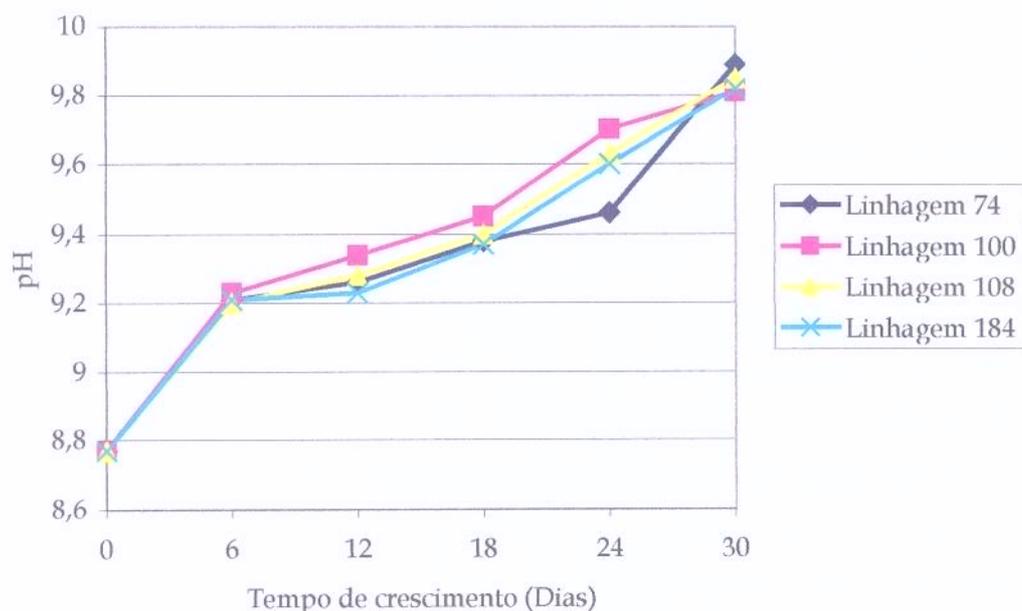


Figura 49: Variação do pH durante o crescimento das Linhagens 74, 100, 108 e 184, no experimento VII.

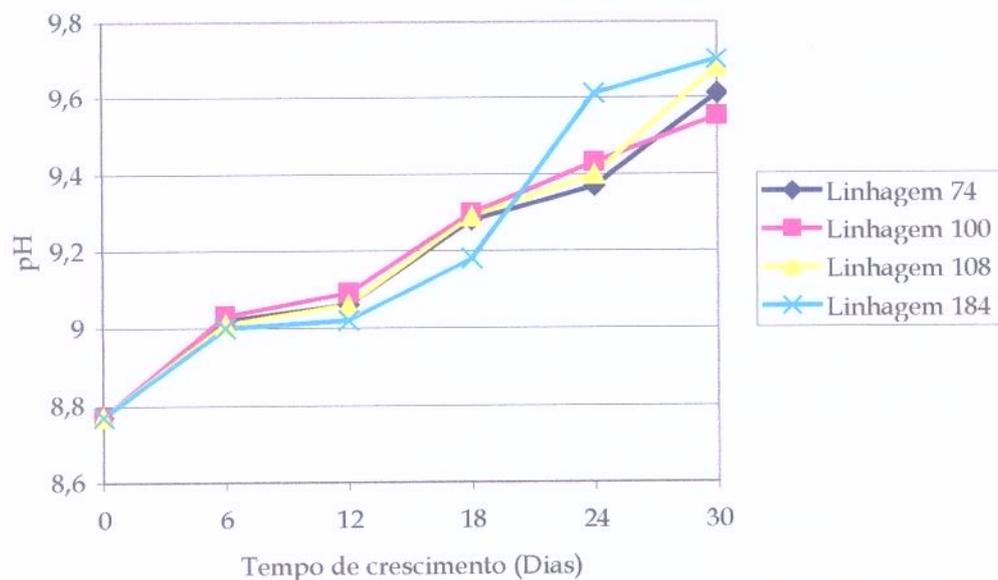


Figura 50: Variação do pH durante o crescimento das Linhagens 74, 100, 108 e 184, no experimento VIII.

Todos os gráficos apresentam valores de pH altos. As linhagens em estudo são, em sua maioria fungos (com exceção de uma Linhagem bacteriana, 254), e

teriam predileção por ambientes que apresentassem pH próximo à neutralidade, ou um pouco ácido. Este ambiente alcalino propicia uma maior dificuldade para a degradação dos compostos presentes nas amostras. Os microrganismos, acostumados a valores de pH mais baixos, necessitam de adaptação a meios com pH mais elevado. Uma tentativa de reduzir o pH antes da inoculação dos fungos resultou num crescimento microbiano bem menor. Quando se alterou o pH por meio de adição de ácidos, uma precipitação de compostos do chorume teve início. Quanto mais ácidos se adicionava (H_2SO_4 0,1N e HCl 0,1N), maior a quantidade de precipitado se formava e o chorume, por sua vez, perdeu um pouco de sua cor. Os compostos precipitados provavelmente sejam substâncias húmicas que induzem a síntese de enzimas ligninolíticas e o ataque enzimático ao substrato. Uma vez precipitados, os ácidos húmicos não estão mais disponíveis, e o ataque enzimático fica prejudicado. Os nutrientes e outros compostos químicos também podem estar adsorvidos aos ácidos húmicos e sua precipitação dificulta o ataque enzimático.

4.5. DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E QUANTIFICAÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)

Nas Figuras 51 a 54 são apresentados os resultados da determinação das atividades enzimáticas de MnP, LiP e Peroxidases, e a variação da DQO obtidas a partir do experimento I (chorume autoclavado e sem adição de nutrientes, agitação a 150 rpm e temperatura de 30 °C).

De um modo geral a produção de enzimas foi pequena, com picos de produção de LiP no meio e final dos crescimentos (18 e 24 dias). A produção de outras enzimas não apresentou significância. Nestes experimentos, a Linhagem 74 foi a que apresentou melhor resultado aparente de remoção da DQO, com máximo de 16,9 % de remoção. O tempo envolvido no experimento (30 dias) é pequeno para se falar em remoção efetiva da DQO.

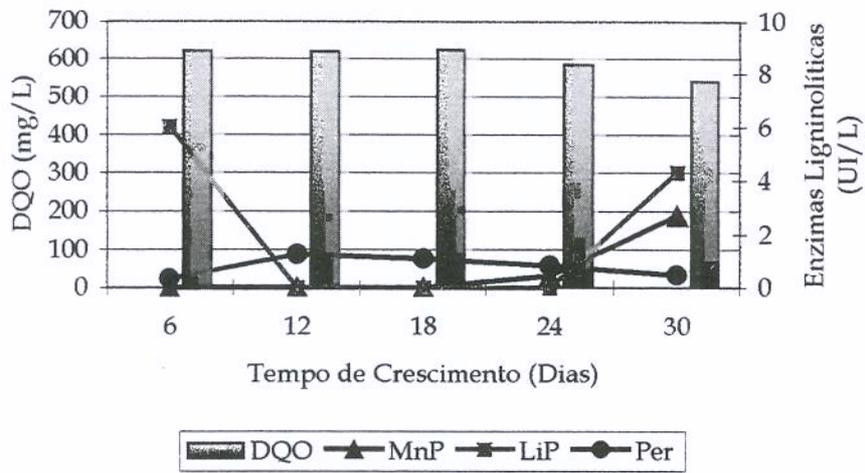


Figura 51: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 74, no experimento I.

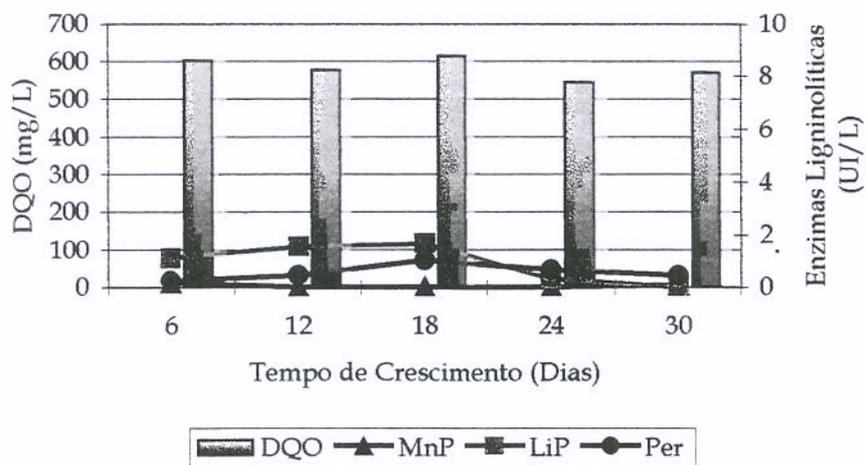


Figura 52: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 100, no experimento I.

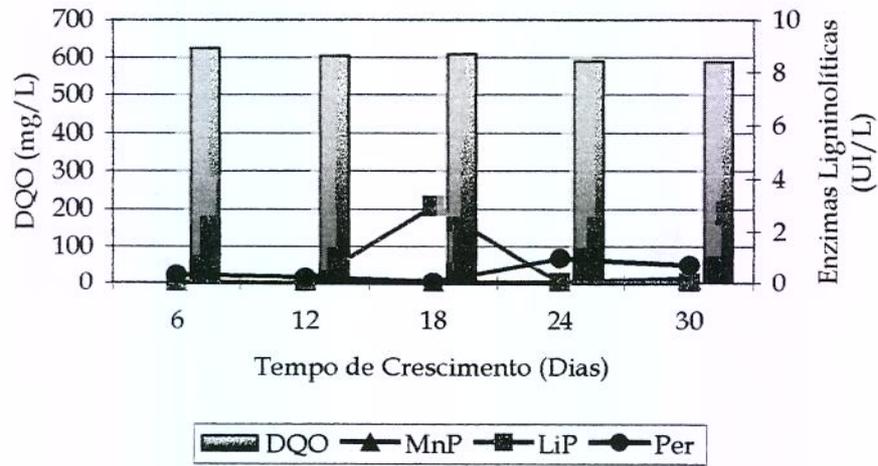


Figura 53: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 108, no experimento I.

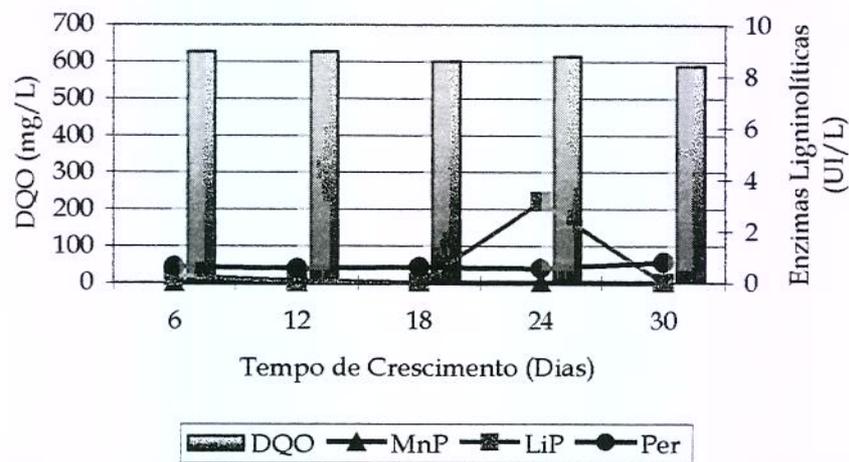


Figura 54: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 184, no experimento I.

No experimento II (chorume sem autoclavar, sem adição de nutrientes, agitação a 150 rpm e temperatura de 30 °C), a produção de enzimas também não apresentou resultados satisfatórios. Como pode ser visto nas Figuras 55 a 58, as enzimas LiP e MnP predominam aos 18 e 24 dias para algumas linhagens, sendo que, quando elas ocorreram (Linhagens 74 e 184), a variação da DQO pôde ser visualizada, atingindo máximo de 38,1% de remoção para a Linhagem 74 (Figura 55) e 22,7 % para a Linhagem 184 (figura 58).

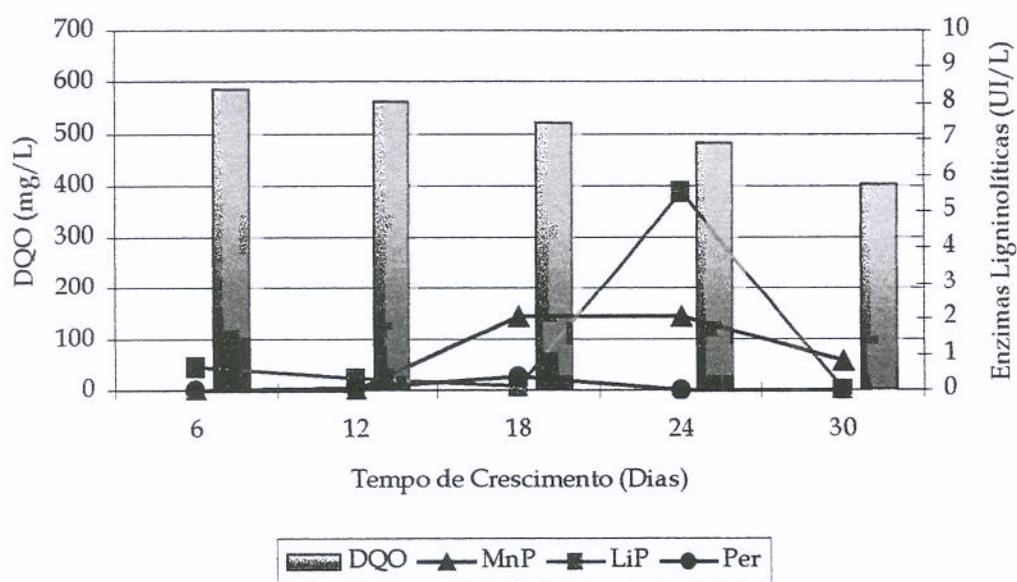


Figura 55: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 74, no experimento II.

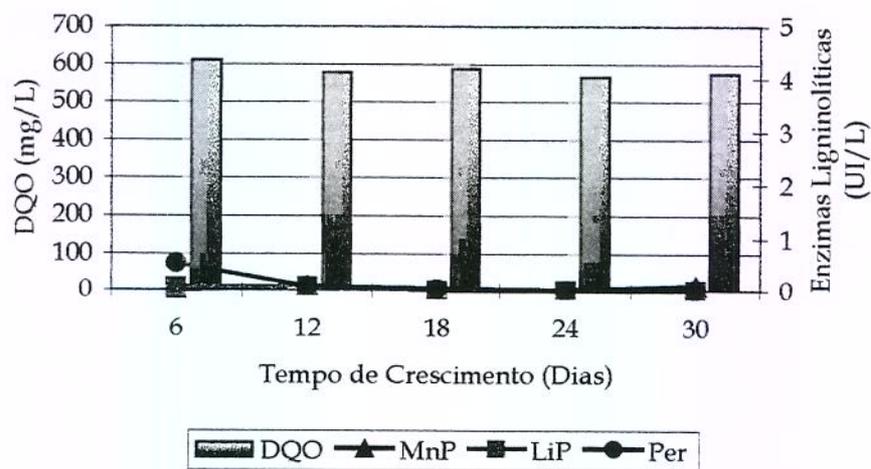


Figura 56: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 100, no experimento II.

