



**Governo do Estado de São Paulo**  
**Universidade Estadual de Campinas**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**DOUTORADO EM ENGENHARIA QUÍMICA**  
**AREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES: PARÂMETROS**  
**ÓTIMOS NA UTILIZAÇÃO DE UM BIOREATOR DE LEITO**  
**RECHEADO MODIFICADO.**

**AUTORA: ELISA ESPOSITO**  
**ORIENTADORA: PROFA. DRA. LÚCIA HELENA INNOCENTINI MEI**

**MARÇO/1995.**

**Es65t**

**24811/BC**

**CAMPINAS - S.P.**  
**BRASIL**

Esta versão corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela Bióloga Elisa Esposito, e aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de Março de 1995.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Mei', written in a cursive style.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE POLÍMEROS

TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES:  
PARÂMETROS ÓTIMOS NA UTILIZAÇÃO DE UM  
BIOREATOR DE LEITO RECHEADO MODIFICADO.

AUTOR: ELISA ESPOSITO

ORIENTADOR: PROFA. DRA. LÚCIA HELENA INNOCENTINI MEI

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do  
título de Doutor em Engenharia Química.

Março/1995.  
Campinas-SP



BC  
UNICAMP  
Es65t  
24811  
433/95  
R\$ 11,00  
08/06/95

CM-00071511-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Es65t      Esposito, Elisa  
Tratamento biológico de efluentes: parâmetros ótimos  
na utilização de um bioreator de leito recheado  
modificado / Elisa Esposito. - - Campinas, SP: [ s.n. ],  
1995.

Orientador: Lucia Helena Innocentini Mei.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Engenharia Química.

1. Biodegradação. 2. Bioreatores. 3. Fungos -  
Biotecnologia. 4. Indústria de celulose. I. Mei, Lucia  
Helena Innocentini. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese defendida e aprovada, em 23 de março de 1995, pela banca examinadora constituída pelos Professores:



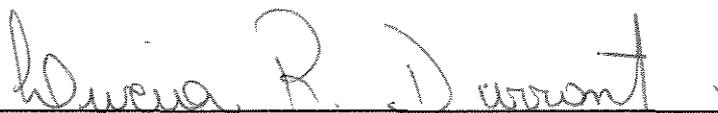
---

Prof. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei



---

Prof. Dr. André Luiz Ferraz



---

Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant



---

Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos



---

Prof. Dra. Sandra Lúcia da Cruz

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto de Química e a seus Funcionários por todas as facilidades obtidas durante todo o período desta tese e especialmente ao Professor Dr. Nelson Durán (Laboratório de Química Biológica) pelo apoio, incentivo e valiosas discussões sobre o tema deste trabalho.

A Dra. Juanita Freer, ao Dr. Jaime Baeza e ao Dr. Jaime Rodriguez do Laboratório de Recursos Renováveis (Universidad de Concepción, Concepción, Chile), pela possibilidade de utilizar toda a infraestrutura deste laboratório em análise de efluentes, permitido realizar parte deste trabalho.

A Dra. Lúcia H. Innocentini Mei pela amizade e apoio no decorrer deste trabalho.

A minha mãe, pelo apoio, especialmente nesta última etapa de redação da tese, nos cuidados com a Gabriela, dividindo comigo o papel de mãe.

As amigas Mariela Speranza e a Valéria Reginatto pelo incentivo e bons momentos de descontração.

A Raquel Pupo Nogueira e Sandra Gomes de Moraes (IQ-UNICAMP) pelo auxílio na realização das análises de TOC.

A Rosana Bergamasco (DEQ-Universidade Estadual de Maringá) pelos esclarecimentos no tema de coeficiente de transferência de oxigênio.

Aos colegas da Faculdade de Engenharia Química, em especial a Ruth pelo companherismo e horas de estudo em conjunto.

Ao CNPq, pelo fundamental apoio financeiro.

## ABSTRACT

Biological treatment of effluent is a promising process for reduction of the environmental impact due to the effluent discharge from the pulp and paper industry. Two fungal strains, *Lentinula* (= *Lentinus*) *edodes* UEC-2019 and UEC-2021, previously selected for this purpose were studied. The principal aim of this study was to determine the optimal conditions for the effluent treatment from pulp and paper industry with the selected fungi in a modified air-lift-packed bed reactor. The conditions for the lignin peroxidase (LiP) and for manganese peroxidase (MnP) production, *L. edodes* free and immobilized system at Erlenmeyer and bioreactor scale with different nature of organochloride compounds were studied. The oxygen transfer coefficient ( $K_La$ ) in free and immobilized system at the flow rate of 400, 600, and 800 mL/min of oxygen, which is an essential information of aerobic treatment was also studied. The results showed that the best conditions for the enzymatic production were 1.25% of malt extract, without any extra nitrogen source and in free micelial growth. *L. edodes* UEC-2021 appeared as the most efficient fungus for effluent decontamination of different nature, reaching 100% of acute toxicity reduction. The  $k_La$  more adequate in the bioreactor studied was the free system ( $0.18 \text{ min}^{-1}$ ). In this condition a 63% of phenol reduction, 32% of chlorolignin degradation and 37.5% of AOX removal after 3 days of treatment were obtained. The immobilized system with a  $K_La$  of  $0.22 \text{ min}^{-1}$  was the most adequate for the AOX reduction (58%) in two days of treatment. The effluent treatment, which is coming from the pulp bleaching, with *L. edodes* UEC-2021 in a air-lift-packed bed bioreactor, demonstrated to be an efficient method for decontamination of these effluents.

## RESUMO

O tratamento biológico de efluentes é um processo promissor para a redução do impacto ambiental ocasionado pela liberação dos efluentes das indústrias papelceiras. Duas cepas de fungos, *Lentinula* (= *Lentinus*) *edodes* UEC-2019 e UEC-2021, previamente selecionadas para este fim, foram empregadas. O objetivo primordial deste estudo foi a determinação das condições ótimas para o tratamento de efluentes da indústria papelceira com *L. edodes* em um modelo modificado de bioreator do tipo "air-lift"-leito recheado. Estudaram-se as condições mais adequadas para produção de lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), *L. edodes* em sistemas livres e imobilizados a nível de Erlenmeyer e em bioreator com efluentes organoclorados de naturezas diferentes. O último parâmetro a ser estudado foi o coeficiente de transferência de oxigênio ( $K_{L,a}$ ) em sistemas livres e imobilizados nas vazões de ar de 400, 600 e 800 mL/min, o qual é um dado essencial no planejamento de bioreatores para tratamentos aeróbios. Os resultados demonstraram que as melhores condições para a produção enzimática foram meio líquido extrato de malte 1.25%, sem fonte adicional de carbono ou nitrogênio e crescimento micelial livre. *L. edodes* UEC-2021 mostrou-se altamente capaz de descontaminar efluentes de diferentes naturezas, atingindo 100% de redução de toxicidade aguda. Em bioreator, o  $K_{L,a}$  mais adequado para a eficiência do processo, foi em sistema livre, 0.18 min<sup>-1</sup>. Atingindo 63% de redução de fenóis totais, 32% de cloroligninas e 37.5% de AOX, em um período de três dias de tratamento. Em sistemas imobilizados um  $K_{L,a}$  de 0.22 min<sup>-1</sup> foi o mais adequado para remoção de AOX, atingindo 58% em apenas dois dias de tratamento. O tratamento de efluentes provenientes do branqueamento da polpa kraft, com *L. edodes* UEC-2021 em bioreator do tipo "air-lift"-leito recheado, demonstrou ser um método eficiente na descontaminação destes poluentes.

## **ABREVIACOES UTILIZADAS**

**AOX (halogenios orgânicos adsorvíveis)**

**DBO (demanda bioquímica de oxigênio)**

**DQO (demanda química de oxigênio)**

**EOP (E=extrao alcalina, O=oxignio, P=perxido de hidrogênio)**

**FPLC (cromatografia líquida rápida de proteinas)**

**$K_{1a}$  (coeficiente de transferência de oxigênio)**

**LiP (lignina peroxidase)**

**MnP (manganês peroxidase)**

**TOC (carbono orgânico total)**

## INDICE

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>01</b>
1.1) Indústria Papeleira: Impacto Ambiental Causado pela Emissão de seus Efluentes.	01
A Produção de Papel	02
O Brasil Frente ao Mercado Internacional	03
Branqueamento de Polpa Kraft	04
1.2) Tratamentos Convencionais de Efluentes e Novas Tendências	05
1.3) Tratamento Biológico de Efluentes: Métodos Alternativos	07
1.4) Bioreator "Air-lift" - Leito Recheado: Efeito do Desenho sobre a Eficiência e Escalamento de Processo	09
1.5) A Utilização de Fungos de Descomposição Branca na Degradação de Poluentes	11
1.6) Imobilização	14
1.7) Coeficiente de Transferência de Oxigênio ( $K_L a$ )	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL E METODOS</b>	<b>17</b>
3.1) Equipamentos	
3.2) Reagentes	17
3.3) Microrganismos	17
3.4) Meio de Cultura e Inóculo	17
3.5) Meio de Cultura: Indução Enzimática com E1 e Fontes de Carbono e Nitrogênio	18
3.6) Efluentes	19
3.7) Método de Seleção	19
3.8) Indução Enzimática	19
3.9) Determinação da Cor	20
3.10) Característica da Cor antes e Após o Tratamento Biológico	20
3.11) Determinação de Fenóis Totais	20
3.12) Determinação de Cloreto	21
3.13) Determinação de AOX e OX total	21
3.14) Determinação de TOC	21
3.15) Extração das Enzimas em Meio Sólido	21
3.16) Determinação de Lignina Peroxidase (LiP)	22
3.17) Determinação de Manganês Peroxidase (MnP)	22

3.18) Determinação de açúcares redutores	22
3.19) Determinação da Absorção do Micélio no Efluente	23
3.20) Determinação do Peso Seco do Micélio	23
3.21) Determinação de Lignina/Clorolignina	23
3.22) Determinação da Toxicidade pela Técnica de MICROTOX	24
3.23) Tratamento Biológico de Efluentes	24
3.24) Suporte para a Imobilização do Fungo	24
3.25) Tratamento para Modificação do Nylon	25
3.26) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
3.27) Bioreator	26
3.27.1) Desenho do Bioreator	26
3.27.2) Condições de Uso	26
3.28) Carregamento e Inoculação do Bioreator com Micélio Livre ou Imobilizado em Nylon	27
3.29) Determinação do $K_La$	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1) Produção e Otimização de LiP e MnP por <i>L. edodes</i>	30
4.2) O Papel de MnP e LiP no Tratamento Biológico de Efluentes	33
4.3) Imobilização de <i>L. edodes</i> em Suportes Modificados Quimicamente	36
4.4) Seleção de Fungos para Tratamento de Efluente E1 de Madeira mole ( <i>Pinus radiata</i> )	42
4.5) Estudo Comparativo entre um Efluente de Madeira Dura ( <i>Eucalyptus grandis</i> ) e outro de Madeira Mole ( <i>Pinus radiata</i> ) Tratados por <i>L. edodes</i> UEC-2021 e <i>P. sanguineus</i> UEC-2050	44
4.6) Cálculo do Coeficiente de Transferência de Oxigênio ( $K_La$ )	48
5. CONCLUSÕES	60
6. PROJEÇÕES	63
7. REFERÊNCIAS	64

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A industrialização do papel Kraft produz uma grande quantidade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, extremamente daninhos ao ambiente. Neste trabalho são analisados os efluentes líquidos emitidos no segundo estágio do branqueamento da polpa Kraft, conhecido por E1 (primeira extração alcalina, após o estágio de cloração) e propõe-se um método alternativo para o tratamento biológico destes efluentes.

### 1.1) Indústria Papeleira: Impacto Ambiental Causado pela Emissão de seus Efluentes.

#### A Produção de Polpa e Papel.

A produção mundial anual de polpa foi estimada em 1992 em 261 milhões de toneladas e a de papel e cartão em 196 milhões de toneladas (Rintala e Puhakka, 1994). No Brasil o total de polpa produzida até 1993 era de 5.379 milhões de toneladas e 4.858 milhões de toneladas de papel (Anônimo, 1994). Para cada tonelada de polpa manufaturada são liberados até 180 m<sup>3</sup> de efluentes, enquanto que 20-70 m<sup>3</sup> são emitidos por tonelada de papel e cartão. Estes efluentes podem causar deficiência de oxigênio, toxicidade aguda ou crônica, mutagenicidade e eutroficação nos corpos de águas receptores e por consequência modificações nas comunidades de plantas e animais (Kautsky, 1992, Leonardsson, 1993). Recentemente foi constatada a presença de dioxinas (polifenóis clorados) altamente tóxicas (em níveis de partes por trilhão), em polpas Kraft branqueada com cloro molecular e seu licor residual de branqueamento (Mounteer e col. 1992; Zini, 1993). A princípio pouca atenção foi dada ao problema (McCubbin, 1994). Em 1983 foram encontrados traços de dioxinas e furanos em peixes no rio Wisconsin, nos Estados Unidos. Mais tarde, em 1986, pesquisadores suecos constataram deformidade em peixes no mar Báltico, próximos da área de lançamento de efluentes de uma indústria papeleira (Odendahl, 1994). As dioxinas são os compostos químicos mais tóxicos regulados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA, USA). A avaliação mais recente foi iniciada em 1991, devido a novos estudos e controvérsias acerca da ameaça à saúde causada por esses compostos. Em 1994 foi reafirmada a probabilidade de causa de câncer em humanos e também novos efeitos nocivos à saúde, que incluem disfunção dos sistemas endócrino, reprodutor, e imune, bem como efeito no

desenvolvimento fetal e outros (Johnson, 1995). Esses eventos e outros tornaram o assunto polêmico, o bastante para envolver a indústria, o governo, pesquisadores, ambientalistas e toda a opinião pública na luta para controlar a liberação de compostos organoclorados nos ecossistemas aquáticos. Na conferência anual de Branqueamento Não Clorado (NCB) (Ilha Amélia, Finlândia, março de 1994) o enfoque foi a redução ou eliminação do uso de compostos clorados. As indústrias vêm empenhando esforços para alterar os processos convencionais de cozimento, branqueamento e tratamento de efluentes. Em decorrência, a forma mais tóxica de dioxina clorada, a 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) desapareceu das indústrias papeleiras na América do Norte. Através das mudanças na tecnologia, decresceu cerca de 80% a descarga de compostos organoclorados, nos últimos 5 anos (Odendahl, 1994). Em 1992 a produção mundial de polpa totalmente livre de cloro atingiu somente 1% (Odendahl, 1994). A fig. 1 mostra as mudanças nas quantidades relativas de branqueadores químicos utilizados no mundo inteiro e suas projeções. A tendência é uma queda acentuada dos compostos clorados e a substituição dos mesmos por agentes a base de oxigênio.

Está programado pela EPA, para este ano de 1995, o início do desenvolvimento de uma estratégia de controle de dioxinas. Entretanto o problema não se resolve apenas com esta medida, pois recentemente foi descoberto efeito sub-letal em peixes expostos a efluentes livres de cloro.

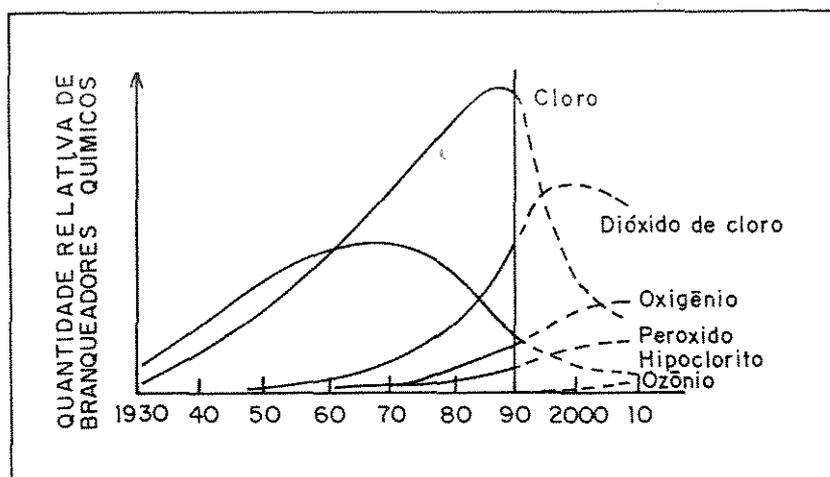


FIGURA 1. Branqueadores químicos utilizados no mundo (Odendahl, 1994).

Estudos realizados no Canadá sugerem que a liberação de compostos não clorados da madeira durante a polpação podem causar estes problemas de toxicidade crônica (Peck e Daley, 1994). Esses compostos ou composto ainda não identificado está sendo denominada como "composto X". Enquanto isso vários questionamentos ficam sem resposta: Quais as fontes destes compostos nos efluentes ? Que estratégias são viáveis para controlar sua liberação? Que fatores como o tipo de madeira utilizada para polpação, tecnologia de polpação e branqueamento afetam a sua liberação? São os lodos e outros resíduos produtos contaminados? Quais são persistentes no ambiente? Quais são bioacumulativos? Quais serão as concentrações permitidas para o ambiente?

As tendências da tecnologia aplicada a redução do impacto ambiental ocasionado pela produção de polpa e papel pode ser sumarizada nos seguintes itens: a) Redução do consumo de água; b) Reciclagem dos efluentes de branqueamento; c) Maior deslignificação durante o estágio de polpação e menos durante o branqueamento; d) A adição de um estágio de deslignificação com oxigênio antes da planta de branqueamento; d) A redução ou eliminação de compostos clorados na planta de branqueamento; e) O uso de oxigênio e/ou peróxido de hidrogênio no estágio E1; f) Liberação de efluentes não tóxicos, com baixa DBO, TSS (Total de Sólidos Suspensos) e organoclorados (Odendahl, 1994).

Com relação a primeira colocação, Mobius e Cordes-Tolle (1993, 1994) estudaram a reutilização da água antes e após tratamento biológico. O efluente de plantas com filtro biológico são especialmente preferidas para este fim. Em muitos casos o reuso atinge 40% do efluente tratado, em outros acima de 70 % é possível, sem problemas com a produção ou qualidade do produto. Existem muitos outros trabalhos abordando este tema (Odendahl, 1994).

### **O Brasil Frente ao Mercado Internacional.**

Com o objetivo de atender as exigências do mercado internacional, principalmente o europeu, e reduzir a poluição, as indústrias brasileiras, em geral, tem demonstrado uma preocupação crescente frente a implementação de novas tecnologias para redução de compostos clorados no processo de branqueamento. Podemos citar como exemplo as indústrias Aracruz Celulose (ES), Riocell (RS) e Ripasa S.A. Celulose e Papel (SP). A Aracruz estimou para o ano de 1993, a produção de 80 mil toneladas de celulose, totalmente livre de cloro, volume três vezes superior

ao ano de 1992. Parte da produção total de celulose (1,025 milhão de ton/ano) será branqueada com oxigênio e dióxido de cloro. A Ripasa vem desenvolvendo uma tecnologia semelhante, com a introdução de peróxido de hidrogênio no branqueamento, substituindo 30 % dos compostos clorados (Anônimo, 1993). A Ripasa vem desenvolvendo pesquisas junto a Centros de estudos como o da Universidade da Carolina do Norte, nos Estados Unidos, e laboratórios como o da Paprican, do Canadá. As pesquisas envolvem experimentos com ozônio, peróxido de hidrogênio, soda e oxigênio. A Riocell vem desenvolvendo pesquisas junto a Universidade de Georgia nos Estados Unidos, empregando oxigênio, xilanases, ozônio e peróxido de hidrogênio (Grant, 1993). O objetivo de todas estas empresas é o mesmo, a redução ou eliminação de compostos clorados no processo de branqueamento, evitando o acúmulo de poluentes organoclorados.

### **Branqueamento da Polpa Kraft.**

O branqueamento da polpa Kraft é feito por sequências de múltiplas etapas, chamado pré-branqueamento, onde 90 a 95 % da lignina é removida sem que ocorra um aumento significativo da alvura da polpa. A deslignificação se realiza tipicamente por reações de substituição e oxidação com cloro (C) ou mistura de cloro e dióxido de cloro (C + D). Após a lavagem, este estágio é seguido por extração com hidróxido de sódio (E) durante o qual os componentes solúveis em álcali são removidos. Recentemente, tem sido introduzido o uso de pequenas quantidades de oxigênio e/ou peróxido de hidrogênio no estágio alcalino para a substituição parcial de outros agentes químicos (Rintala e Puhakka, 1994). O verdadeiro branqueamento da polpa ocorre na segunda parte da sequência pela aplicação de oxidantes tais como dióxido de cloro (D), hipoclorito (H), peróxido de hidrogênio (P) e estágios de extração da polpa (Bajpal e Bajpal, 1992).

Os efluentes do branqueamento da polpa Kraft contém principalmente organoclorados provenientes das reações entre a lignina presente nas fibras e o cloro empregado para o branqueamento. Cerca de 10 % dos compostos clorados de baixa massa molecular (PM < 1000 g/mol) tem sido identificados, enquanto que cerca de 70 a 95 % dos organoclorados de alta massa molecular (PM > 1000 g/mol) já tem sido reportado (Rintala e Puhakka, 1994).

## 1.2) Tratamentos Convencionais de Efluentes e Novas Tendências.

Embora as indústrias de polpa e papel estejam investindo na produção de celulose livre de cloro, para redução de poluentes organoclorados na etapa final do processo, ainda persiste o problema da liberação destes efluentes ao meio ambiente. A substituição de cloro por dióxido de cloro nas etapas de branqueamento, como mencionado anteriormente, vem ganhando grande aceitação. A substituição por dióxido de cloro diminui a cor do efluente, a quantidade de organoclorados e também de dioxinas. Entretanto existe a problemática da formação de cloratos, que é proporcional a quantidade de dióxido de cloro utilizado. O clorato é um potente herbicida, e certas algas, como por exemplo as algas pardas, são particularmente sensíveis. Um exemplo prático ocorreu em meados de 1980, devido a emissão de clorato no mar Báltico por uma indústria papeleira, a alga *Fucus vesiculosus* desapareceu de uma área de 12 km<sup>2</sup> (Rosemarin e col. 1994). Portanto estes efluentes devem ser tratados biologicamente ou quimicamente antes de eliminá-los ao meio ambiente (Durán e Esposito, 1993). Os agentes a base de oxigênio (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ozônio), não produzem matéria orgânica clorada nos efluentes de branqueamento, além destes estarem isentos de componentes corrosivos. Porém, em desvantagem, pode haver uma redução significativa das propriedades físico-mecânicas do papel (resistência ao rasgo, viscosidade e rendimento). Embora o ozônio seja perfeitamente capaz de deslignificar, branquear e propiciar alvura nas polpas Kraft, ele tende a degradar os carboidratos, mais que outros agentes (Mounteer e col. 1992).

Uma das aplicações de maior sucesso da biotecnologia aplicada a indústria papeleira tem sido a utilização de xilanases na sequência de branqueamento da polpa. As xilanases tem sido empregadas para aumentar a eficiência da deslignificação com dióxido de cloro (McCubbin, 1994). Com o tratamento enzimático há uma economia de 15% dos branqueadores químicos convencionais (Odendahl, 1994), além de uma redução significativa dos compostos organoclorados nos efluentes (Daneault e col. 1994). A combinação de xilanases com ozônio, processo conhecido como EnZone, tem recebido bastante atenção (Yang e col. 1993). Outras enzimas oxidativas estão sendo estudadas para o branqueamento da polpa kraft, lacase e manganês peroxidase, que em presença de oxigênio e peróxido de hidrogênio podem deslignificar parcialmente a polpa (Paice e col. 1994). Todos estes reagentes continuam sendo exaustivamente

estudados como possíveis branqueadores químicos para substituição total do cloro da sequência de branqueamento (Ragauskas e col. 1994, Odendahl, 1994, McCubbin, 1994).

Como se pode observar, apesar das modificações já implementadas nas indústrias, o efluente gerado nos processos de branqueamento da polpa, necessariamente deve ser tratado. Os tratamentos convencionais são lagoas aereadas e lodos ativados. Estes métodos são eficientes na redução da demanda bioquímica de oxigênio e normalmente a toxicidade aguda é eliminada nas lagoas aereadas, entretanto, sabe-se que ligninas cloradas de alta massa molecular não são degradadas (Eriksson, 1992, Terrón e col. 1993, Cocci e col. 1993, Martín e Manzanares, 1994). O processo de lodo ativado é mais eficiente, reduzindo até 40 % dos compostos clorados, entretanto existe uma grande desvantagem que é a formação exagerada de lodo. Há um grande interesse na biodegradação de compostos clorados por digestão anaeróbia, porém o sistema é muito lento (Prasad e Joyce, 1993). Entretanto estudos recentes sobre tratamento anaeróbio tem mostrado várias vantagens deste tratamento comparado ao aeróbio. Polifenóis policlorados são removidos eficientemente, bem como AOX e o íon clorato fitotóxico são eliminados em um período de 10 h (Yu e Welander, 1994). A toxicidade dos efluentes de branqueamento para bactérias metanogênicas parece ser um dos principais fatores limitantes no processo de tratamento anaeróbio.

Os métodos de tratamento que podem remover compostos organoclorados, não são comumente aplicados. Entre eles podemos citar: adsorção, peróxido de hidrogênio, técnicas de membrana e radiação UV. Cerca de 140 métodos para remoção de cor foram avaliados, entretanto nenhum deles foi considerado comercialmente favorável pelas indústrias papeleiras (Prasad e Joyce, 1993). Duas plantas de ultrafiltração estão operando desde 1981 no Japão e na Suécia desde 1988. Atinge-se 87% de remoção de cor após 2000 horas de operação contínua (Odendahl, 1994).

A combinação do processo de adsorção com biodegradação foi avaliada em um trabalho recente de Çeçen (1994). Foi estudada a adição de carbono ativo em lodo ativado para o tratamento de efluentes de branqueamento que contém grandes quantidades de compostos não biodegradáveis. Tanto em sistema contínuo quanto estacionário, os dados revelaram que existem grandes quantidades de compostos não biodegradáveis (40-60% da DQO inicial) expressos como DQO residual e cor a 436 nm que são eficientemente removidos com adição de carbono ativo. Este parece ser um método promissor para tratamento de efluentes Kraft.

A utilização de ozônio também está sendo bastante considerada. Como já foi comentado acima, os compostos de coloração escura e os organoclorados são resistentes aos tratamentos convencionais. Há um decréscimo significativo na cor, na demanda química de oxigênio (DQO), halogênios orgânicos adsorvíveis (AOX) e toxicidade através do tratamento com ozônio (Masten e Davies, 1994). Entretanto, apesar da eficiência do processo, o ozônio é uma opção de custo elevado (Masten e Davies, 1994).

Foi estimado que até dezembro de 1995 todas as indústrias papeleras no Canadá terão tratamento de efluente primário e secundário.

### 1.3) Tratamento Biológico de Efluentes: Métodos Alternativos.

O objetivo de um tratamento biológico é a utilização da atividade de microrganismos para remoção ou redução da concentração de poluentes, podendo ser aeróbio ou anaeróbio (Terrón e col. 1993, Bajpai e Bajpai, 1994). Durante o tratamento biológico, os microrganismos utilizam os poluentes como fontes de energia e carbono, os quais resultam em crescimento e eventual divisão celular. Vários destes, principalmente fungos de decomposição branca foram utilizados para descoloração de efluentes das mais diferentes fontes (Esposito e col. 1991, Wang e col. 1992). Também é conhecida a ação de actinomicetos na transformação de efluentes produzidos a partir do branqueamento químico da polpa. Recentemente foi publicado por Hernández e col. (1994) a ação de 5 cepas de *Streptomyces* spp.(actinomicetos) sobre este tipo de efluente. As cepas descoloriram 60-65% do efluente após 7 dias de incubação com 80% de efluente, apenas 20% foi devido a adsorção micelial. A descloração biológica de cloroligninas, utilizando o processo MyCoR ("Mycelial Color Removal") baseado na imobilização do fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*, em um contator biológico rotatório, foi estudada (Eaton e col. 1980). Este processo foi utilizado primeiramente para descoloração do efluente e mais tarde para degradar cloroligninas (Prasad e Joyce, 1993).

O tratamento biológico sequencial empregando um fungo de decomposição branca e uma bactéria aeróbia, foi estudado por Yin e col. (1989) e citado por Prasad e Joyce (1993). Aproximadamente 65 a 80 % dos compostos organoclorados, expressos como AOX, e 60 a 80 % da cor são removidos neste tipo de tratamento.

Prasad e Joyce (1993) estudaram o tratamento sequencial de um efluente por um fungo (imobilizado em um contator biológico rotatório) e uma bactéria anaeróbia e o mesmo foi comparado com o tratamento em uma lagoa aereada. Os resultados indicaram que o tratamento sequencial aeróbico (fungo) - anaeróbico (bactéria) foi mais eficiente que apenas o aeróbico convencional (lagoa aereada). Armenante e col. (1992) avaliaram um processo integrado anaeróbio-aeróbico em um bioreator de leito fixo, com duas classes de microrganismos para degradar compostos tóxicos halogenados e observaram uma degradação completa dos mesmos. Hall e Randle (1992) estudaram comparativamente a remoção de AOX em três tipos de tratamentos biológicos do efluente kraft, lodo ativado, uma lagoa de estabilização facultativa e uma lagoa de estabilização aereada. A comparação dos resultados obtidos sob uma variedade de condições operacionais indicam que ocorreu uma remoção muito eficiente (66-94%) de AOX nas lagoas de estabilização facultativa e aereada do que em lodo ativado. A redução de AOX se deu apenas sob condições estritas de aerobiose.

Existem vários estudos para tratamento de efluentes utilizando bioreatores. Um novo reator de biofilme movediço (MBBR) desenvolvido pela "Norwegian Company Kaldnes Miljøteknologi" (KMT) em cooperação com o centro de pesquisa SINTEF. Neste modelo a biomassa fica aderida a pequenos elementos plásticos que se movem livremente com o líquido no reator. O movimento é causado pela aeração na versão aeróbica do reator e por agitação mecânica na versão anóxica/anaeróbia. Foram realizados testes em planta piloto testando 4 tipos de efluentes, entre estes efluente de branqueamento de uma indústria papelreira. Neste último o tratamento foi realizado em um MBBR com um reator anaeróbico seguido por dois aeróbicos por um período de 28 semanas, operado com uma vazão de 10 m<sup>3</sup>/h correspondendo a um tempo de retenção hidráulica de apenas 40 minutos. Foram removidos neste processo 50% de DQO, 80-90% de DBO, 50% de AOX, 90% de ClO<sup>3-</sup> (clorato) e não foi detectada toxicidade aguda no efluente residual (Rusten e col. 1994).

Outro estudo com tratamento sequencial foi realizado por Franta e col. (1994). Três reatores de lodo ativado em regime estacionário (SBR) foram empregados para avaliar a composição e a concentração dos resíduos orgânicos dos efluentes originados de uma planta de tratamento biológico de uma indústria papelreira. A maioria dos constituintes dos efluentes foi rapidamente biodegradado. Knudsen e col. (1994) estudaram em planta piloto o tratamento de efluentes em

dois estágios aeróbico e lodo ativado. Com este sistema foram obtidas reduções acima de 85% de DQO e 99% de DBO. Praticamente todos os compostos orgânicos biodegradáveis são removidos neste processo.