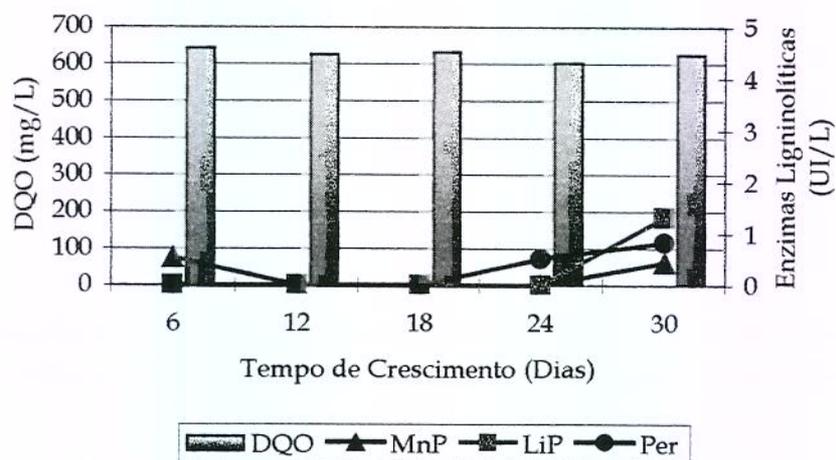


Figura 57: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 108, no experimento II.

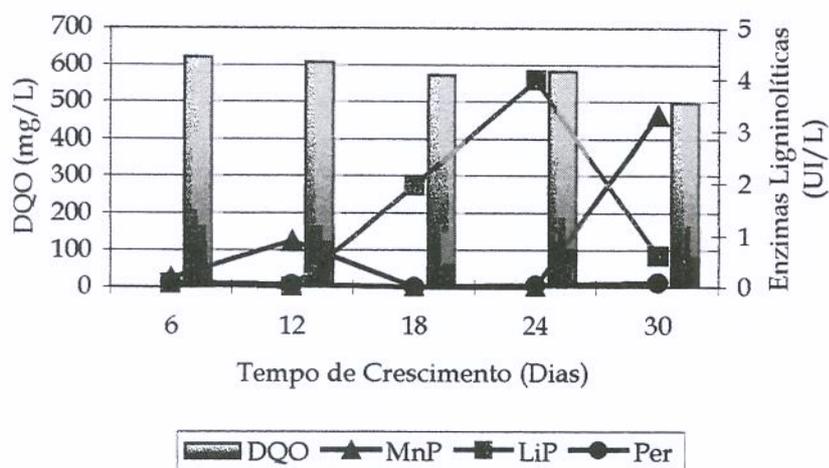


Figura 58: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 184, no experimento II.

No experimento III (chorume autoclavado, com adição de glicose – 0,5 % e extrato de leveduras – 0,1 %, agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C) a produção de enzimas LiP e MnP apresentou bons resultados. Estão demonstrados os picos de produção de LiP (17 UI/L), Figura 60 e de MnP (4,9 UI/L), Figura 62. A produção de LiP não continuou a apresentar o mesmo perfil que vinha apresentando e apareceu em quase todas as amostras (Figuras 59 e 60), com pico de produção máxima observado no 18 ° dia, para a Linhagem 100 (figura 60). A enzima MnP novamente voltou a ocorrer no final dos experimentos (24 e 30 dias), e parece ter atuação mais tardia que a LiP. Quanto à DQO, as Linhagens 100 e 184 apresentaram melhores resultados (36,8 % e 30,8 % de remoção respectivamente, Figuras 60 e 62).

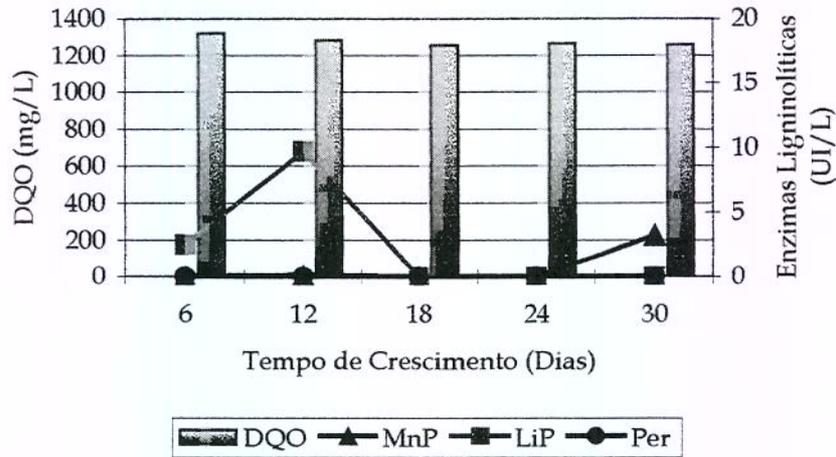


Figura 59: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 74, no experimento III.

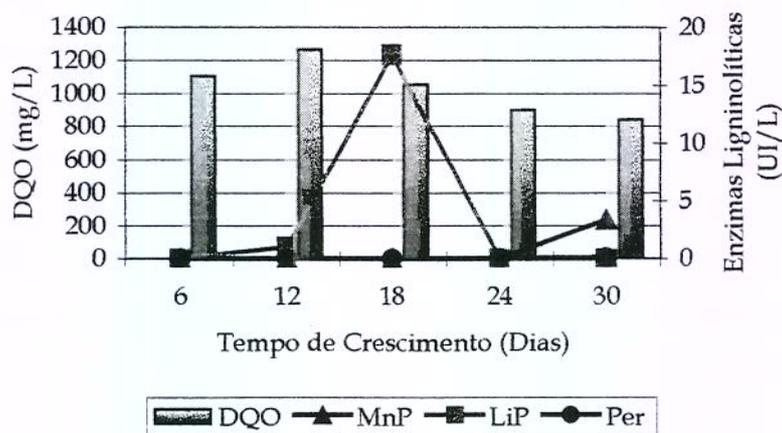


Figura 60: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 100, no experimento III.

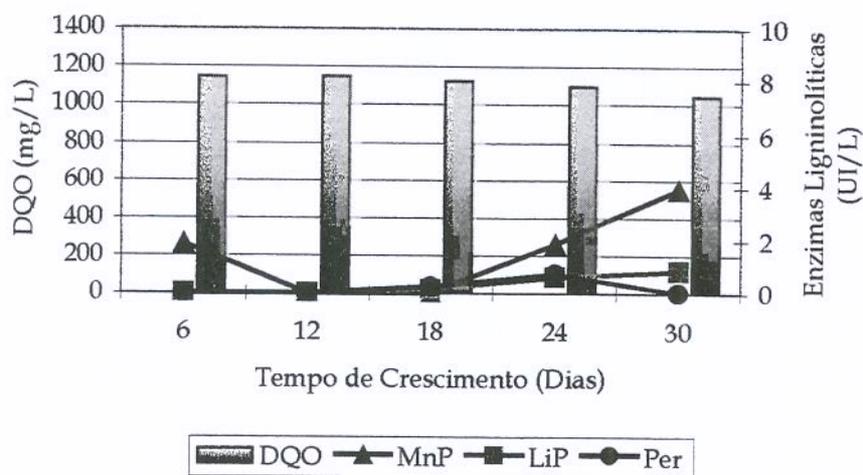


Figura 61: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 108, no experimento III.

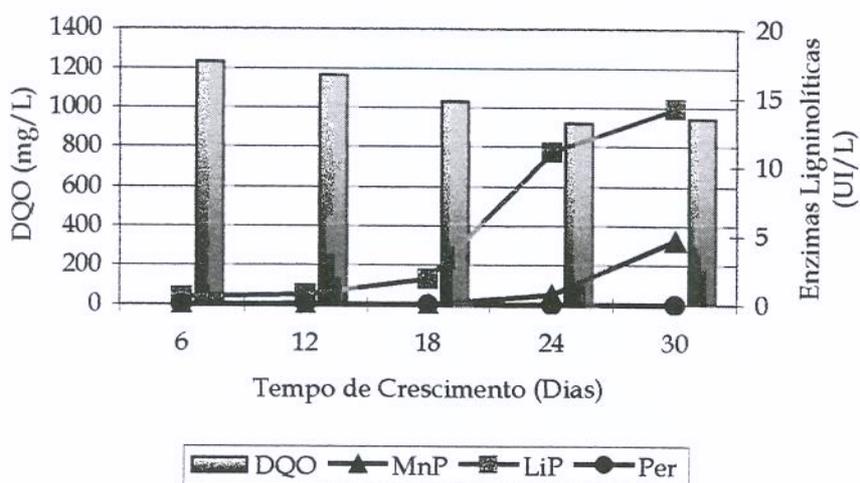


Figura 62: Diminuição da DQO e sua relação com as atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 184 no experimento III.

Durante a realização do experimento IV (chorume sem autoclavar, adição de glicose – 0,5% e extrato de leveduras – 0,1 %, agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C), novamente, as Linhagens 100 e 184 mostraram-se melhores na produção de enzimas e abaixamento da DQO.

Os valores de redução da DQO foram os mais altos de todos os experimentos, assim como a produção de enzimas. A linhagem 100 apresentou um máximo de 17 UI/L de LiP, com uma redução de 22,9 % nos valores de DQO (Figura 64). Já as Linhagens 108 (Figura 65) e 184 (Figura 66) apresentaram uma remoção da DQO, com valores de 30,8 % e 51,8% respectivamente, sendo que a Linhagem 184 apresentou o mais alto índice de LiP (18 UI/L). Comparando-se os resultados, observa-se que o chorume autoclavado dificulta a produção de enzimas e até o crescimento dos microrganismos, uma vez que a autoclavagem “coagula” compostos do chorume, aumenta sua viscosidade e elimina microrganismos já adaptados ao chorume. Também pode estar ocorrendo grande número de reações químicas, de forma que muitos compostos gerados nestas reações não são facilmente degradados.

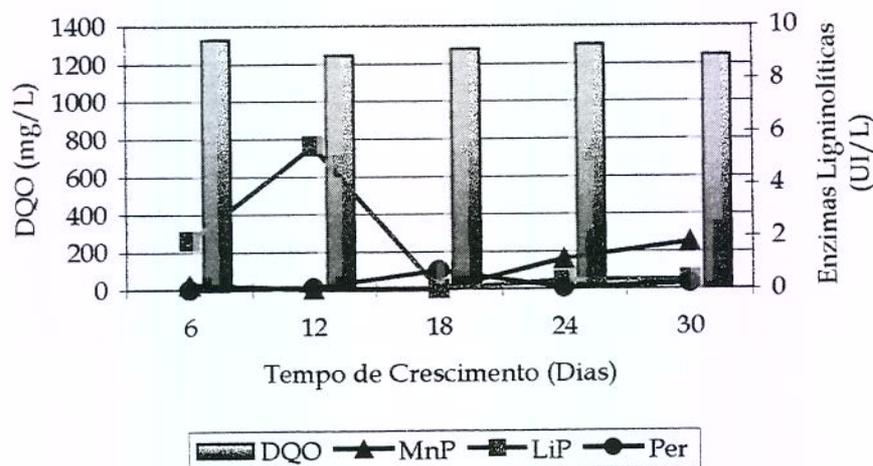


Figura 63: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 74, no experimento IV.

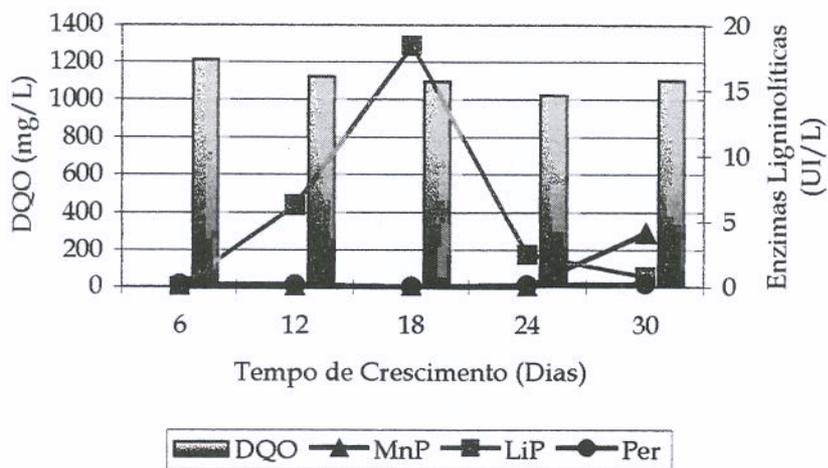


Figura 64: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 100, no experimento IV.

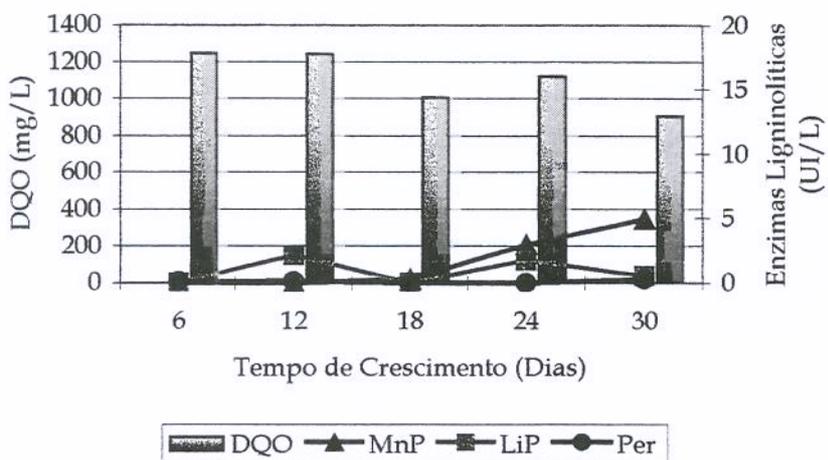


Figura 65: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 108, no experimento IV.