#### 1.4) Bioreator "Air-lift"-Leito Recheado: Efeito do Desenho sobre a Eficiência e Escalonamento (Scale-up) de Processo.

Sistemas de biofilme tais como contactor biológico rotatório (RBC), bioreator de leito recheado com alça de ar (air-lift), de leito fluidizado, filtro biológico, etc. têm sido largamente estudados para o tratamento de efluentes, devido a alta concentração de biomassa retida no reator e presumivelmente a simplicidade no controle desta biomassa. Reactores de leito fluidizado e air-lift com alta taxa de recirculação e ductos de transporte e recirculação são os melhores, descritos na literatura para sistemas de mistura completa. Cao e Alaerts (1995) estudaram o efeito do tipo de reator e a tensão de cisalhamento sobre as principais características do biofilme, incluindo a composição da comunidade microbiana, atividade da biomassa, cinética e aperfeiçoamento do biofilme (ex. transferência de massa e fluxo). Bioreatores air-lift têm atraído muita atenção tanto de pesquisadores quanto da indústria devido a sua única característica hidrodinâmica (Merchuk e col. 1994). Um reator air-lift consiste em uma quantidade de líquido dividida em ductos de transporte e recirculação, que estão interconectados. O ar ou oxigênio é suplementado na porção central, lateral interna ou externa do reator (fig. 2). A indução da circulação do líquido pela entrada de ar, guiada ao longo de uma rota bem definida, é uma característica importante deste tipo de reator (Chisti, 1989). Para que este tipo de reator forneça um dado grau de operações variáveis implica na seleção de vários parâmetros geométricos. A altura do reator foi considerada em um modelo prévio (Merchuk e col. 1992). Reactores air-lift possuem uma estrutura mecânica simples, baixa tensão de cisalhamento, gasto reduzido de energia e um bom processo de mistura (Chang e col. 1994). A influência da geometria na secção de separação de gás no topo do reator foi estudado para o sistema gás-líquido (Siegel e col. 1986, Siegel e Merchuk, 1987) e para sistema gás-sólido-líquido (Siegel e Merchuk 1988). A influência da geometria da secção inferior sobre a eficiência do bioreator foi estudada por Blenke (1979). A principal mudança encontrada

quando se passa do laboratório para uma escala maior são a dinâmica dos fluidos do sistema. Assim sendo um dos fatores mais importantes no projeto e aumento de escala é a influência da geometria do sistema sobre a fluência das diferentes fases presentes. No caso do tubo concêntrico, a distância da base do reator até a superfície livre do fundo e a distância do topo do tubo para o nível do líquido no topo (fig. 2c) tem recebido pouca atenção. Entretanto, recentemente, Merchuk e col. (1994) realizaram uma série de experimentos com este tipo de bioreator aumentando a escala de 30 para 300 L e os efeitos das características geométricas foram estudados. Em um trabalho anterior Lindert e col. (1992), já haviam estudado o escalonamento de processo para três tipos de modelos "air-lift" baseado no modelamento do coeficiente de transferência de oxigênio. Os dados experimentais para o coeficiente de transferência de oxigênio foram estimado para um volume de 2, 80 e 800 L. O fator geométrico mais importante para a transferência de massa no reator é a altura do mesmo, a qual domina a pressão média e influencia na concentração de saturação e direção da força motriz. O coeficiente de transferência de oxigênio praticamente não sofre alteração.

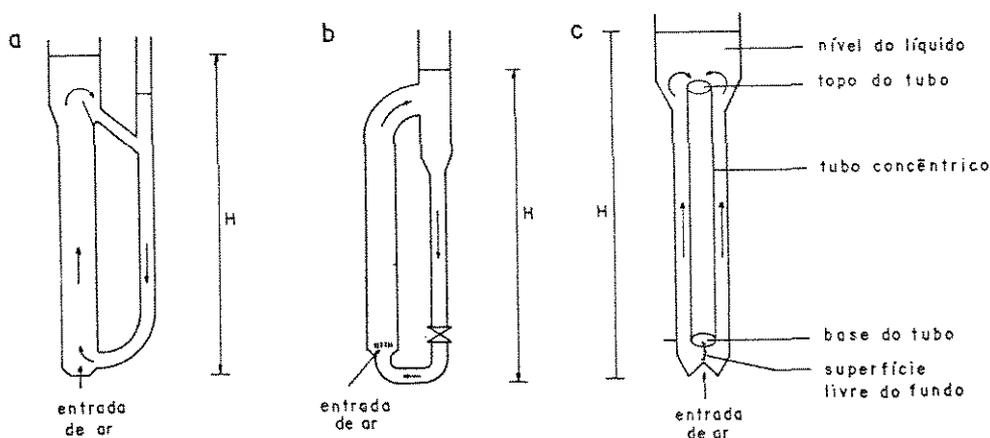


FIGURA 2. Reatores "air-lift". a) e b) aeração lateral, c) aeração central.

O bioreator empregado neste estudo é um modelo modificado de leito recheado transformado em um "air-lift". A modificação consiste na introdução de um tubo interno no centro do reator

para melhorar a imobilização do fungo e a dispersão de oxigênio ou ar do reator, evitando assim a formação de bolhas no suporte de imobilização. Poderíamos afirmar que o modelo modificado é um autêntico "air-lift", entretanto o mesmo pode funcionar com sistema de imobilização nas paredes laterais concêntricas ao tubo. Modelos similares a este foram primeiramente estudados por Guadalupe (1985) e Reis e Sant'Anna (1985), avaliando a eficiência destes no tratamento de efluentes. Embora não se tenha feito uma caracterização hidrodinâmica do modelo modificado, já que a modificação foi baseada em dados experimentais, estes estudos confirmam que a fase líquida é praticamente homogênea agitada. Neste contexto, o reator testado, operado em batelada, pode ser considerado um reator de mistura perfeita. Estudos posteriores com este tipo de bioreator para o tratamento biológico de efluentes foram realizados por Cammarota e Sant'Anna (1992), Esposito (1992) e Esposito e col. (1993).

#### 1.5) A Utilização de Fungos de Descomposição Branca na Degradação de Poluentes.

Os fungos de descomposição branca, possuem um sistema enzimático extracelular capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos (Barr e Aust, 1994).

Enzimas como lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), são produzidas por estes fungos em resposta a baixas concentrações de fontes de carbono, nitrogênio, ou nutrientes sulfurados. Existem evidências que indicam que estas enzimas são responsáveis pela fragmentação inicial do polímero de lignina. Manganês e peroxidases dependentes de manganês foram relacionadas à degradação enzimática da lignina. Entretanto o papel específico de manganês é incerto. Forrester e col. (1988) observaram que na ausência da enzima,  $Mn^{3+}$  quelado foi um agente ligninolítico capaz de oxidar álcool veratrílico, compostos modelo de lignina e lignina. Foi demonstrado que a atividade ligninolítica de *Lentinula (=Lentinus) edodes*, o fungo utilizado neste estudo, é dependente da adição de manganês (Leatham, 1986). Acredita-se que sob condições adequadas,  $Mn^{3+}$  gerado por MnP pode ser uma parte importante do sistema ligninolítico de *L. edodes* e de outros fungos de descomposição branca (Forrester e col. 1988). A principal peroxidase extracelular detectada em culturas de *L. edodes* foi a MnP (Forrester e col. 1990). A enzima foi purificada e estudada quanto a suas características e sequência de

aminoácidos. O efeito de vários compostos fenólicos derivados da lignina sobre o crescimento e degradação por *L.edodes* foi estudado por Shuen e col. (1992). A eficiência deste organismo na descontaminação de efluentes provenientes das indústrias de polpa e papel, foi previamente demonstrada (Esposito e col. 1991, Esposito, 1992, Esposito e col. 1993).

Acredita-se que os fungos de decomposição branca que utilizam MnP para mediar a degradação de lignina na natureza, também produzam agentes quelantes tais como oxalato para estabilizar  $Mn^{3+}$ .

Tanto LiP quanto MnP são dependentes de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio extracelular, produzido a partir do oxigênio molecular, é suplementado por enzimas oxidativas, que utilizam glicose, glioxal, metil glioxal, e outros produtos da degradação da celulose e lignina como substrato (fig. 4) (Barr e Aust, 1994; Kirk, 1993). A LiP, após sofrer oxidação por peróxido de hidrogênio, oxida núcleos aromáticos na lignina (fenólicos e não fenólicos) por extração de um elétron, gerando radicais cátions. Estes reagem com nucleófilos e com oxigênio molecular. O resultado é uma "combustão enzimática" na qual as ligações C-C e C-O, são clivadas, causando a despolimerização do polímero e a abertura dos anéis aromáticos. O álcool veratrílico, um metabólito excretado no final da fase primária de crescimento e na fase estacionária (metabólito secundário), é um excelente substrato para LiP e atua como doador de elétrons, oxidando radicais cátions, os quais podem oxidar outros compostos químicos que não são diretamente oxidados por LiP (fig. 5). Foi demonstrado que o álcool veratrílico protege LiP da inativação por peróxido de hidrogênio (Gold e Alic, 1993).

MnP tipicamente oxida  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ ;  $Mn^{3+}$  é empregado para oxidar compostos químicos. Aparentemente  $Mn^{3+}$  pode oxidar hidroquinonas a radicais semiquinonas, as quais podem atuar como agentes redutores (fig. 5). A MnP possui um forte potencial de oxiredução ( $E^{\circ} = 1,54$  V em água) e pequeno tamanho, comparado a proteínas, o que favorece a penetração de  $Mn^{3+}$  em substratos lignocelulósicos e oxidação da lignina.

O papel da LiP e MnP na descoloração de efluentes de branqueamento, foi estudado por Michel e col. (1991). Neste estudo foi evidenciada a importância das peroxidases extracelulares na descontaminação de efluentes, entretanto MnP parece ter um papel predominante sobre LiP. Este resultados foram corroborados por outros autores (Momohara e col. 1989, Perez e Jeffries, 1990, Jaspers e col. 1994).

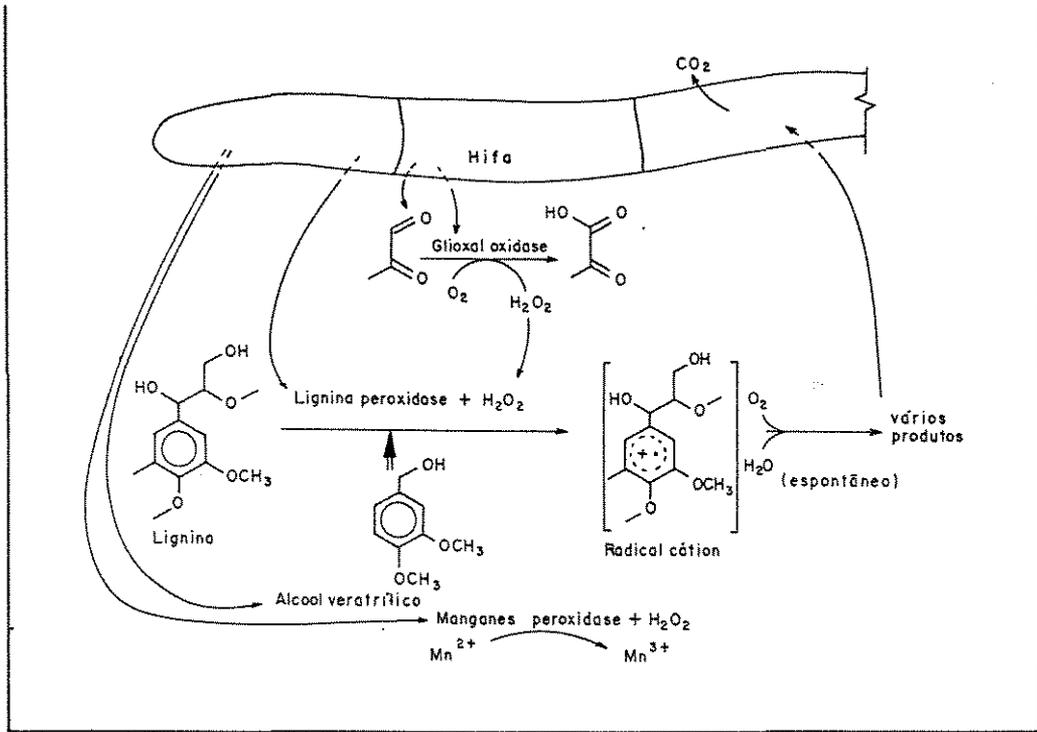


FIGURA 3) Representação do sistema ligninolítico de *P. chrysosporium* (Kirk, 1993).

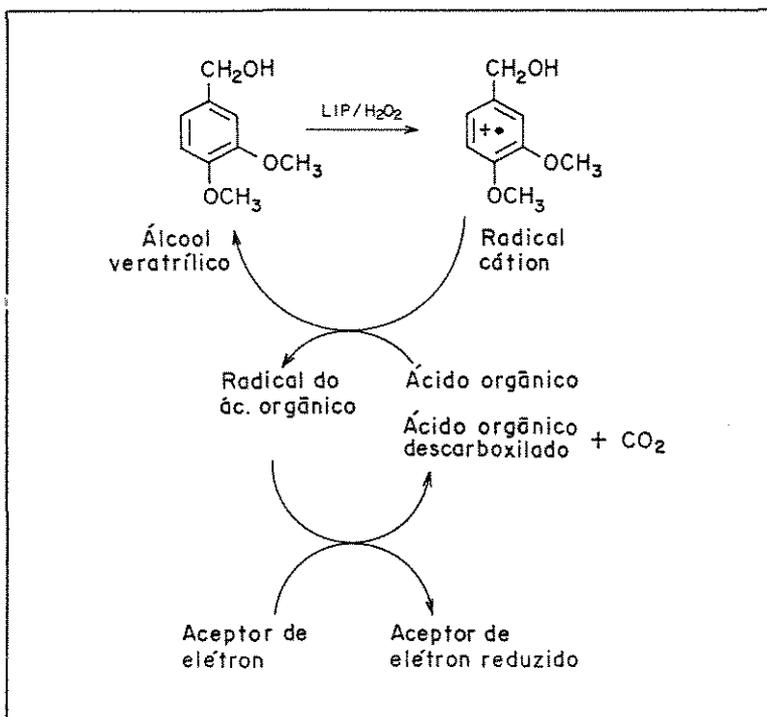


FIGURA 4) Mecanismo de ação de Lignina Peroxidase (Barr e Aust, 1994).

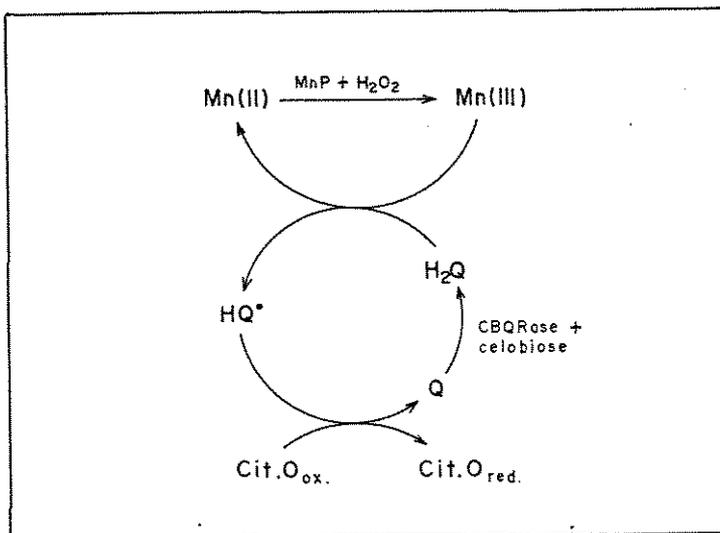


FIGURA 5) Mecanismo de ação de Manganês Peroxidase (Barr e Aust, 1994).