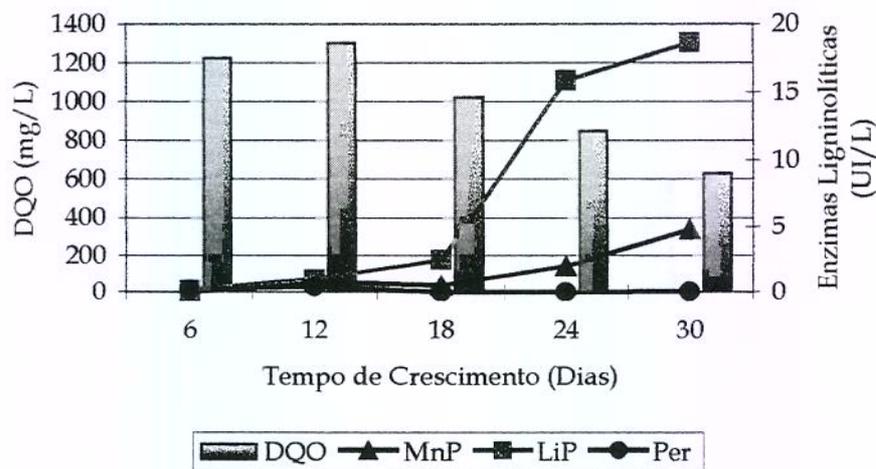


Figura 66: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 184, no experimento IV.

Nas Figuras 67 a 70 são mostrados os resultados obtidos pelas linhagens durante a realização do experimento V (chorume sem autoclavar, adição de glicose 0,5%, agitação a 150 rpm e temperatura de 30 °C). A produção enzimática foi maior para as Linhagens 100 e 184, sendo que a Linhagem 184 apresentou a maior produção da enzima MnP, atingindo pico máximo de 21 UI/L por volta do 18 ° dia. A diminuição da DQO realizada por esta linhagem foi boa, atingindo o valor de 50,4 % de degradação (Figura 70). As outras linhagens apresentaram resultados insatisfatórios.

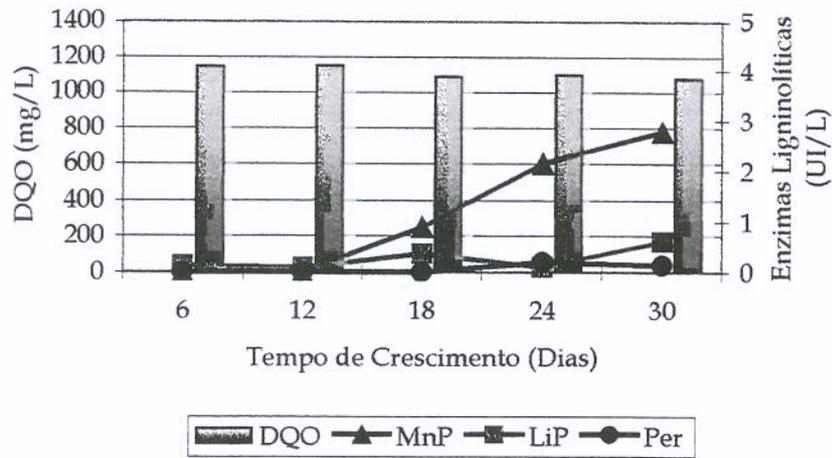


Figura 67: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 74, no experimento V.

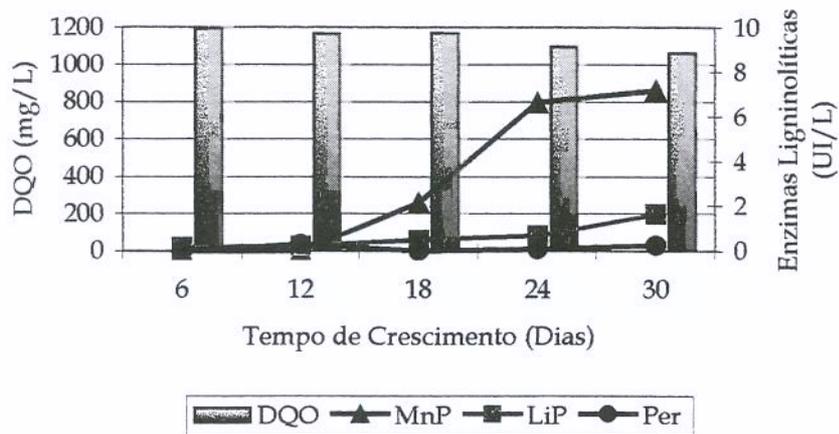


Figura 68: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 100, no experimento V.

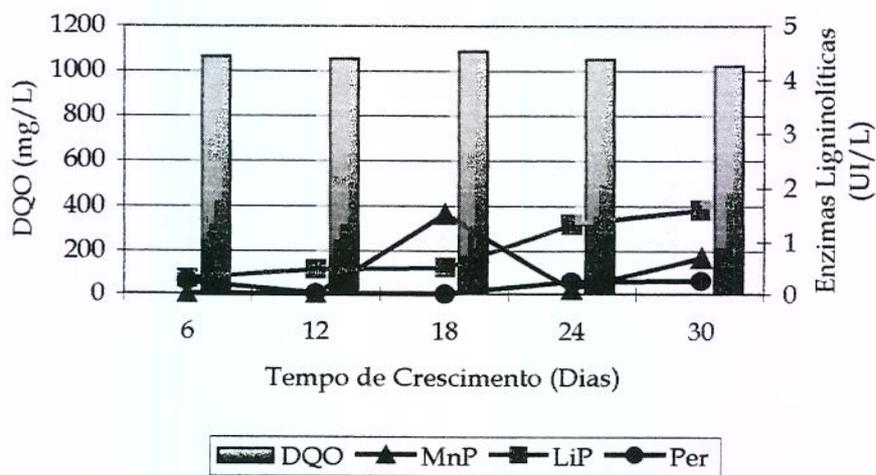


Figura 69: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 108, no experimento V.

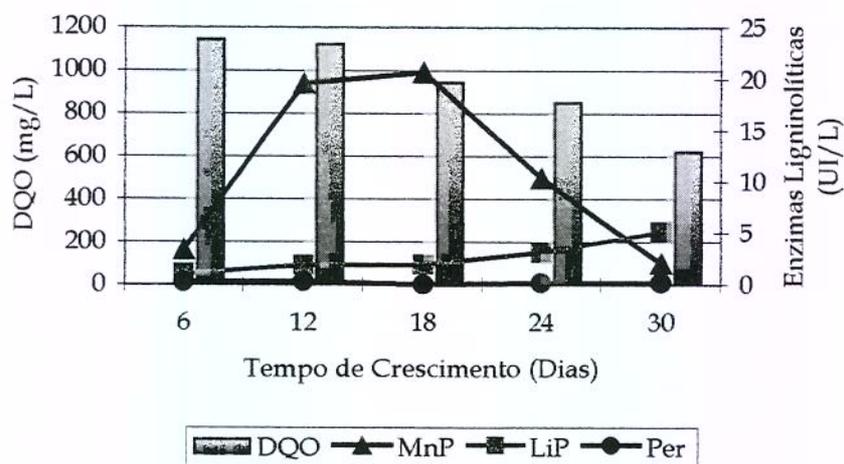


Figura 70: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 184, no experimento V.

Durante a realização do experimento VI (chorume sem autoclavar, adição de sacarose – 0,5 %, agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C), somente a Linhagem 108 (Figura 73) não apresentou resultados importantes. As Linhagens 74, 100 e 184 (figuras 71, 72 e 74) apresentaram boa produção de enzimas, principalmente LiP. Os valores de diminuição de DQO foram maiores para as Linhagens 100 e 184, com redução de 38,3 % e 36,6 %, respectivamente, porém inferiores aos obtidos durante a realização dos experimentos IV e V.

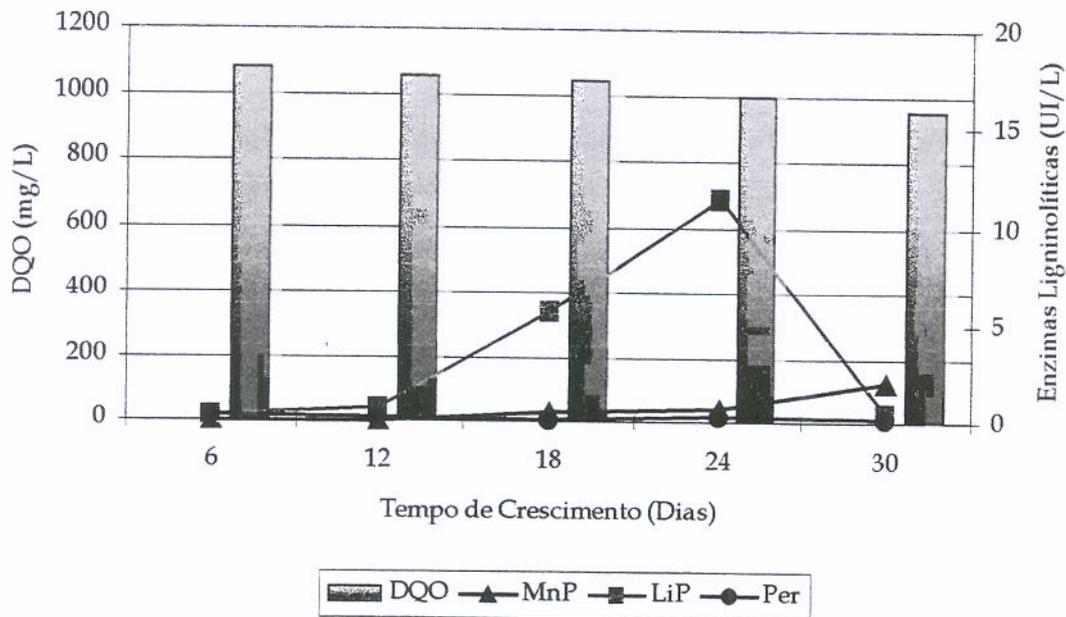


Figura 71: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 74, no experimento VI.

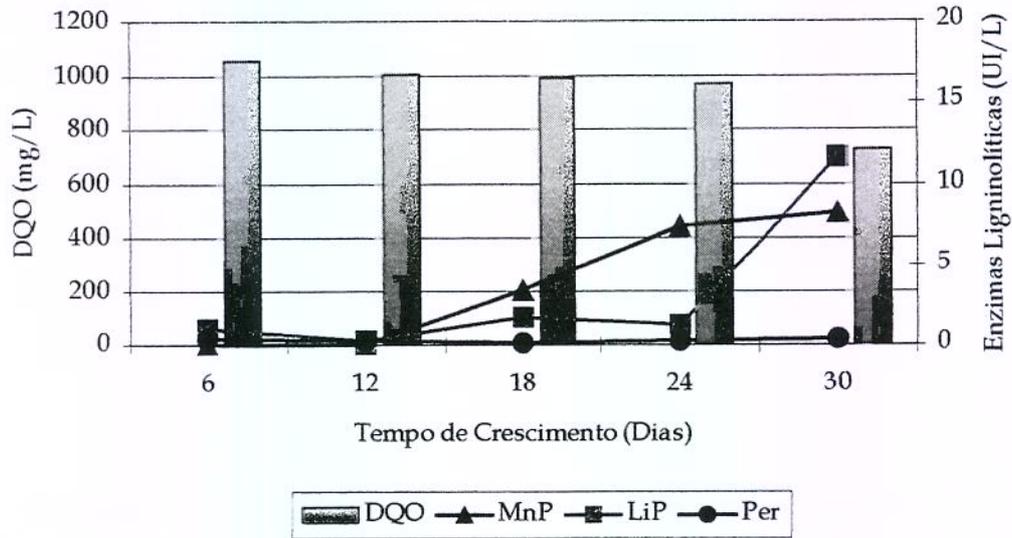


Figura 72: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 100, no experimento VI.

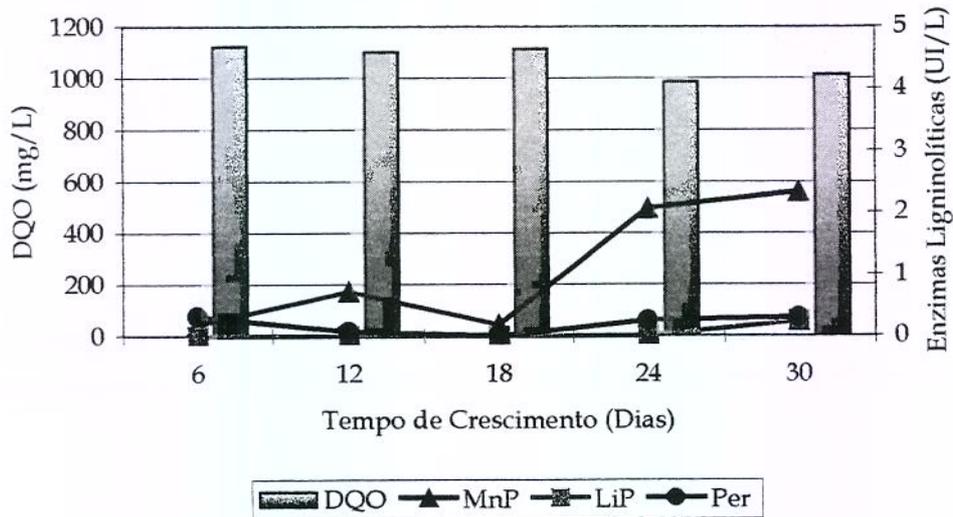


Figura 73: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 108, no experimento VI.

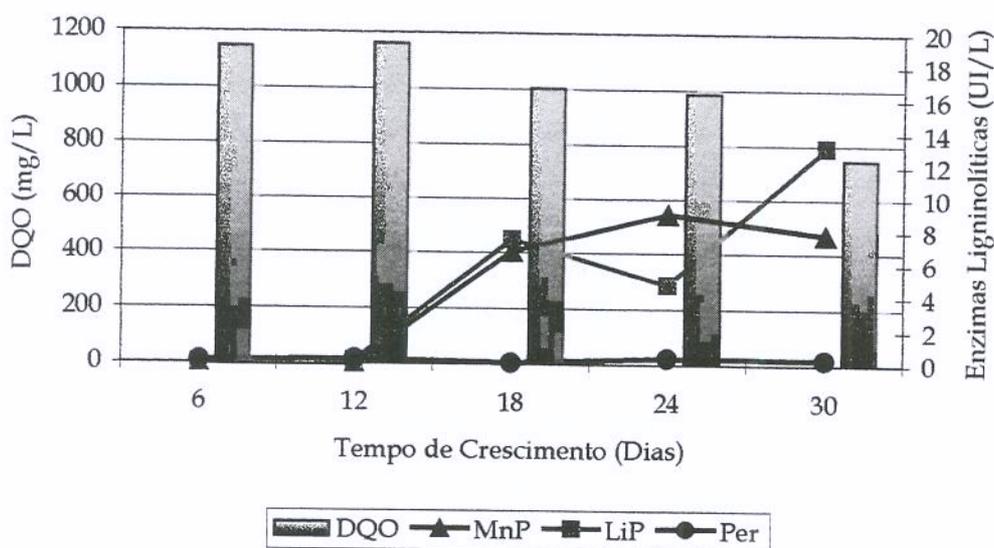


Figura 74: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 184, no experimento VI.

Observando-se as Figuras do experimento VII (chorume sem autoclavar, adição de sacarose – 0,5 % e extrato de leveduras – 0,1%, agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C), pode-se ver que a produção de enzimas durante a realização deste experimento foi baixa, com exceção da Linhagem 184, que apresentou pico máximo de LiP, próximo de 12 UI/L. Esta Linhagem (Figura 78), juntamente com a Linhagem 74 (Figura 75) foram as que apresentaram melhor redução da DQO nesta série de experimentos, embora bastante inferiores aos experimentos anteriores .

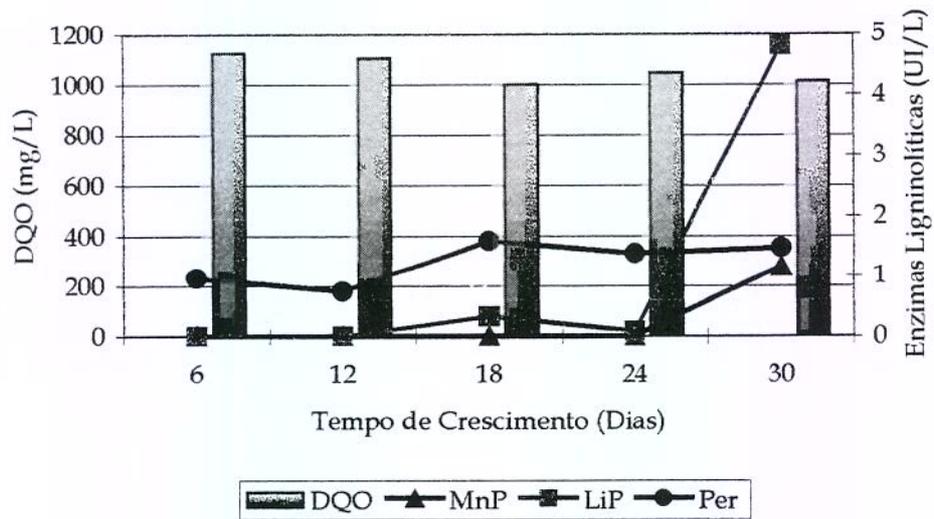


Figura 75: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 74, no experimento VII.

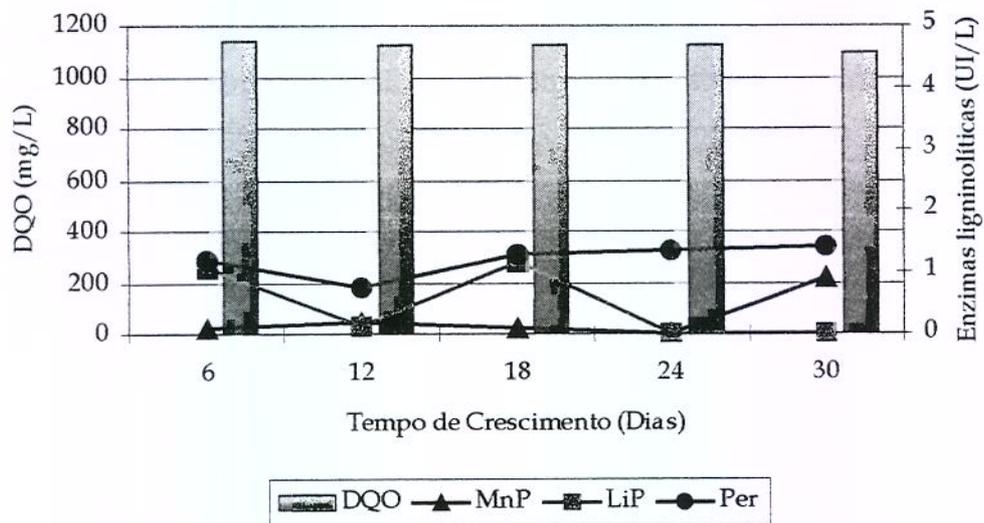


Figura 76: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 100, no experimento VII.

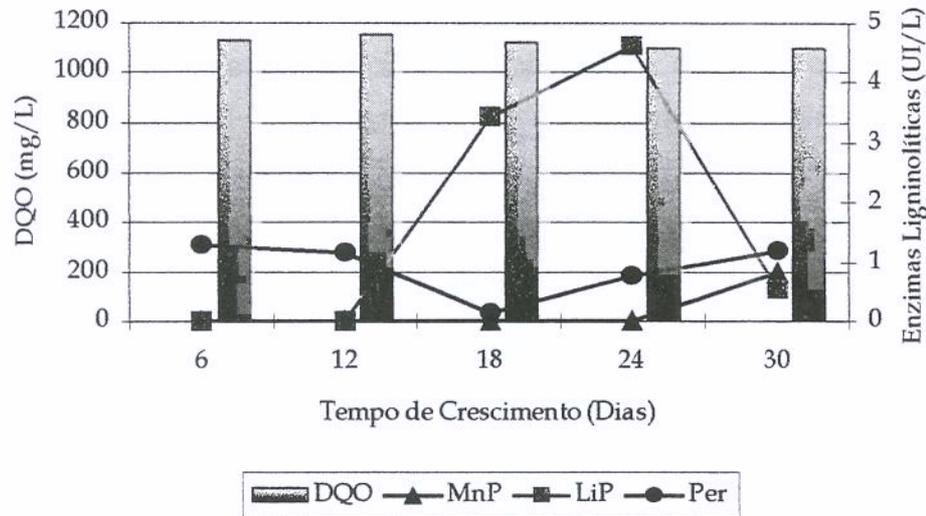


Figura 77: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 108, no experimento VII.

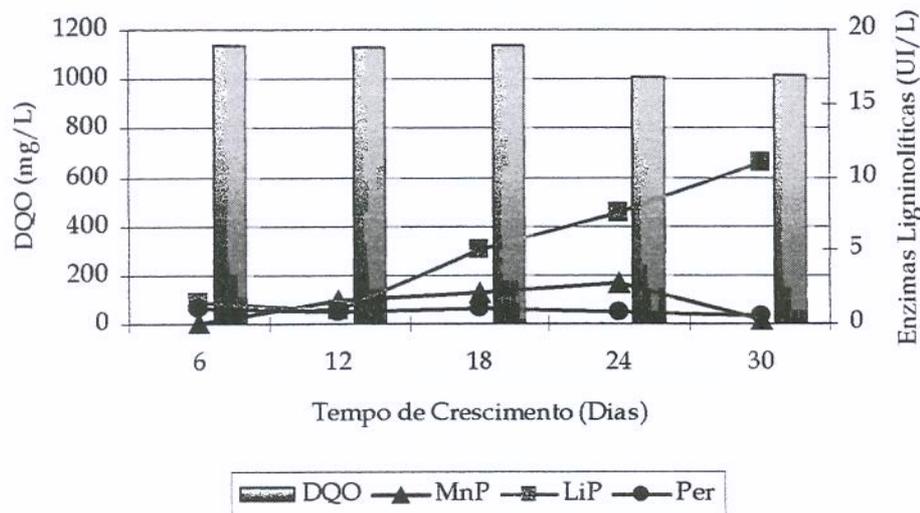


Figura 78: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 184, no experimento VII.

Finalizando, o experimento VIII (chorume sem autoclavar, adição de avicel 0,5%, agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C) não apresentou bons resultados de produção de enzimas e de diminuição da DQO. O composto Avicel utilizado neste experimento é um derivado da celulose de difícil degradação e parece ter atuado negativamente, inibindo a produção de enzimas pelas linhagens. Estes valores baixos podem ser visualizados nas Figuras 79 a 82. Inicialmente esperava-se que os valores de degradação fossem melhores com adição de avicel, por se tratar de um indutor da produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas.

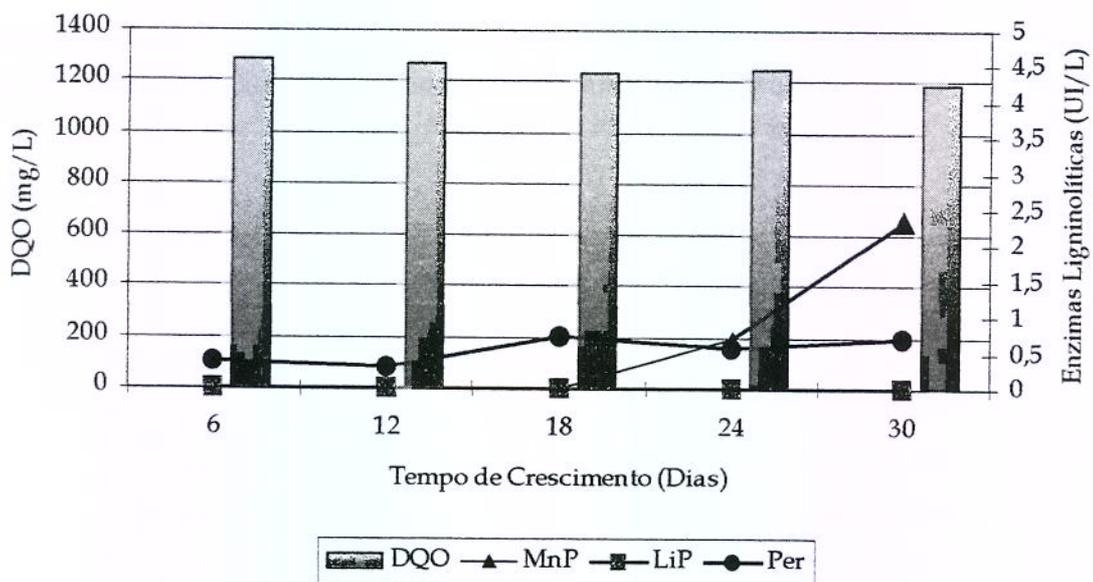


Figura 79: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 74, no experimento VIII.

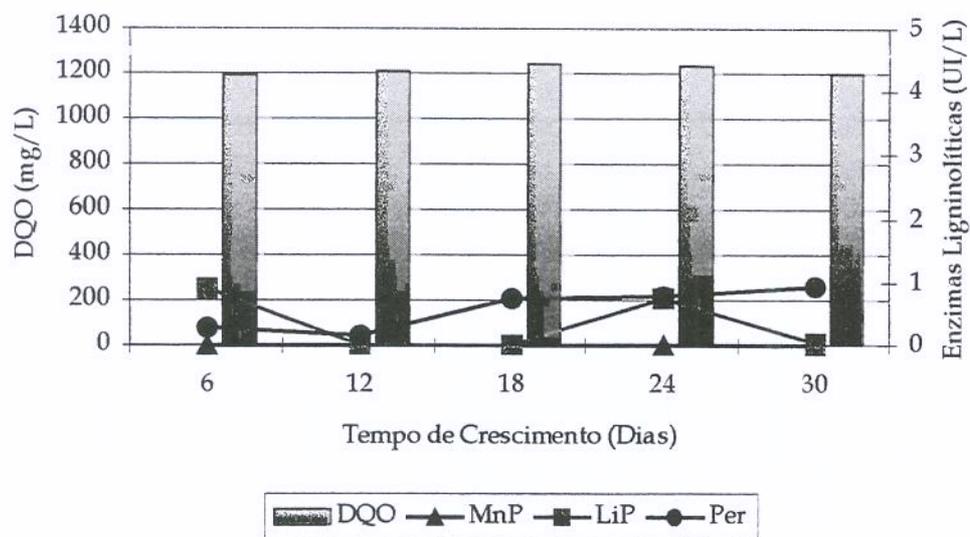


Figura 80: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 100, no experimento VIII.

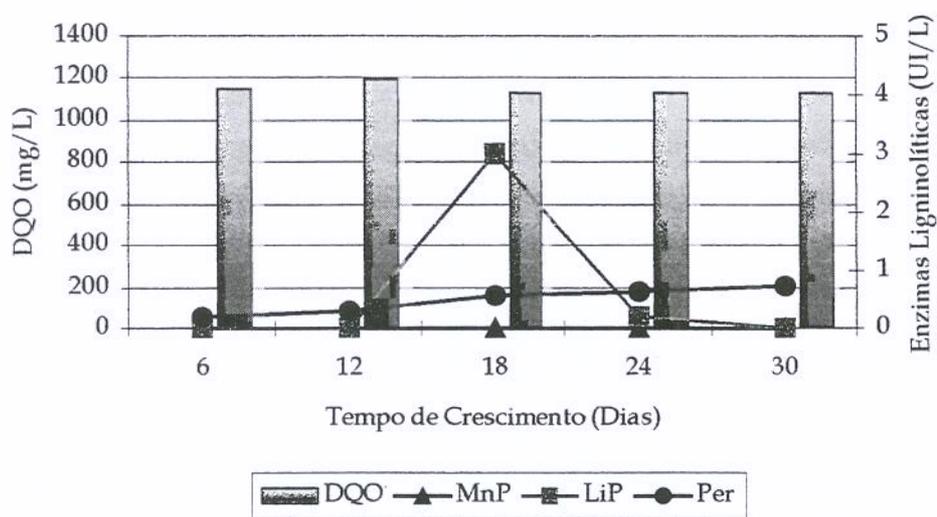


Figura 81: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 108, no experimento VIII.

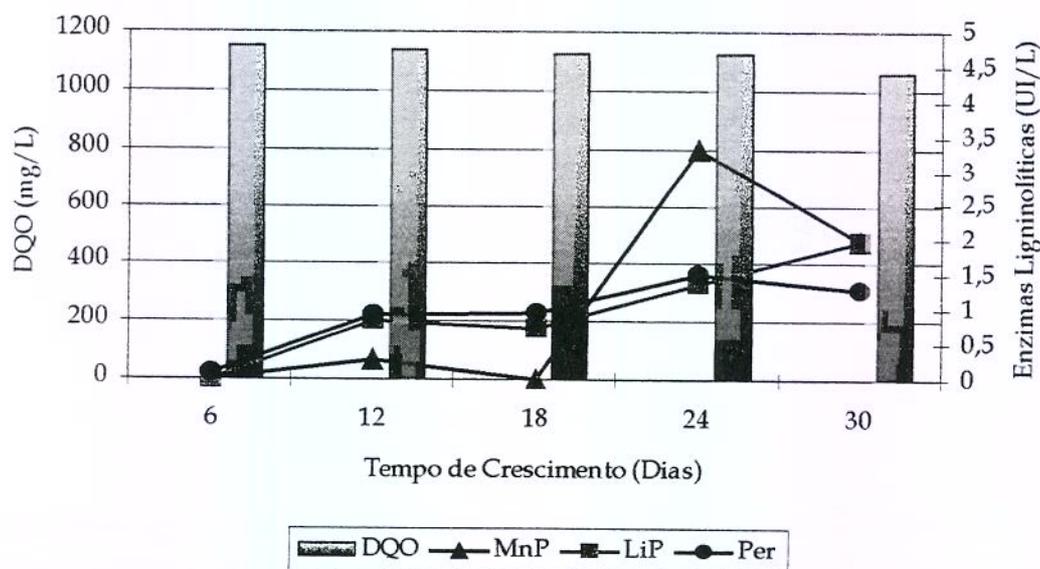


Figura 82: Variação da DQO e atividades enzimáticas de Manganês-Peroxidase (MnP), Lignina-Peroxidase (LiP) e Peroxidases (Per) apresentadas pela Linhagem 184, no experimento VIII.