### 1.6) Imobilização

Um grande número de processos biológicos utilizando vários biocatalizadores imobilizados, tais como enzimas, microrganismos, organelas, células vegetais e células animais tem sido estudado (Furusaki e Seki, 1992). Uma ampla aplicação de biocatalizadores imobilizados, foi proposta desde o primeiro sucesso da industrialização do processo de enzimas imobilizadas em 1969, Pela Companhia Tanabe Seiyaku Co.(Furusaki e Seki, 1992). A imobilização de microrganismos pode ser definida como uma técnica que limita a livre migração de células. A mobilidade das mesmas, pode ser restringida por agregação, confinamento ou por fixação a um suporte sólido. Durante os últimos anos novas técnicas de imobilização foram desenvolvidas. Dentre elas, podemos citar duas categorias principais: 1) fixação, onde o microrganismo adere a superfície de um suporte por interações fracas ou ligação química; e 2) aprisionamento, onde os microrganismos prendem-se nos interstícios das fibras ou poros do material ou são fisicamente contidos, ou por um sólido ou por uma matriz porosa tal como gel estabilizado ou uma membrana.

Dentro desta segunda categoria podemos citar a imobilização em fibras tais como algodão,

tecidos, nylon e vários tipos de esponjas. As fibras apresentam uma grande área superficial, permitindo a imobilização de muitas células. O nylon, suporte utilizado neste estudo, está definido como uma família de polímeros lineares constituído de unidades repetidas de grupos metileno unido por ligações secundárias de amida. Os diferentes tipos de nylon são designados de acordo com o número de átomos de carbono nas unidades monoméricas (Hornby e Goldstein, 1976).

As estruturas do nylon são mecanicamente fortes e não biodegradáveis ou seja trata-se de um material inerte, ideal para tratamentos biológicos. Um estudo realizado com *P. chryso sporium* imobilizado em diferentes suportes, dentre estes, nylon e poliuretano demonstrou que havia um incremento considerável da produção enzimática com relação ao fungo livre (Linko e Zhong, 1987). Esse aumento na atividade enzimática do fungo imobilizado poderia estar relacionado a maior área de superfície micelial exposta ao oxigênio, facilitando a excreção das enzimas. O fungo *Trametes (Coriollus) versicolor* imobilizado em esponja de poliuretano foi utilizado com sucesso no branqueamento biológico de polpa (Kirkpatrick e col. 1990).

### 1.7) Coeficiente de Transferência de Oxigênio

A transferência do oxigênio, proveniente da aeração, ocorre em três etapas (Stanbury e Whitaker, 1986) : 1) transferência de oxigênio da bolha de ar para a solução; 2) transferência de oxigênio dissolvido através do meio de fermentação para a célula microbiana; 3) utilização do oxigênio pela célula.

Durante uma fermentação empregando fungos filamentosos, encontram-se valores de  $K_L a$  muito inferiores aos observados com água (Brunello e Concone, 1986). Este fato poderia ser atribuído à influência complexa do micélio e demais substâncias necessárias à fermentação sobre as características da interface e sobre as dimensões das bolhas.

Segundo Stanbury e Whitaker (1986), a eficiência de aeração de um sistema medido através do  $K_L a$  é a medida da capacidade de aeração de um fermentador. De acordo com Chang e col. (1989), o valor de  $K_L a$  é indispensável no planejamento de bioreatores para processos aeróbios.

## 2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi a definição dos parâmetros ótimos no processo de tratamento do efluente E1 de *E. grandis* por *L. edodes* em um bioreator de leito recheado modificado. Para tanto foi necessário:

- 2.1) Estudar a produção e otimização das enzimas ligninolíticas por *L. edodes*;
- 2.2) Avaliar o potencial destas enzimas no tratamento de efluente E1 proveniente do branqueamento da polpa de madeira de *Eucalyptus grandis*;
- 2.3) Estudar *L. edodes* em sistemas imobilizados para tratamento de efluentes de *E. grandis* (madeira dura) e *Pinus radiata* (madeira mole);
- 2.4) Utilizar como meio de imobilização para *L. edodes*, o nylon tratado quimicamente por diferentes processos (HCl e glutaraldeído), para o tratamento de efluente E1 de *E. grandis*.
- 2.5) Avaliar o tratamento biológico de efluentes E1 de naturezas diferentes (madeira mole e dura);
- 2.6) Calcular o coeficiente de transferência de oxigênio ( $K_L a$ ) em bioreator (leito recheado modificado) em sistemas livres e imobilizados;
- 2.7) Estabelecer qual o  $K_L a$  mais adequado para aumentar a eficiência do tratamento biológico de *L. edodes* em bioreator;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1) Equipamentos

Autoclave vertical AV 75 Phoenix

Bioreator de Leito Recheado (modificado)

Espectrofotômetro UV/Visível Beckmann DU-70

Estufa de cultivo Fabbe mod. 116

Fluxo laminar Veeco mod. VLFS 12

Incubador rotatório série 25 New Brunswick Scientific

Shaker CELLSTAR, modelo Q4730ABA;

Oxígrafo YSI MODEL 5300

Analizador de Halogênios Orgânicos Adsorvíveis Euroglass (Netherlands).

Analizador de Carbono Orgânico Total TOC-5000 (Shimadzu).

Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JSMT-300.

Eletrodo para determinação de Cl<sup>-</sup>, ORION modelo 94-17B

pHmetro, modelo E512 Metrohm Herisau

#### 3.2) Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### 3.3) Microrganismos

Os fungos utilizados neste estudo: *Aspergillus oryzae* UEC-2051, *Lentinula edodes* UEC-2019, *L. edodes* UEC-2021 e *Pycnoporus sanguineus* UEC-2050, pertencem a coleção do Laboratório de Química Biológica (Instituto de Química), da Universidade Estadual de Campinas.

#### 3.4) Meio de Cultura e Inóculo

A) As cepas dos fungos foram mantidas em água estéril e em meio agar extrato de malte 1,25% a 5°C. Para o emprego destas cepas no tratamento de efluentes, as mesmas foram cultivadas em placas, contendo meio agar extrato de malte 1,25 % e efluente E1 20 % (aproximadamente 20 mL de meio/placa) no pH do meio (5,0), durante 5 dias a 28 °C, na ausência de luz. Após este período os fungos foram repicados para o meio líquido (100 mL), extrato de malte 1,25 %, efluente E1 20 %, a 5°C.

efluente E1 20 %, em Erlenmeyers de 250 mL, e cultivados por 5 dias a 28 °C, a pH inicial 5,0, sob agitação de 150 rpm para a formação de "pellets", na ausência de luz. O meio agar extrato de malte é amplamente utilizado, especialmente para fungos basidiomicetos xilófagos (Esposito e col. 1991).

O repique do pré-inóculo (meio sólido) para o inóculo (meio líquido) foi realizado com um pequeno tubo de vidro de 0,5 mm de diâmetro. O micélio foi recortado na zona de crescimento. Utilizamos 12 círculos para cada 100 mL de meio.

Os "pellets" ou a massa micelial formada durante o período de incubação, foi filtrada para a separação do líquido, pesada e inoculada (10% p/v) no efluente Kraft sem fonte adicional de carbono ou nitrogênio, em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de efluente e mantidos a 28°C, sob agitação de 150 rpm, na ausência de luz durante 5 dias. O pH inicial foi ajustado para 5.

A cepa de *Aspergillus*, foi cultivada por um período de 5 dias, em meio nutriente (Extrato de carne 3,0 g/L e peptona 5,0 g/L, agar 15,0 g/L), pH 7,0, 28°C, 150 rpm. Após este período a mesma foi transferida para meio líquido e seguido o mesmo procedimento já descrito anteriormente para os demais fungos.

B) Composição de Outros Meios Empregados no Cultivo de *L. edodes*: B.1) (Leatham e Kirk, 1983). D-glicose 25 g/L, L-ácido glutâmico 5 g/L, D-glucuronolactona 4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2g/L, tiamina-HCl 1 mg/L, ácido férrico 1 mg/L, e uma solução de elementos traços inorgânicos suplementando a concentração final (mg/L). B.2) (Tien e Kirk, 1988): glicose 10 g/L, extrato de malte 10 g/L, peptona 2 g/L, extrato de levedura 2 g/L, Asparagina 1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L, tiamina-HCl 1 mg/L e uma solução com elementos traços suplementando a concentração final (mg/L).

### 3.5) Meio de Cultura: Indução Enzimática com E1 e Fontes de Carbono e Nitrogênio.

Foram utilizados os meios extrato de malte 1,25 % tanto para cultivos líquidos como sólidos (2 % agar) e também extrato de malte 1,25 % em meio induzido por efluente E1 (20 %) de *Eucalyptus grandis*. Foram testadas concentrações variáveis de carbono (malte: 2,5 %, 1,25 % e 0,62 %) e nitrogênio (tartarato de amônio: 1,88 %, 0,94 % e 0,47 %) no mesmo meio descrito acima (extrato de malte).

### 3.6) Efluente

Utilizamos para este estudo três tipos de efluentes E1, provenientes de duas empresas papelarias: 1) RIPASA S.A. Celulose e Papel (Limeira, S.P., Brasil) e 2) CELULOSA ARAUCO (Arauco, Chile). Ambas empresas utilizam o processo Kraft de polpação, porém a madeira empregada é diferente, *Eucalyptus grandis* e *Pinus radiata* respectivamente. O pH original (9-13) foi ajustado para 5,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os efluentes provenientes da primeira extração alcalina (E1) da RIPASA S.A. podem ser classificados de duas formas, já que a indústria modificou nos últimos 2 anos a sequência de branqueamento da polpa, reduzindo a utilização do cloro em 30% e adicionando oxigênio e peróxido de hidrogênio à extração alcalina. O primeiro, E1 tradicional (Abs. 465 nm, pH 7,6: 0,60), e o segundo EOP (Extração alcalina-Oxigênio-Peróxido de hidrogênio) (Abs. 465 nm, pH 7,6: 0,20) ambos os tipos foram utilizados diretamente sem diluição. O efluente proveniente da CELULOSA ARAUCO foi convenientemente diluído para a mesma faixa de absorvância de 0,60. Em nenhum dos casos, o efluente foi pré-filtrado e/ou esterilizado para o tratamento biológico.

### 3.7) Método de Seleção

Realizou-se uma nova seleção para o efluente de *Pinus radiata* (madeira mole) (CELULOSA ARAUCO, Chile), já que as características do efluente eram diferentes das do efluente de *Eucalyptus grandis* (madeira dura), para o qual já havíamos selecionado duas cepas de *L. edodes* UEC-2019 e UEC-2021 (Esposito, 1992). A seleção consistiu em testar os microrganismos em condições padrões (Esposito e col. 1991). Os fungos foram cultivados em meio sólido e após 5 dias repicados para o meio líquido e finalmente, após outros 5 dias foram inoculados no efluente E1, sem fonte extra de carbono e/ou nitrogênio, pH inicial 5,0, temperatura de 28°C e sob agitação a 150 rpm. No final de um período de 120 horas, o efluente tratado foi analisado quanto descoloração, redução de fenóis e AOX.

### 3.8) Indução Enzimática

Para induzir os fungos a uma adaptação prévia ao efluente a ser tratado foi utilizado o mesmo efluente E1 (20%) em meio de cultura.

### 3.9) Determinação da Cor

A cor foi avaliada de acordo com o método padrão conforme descrito por Atlow e col. (1984). O pH do efluente, previamente filtrado em membrana millipore 0,47 µm, foi ajustado para 7,6 com tampão fosfato 0,1 M e determinada a sua absorvância a 465 nm contra água destilada.

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

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

Onde:

$A_1$  É a absorvância de uma solução padrão de platina-cobalto de 500 CU ( $A_{465} = 0,132$ ).

$A_2$  É a absorvância do efluente.

### 3.10) Característica da Cor Antes e Após o Tratamento Biológico

Para determinação da natureza da cor antes e após a descoloração, seguiu-se o método de Momohara e col. (1989). A) Determinação da cor referente a porção quinonas: para 3 mL de E1 (absorvância inicial a 465 nm de 0,60, a pH 7,6), 85 mg de ditonito de sódio foram adicionados, o pH utilizado foi de 5,5. Após 24 horas o pH foi ajustado para 7,6 e a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm, por 5 minutos. Em seguida foi lida a absorção do sobrenadante a 465 nm. B) Determinação da cor referente a porção total de quinona e carbonila: para 3 mL de E1 (absorvância inicial a 465 nm de 0,60, a pH 7,6) foram adicionados 100 mg de borohidreto de sódio e o pH elevado a 10,5. Após 24 horas, o pH foi ajustado para 7,6 e a amostra centrifugada a 12.000 rpm, por 5 minutos. A absorção do sobrenadante foi medida em 465 nm. C) Determinação de outros tipos de cor: a porcentagem da cor restante, não enquadrada nos ítems A e B (quinona e/ou carbonila) é definida como outros tipos de cor.

### 3.11) Determinação de Fenóis Totais

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

O princípio do método é a reação entre o reagente Folin-Ciocalteu e fenóis, com subsequente oxidação dos fenóis e formação de um complexo azul, a uma taxa proporcional de concentração de fenóis. A mistura de reação continha 1000 uL de amostra, 250 uL de carbonato-tartarato de sódio e 25 uL do reagente folin 2 N. Após 30 minutos, a temperatura de 20°C, foi lida a absorbância a 700 nm e comparada a uma curva padrão de fenol. Para o branco utilizou-se água ao invés da amostra. Os resultados foram expressos em mg/L de fenol (solução estoque 10 mg/L).

### 3.12) Determinação de Cloreto

A determinação de cloreto foi efetuada através de um eletrodo específico. A leitura do potencial foi convertido em logaritmo e comparada a uma curva padrão de NaCl (solução estoque 1 ppm).

### 3.13) Determinação de AOX e OX total.

Os halogênios orgânicos adsorvíveis (AOX), neste caso cloro unido a molécula orgânica, foram determinados segundo o método padrão de ISO 9562, em um analisador de AOX (ISO, 1989). Para determinação de OX total foi empregada a mesma metodologia, porém a diferença está no fato de que na medida de AOX, a amostra (líquida) é agitada em carbono ativo para adsorção de íons cloreto, enquanto que na medida de OX, a amostra é um sólido, por isso considera-se que possa haver adsorção não somente no carbono ativo como também no micélio. Após este tratamento com carbono ativo a amostra é queimada a 1000 °C e titulada utilizando como referência um eletrodo de prata/cloreto de prata e um sensor prata no mesmo analisador.

### 3.14) Determinação de TOC

Para determinação do carbono orgânico total utilizou-se a metodologia padrão (ISO, 1987).

## ATIVIDADES ENZIMATICAS

### 3.15) Extração das Enzimas em Meio Sólido

Após o cultivo de *L. edodes* em meio agar extrato de malte 1,25 % por 5 dias foram extraídas as enzimas com tampão acetato 20 mM, pH 5 (Curotto e col. 1993).

### 3.16) Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade de lignina peroxidase foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico segundo metodologia modificada de Tien e Kirk (1984). Foram adicionados 550 uL de caldo de cultivo filtrado, 250 uL de uma solução de álcool veratrílico 8,0 mM, em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH 3,0) e 200 uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mM para iniciar a reação. O aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm ( $E = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma unidade de ligninase corresponde a quantidade de enzima que oxida 1,0 umol de álcool veratrílico por minuto.

### 3.17) Manganês Peroxidase (MnP)

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

### 3.18) Determinação de Açúcares Redutores

MÉTODO DO DNS (Miller, 1959). Para a determinação de açúcares redutores foram adicionados 3 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 1,5 mL de amostra. A mistura foi incubada num banho termostatizado a 100°C por 5 minutos. Após esse período a amostra foi resfriada até atingir a temperatura ambiente e a absorbância lida a 540 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão de glicose (solução estoque 10 mg/L).

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se em 1.4 L de água os seguintes compostos:

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10.6 g
Hidróxido de sódio	19.8 g
Tartarato de sódio e potássio	300.0 g
Fenol	7.5 mL
Bissulfito de sódio	8.3 g

### 3.19) Determinação da Adsorção Micelial do Efluente

Para determinar a capacidade de adsorção do fungo foi necessário testar o micélio inativo (morto). Adsorção significa agregação de um líquido (efluente) a superfície de um sólido (micélio fungico). Durante um período de 5 dias determinamos a porcentagem de descoloração causada pelo fungo morto. No final do processo definimos quanto de descoloração era devida a adsorção. Para obtenção do micélio inativo utilizou-se o seguinte procedimento: após o período de crescimento em meio de cultivo líquido, a massa micelial obtida no período de 5 dias foi filtrada para separar o micélio do líquido. Em seguida lavou-se com água destilada, pesou-se e autoclavou-se por 30 minutos a 120°C, segundo método de Durán e col. (1991).

### 3.20) Determinação do Peso Seco do Micélio

As culturas em meio sólido foram desidratadas a 80°C até a obtenção do peso constante.

### 3.21) Determinação de Lignina/Clorolignina

A determinação de clorolignina foi realizada segundo metodologia descrita por Wang e col. (1992). Após a amostra ser filtrada em membrana Millipore 0.47 µm, a mesma foi convenientemente diluída e lida sua absorbância a 280 nm. A concentração de lignina/clorolignina é dada pela equação abaixo:

$$C = (A)/(a).(D) = (A)/(20).(D)$$

Onde: C = concentração de lignina ou clorolignina (g/L)

A = absorbância a 280 nm

D = fator de diluição

a = absortividade : 20 L/g cm

### 3.22) Determinação da Toxicidade pela Técnica de MICROTOX

A determinação da toxicidade aguda do efluente antes e após tratamento com *L. edodes*, foi avaliada através do método de bactérias luminescentes conhecido como MICROTOX em um Analisador de Toxicidade Microtox. O bioensaio utiliza como organismo teste uma bactéria marinha luminescente e não-patogênica, *Photobacterium phosphoreum*. Essas bactérias emitem luz como mecanismo de liberação de energia, durante seu metabolismo normal. A intensidade de luz emitida é, portanto, uma medida da atividade metabólica destas bactérias. Quando esses organismos são expostos a uma amostra tóxica, a emissão de luz diminui de forma proporcional a toxicidade da amostra. É um ensaio baseado na inibição da atividade enzimática da luciferina, que é a enzima responsável pela luminescência desta e outras bactérias (Ribó, 1992, Ronco, 1992). Os resultados são expressos em termos de EC50, que significa a concentração que causa uma redução de luminescência de 50%, depende do tempo de exposição, da temperatura e logicamente da natureza química dos contaminantes presentes na amostra.

### 3.23) Tratamento Biológico de Efluentes

Cultivou-se *L. edodes* UEC-2021 em meio sólido indutor agar-extrato de malte 1.25 %-efluente 20% (*E. grandis*), durante 5 dias a 28°C. Após este período repicou-se 12 círculos de micélio-agar (5 mm de diâmetro) para 100 mL de meio líquido indutor extrato de malte 1.25 %-efluente 20% (*E. grandis*) e incubou-se a 28°C durante 5 dias, em regime estacionário e agitado (150 rpm). Finalizada esta etapa, os caldos foram filtrados, as atividades enzimáticas de LiP e MnP determinadas e a massa micelial úmida separada foi inoculada em efluente puro, na proporção de 10% (p/v). Durante o período de tratamento (5 dias), foram determinadas as atividades enzimáticas de LiP e MnP e estas relacionadas com a redução de cor e fenóis totais.

Para o outro efluente (*Pinus radiata*), para o qual utilizou-se além de *L. edodes*, outros fungos (citados no item 3.3), foi empregado o mesmo processo descrito acima. Entretanto como não se tratava de otimizar as condições de produção das enzimas ligninolíticas para aplicação neste efluente (*Pinus radiata*), não foi acompanhado cineticamente a produção de MnP e LiP.

### 3.24) Suporte para Imobilização do Fungo

Como suporte de imobilização utilizou-se nylon (3M Scotch Brite MR) (nativo) cortado em

cubos de aproximadamente 1,0 x 0,5 cm.

### 3.25) Tratamento para Modificação do Nylon

a) Tratamento com HCl: Para uma clivagem hidrolítica do nylon, o mesmo foi tratado com HCl 4,5 M por 15 min a 35°C (Hornby e Goldstein, 1976 modificado). Após este período o nylon foi lavado exaustivamente com água destilada. O objetivo deste tipo de tratamento é a liberação dos grupos amino (fig. 6).

b) Tratamento com Glutaraldeído: Os grupos amino livres, os quais forão liberados no tratamento com HCl, são ativados por perfusão em uma çoluna com 5 % (p/v) de glutaraldeído em 0,2 M de tampão borato, pH 8,5, por 15 min a 20°C e um fluxo de 2 mL min<sup>-1</sup> (fig. 6).

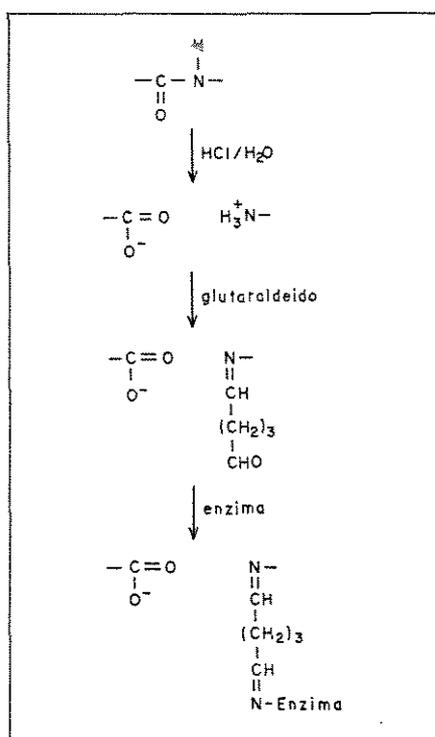


FIGURA 6) Esquemática do Nylon tratado por HCl e glutaraldeído (Hornby e Goldstein, 1976).

### 3.26) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O nylon com e sem tratamento químico e/ou biológico devidamente seco, foi analisado por MEV. Foram retiradas amostras do nylon em forma de pequenos cubos (aproximadamente 0.5 x 0.5 mm) para observação no microscópio.

### 3.27) Bioreator

#### 3.27.1) Desenho do Bioreator

O reator utilizado neste estudo é um tipo modificado de leito recheado, com uma capacidade volumétrica de 500 mL. A modificação consiste na introdução de um tubo interno de 4,0 cm de diâmetro e 14,0 cm de altura suspenso dentro de um tubo externo de vidro com 8 cm de diâmetro interno e 32,0 cm de altura (Fig. 7). Esta nova configuração permite uma melhor circulação do líquido e do oxigênio, não havendo a formação de bolhas de ar e favorecendo o contato com o micélio.

#### 3.27.2) Condições de Uso

O bioreator foi esterilizado por 45 minutos a 120°C antes de sua utilização. As borrachas utilizadas para canalização do ar de entrada e saída e do efluente foram lavadas com álcool etílico 70 % .

Não foi empregada a jaqueta de aquecimento do bioreator, para manter a temperatura, pois os testes foram realizados a temperatura ambiente. Introduziu-se a aeração pelo fundo do bioreator através de uma placa de vidro porosa. O fluxo de ar, proveniente de um compressor geral que supre o encanamento do laboratório, foi controlado por um rotâmetro. O ar passava primeiramente por um filtro de algodão, em seguida por um Erlenmeyer com água destilada para umidificar o ar antes de entrar no bioreator. A figura 8 mostra um esquema geral da utilização do bioreator no tratamento de efluentes.

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

### 3.28) Carregamento e Inoculação do Bioreator com Micélio Livre ou Imobilizado em Nylon

O fungo, *L. edodes* foi cultivado em placas, contendo o meio agar extrato de malte 1,25 % e efluente E1 20 % (aproximadamente 20 mL de meio/placa) no pH do meio (5,0), durante 5 dias a 28 °C, na ausência de luz. Após este período a cepa foi repicada para o bioreator em meio líquido (500 mL), extrato de malte 1,25 %, efluente E1 20 % e cultivada por 5 dias a temperatura ambiente 28-30°C, a pH inicial 5,0, sob aeração (400, 600 e 800 mL/min).

A massa de nylon (2,5 g) foi introduzida no bioreator, no espaço interno entre os dois tubos de vidro e esterilizada juntamente com o mesmo. Após o resfriamento, a aparelhagem foi montada e o bioreator, inoculado com 500 mL de meio extrato de malte contendo 20% de efluente EOP como indutor. Após o crescimento do fungo imobilizado no nylon (5 dias) ou livre, o meio foi integralmente retirado e introduzidos 500 mL do efluente a ser tratado. A cada 24 horas foram retiradas amostras de 10 mL aproximadamente para determinação do pH, cor, fenóis totais, cloroligninas e AOX, até completar o ciclo de 72 horas.

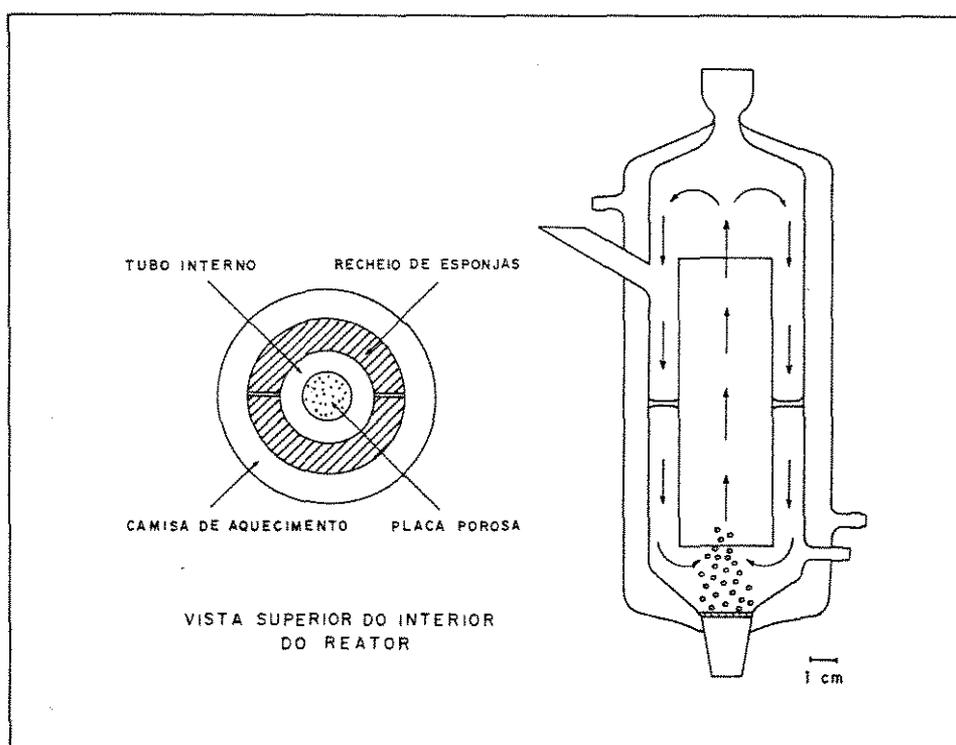


FIGURA 7) Bioreator de leito-recheado (modelo modificado).

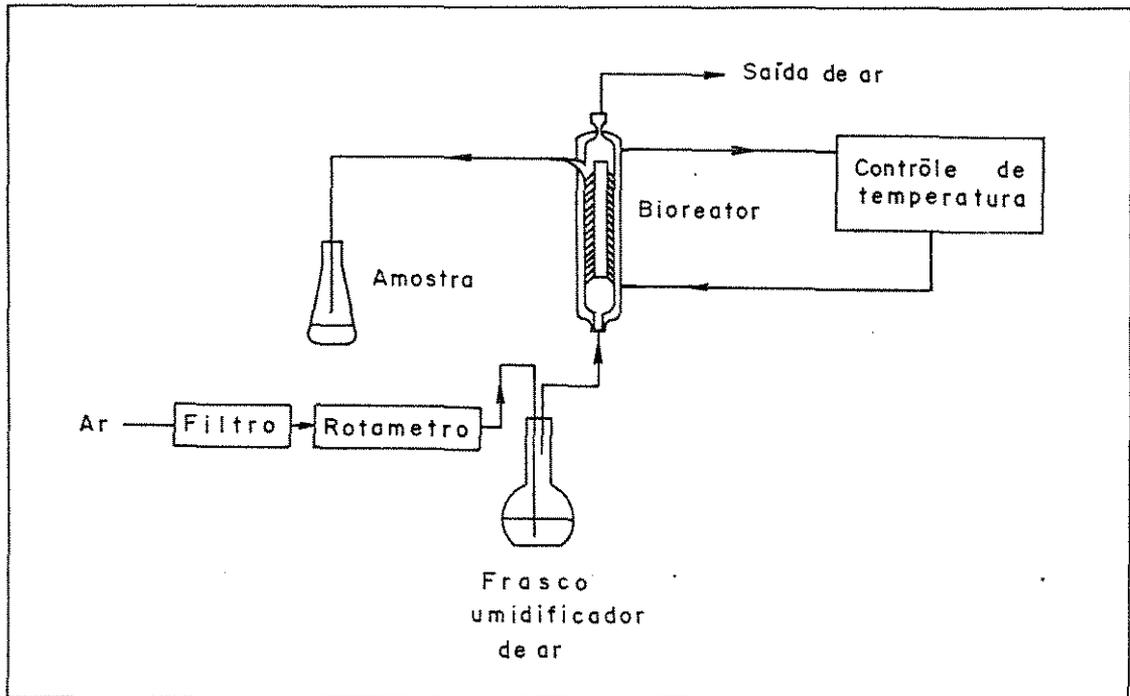


FIGURA 8. Esquema geral da utilização do bioreator.

### 3.29) Determinação do $K_L a$

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L a$ ) foi estimado com base no método polarográfico (Stanbury e Whitaker 1986). Primeiramente a concentração de oxigênio dissolvido na solução foi reduzida a zero com a injeção de nitrogênio no meio. Em seguida, a solução foi aereada e o aumento da concentração de oxigênio, monitorado por um oxígrafo.

A equação (1) descreve a variação da concentração de oxigênio com o tempo:

$$dC_L/dt = k_L a (C^* - C_L) \quad (1)$$

A integração da equação (1) leva a equação (2):

$$\ln \frac{[C^* - C_L]}{[C^* - C_{L0}]} = k_L a \times t \quad (2)$$

Onde:

$C_L$  = concentração de oxigênio no meio em % de saturação

$C^*$  = concentração de oxigênio dissolvido na saturação

$C_{L0}$  = concentração de oxigênio dissolvido no instante zero. Considera-se  $C_{L0}$  é igual a zero.