Com base nos resultados obtidos de redução da DQO foi elaborada a Tabela 13, onde são visualizados, de uma maneira global, os resultados da diminuição de DQO obtidos após o crescimento das linhagens nos experimentos I a VIII. As marcações em cinza na tabela apresentam os melhores resultados e as linhagens responsáveis pela diminuição da DQO. Nos casos em que o chorume não foi autoclavado existe a cooperação das linhagens já adaptadas ao chorume.

Os melhores resultados de remoção da DQO foram obtidos nos experimentos IV e V, com porcentagens de remoção de 51,8 % e 50,4 %, respectivamente. Outra linhagem (Linhagem 100 – experimentos III e VI) também apresentou bons resultados, da ordem de 36,8 % e 38,3 %, respectivamente.

Tabela 13: Porcentagens de redução da DQO pelas Linhagens 74, 100, 108 e 184.

<i>Experimento</i>	<i>Linhagem</i>	<i>Diminuição da DQO (%)</i>
1	74	16.9
	100	15.3
	108	9.23
	184	9.23
2	74	38.1
	100	11.5
	108	7.38
	184	22.7
3	74	4.51
	100	36.8
	108	21.0
	184	30.8
4	74	6.01
	100	22.9
	108	30.8
	184	51.8
5	74	12.8
	100	13.6
	108	18.4
	184	50.4
6	74	20.0
	100	38.3
	108	17.5
	184	36.6
7	74	15.7
	100	6.7
	108	6.7
	184	15.5
8	74	3.6
	100	4.0
	108	6.4
	184	12.9

4.5. DEGRADAÇÃO DE FENOL

As determinações foram realizadas no chorume puro e nas amostras após 30 dias de tratamento com o crescimento das linhagens, lembrando que foi utilizada uma amostra de chorume para os experimentos I a IV (concentração de fenol = 1,94 mg/L) e outra amostra para os experimentos V a VIII (concentração de fenol = 1,68 mg/L). A Tabela 14 a seguir apresenta os resultados de porcentagem de degradação obtidos após a realização do método. Novamente as marcações em cinza na tabela apresentam os melhores resultados e as linhagens responsáveis.

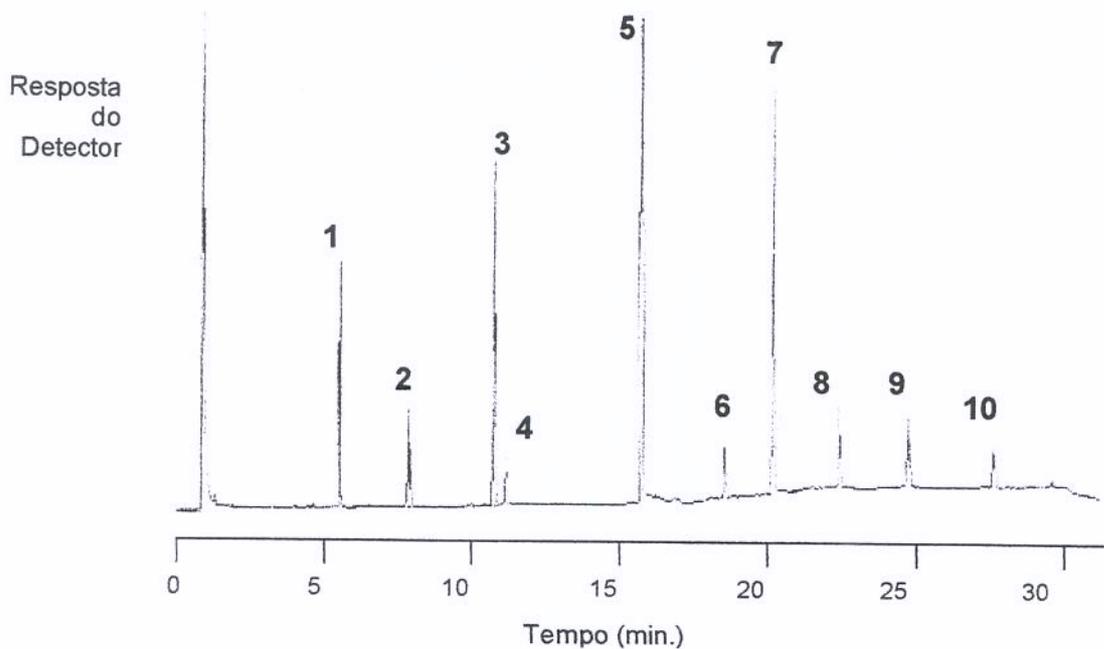
Tabela 14: Degradação de fenol obtida após os experimentos realizados com as linhagens nº 74, 100, 108 e 184.

<i>Experimento</i>	<i>Linhagem</i>	<i>Degradação de Fenol (%)</i>
1	74	13.7
	100	12.9
	108	10.7
	184	13.7
2	74	25.9
	100	20.7
	108	18.3
	184	20.7
3	74	8.5
	100	39.4
	108	23.0
	184	35.7
4	74	8.9
	100	50.1
	108	45.7
	184	72.9
5	74	18.5
	100	20.7
	108	18.3
	184	63.7
6	74	37.8
	100	25.6
	108	20.7
	184	38.7
7	74	23.2
	100	18.9
	108	7.5
	184	10.3
8	74	13.7
	100	15.7
	108	12.8
	184	10.0

As linhagens que apresentaram melhor degradação do fenol são coincidentes com as que atingiram uma remoção aparente da DQO, no experimento anterior (Tabela 13). A Linhagem 184, nos experimentos IV e V, foi a que apresentou melhores resultados de degradação do fenol, com picos de 72,9 % e 63,7 %, respectivamente.

4.6. CROMATOGRAFIA GASOSA

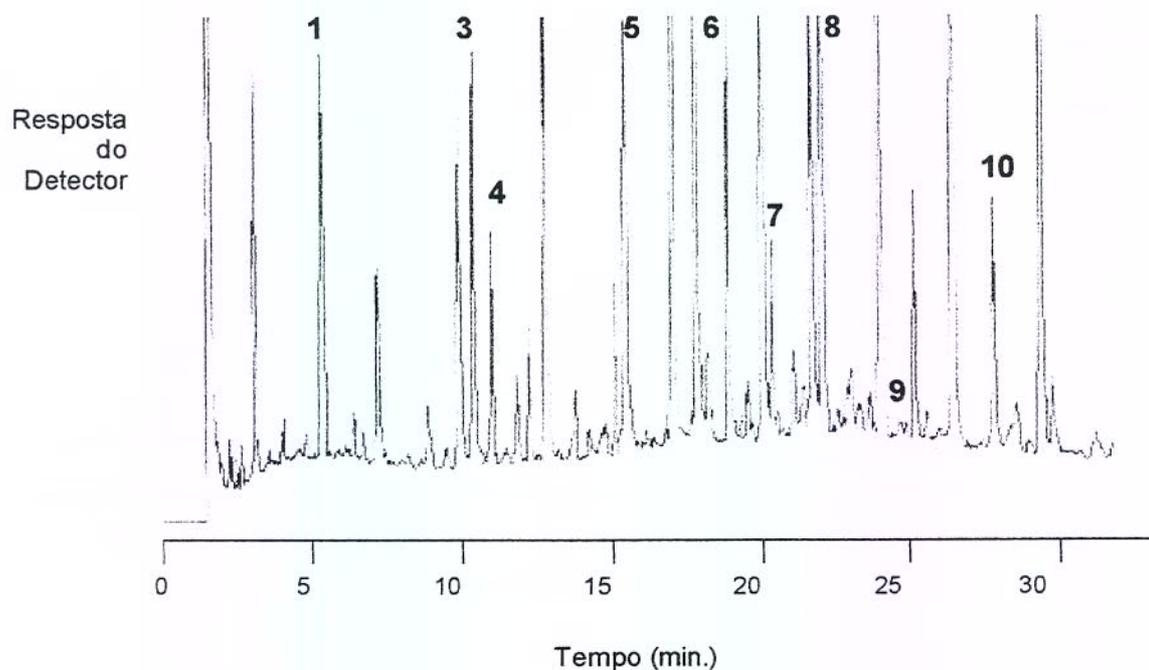
Na Figura 83 está representado o cromatograma dos padrões adotados para a análise de toxicidade do chorume.



Compostos: 1) Naftaleno, 2) Acenafteno, 3) Fluoreno, 4) Fenantreno, 5) Antraceno, 6) Fluoranteno, 7) Pireno, 8) Criseno, 9) Benzo[a]pireno e 10) Perileno.

Figura 83: Cromatograma dos padrões de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs).

Após a determinação do tempo de retenção dos compostos do padrão, as amostras de churume puro, e das Linhagens 74, 100, 108 e 184 após crescimento nos experimentos IV e V foram submetidas às análises cromatográficas. Os cromatogramas obtidos foram comparados com o cromatograma da amostra de churume puro. A Figura 84 (amostra de churume puro) o churume apresentou uma variedade de picos, o que vem confirmar sua heterogeneidade e dificuldade de identificação de todos os picos.



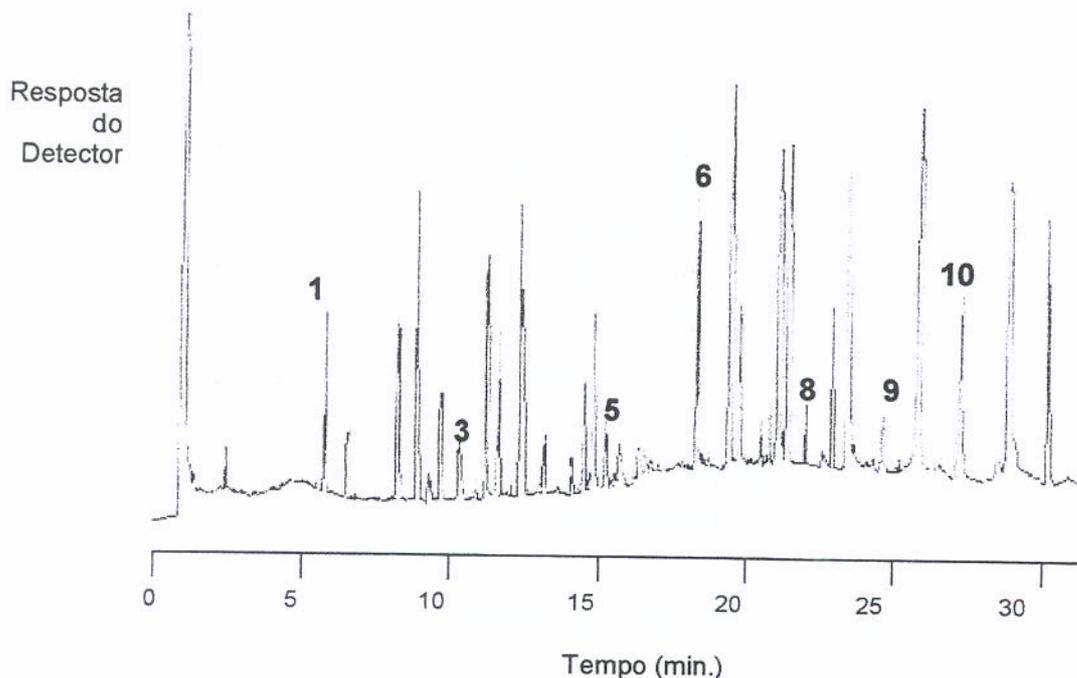
Compostos: 1) Naftaleno, 3) Fluoreno, 4) Fenantreno, 5) Antraceno, 6) Fluoranteno, 7) Pireno, 8) Criseno, 9) Benzo[a]pireno e 10) Perileno.

Figura 84: Cromatograma da amostra de chorume puro, sem tratamento.

Nesta amostra de chorume puro (Figura 84) não foi detectado o composto acenafteno, mas os picos de naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]pireno e perileno foram encontrados, em diferentes quantidades. A identificação teve como base somente a comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os picos dos padrões. Para total certeza dos resultados e identificação correta dos picos, outras técnicas mais detalhadas teriam que ser realizadas.

Na Figura 85 está representado o cromatograma dos picos obtidos da análise da amostra de chorume após degradação pela Linhagem 100, no experimento IV. Comparando-o com o cromatograma da amostra de chorume puro (Figura 84) nota-se considerável redução do número de picos. Foram encontrados compostos em

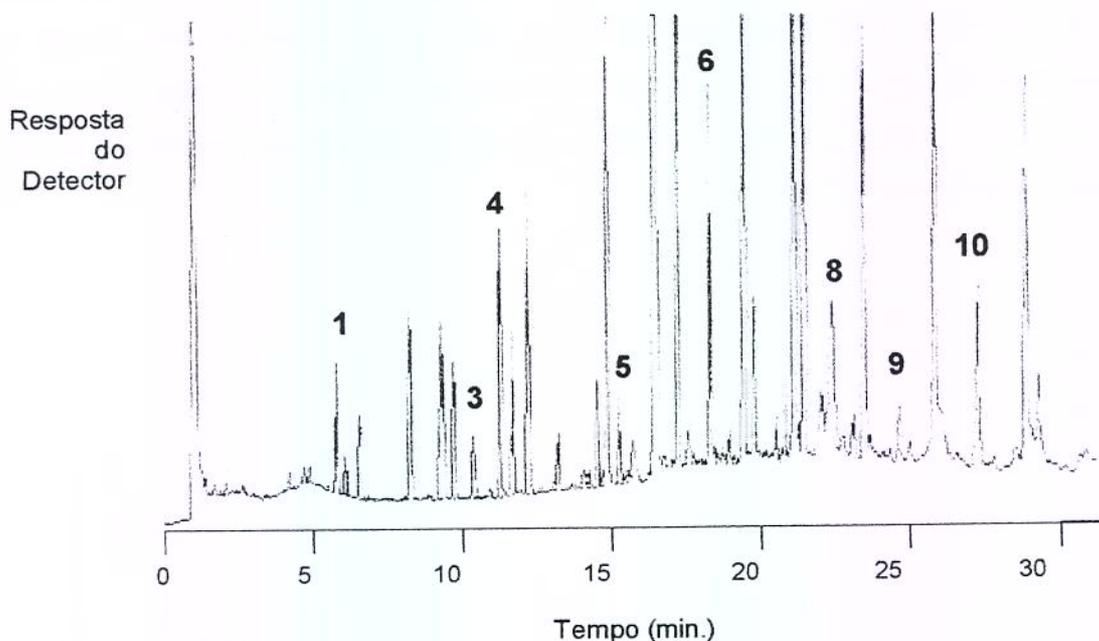
comum com a amostra de chorume puro. Os compostos 4 (fenantreno) e 7 (pireno) não apareceram neste cromatograma, o que pode indicar que houve total degradação dos mesmos. Já os outros compostos apresentaram-se numa menor concentração, o que também denota que houve degradação geral de todos os compostos do chorume.