Portanto, medindo-se vários valores de  $C_L$ , compreendidos entre 0 % e 100 % da saturação do meio com ar, pode-se calcular o valor experimental de  $K_L a$  através do gráfico de  $\ln [(C^* - C_L)/C^*]$  em função do tempo  $t$ . A inclinação da reta corresponde ao valor de  $K_L a$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1) Produção e Otimização de LiP e MnP por *L. edodes*

Partindo de uma seleção prévia (Esposito e col., 1991; Esposito, 1992), foram empregadas duas cepas de *L. edodes*, UEC-2019 e UEC-2021 para o estudo de produção e otimização de enzimas ligninolíticas. Na figura 9 podemos acompanhar a cinética de produção enzimática em meio líquido (extrato de malte, 1,25 %) para ambas cepas por um período de 15 dias. O ponto máximo de atividade enzimática deu-se aos 5 dias de cultivo, logo decidiu-se otimizar as condições de produção para esse tempo. Resultados semelhantes foram obtidos por Michel e col. (1991). Provavelmente após este período estaria ocorrendo a produção de proteases, já que teríamos uma redução da fonte de carbono.

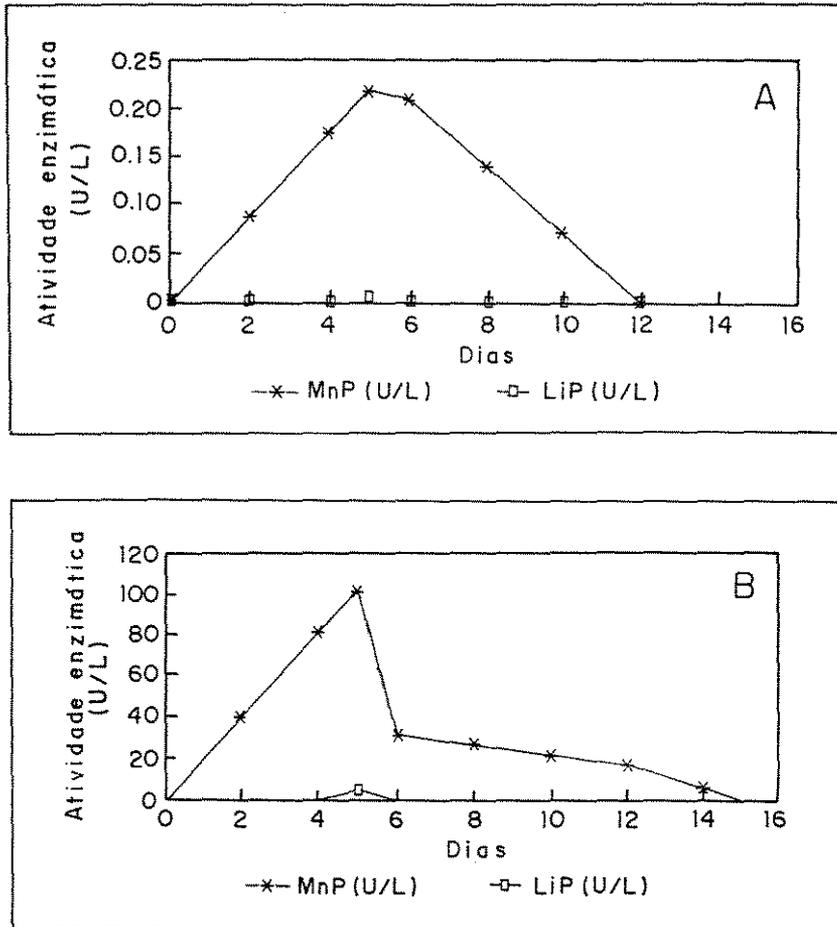


FIGURA 9. A) *L. edodes* UEC-2019 e B) *L. edodes* UEC-2021 incubadas por 15 dias.

Foram determinadas as atividades enzimáticas em meio sólido e comparadas com as obtidas em meio líquido (TABELA 1). Em meio líquido, a produção tanto de MnP quanto de LiP, foi notoriamente maior. Poderíamos atribuir este resultado a melhor oxigenação obtida em meio líquido. Esta afirmação também é corroborada mais adiante com os estudos de descontaminação do efluente em fase estacionária e agitada.

TABELA 1. Atividade enzimática de *L. edodes* UEC-2021 em meio de cultura sólido e líquido<sup>a</sup>, em 5 dias de cultivo.

<i>L. edodes</i> UEC-2021 <sup>+++</sup>	Mn-Peroxidase (U/L)	Li-Peroxidase (U/L)
Meio Sólido	2.4	0.3
Meio Líquido	60.0	1.2

a) meio líquido (100 mL, pH 5, 12 círculos de micélio-agar<sup>\*</sup>) sob agitação de 150 rpm, 28°C. (\*) crescimento micelial do inóculo utilizado: (+)= pouco (++)= razoável, (+++)= bom e (++++)= excelente.

Na TABELA 2 abaixo, são apresentados os resultados do estudo do tamanho de inóculo. A maior atividade para as enzimas estudadas foi produzida a partir da inoculação com 12 círculos de micélio-agar para 100 mL de meio. Esta afirmação é válida para experiências comparativas com inóculo retirado da mesma placa.

TABELA 2. Influência do tamanho do inóculo na produção enzimática de *L. edodes* UEC-2021 em meio líquido.

<i>L. edodes</i> UEC-2021 <sup>++</sup> Inóculo em 100 mL	Mn-Peroxidase (U/L)	Li-Peroxidase (U/L)
8 Círculos	21.0	1.2
12 Círculos	35.6	2.0
16 Círculos	ND	0.1
20 Círculos	ND	0.2

ND (Não Detectado). Meio líquido (pH 5) sob agitação de 150 rpm, 28°C. (++)= razoável crescimento micelial (vide legenda TABELA 1).

Foram estudados outros meios de cultivo (Tien e Kirk, 1988 e Leatham e Kirk, 1983), os quais utilizavam glicose como fonte de carbono (resultados não mostrados), porém resultados mais satisfatórios foram obtidos com o meio padrão extrato de malte.

Sem dúvida a fonte de carbono é importante para a atividade ligninolítica de *L. edodes*, porém um excesso ou redução da mesma pode inibir a expressão de MnP. Entretanto um aumento na fonte de carbono ocasiona proporcionalmente um incremento de LiP (TABELA 3). Estas observações são corroboradas pelo trabalho de Leatham (1986), onde ele apresenta um estudo comparativo da atividade ligninolítica de *L. edodes* e *Phanerochaete chrysosporium*. Apesar de não ter sido detectada atividade de LiP com álcool veratrílico nas culturas de *L. edodes*, o aumento na fonte de carbono coincidiu com uma degradação acentuada de lignina. Provavelmente este fato se deveria a presença de peroxidases.

Na TABELA 4 pode ser visto que há um aumento significativo de MnP e um decréscimo de LiP com a redução da fonte de nitrogênio. Leatham e Kirk (1983) observaram que em altas concentrações da fonte de nitrogênio havia um incremento na degradação de lignina. Provavelmente devido a presença de LiP, o que estaria de acordo os resultados observados (TABELA 4), já que o aumento da fonte de nitrogênio também ocasiona um aumento de LiP. Entretanto neste trabalho, os autores não determinaram as atividades nem de LiP e nem de MnP, referiram-se apenas a atividade ligninolítica de forma genérica. De qualquer forma podemos afirmar que no presente estudo a fonte de nitrogênio é importante para a expressão de LiP, mas é dispensável para produção de MnP, já que com a redução da mesma, observa-se uma melhora na atividade enzimática.

TABELA 3. Requerimento da fonte de carbono nas atividades enzimáticas de *L. edodes* UEC-2021.

Fonte de Carbono (Malte)	Mn-Peroxidase (U/L)	Li-Peroxidase (U/L)
2.50%	ND	0.97
1.25%	35.0	0.14
0.62%	ND	0.02

Meio líquido malte com concentrações variáveis, pH 5, inóculo de 12 círculos de micélio-agar<sup>++</sup> (vide legenda TABELA 1), agitação de 150 rpm, 28°C.

TABELA 4. Requerimento da fonte de nitrogênio nas atividades enzimáticas de *L. edodes* UEC-2021.

Fonte de Nitrogênio (CHOH-COONH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Mn-Peroxidase (U/L)	Li-Peroxidase (U/L)
1.88%	0.8	5.0
0.94%	0.9	3.0
0.47%	46.0	2.0

Meio líquido malte 1.25% com fonte adicional de nitrogênio, pH 5, inóculo de 12 círculos de micélio-agar<sup>++</sup> (vide legenda TABELA 1), agitação de 150 rpm, 28°C.

Na TABELA 5 pode-se observar a influência do sistema de imobilização para *L. edodes*. Neste caso, as duas enzimas em questão apresentaram um aumento de aproximadamente 30% nas suas atividades, em meio de crescimento livre.

TABELA 5. Atividade enzimática de *L. edodes* UEC-2021 livre e imobilizado.

<i>L. edodes</i> UEC-2021	Mn-Peroxidase (U/L)	Li-Peroxidase (U/L)
Micélio livre	101.0	3.0
Micélio imobilizado	74.0	2.0

Meio líquido malte 1.25% (pH 5), inóculo de 12 círculos de micélio-agar<sup>++++</sup> (vide legenda TABELA 1), sob agitação de 150 rpm, 28°C.

A partir deste estudo foram definidas as condições mais adequadas para produção de MnP e LiP por *L. edodes*. Resumidamente essas condições seriam utilização de meio líquido extrato de malte 1.25%, sem fonte adicional de nitrogênio, inóculo de 12 círculos de micélio-agar para 100 mL e crescimento micelial livre.

#### 4.2) O papel de MnP e LiP no Tratamento Biológico de Efluentes.

As figuras 10 e 11 representam o estudo cinético do tratamento biológico de efluentes.

Durante o período de 5 dias são analisadas a redução de cor e de fenóis totais e relacionadas com a produção das enzimas LiP e MnP em culturas estacionária e agitada respectivamente. Em ambas as culturas observa-se um máximo de redução de cor (aproximadamente 70%) ao redor do 3º dia. Na cultura submetida a agitação (figura 10) um pico de produção enzimática de LiP (0.85 U/L) e de MnP (3.36 U/L) também é encontrado nesse mesmo período. A degradação de fenóis é mais lenta, atingindo em 3 dias cerca de 30 % nas culturas estacionárias (figura 11) e 45% nas culturas agitadas, entretanto no 5º dia ocorre um aumento de aproximadamente 30 % para ambas culturas, atingindo 45 % de redução nas culturas estacionárias e 63 % de redução nas culturas agitadas.

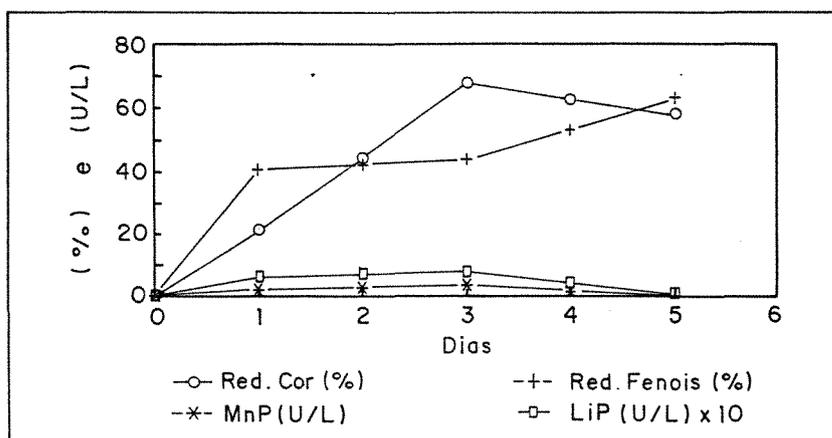


FIGURA 10. *L. edodes* UEC-2021: Estudo cinético em cultura sob agitação de 150 rpm a 28°C.

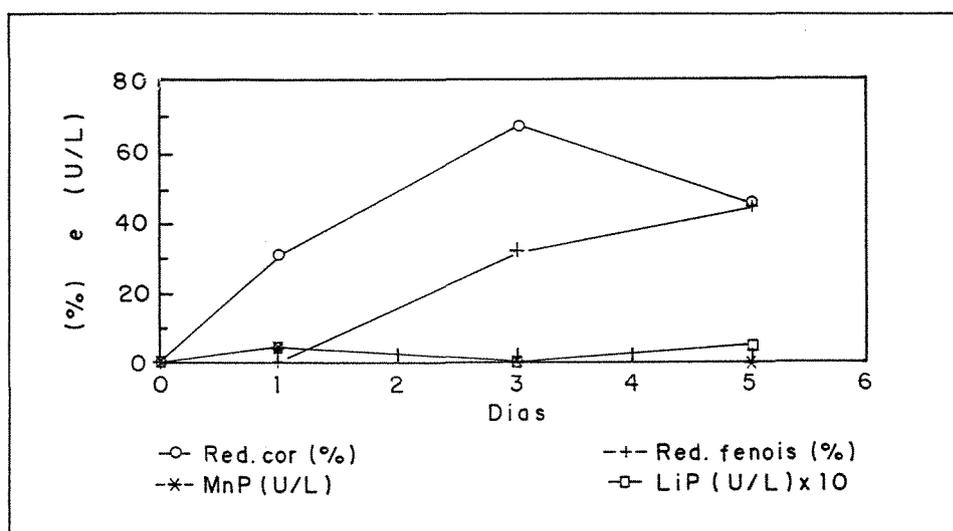


FIGURA 11. *L. edodes* UEC-2021: Estudo cinético em cultura estacionária a 28°C.

A partir destes resultados podemos inferir que a descoloração do efluente está diretamente relacionada a produção de MnP e LiP.

Momohara e col. (1989), estudaram a relevância de LiP no tratamento de efluentes. Sabe-se que a atividade ligninolítica de *P. chrysosporium* é reduzida pela adição de catalase no meio. Nos experimentos com catalase foi demonstrado que LiP não é secretada ou não está ativa durante a descoloração. Em um trabalho realizado com *P. chrysosporium* para descoloração de efluentes, não foi possível correlacionar claramente a atividade ligninásica com a descontaminação do efluente (Hatakka e col. 1990). O efeito do efluente de uma planta de branqueamento sobre a produção de LiP por *P. chrysosporium* foi estudada por Presnell e col. (1992). Análises por FPLC mostraram diferentes perfis de proteína com relação ao efluente sem o fungo, demonstrando que o efluente induz a produção enzimática. Além do mais as enzimas produzidas na presença do efluente são diferentes das produzidas em meio de cultura.

Em um estudo preliminar realizado com vários fungos no tratamento de efluentes foram determinadas as atividades de lacase, peroxidase e LiP. A partir destes resultados observou-se que LiP não exercia um papel preponderante no processo, já que uma cepa de *Phaeocoriolellus trabeus* apesar de produzir 230 U/L de ligninase não era eficiente na descontaminação do efluente (Esposito e col. 1991). Michel e col. (1991) realizaram um estudo com LiP e MnP de *P. chrysosporium* na descontaminação do efluente Kraft E1 e concluíram que MnP era mais importante do que LiP durante o processo de tratamento. Recentemente Jaspers e col. (1994) evidenciaram a atuação de MnP na descoloração do efluente kraft. *P. chrysosporium* cultivado em efluente produz apenas MnP, LiP não foi detectada nestas condições. Experimentos realizados a diferentes pHs com LiP purificada mostraram que a enzima é desativada na presença do efluente (Jaspers e col. 1994). Entretanto estudos anteriores com LiPs purificadas (LiP I, II e III) de *Chrysonilia sitophila* sobre descoloração de efluente E1 demonstraram que esta enzima é capaz de causar uma pequena redução de cor no efluente em torno de 15% (LiP tipo II e III) (Ferrer e col. 1991, Dezotti, 1992).

Ao que tudo indica, MnP exerce um papel predominante sobre LiP na descontaminação do efluente.

Aparentemente a atividade de descoloração por MnP no efluente não depende da adição externa de  $Mn^{2+}$  e  $H_2O_2$ . A concentração destes substratos pode ser suficientemente alta no efluente

industrial ou por outro lado a atividade de descoloração pode se dar através de uma oxidase ainda não identificada, que catalisa uma reação lateral (Jaspers e col. 1994).

Estes trabalhos concordam com os resultados e conclusões obtidas neste estudo com *L. edodes*.

A existência de uma nova enzima fungica que processe ambas atividades de oxidase e peroxidase foi recentemente documentada (Vares e col. 1993). Além desta possibilidade deve-se considerar a atividade de outras enzimas fúngicas no efluente, como lacases e beta-glicosidase. As lacases catalisam a polimerização oxidativa de compostos fenólicos. Os produtos resultantes polimerizam-se espontaneamente formando complexos insolúveis, os quais são facilmente removidos por precipitação, filtração ou centrifugação. A beta-glicosidase possui atividade transferásica. Essa propriedade torna esta enzima importante no tratamento de efluentes, pois permite que o escasso açúcar presente no efluente seja ligado á derivados da lignina, formando um substrato adequado para o ataque fúngico (Esposito, 1992).

#### 4.3) Imobilização de *L. edodes* em Suportes Modificados Quimicamente.

Foram realizados estudos com ambas cepas de *Lentinula edodes* imobilizadas em nylon tratado quimicamente de duas formas, com HCl e com glutaraldeído e comparadas com a imobilização no nylon sem tratamento. Em um trabalho recente de Wang e Ruckenstein (1993), os autores empregaram HCl para gerar poros adicionais ao poliuretano com a finalidade de melhorar a capacidade de imobilizar enzimas e utilizaram o glutaraldeído para conferir maior estabilidade a imobilização.

Neste estudo o objetivo foi verificar se haveria um incremento nas propriedades de imobilização do fungo com a liberação dos grupamentos amino do nylon, após o tratamento ácido. Os resultados são apresentados na TABELA 6 relacionada abaixo e na figura 12 são mostradas as fotos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do nylon antes e após do tratamento biológico (a-f). Comparando-se morfologicamente o nylon antes e após do tratamento químico com HCl, a única diferença a salientar são as terminações das fibrilas. No nylon sem tratamento (fig. 12 a), estas parecem totalmente homogêneas, enquanto que após o tratamento ácido as terminações parecem queimadas e irregulares (fig. 12 b).

Os experimentos com *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em nylon tratado com HCl comparado

(resultados não mostrados) atingindo um platô em um período menor de tempo (48 h). Entretanto os resultados finais são similares, exceto pelo decréscimo do carbono orgânico total (TOC), que foi bem mais significativo com o sistema de imobilização em nylon sem tratamento químico. Nas fotos (fig. 12, c e d) em MEV, podemos observar que há aparentemente um crescimento micelial mais abrangente no suporte tratado quimicamente, o que possivelmente estaria ocasionando a atuação do fungo sobre a descontaminação do efluente E1 de forma mais eficiente com relação a redução de cor e fenóis totais. O mesmo não se pode dizer sobre *L. edodes* UEC-2019. Os resultados mostram que a imobilização, mesmo no suporte modificado, não estimula a ação do fungo sobre o efluente.

TABELA 6. Descontaminação do efluente tratado por *L. edodes* imobilizado em nylon com pré-tratamento (HCl) (NT) comparado ao nylon não tratado quimicamente (NNT).

Parâmetros Medidos	<i>L. edodes</i> UEC-2021 NNT	<i>L. edodes</i> UEC-2021 NT	<i>L. edodes</i> UEC-2019 NNT	<i>L. edodes</i> UEC-2019 NT
Cor (% Red.)	83.3	88.0	42.0	37.7
Fenóis (% Red.)	53.3	58.3	15.0	12.0
TOC (% Red.)	60.0	34.0	29.0	24.0
Cl <sup>-</sup> (% Aumento)	0.0	0.0	10.0	6.0
pH	5.6	5.6	3.7	4.3

Tratamento biológico por 5 dias, a 28°C, 150 rpm, sem iluminação.

\* os valores absolutos de todos os parâmetros analisados estão no anexo 1.

No tratamento do nylon com glutaraldeído, os grupamentos imina ficam livres para a ligação do fungo ou de suas enzimas. Os resultados são apresentados na TABELA 7 e nas fotos em MEV mostradas na figura 13 (a-i). Com relação a mudança na morfologia do nylon após tratamento químico, pode-se observar claramente que há um achatamento das fibrilas tomando uma forma laminar (figura 13 a-d).

TABELA 7. Descontaminação do efluente tratado por *L. edodes* imobilizado em nylon previamente tratado com Glutaraldeído (NT) comparado ao nylon sem tratamento químico (NNT).

Parâmetros Medidos	<i>L. edodes</i> UEC-2021 NNT	<i>L. edodes</i> UEC-2021 NT	<i>L. edodes</i> UEC-2019 NNT	<i>L. edodes</i> UEC-2019 NT
Cor (% Red.)	83.0	40.0	42.0	20.0
Fenóis (%Red.)	53.0	52.0	15.0	20.0
TOC (% Red.)	60.0	3.0	29.0	7.0
Clorolig. (% Red.)	ND	17.4	ND	ND
pH (final)	5.6	6.0	5.4	5.6

Tratamento biológico por 5 dias, a 28°C, 150 rpm, sem iluminação. \* os valores absolutos de todos os parâmetros analisados estão no anexo 1. ND= não determinado.

Após o tratamento químico do nylon com glutaraldeído, ao ser utilizado para imobilização do fungo, não ocorreu nenhum crescimento, durante 5 dias. Para possibilitar o desenvolvimento do microrganismo, foi realizada uma lavagem extensiva deste suporte uma vez já utilizado no tratamento biológico, para ser reutilizado pela segunda vez. Nas fotos de MEV, pode ser observado diferenças na estrutura do nylon. O nylon reutilizado, possui a superfície mais rugosa, talvez essa característica facilite o crescimento do fungo imobilizado.

O crescimento micelial é notavelmente diferente entre o nylon tratado com HCl e com glutaraldeído. No primeiro caso, o crescimento é mais livre, esponjoso, dando uma aparência de teia (fig.12 c-f), já no segundo caso respectivamente, observa-se um crescimento altamente compacto, formando uma espécie de crosta (fi. 13 e-i). Possivelmente esta característica tenha afetado a eficiência de descontaminação pelo fungo. Poderíamos supor que esse crescimento compacto do micélio fungico no nylon dificultaria o contato do microrganismo com o efluente, impedindo a livre recirculação do líquido, como possivelmente estaria ocorrendo nos nylons sem tratamento e tratado com HCl.

A TABELA 8 mostra sucintamente os resultados da descontaminação do efluente por *L. edodes* UEC-2021 imobilizado no nylon sem nenhum tipo de tratamento prévio, comparado ao

nylon tratado quimicamente com HCl e Glutaraldeído.

TABELA 8. Quadro comparativo de *L. edodes* UEC-2021 Imobilizado no nylon sem tratamento químico, tratado com HCl e tratado com Glutaraldeído na descontaminação do efluente. Período: 5 dias.

% de REDUÇÃO	Nylon sem Tratamento	Nylon Tratado com HCl	Nylon Tratado com Glutaraldeído
COR	82.7	88.0	40.0
FENÓIS	53.0	58.0	52.0
TOC	60.0	37.7	3.0
CLOROLIGNINA	ND	ND	17.4
pH (final)	5.6	5.6	6.0

ND = não determinado

A partir destes resultados podemos inferir que os tratamentos químicos propostos para melhorar a qualidade da imobilização do fungo no nylon, não se justificam. O nylon por si só é um excelente suporte para imobilização.

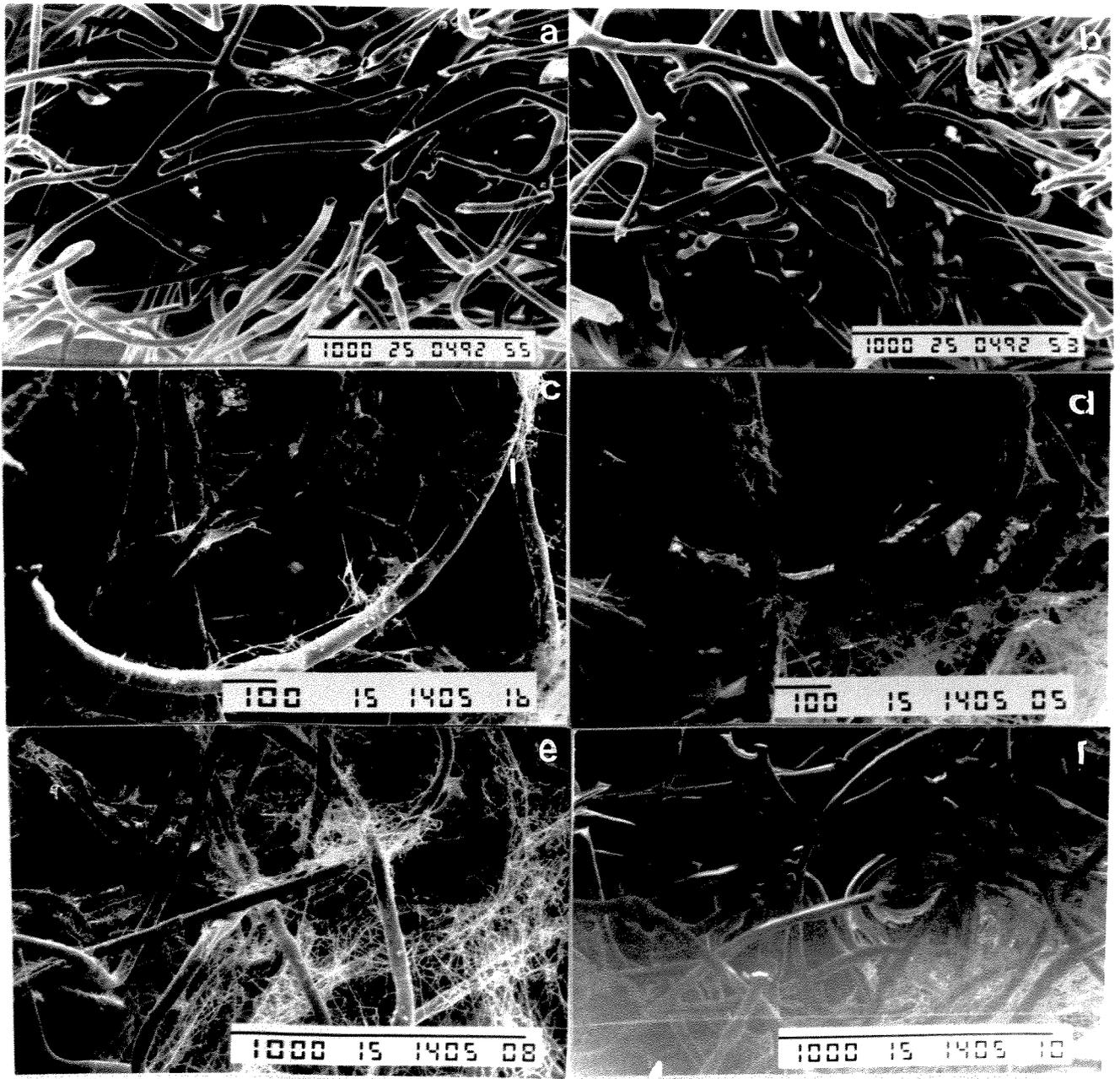


FIGURA 12. Cepas de *L. edodes* imobilizado em nylon não tratado e tratado e seus respectivos controles. a) MEV de nylon não tratado controle (x 50); b) MEV de nylon tratado controle (x 50); c) MEV de *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em nylon não tratado (x 75); d) MEV de *L. edodes* UEC-2021 imobilizado sobre nylon tratado (x 100); e) MEV de *L. edodes* UEC-2019 imobilizado em nylon não tratado (x 50); f) MEV de *L. edodes* UEC-2019 imobilizado em nylon tratado (x 50).

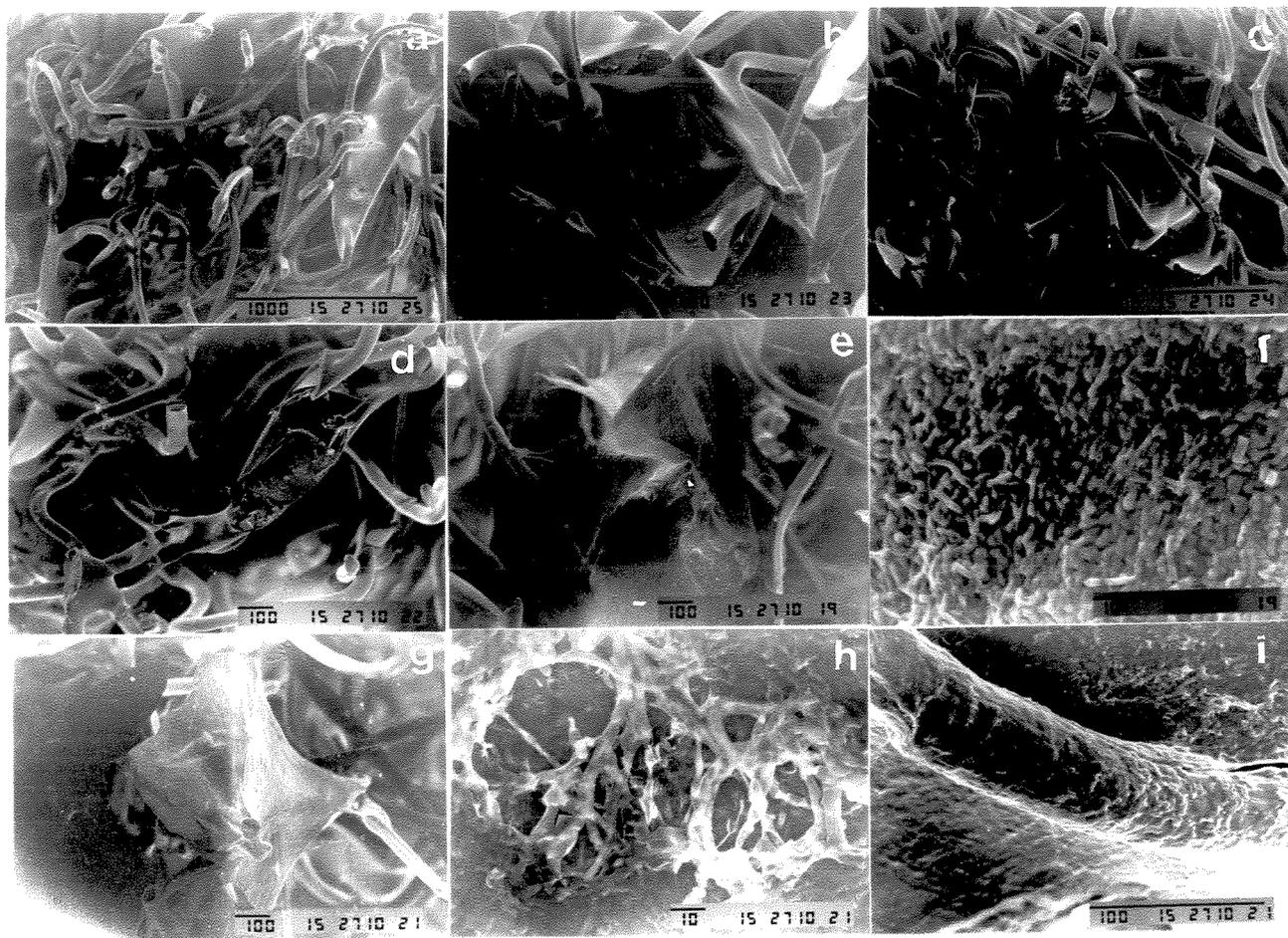


FIGURA 13. Cepas de *L. edodes* imobilizado em nylon tratado com Glutaraldeido e seus respectivos controles. a) MEV de nylon tratado com Glutaraldeido controle (x 50); b) MEV de nylon tratado com Glutaraldeido controle (x 100); c) MEV de nylon tratado com Glutaraldeido controle (x 50) após prévia utilização e lavagem extensiva; d) MEV de nylon tratado com Glutaraldeido controle (x 100) após prévia utilização e lavagem extensiva; e) MEV de *L. edodes* UEC-2019 imobilizado em nylon tratado (x 100); f) MEV de *L. edodes* UEC-2019 imobilizado em nylon tratado (x 1000); g) MEV de *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em nylon tratado (x 100); h) MEV de *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em nylon tratado (x 1000); i) MEV de *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em nylon tratado (x 1000).