Compostos: 1) Naftaleno, 3) Fluoreno, 5) Antraceno, 6) Fluoranteno, 8) Criseno, 9) Benzo[a]pireno e 10) Perileno.

Figura 85: Cromatograma do chorume após degradação pela linhagem 100, experimento IV.

Após a realização do experimento V, a Linhagem 100 continuou apresentando bons resultados de degradação, porém nota-se que se forem comparados os resultados dos cromatogramas obtidos pela linhagem, a redução dos picos foi mais significativa no experimento IV. Neste experimento, a redução da DQO foi maior, como foi melhor também a produção de enzimas ligninolíticas (Figura 86).

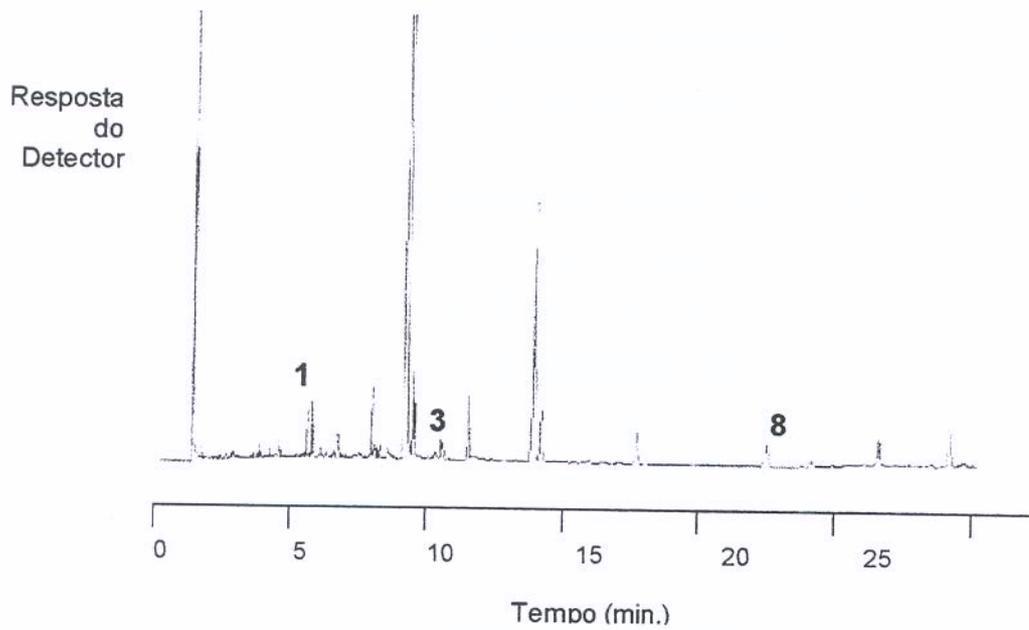


Compostos: 1) Naftaleno, 3) Fluoreno, 4) Fenantreno, 5) Antraceno, 6) Fluoranteno, 8) Criseno, 9) benzo[a]pireno e 10) Perileno.

Figura 86: Cromatograma do chorume após degradação pela linhagem 100, experimento V.

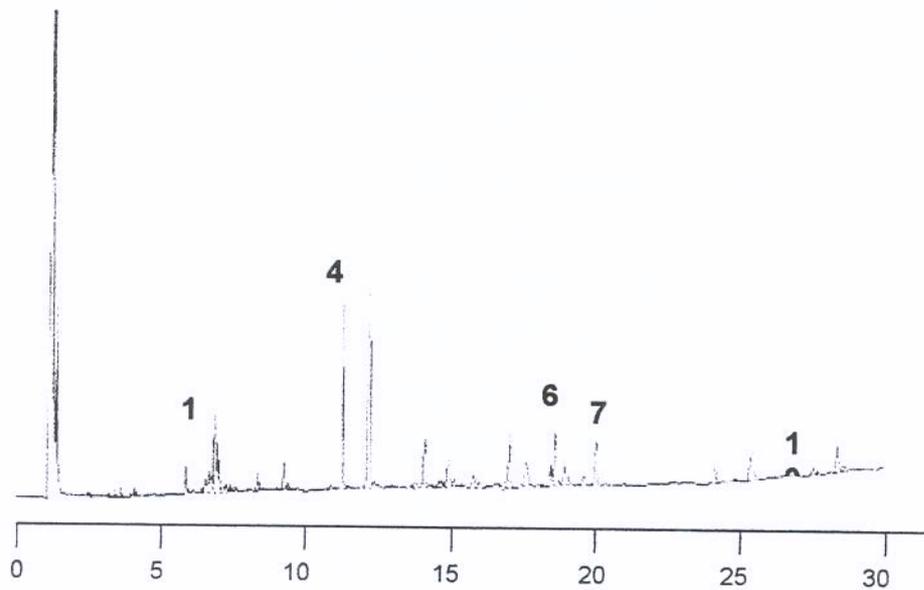
Neste cromatograma (Figura 86), nota-se que o composto pireno não foi detectado novamente. Acredita-se que a Linhagem 100 tenha conseguido degradar totalmente o pireno.

Mais significativo é o comportamento da linhagem 184. Esta linhagem (um fungo deuteromiceto – *Aspergillus sp.*) apresentou bons resultados de remoção da DQO, degradação de fenol, degradação de compostos tóxicos, produção de enzimas ligninolíticas, e todas estas características levaram à degradação parcial da maioria dos compostos que são encontrados no chorume puro. Nas Figuras 87 e 88 (Experimentos IV e V, respectivamente), nota-se a grande diferença dos cromatogramas em relação ao cromatograma da amostra de chorume puro (Figura 84), uma vez que a maioria dos picos desapareceram ou diminuíram de tamanho, denotando grande atividade de degradação.



Compostos: 1) Naftaleno, 3) Fluoreno e 8) Criseno.

Figura 87: Cromatograma do chorume após degradação pela Linhagem 184, experimento IV.



Compostos: 1) Naftaleno, 4) Fenantreno, 6) Fluoranteno, 7) Pireno e 10) Perileno.

Figura 88: Cromatograma do chorume após degradação pela Linhagem 184, experimento V.

Com base nestes resultados (Figuras 83 a 88) observa-se que as linhagens conseguiram atingir níveis satisfatórios de degradação de compostos do chorume, sendo que a Linhagem 184 apresentou melhor desempenho, mostrando resultados bastante promissores, o que sugere sua aplicação na degradação de compostos poluentes em águas subterrâneas, superficiais e residuárias. Seria importante um estudo detalhado de inoculação desta linhagem fúngica em sistemas de lodos ativados. Estes lodos funcionam perfeitamente em condições aeróbias, porém, como todo lodo ativado, a presença de fungos geralmente é indesejada por comprometer o resultado final de degradação.

4.7. IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM BACTERIANA 254

Dos 13 microrganismos que apresentaram melhores resultados neste último experimento, uma linhagem é bacteriana e portanto foi identificada através de microscopia ótica e testes bioquímicos.

A Figura 89 apresenta o crescimento da Linhagem 254 em meio de cultivo R2A. A bactéria apresenta coloração vermelha bastante intensa. Esta coloração também condiz com bactérias do gênero *Achromobacter*.

Os testes foram realizados em triplicata; utilizando-se inóculo de uma cultura apenas. Cada teste foi inoculado três vezes; e, para efeito de diferenciação, receberam os números 254 - 1, 254 - 2, e 254 - 3; de acordo com o que pode ser visto na Tabela 15. Os resultados não foram iguais nas três caracterizações bioquímicas, por isso alguns testes tiveram que ser repetidos. Sabe-se que estes testes bioquímicos variam muito, dependendo do tamanho ou quantidade de inóculo. A bactéria foi confirmada como sendo do gênero *Achromobacter*.

Tabela 15: Resultados dos testes de identificação da linhagem 254

Linhagem bacteriana 254				
Teste Bioquímico	254 - 1	254 - 2	254 - 3	Confirmação
GRAM	BGN	BGN	BGN	BGN
KOH	(+)	(+)	(+)	(+)
Catalase	(+)	(+)	(+)	(+)
Oxidase	(-)	(-)	(-)	(-)
ONPG	(+)	(+)	(+)	(+)
Indol	(±)	(±)	(-)	(-)
TSI	AL	AC	AC	AL/AC
Hidrólise da Gelatina	(+)	(-)	(+)	(+)
Citrato	(-)	(-)	(-)	(-)
Vermelho de Metila	(-)	(+)	(-)	(+)
Voges Proskauer	(-)	(+)	(+)	(-)
H ₂ S	(+)	(+)	(-)	(+)
Lactose	(-)	(-)	(-)	(-)
Nitrato	(+)	(+)	(+)	(+)
Ornitina	(-)	(-)	(-)	(-)
Fenilalanina	(+)	(+)	(+)	(+)
Lisina	(±)	(-)	(-)	(-)
Pigmento	(+)	(+)	(+)	(+)
Manitol	(-)	(-)	(-)	(-)
Amido	(-)	(+)	(-)	(+)
EMB	(-)	(-)	(-)	(-)
OF	OF	OF	OF	OF
Produção de Gás	(-)	(-)	(-)	(-)
Motilidade	(-)	(-)	(-)	(-)

BGN = Bastonetes Gram Negativos
O = Oxidativo

± = Duvidoso
F = Fermentativo

AL = Alcalino

AC = Ácido

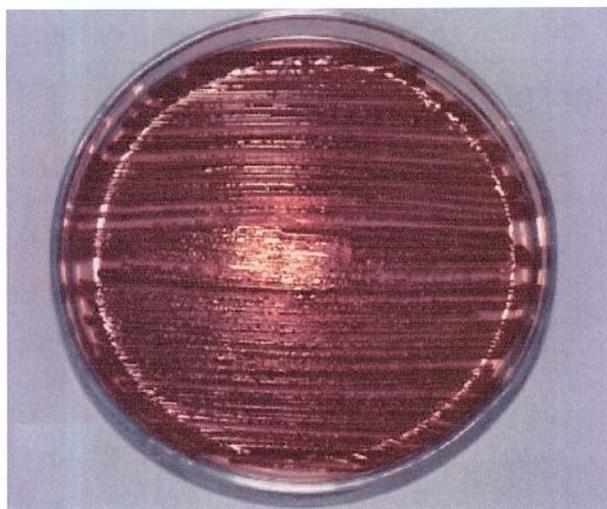


Figura 89: Crescimento da Linhagem bacteriana 254 em placa de Petri contendo meio R2A.

A bactéria apresenta pigmento vermelho. Em observação microscópica, em instrumento ótico, o esfregaço da colônia pura apresenta inúmeros bastonetes curtos Gram negativos, de coloração rósea, não se apresentando em cadeias. As células aparecem isoladas e não formam cadeias (Figura 90).

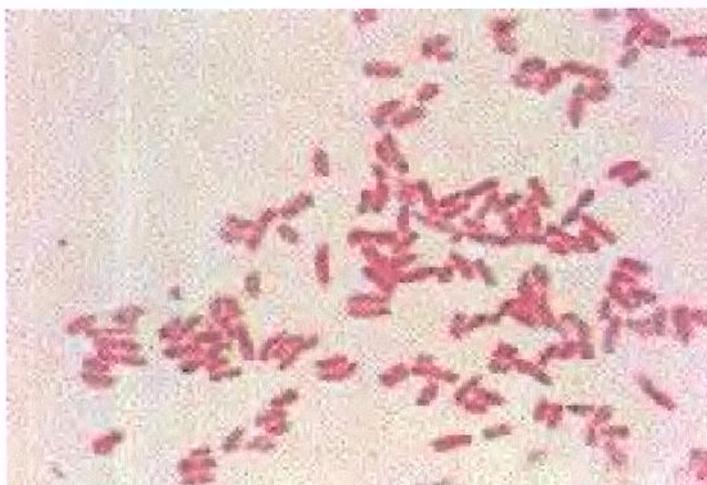


Figura 90: Observação de esfregaço da colônia pura da Linhagem 254 ao microscópio ótico.

4.8. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS

A linhagem fúngica 100 (Figura 91) apresentou crescimento cotonoso, com micélio aéreo e bastante disperso pela placa. O tipo de crescimento e de estrutura de reprodução observados sugere que este fungo pertence ao gênero *Neurospora*, um ascomiceto de coloração alaranjada. As culturas contendo este fungo apresentam cheiro característico de maçã.

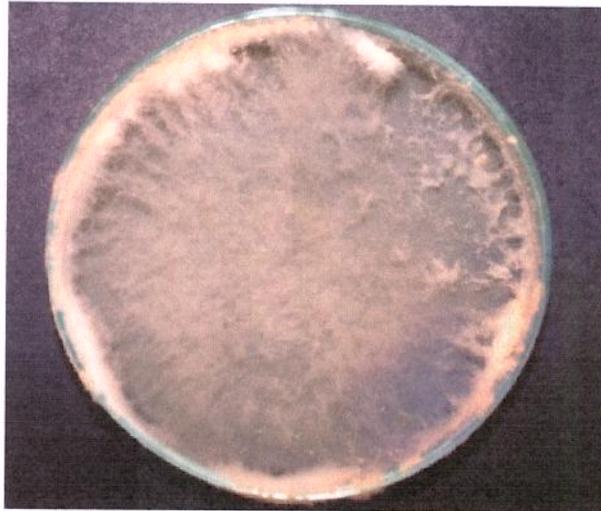


Figura 91: Crescimento da Linhagem fúngica 100 em placa de Petri contendo meio R2A.

Ao microscópio ótico, após coloração com lactofenol azul de algodão, as estruturas aparecem como pode ser observado na Figura 92. Deve-se observar a presença de inúmeros esporos (ascosporos), que são esporos alojados dentro de estruturas especiais dos fungos desta espécie, chamadas ascos.

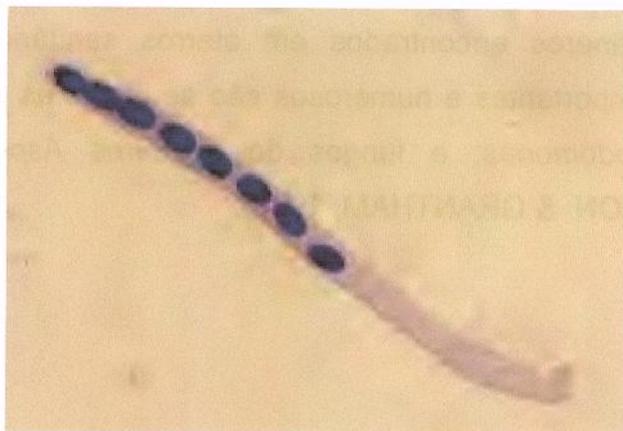


Figura 92: Observação da Linhagem 100 ao microscópio ótico após crescimento sob microcultivo.

A Linhagem 184 pertence à classe dos deuteromicetos, ou fungos imperfeitos, ou seja, fungos que possuem o ciclo sexual imperfeito, ou ainda ascomicetos ou basidiomicetos que perderam a parte sexual de seu ciclo de vida (PERRY & STALEY, 1997). Esta linhagem pertence ao gênero *Aspergillus* sp. Seu crescimento negro, com hifas aéreas e intensa formação de esporos confirmam esta teoria (Figura 93-A). Na figura 93-B é demonstrada a presença de conidióforos em preparação de lâmina após microcultivo, com coloração de lactofenol azul de algodão.

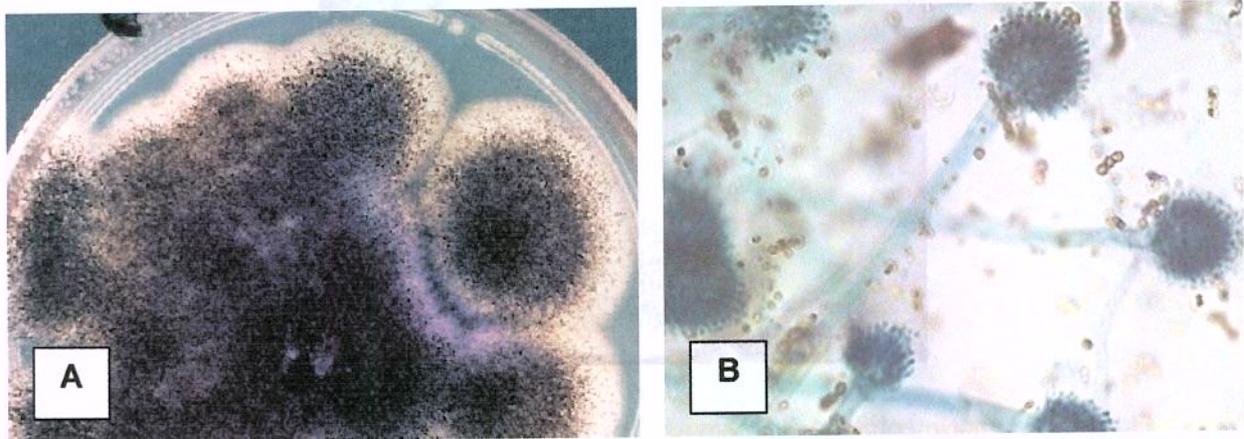


Figura 93: A) Observação macroscópica de placa contendo crescimento da Linhagem 184; e, B) Observação da Linhagem 184 ao microscópio ótico após crescimento em placa de microcultivo, utilizando meio de cultura PDA.

Dentre os gêneros encontrados em aterros sanitários já descritos pela literatura, os mais importantes e numerosos são as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Pseudomonas*; e fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (ROBINSON & GRANTHAM, 1988).

PARTE V

Conclusão

- ▶ O chorume apresentou uma variabilidade muito grande no que diz respeito à sua constituição química, o que dificultou sua análise.
- ▶ Todas as linhagens selecionadas (nº 74, 100, 108 e 184) apresentaram produção das enzimas lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidases. Destas enzimas, a lignina peroxidase foi produzida em grande quantidade nos experimentos onde houve maior diminuição da DQO e dos fenóis, possibilitando-nos então afirmar que está envolvida no processo de destoxificação do chorume. Quando a manganês-peroxidase aparece conjuntamente com a lignina-peroxidase, esses resultados apresentam-se melhores ainda.
- ▶ A linhagem 184 foi a que melhor competência apresentou na diminuição da toxicidade do chorume.
- ▶ Dentre os microrganismos isolados, os que apresentam melhores taxas de crescimento em chorume foram os fungos filamentosos. Estes apresentaram maior produção de enzimas ligninolíticas.
- ▶ As linhagens 74, 100 e 184 produziram enzimas ligninolíticas, sendo que a linhagem 184 apresentou um papel de destaque, atingindo níveis altos de enzima manganês-peroxidase e lignina-peroxidase.
- ▶ O crescimento microbiano também parece exercer um papel fundamental para a produção das enzimas, uma vez que as linhagens que apresentaram maior crescimento também produziram mais enzimas. Esses dados de crescimento permitiram-nos comparar os resultados de produção de enzimas entre as linhagens. A linhagem 184 apresentou um ótimo crescimento, principalmente quando se utilizou a adição de glicose e extrato de leveduras ao chorume. Durante o crescimento desta linhagem, o chorume teve uma diminuição acentuada na turbidez, indicando que a linhagem consegue degrada-lo. As demais linhagens que apresentaram melhor crescimento foram a linhagem 74 e a linhagem 100, porém, com menor diminuição da turbidez.
- ▶ O papel do pH durante a degradação é bastante difícil de ser explicado, uma vez que todas as linhagens apresentaram perfis de pH compatíveis entre si. O

que se pode notar de diferente é que a linhagem 184 apresentou níveis maiores de pH, chegando a valores de 9,7 que são altamente incompatíveis para o crescimento microbiano. Mais uma vez então destaca-se o poder de adaptação do fungo linhagem 184.

- ▶ A linhagem 184 foi identificada como fungo do gênero *Aspergillus*.
- ▶ Os microrganismos 100 e 184 são bastante promissores e, após estudos de adaptação, poderiam ser testados em sistemas de lodos ativados para verificar sua adaptação e capacidade de degradação, atuando em consórcio com outros microrganismos presentes nos lodos.

PARTE VI

Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environment concern. **Science**, v. 211, p. 132-138, 1981.
- ALLEMAN, B.C.; LOGAN, B.E.; GILBERTSON, R.L. A rapid method to screen fungi for resistance to toxic chemicals. **Biodegradation**, v. 4, p. 125-129, 1993.
- ALVARES DA SILVA, M.O.S. **Análises físico-químicas para controle de estações de tratamento de esgotos**. 1.ed. São Paulo: CETESB, 1977.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. Washington: American Public Health Association, 1995.
- ANDER, P.; HATAKKA, A.; ERIKSSON, K. E. Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, v. 125, p. 189-202, 1980.
- ASADA, Y.; MIYABE, M.; KIKKAWA, M.; KUWAHARA, M. Oxidation of NADH by a peroxidase of a lignin-degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*, and its involvement in the degradation of a lignin model compound. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 50, p. 525-529, 1986.
- BAADER, W. **Biotechnological methods for the utilization of residues and by-products of agricultural production**. Institute for technology, v.32, p. 23-33, 1991.
- BAE, B.U.; JUNG, E.S.; KIM, Y.R.; SHIN, H.S. Treatment of landfill leachate using activated sludge process and electron-beam radiation. **Water Research**, v. 33, p. 2669-2673, 1999.
- BENFENATI, E.; PIERUCCI, P.; FANELLI, R.; PREISS, A.; GODEJOHANN, M.; ASTRATOV, M.; LEVSEN, K.; BARCELÓ, D. Comparative studies of the leachate of an industrial landfill by gas chromatography – mass spectrometry, liquid chromatography – nuclear magnetic resonance and liquid chromatography – mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 831, p. 243-256, 1999.
- BERTRAND, G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans suc de quelques champignons. **C.R. Hebd Seances Academic Sciences**, v. 123, p. 463-465, 1896.
- BIDONE, F.R.A.; POVINELLI, J.; COTRIM, S.L.S. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário através de filtros percoladores. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19., ABES, 1998.
- BITTAR, P.R. Biorremediação, **Revista Informativo do C.R.Q.**, p. 65-67, Set/Out, 2000.
- BLANCHETTE, R.A. Degradation of the lignocellulose complex in wood. **Canadian Journal of Botany**, Supplement 1, v. 73, p. 24-29, 1995.

- BOLLAG, J. -M.; SHUTTLEWORTH, K. L.; ANDERSON, D. H. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 3086-3091, 1988.
- BONNEN, M.A.; ANTON, L.H.; ORTH, A.B. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 960-965, 1994.
- BONO, I.; RIOLA, M.C.M.; BRADLEY, J.A. Oxidations of phenolic compounds by lignin peroxidase. **FEBS Letters**, v. 429, p. 390-392, 1998.
- BORZACCONI, L.; LOPEZ, I.; OHANIAN, M.; VINAS, M. Anaerobic-aerobic treatment of municipal solid waste leachate. **Environmental Technology**, v. 20, p. 211-217, 1999.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 823-827, 1992.
- BRACK, W.; FRANK, H. A Bioassay-directed method for the separation of volatile compounds from landfill leachates. **Chemosphere**, v. 34, p. 849-854, 1997.
- BRANCO, S.M.; HESS, M.L. Tratamento de resíduos. **Tópicos de microbiologia industrial**, São Paulo: EDUSP, 1975, v.2. p. 47-76.
- BRÁS, I.; SANTOS, L.; ALVES, A. Monitoring organochlorine pesticides from landfill leachates by gas chromatography – electron-capture detection after solid-phase microextraction, **Journal of Chromatography A**, v. 891, p. 305-311, 2000.
- BUMPUS, J.A.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST, S.D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. **Science**, v. 228, p. 1434-1436, 1985.
- BUSWELL, J. A.; ODIER, E. Lignin biodegradation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 6, p.1-60, 1987.
- CARVALHO, B. **A ecologia aplicada ao saneamento ambiental**. Rio de Janeiro: ABES, p. 56-58, 1980.
- CASTILHOS JR., A.B. Produção de biogás e líquidos percolados em aterros sanitários. **Saneamento Ambiental**, v. 12, p. 28-33, 1991.
- CHEN, C-I.; CHANG, H-M. Chemistry of lignin biodegradation. T. Higuchi. In: **Biosynthesis and biodegradation of wood components**, Academic Press, Orlando, 1985, p. 535-556.
- CHIANG, L-C., CHANG, J-E.; WEN, T-C. Electrochemical treatability of refractory pollutants in landfill leachate. **Hazardous Waste Hazardous Materials**, v. 12, p. 71-82, 1995.

- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 1 de 23 janeiro de 1986. Diário Oficial da União: 17/02/1986.
- COOKSON, J.T. **Bioremediation engineering design and application**. EUA: McGraw-Hill Inc., 524 p. 1995.
- DENT, B.B.; KNIGHT, M.J. Cemeteries: a special kind of landfill; IAH SUSTAINABLE SOLUTIONS CONFERENCE, Kenilworth International Association of Hydrologists, 1998, Proceedings.
- DIAMADOPOULOS, E. Characterization and treatment of recirculation-stabilized leachate. **Water Research**, v. 28, p. 2439-2445, 1994.
- DIAS, S.M.F.; VAZ, L.M.S. Compostagem aeróbica: Tratamento dado ao lixo gerado no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19. ABES, 1998.
- EPA – Environmental Protection Agency. **Handbook of in-situ treatment of hazardous waste contaminated soils**. 1990, 157p., EPA 540/2 – 90/002.
- EPA – Environmental Protection Agency – <http://www.epa.gov/superfund/sites>. Data de acesso: 14/07/2000
- ERIKSSON, K. -E.; NISHIDA, A. Methanol oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* **Methods of Enzymology**, v. 161B, p. 322-326, 1988.
- ERIKSSON, K. E. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, v. 24, p. 79-101, 1990.
- ERIKSSON, K. E.; JOHNSRUD, S. C.; VALLANDER, L. Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, v. 135, p. 161-168, 1983.
- ESTUDO DO IMPACTO AMBIENTAL DOS ATERROS SANITÁRIOS DE PRADO, ALCOBAÇA E CARAVELAS. Salvador: Conder/Higes, 2000.
- EVANS, C. S.; DUTTON, M. V.; GUILLÉN, F.; VENESS, R. G. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 13, p. 235-240, 1994.
- FARQUHAR, G.J. Leachate: Production and characterization. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v.6, p. 317-325, 1987.
- FERRUCIO, R.S. **Comparação da aplicação da remediação em áreas degradadas**. Campinas, 1997. 194p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas.

- FIELD, J.A.; DE JONG, E.; FEIJOO-COSTA G.; DE BONT, J.A.M, Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. **Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 44-48, 1993.
- FOLHA DO MEIO AMBIENTE, **Chorume dos cemitérios contamina lençol freático**, – Disponível na internet: <http://www.folhadomeioambiente.com.br/fma-104/cemi104.htm>. Data de acesso: 06/02/2001
- GANDOLLA, M.; FISCHER, C.; ACAIA, C. Environmental impact and monitoring of sanitary landfills. In: 2nd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON WASTE DISPOSAL, Bahia: 1997, Proceedings.
- GLAZER, A.N.; NIKAIDO, H. Environmental applications. **MICROBIAL Biotechnology**. Eds. W.H. Freeman & Co. N. York. p.561-620. 1995.
- GLENN, J. K.; AKILESWARAN, L.; GOLD, M. H. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 251. p. 688-696, 1986.
- GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; MAYFIELD, M. B.; KUWAHARA, M.; GOLD, M.H. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in the lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 114, p. 1077-1083, 1983.
- 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.
- GOLD, M. H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiological Review**, v. 57, p.606-622, 1993.
- GOLD, M. H.; WARIISHI, H.; VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **ACS Symposium**, v. 389, p. 127-140, 1989.
- GOLDBERG, M.S.; SIEMIATYCK, J.; DEWAR, R.; DESY, M.; RIBERDY, H. Risks of developing cancer relative to living near a municipal solid waste landfill site in Montreal, Quebec, Canada. **Archives of Environmental Health**, v. 54, p. 291-296, 1999.
- GREENE, R. V.; GOULD, J. M. Fatty acyl-coenzyme A oxidase activity and H₂O₂ production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 118, p. 437-443, 1984.
- GUILLÉN, F.; MARTINEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 603-611, 1992.