#### 4.4) Seleção de Fungos para Tratamento de Efluente E1 de Madeira Mole (*Pinus radiata*).

Nesta etapa do trabalho, após já ter selecionado a melhor cepa e as condições mais adequadas para o tratamento de efluente de madeira dura (*Eucalyptus grandis*) a nível de Erlenmeyer, realizou-se um estudo com esta (*Lentinula edodes* UEC-2021) e outros fungos (*Aspergillus oryzae*, *Pycnoporus sanguineus* e *L.edodes* UEC-2019) atuando sobre efluente E1 de madeira mole (*P. radiata*). As TABELAS 9-12 apresentam estes resultados.

TABELA 9. Descontaminação de efluente E1 por *Aspergillus oryzae*.

Dias	0	1	3	5
pH	5.0	6.4	7.1	7.2
Redução de Cor (%)	0.0	34.0	-33.0	8.0
Redução de AOX (%)	0.0	52.0	64.0	49.0
Redução de Fenóis (%)	0.0	79.0	40.0	48.0

Em  $t_0$ : Absorbância: 0.507 (pH 7.6), açúcares redutores: 0.007 %, AOX: 30 mg/L e Fenóis totais: 22.5 mg/L, 28°C, 150 rpm.

TABELA 10. Descontaminação de efluente E1 por *Pycnoporus sanguineus*.

Dias	0	1	3	5
pH	5.0	7.0	7.9	8,1
Redução de Cor (%)	0.0	54.0	-22.0	-7,0
Redução de AOX (%)	0.0	51.0	19.0	50,0
Redução de Fenóis (%)	0.0	90.0	40.0	58,0

Em  $t_0$ : Absorbância: 0.507 (pH 7.6), açúcares redutores: 0.007 %, AOX: 30.0 mg/L e Fenóis totais: 22.5 mg/L, 28°C, 150 rpm.

TABELA 11. Descontaminação de efluente E1 por *L. edodes* UEC-2019.

Dias	0	1	3	5
pH	5.0	5.2	5.0	6.5
Redução de cor (%)	0.0	40.6	25.0	11.6
Redução de AOX (%)	0.0	17.4	50.0	12.7
Redução de fenóis (%)	0.0	90.0	40.0	58.0

Em  $t_0$ : Absorbância: 0.600 (pH 7.6), açúcares redutores: 0.007 %, AOX: 21.0 mg/L e Fenóis totais: 22.0 mg/L, 28°C, 150 rpm.

As duas cepas de *L. edodes* foram selecionadas (Esposito e col. 1991, Esposito, 1992), pela eficiência demonstrada, para o tratamento de efluente proveniente da polpação de madeira dura (*E. grandis*) (figura 10). Assim sendo, para fins comparativos com outro efluente de natureza diferente (madeira mole, *P. radiata*), decidiu-se estudar sob vários aspectos, estas mesmas cepas, apesar dos dois primeiros fungos, *A. oryzae* (TABELA 9) e *P. sanguineus* (TABELA 10), demonstrarem maior eficiência em menos tempo do que *L. edodes* (TABELAS 11 e 12).

TABELA 12. Descontaminação de efluente E1 por *L. edodes* UEC-2021.

Dias	0	1	3	5
pH	5.0	5.4	5.4	6.0
Redução de Cor (%)	0.0	26.7	48.0	26.7
Redução de AOX (%)	0.0	29.8	38.0	30.5
Redução de Fenóis (%)	0.0	27.0	33.5	29.0

Em  $t_0$ : Absorbância: 0.600 (pH 7.6), açúcares redutores: 0.007 %, AOX: 21.0 mg/L e Fenóis totais: 22.0 mg/L.

*L. edodes* UEC-2019 (TABELA 11) apresentou uma redução mais eficiente de todos os parâmetros analisados do que *L. edodes* UEC-2021, entretanto nos estudos de imobilização *L. edodes* UEC-2021 mostrou-se notoriamente melhor (Esposito e col. 1993). Logo, para os estudos

posteriores de sistemas imobilizados em bioreator, decidiu-se trabalhar com a cepa UEC-2021.

A TABELA 13 mostra a eficiência de *L. edodes* UEC-2021 frente a outra cepa (*L. edodes* UEC-2019), atingindo um platô no 3º dia de tratamento com a diminuição de 50% na cor, 58% de AOX e 72.7% de fenóis totais. Os valores de redução de cor e AOX são 1.4 vezes maiores e de fenóis 6 vezes com a cepa UEC-2021.

TABELA 13. Descontaminação do efluente E1 (*Pinus radiata*)<sup>a</sup> por *L. edodes* imobilizado em bioreator. Comparação das duas cepas.

DIAS	0	1	3	5
<i>L. edodes</i> UEC-2019 (A)				
pH	5.0	4.9	5.2	4.9
COR (% Redução)	0.0	0.0	38.0	39.0
AOX (% Redução)	0.0	42.0	42.0	-
FENÓIS (% Redução)	0.0	5.0	12.3	-
<i>L. edodes</i> UEC-2021 (B)				
pH	5.0	5.6	4.9	4.9
COR (% Redução)	0.0	24.0	50.0	60.0
AOX (% Redução)	0.0	25.3	58.0	57.0
FENÓIS (% Redução)	0.0	21.7	72.7	73.0

a) Conc. açúcares redutores inicial de 0.002%. Temp. 22 °C. Pré-inóculo (20 % do vol. total) e 0.8 g de esponja de poliuretano, 5 dias de incubação com aeração contínua. A) Em t<sub>0</sub>: Cor: Abs.<sub>465</sub> 1.362 (pH 7.6), AOX: 29.0 mg/L, Fenóis totais: 26.4 mg/L. B) Em t<sub>0</sub>: Cor: Abs.<sub>465</sub> 1.440 (pH 7.6), AOX: 30.0 mg/L, Fenóis totais: 30.0 mg/L.

#### 4.5) Estudo Comparativo entre um Efluente de Madeira de Dura (*Eucalyptus grandis*) e outro de Madeira Mole (*Pinus radiata*) Tratados por *L. edodes* UEC-2021 e *P. sanguineus* UEC-2050.

As ligninas das madeiras moles contém principalmente grupamentos guaiacilicos com poucos ou nenhum resíduo siringilico (fig. 14). Enquanto que as madeiras duras contém quantidades similares destas unidades (Fengel e Wegner, 1984). Essa composição diferente se reflete nos

efluentes produzidos. Os efluentes de madeiras moles geram duas vezes mais AOX e em geral liberam grandes quantidades de compostos fenólicos em relação a madeiras duras. Na TABELA 14 são apresentados os resultados das análises realizadas com os efluentes originais, utilizados neste trabalho, provenientes do branqueamento da polpa de madeira dura e mole.

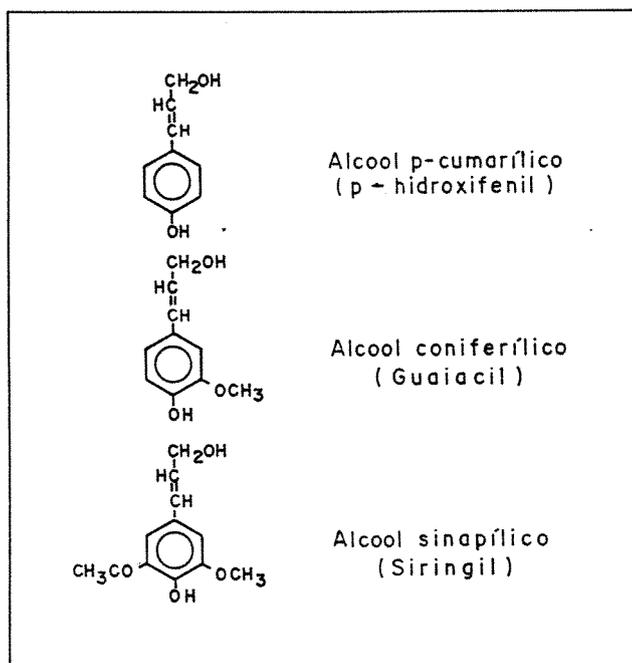


FIGURA 14. Precursores da lignina.

TABELA 14. Quadro comparativo dos efluentes produzidos a partir de madeira dura (*E. grandis*-Ripasa, Brasil) e madeira mole (*P. radiata*-Celulosa Arauco, Chile).

EFLUENTE	Estágio E1	pH	Cor Abs. <sub>465nm</sub>	AOX mg/L	Fenóis mg/L
M. Dura	EOP	9.7	0.23	45	10.0
M. Mole	E	10.0	3.13	71	72.6

Na TABELA 15 são apresentados os resultados obtidos na descoloração de ambos efluentes com *L. edodes* UEC-2021.

TABELA 15. Descoloração de Efluente E1 (madeira dura e mole) por *L. edodes* UEC-2021.

Dias	0	1	3	4	5
Madeira Dura	0%	23%	62%	60%	55%
Madeira Mole	0%	26%	38%	45%	60%

Um estudo similar foi desenvolvido por Lankinen e col. (1991) utilizando o fungo *Phlebia radiata*, onde a descoloração biológica de efluentes E1 de madeira mole e dura foi acompanhada por 5 dias (TABELA 16). Não observam-se diferenças significativas na ação do fungo.

Na etapa inicial e final do processo levado a cabo com *L. edodes*, também não se observam diferenças notórias. Entretanto podemos afirmar que no caso do efluente originado à partir de madeira dura, a ação do fungo é mais rápida atingindo o máximo de descoloração em 3 dias. O mesmo não ocorre com efluentes originados de madeira mole, pois o máximo de descoloração é atingido aos 5 dias de incubação. Possivelmente o efluente de madeira dura seja mais fácil de ser mineralizado. A origem do efluente exerce um efeito importante no aparecimento de enzimas ligninolíticas. Os efluentes de madeira mole por possuírem níveis de AOX superiores aos encontrados com madeiras duras, provavelmente também contenham um tipo de clorolignina que afeta o perfil das enzimas produzidas (Hatakka e col., 1990).

TABELA 16. Descoloração de efluente E1 (madeira dura e mole) pelo fungo, *Phlebia radiata* (Lankinen e col. 1991).

Dias	0	1	3	4	5
Madeira Dura	0	-5%	-15%	-20%	55%
Madeira Mole	0	-5%	-10%	20%	65%

A cor do efluente E1 pode ser reduzida por ditionito de sódio, a qual constitui mais da metade do total da cor do efluente. Em um trabalho realizado por Momohara e col. (1989), os componentes do efluente E1 foram fracionados em três níveis de alto, médio e baixo peso molecular e a cor de cada fração foi analisada pela redução com ditionito de sódio (remove

somente estruturas do tipo quinonas) e borohidreto de sódio (remove todas estruturas do tipo carbonila). O procedimento de remoção de cor das frações de alto peso molecular prova que a precipitação ou adsorção de materiais coloridos não é o principal fator na remoção de cor, mas sim a biodegradação. Dos três tipos de cor, a porção referente a estruturas do tipo quinonas foi degradada mais rapidamente. Em um trabalho posterior Momohara e col. (1990) estudaram, por cromatografia gasosa, a degradação de um composto modelo de quinona por *P. chrysosporium* e LiP. Os resultados indicaram que alguns tipos de estruturas quinônicas podem ser degradadas a compostos mais simples pelo fungo e que LiP pode catalizar esta reação com a ajuda do álcool veratrílico.

Os resultados apresentados na TABELA 17 indicam que *L. edodes* UEC-2021 demonstra especificidade para estruturas do tipo quinonas e carbonilas no caso do efluente de madeira dura e que no caso de madeira mole o fungo parece atuar mais especificamente sobre os grupamentos quinonas e outros tipos de cor.

TABELA 17. Tratamento biológico de efluentes por *L. edodes* UEC-2021 por 3 dias: Porcentagem de redução de cor com relação ao controle.

Natureza da Cor	Madeira Dura	Madeira Mole
	<i>E. grandis</i>	<i>P. radiata</i>
Quinonas	43%	47%
Carbonilas	48%	15%
Outros Tipos	21%	38%

Determinação da cor do efluente a) de madeira dura E1 (controle): 53.7 % de estruturas do tipo Quinonas, 30.0% do tipo Carbonilas e 16.2% de outros tipos. b) de madeira mole E1: 60% de estruturas do tipo Quinonas, 24% do tipo carbonilas e 16% de outros tipos.

Momohara e col. (1989) estudaram as características da cor durante a descoloração por *P. chrysosporium* e concluíram que o mecanismo de ação deste fungo pode incluir a destruição ou a modificação de estruturas do tipo quinona, como passo mais importante deste processo. *L. edodes* tanto no efluente proveniente de madeira dura quanto mole apresenta um mecanismo de

degradação, porém a especificidade é diferente.

A TABELA 18 mostra as características da cor após o tratamento de efluente E1 (madeira mole) com *P. sanguineus* por 1 dia. Apesar de ter-se feito o estudo cinético (1,3 e 5 dias) (resultados não mostrados), esse período foi escolhido devido a eficiência previamente demonstrada (TABELA 10).

TABELA 18. Tratamento biológico de efluentes por *P.sanguineus* UEC-2050 por 1 dia: Porcentagem de redução de cor.

Natureza da Cor	Madeira Dura <i>E. grandis</i>	Madeira Mole <i>P. radiata</i>
Quinonas	29%	41%
Carbonilas	21%	0%
Outros Tipos	12%	43%

Esses resultados com relação a natureza da cor demonstram claramente a maior eficiência de *P. sanguineus* no tratamento do efluente proveniente de madeira mole. O fungo degrada praticamente duas vezes mais as estruturas do tipo quinonas e 3.6 vezes mais outros tipos de cor, não tocando nas estruturas do tipo carbonilas, neste período.

*L. edodes* UEC-2021 é apto para o tratamento biológico tanto de efluentes de madeira dura quanto mole, demonstrando ser uma cepa altamente eficaz na remoção de uma ampla gama de poluentes.

#### 4.6) Cálculo do Coeficiente de Transferência de Oxigênio ( $K_La$ ).

Esta última etapa do trabalho teve por objetivo a escolha do  $K_La$  mais adequado para a remoção de compostos tóxicos do efluente Kraft E1 (madeira dura) com *L. edodes* UEC-2021 em bioreator.

Foram calculados os valores de  $K_La$  para sistemas livres e imobilizados em bioreator, para três vazões de ar diferentes: 400, 600 e 800 mL/min. As figuras 15-20 mostram estes resultados.

Em sistemas imobilizados parece haver maior resistência devido ao suporte, por isto o  $K_La$  calculado é menor do que nos sistemas livres. Em um trabalho recentemente publicado por

Bonnarme e col. (1993) foram apresentados os cálculos de  $K_L a$  para um bioreator do tipo "airlift", modelo semelhante ao utilizado para este estudo. Os valores estiveram muito próximos, para vazões similares.