- HARMSEN, J. Identification of organic compounds in leachate from a waste tip, **Water Research**, v. 17, p. 699-705, 1983.
- HAMADA, J. Estimativas de geração e caracterização de chorume em aterros sanitários. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19., ABES, 1998.
- HAMMEL, K.E.; KALYANARAMAN, B.; KIRK, T.K. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 16948-16952, 1986.
- HATAKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin biodegradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 125-135, 1994.
- HIGUCHI, T. Lignin biochemistry and biodegradation. **Wood Science and Technology**, v. 24, p. 23-63, 1990.
- HORAN, N.J. **Biological Wastewater treatment systems. Theory and operation**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- HWANG, H-M.; HODSON, R.; LEWIS, D. Microbial degradative activity in ground water at a chemical waste disposal site. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 865-863, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) – Disponível na internet: <http://www.ibge.gov.br>. Data de acesso: 12/01/2001
- INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. **Manual de gerenciamento integrado - lixo municipal**. São Paulo: IPT/CEMPRE, 1995. (Publicação IPT, 2163)
- JENKINS, D.; RICHARD, M.G.; DAIGGER, G.T. **Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming**. 2.ed. EUA: Barney and Nobles, 1993, 193p.
- JONES-LEE, A.; LEE, G.F. Appropriate use of MSW leachate recycling in municipal solid waste landfilling. In: AIR AND WASTE MANAGEMENT ASSOCIATION 93rd NATIONAL ANNUAL MEETING, Pittsburgh: 2000, Proceedings.
- JORNAL CORREIO POPULAR – Disponível na internet: <http://www.correiopopular.com.br>. Data de acesso: 19/02/2001
- KELLEY, R. L.; REDDY, C. A. Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 269-274, 1988.
- KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

- KIRK, T.K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. Influence of cultural parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v. 117, p. 277-285, 1977.
- KOERNER, R.M.; SOONG, T-Y. Leachate in landfills: the stability issues. **Geotextiles and Geomembranes**, v.18, p.293-309, 2000.
- KUPFERLE, M.J.; CHEN, T.C.; GALLARDO, V.J.; LINDBERG, D.E.; BISHOP, P.L.; SAFFERMAN, S.I.; BISHOP, D.L. Anaerobic pretreatment of hazardous waste leachates in publicly owned treatment works. **Water Environmental Research**, v. 67, p. 910-920, 1995.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.
- LABORDE, J. Sur la casse des vins. **C.R. Hebd Seances Academic Sciences**, v. 123, p. 1074-1075, 1896.
- LACKNER, R.; SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of *Pharechaete chrysosporium*. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 178, p. 1092-1098, 1991.
- LAMAR, R.T., LARSEN, M.J.; KIRK, T.K. Sensitivity to and degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3519-3526, 1990.
- LAMAR, R.T.; DIETRICH, D.M. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3093-3100, 1990.
- LEITE, V.D.; POVINELLI, J.; VAZQUEZ, V.R.C. Modelos de bioconversão anaeróbia de resíduos sólidos urbanos inoculados com lodo de esgoto sanitário. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19., ABES, 1998.
- LEITH, W. **The analysis of organic pollutants in water and waste water**. 1ed. Michigan: STS, Inc., 1973.
- LEONOWICZ, A.; SZKLARZ, G.; WOJTAS-WASILEWSKA, M. The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (Peritan Na). **Phytochemistry**, v. 24, p. 393-396, 1985.
- LIMA, L.M.Q. **Tratamento de lixo**. 2.ed. São Paulo: Hemus, 1991. 242p.
- LIN, C-Y.; BIAN, F-Y.; CHOU, J. Anaerobic co-digestion of septage and landfill leachate. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 265-282, 1999.

- LIN, C-Y.; CHANG, F-Y.; CHANG, C-H. Co-digestion of leachate with septage using a UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 175-178, 2000.
- MACHADO, A.V.; PRATA FILHO, D. Gestão de resíduos sólidos urbanos em Niterói. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 20. Rio de Janeiro: 1999.
- MANOHARAN, R.; HARPER, S.C.; MAVINIC, D.S.; RANDALL, C.W.; WANG, G.; MARICKOVICH, D.C. Inferred metal toxicity during the biotreatment of high ammonia landfill leachate. **Water Environmental Research**, v. 64, p 858-865, 1992.
- MANSUR, G.L.; MONTEIRO, J. H. R. P. CARTILHA DE LIMPEZA PÚBLICA. **O que é preciso saber sobre limpeza urbana**. Disponível na internet: <http://www.resol.com.br/Cartilha/cartilha00.htm>. Data de acesso: 25/06/2000
- MARINHO, A.M.C.P. **Contaminação de aquíferos por instalação de cemitérios. Estudo de caso do Cemitério São João Batista**. Fortaleza, 1998. 88p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará.
- MARTIN, C.D.; JOHNSON, K.D.; MOSHIRI, G.A. Performance of a constructed wetland leachate treatment system at the Chunchula landfill, Mobile County, Alabama. **Water Science and Technology**, v. 40, p. 67-74, 1999.
- MARZULLO, L.; CANNIO, R.; GIARDINA, P.; SANTINI, M.T.; SANNIA, G. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 3823-3827, 1995.
- MATHIAS, A.L.; LOPRETTI, M.I.; RODRIGUES, A.E. Chemical and biological oxidation of *Pinus pinaster* lignin for the production of vanillin. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 64, p. 225-234, 1995.
- McCORMICK, R.J.; DUKE, M.L. On site incineration as a remedial action alternative. **Pollution Engineering**, v.4, p. 68-73, 1989.
- MEJU, M.A. Geoelectrical investigation of old/abandoned, covered landfill sites in urban areas: model development with a genetic diagnosis approach. **Journal of Applied Geophysics**, v. 44, p. 115-150, 2000.
- MERCK. **Análisis del agua**. 1st. Ed. MERCK, 1975.
- NEDWELL, D.B.; REYNOLDS, P.J. Treatment of landfill leachate by methanogenic and sulphate-reducing digestion. **Water Research**, v. 30, p. 21-28, 1996.
- ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 1988.

OGATA, M.G. **Os resíduos sólidos na organização do espaço e na qualidade do ambiente urbano: uma contribuição geográfica ao estudo do problema na cidade de São Paulo**. Superintendência de Recursos Naturais e Meio-Ambiente – SUPREN, Série Recursos Naturais e Meio-Ambiente, v.8, p.17-73, 1983.

O lixo – Disponível na Internet:

<http://www.geocities.com/Yosemite/Gorge/7224/lixo.html>. Data de acesso: 11/05/2001

Organics – Disponível na internet: <http://www.organics.com>. Data de acesso: 04/02/2001

OZTURK, I.; ALTINBAS, M.; ARIKAN, O.; DEMIR, A. Anaerobic UASBR treatment of young landfill leachate. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 8, p. 389-396, 1999.

PACHECO, A.; MATTOS, B.A. **Cemitérios e meio-ambiente**. Revista Tecnologias do Ambiente, v. 33, p. 13-15, 2000.

PAICE, M.G.; REID, I. D.; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD, F.S.; JURASEK, L. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies Kraft pulp. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 59, p. 260-265, 1993.

PASZCZYNSKI, A.; HUYNH, V-B.; CRAWFORD, R. Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, p. 37-41, 1985.

PEREZ, J.; JEFFRIES, T.W. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 58, p. 2402-2409, 1992.

PERRY, J.J.; STALEY, J.T. **Microbiology: Dynamics and Diversity**. 1.ed. Washington: Saunders College Publishing, 1997. 911p.

PESSIN, N.; SILVA, A.R.; BRUSTOLIN, I.; MANDELLI, S.M.De C.; PANAROTTO, C.T. Variação da composição dos líquidos percolados do aterro sanitário de São Giacomo – Caxias do Sul – RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19., ABES, 1998.

PINTO, M.S. **A coleta e a disposição de lixo no Brasil**. São Paulo: FGV, 1979.

POHLAND, F.G.; KIM, J.C. In situ anaerobic treatment of leachate in landfills bioreactors. **Water Science Technology**. v.40, p.201-210, 1999.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO PAULO. **Limpeza Pública**. PRODAM/SP – Disponível na internet: <http://www.prodram.sp.gov.br/limpurb>. Data de acesso: 12/11/2000

- REASONER, D.J.; GELDREICH, E.E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 1-7, 1985.
- REDDY, C. A. Na overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 91-107, 1993.
- REDDY, C.A.; D' SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 13, p. 137-152, 1994.
- REID, I.D. Biodegradation of lignin. **Canadian Journal of Botany**, Supplement 1, v. 73, p. S1011-S1018, 1995.
- REITZEL, S., FAQUHAR, G.; McBEAN, E. Temporal characterization of municipal solid waste leachate. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v. 19, p. 668-679, 1992.
- RENGANATHAN, V.; GOLD, M. H. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, na extracellular enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry**, v. 25, p. 1626-1631, 1986.
- REVISTA ÉPOCA – Disponível na internet: <http://www.epoca.com.br>. Data de acesso:
- REVISTA ISTO É – Disponível na Internet: <http://www.istoe.com.br>. Data de acesso: 15/02/2001
- REVISTA UNISANTA ON-LINE – Disponível na internet: <http://www.online.stcecilia.br>. Data de acesso: 15/02/2001
- REVISTA VEJA – Disponível na Internet: <http://www.veja.com.br>. Data de acesso: 15/02/2001
- RINGLING, D.; VAN ALFEN, N. K. Extra- and Intracellular laccases of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica* **Applied Environmental and Microbiology**, v. 59, p. 3634-3639, 1993.
- ROBISON, H.D.; MARIS, P.J. Leachate from domestic waste: generation, composition and treatment. A review. **WCR-Technical Report-TR 108**. March, 1979.
- ROBINSON, H.; GRANTHAM, G. The treatment of landfill leachates in on-site aerated lagoon plants: Experience in Britain and Ireland. **Water Research**, v. 22, p. 733-747, 1988.
- ROSS, W.R. Factors influencing the chemical characteristics of landfill leachates. **Water SA**, v. 16, p. 275-280, 1990.

- RULKENS, W.H.; TICHY, R.; GROTEHUIS, J.T.C. Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures. **Water Science Technology**, v. 37, p. 27-35, 1998.
- SILVA, E.F.; LIMA, M.A.G.A.; SALGUEIRO, A.A. Investigação Microbiológica de águas residuárias do aterro de Muribeca, Recife, PE. In: CONGRESSO NORDESTINO DE ECOLOGIA, 8. Recife: 1999.
- SILVA, E.F., LIMA, M.A.G.A. & SALGUEIRO, A.A. **Investigação microbiológica de águas residuárias do Aterro da Muribeca, Recife, PE**. Impactos Ambientais – Disponível na internet: http://www.sne.org.br/congresso/resumos/impactos_ambientais/288.htm. Data de acesso: 15/02/2001
- SRINIVASAN. C.; D SOUZA, T. M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Demonstration of laccase in the White rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. **Applied Environmental and Microbiology**. V. 61, p. 4274-4277, 1995.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenol oxidases by wood-rotting fungi. **Mycology**, v. 81, p. 234-240, 1989.
- SZKLARZ, G.D.; LEONOWICZ, A. Cooperation between fungal laccase and glucose oxidase in the degradation of lignin derivatives. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2537-2539, 1986.
- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, 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.
- TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Procedures of the National Academy of Science, USA**. v. 81, p. 2280-2284, 1984.
- TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 1-17, 1995.
- VALLI, K.; GOLD, M. H. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 2131-2137, 1991.
- VAZOLLER, R.F.; GARCIA, M.A.R.; GARCIA, A.D.; CONCEIÇÃO NETO, J. **Manual Técnico sobre Microbiologia de Lodos Ativados**. CETESB - Séries Anuais, 22p., 1989.

- VAZOLLER, R.F. Microbiologia e saneamento ambiental. In: Biodiversidade e oportunidades tecnológicas. Disponível na internet: <http://www.bdt.org.br/publicacoes/padct.bio/cap9/3/rosbio.htm> Data de acesso: 15/02/2001
- VOLC, J.; ERIKSSON, K. E. Pyranosa 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* **Methods of Enzymology**, v. 161B, p. 316-322, 1988.
- VOLC, J.; KUBÁTOVÁ, E.; SEDMERA, P.; DANIEL, G.; GABRIEL, J. Pyranose oxidase and pyranose dehydratase: enzymes responsible for conversion of D-glucose to cortalcerone by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v. 156, p. 297-301, 1991.
- WALL, D.K.; ZEISS, C. Municipal landfill biodegradation and settlement. **Journal of Environmental Engineering**, v. 121, p. 214-224, 1995.
- WARIISHI, H.; GOLD, M.H. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 2070-2077, 1990.
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 23688-23695, 1992.
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model cimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* **Biochemistry**. V. 28, p. 6017-6023, 1989.
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. *In vitro* Depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 176, p. 269-275, 1991.
- WENZEL, A.; GAHR, A.; NIESSNER, R. TOC-removal and degradation of pollutants in leachate using a thin-film photoreactor. **Water Research**, v. 33, p.937-946, 1999.
- WESTLAKE, K.; ARCHER, D.B.; BOONE, D.R. Diversity of cellulolytic bacteria in landfill. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 73-78, 1995.
- WHEATLEY, F.; PALMISANO, A.C.; MARUSCK, D.A. Enumeration of micro-organisms from a sanitary landfill. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 393-399, 2000.
- YASUHARA, A.; SHIRAISHI, H.; NISHIKAWA, M.; YAMAMOTO, T.; UEHIRO, T.; NAKASUGI, O.; OKUMURA, T.; KENMOTSO, K.; FUKUI, H.; NAGASE, M.; ONO, Y.; KAWAGOSHI, Y.; BABA, K.; NOMA, Y. Determination of organic components in leachate from hazardous waste disposal sites in Japan by gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 774, p. 321-332, 1997.

- YOSHIDA, H. Chemistry of Lacquer (Urushi) part 1. **Chemical Society**, v. 43, p. 472-486, 1883.
- ZADRAZIL, F. Conversion of different plant waste into feed by basidiomycetes. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology** , v. 9, p. 243-248, 1980.
- ZADRAZIL, F. Screening of fungi for lignin decomposition and conversion of straw into feed. **Angew Botanik** v. 59, p. 433-452, 1985.
- ZADRAZIL, F.; BRUNNERT, H. The influence of ammonium nitrate supplementation on degradation and in vitro digestibility of straw colonized by higher fungi. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 37-44, 1980.
- ZINEBI, S.; HENRIETTE, C.; PETITDEMANGE, E.; JORET, J.C. Identification and characterization of bacterial activities involved in wastewater treatment by anaerobic fixed-bed reactor. **Water Research**, v. 28, p. 2575-2582, 1994.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE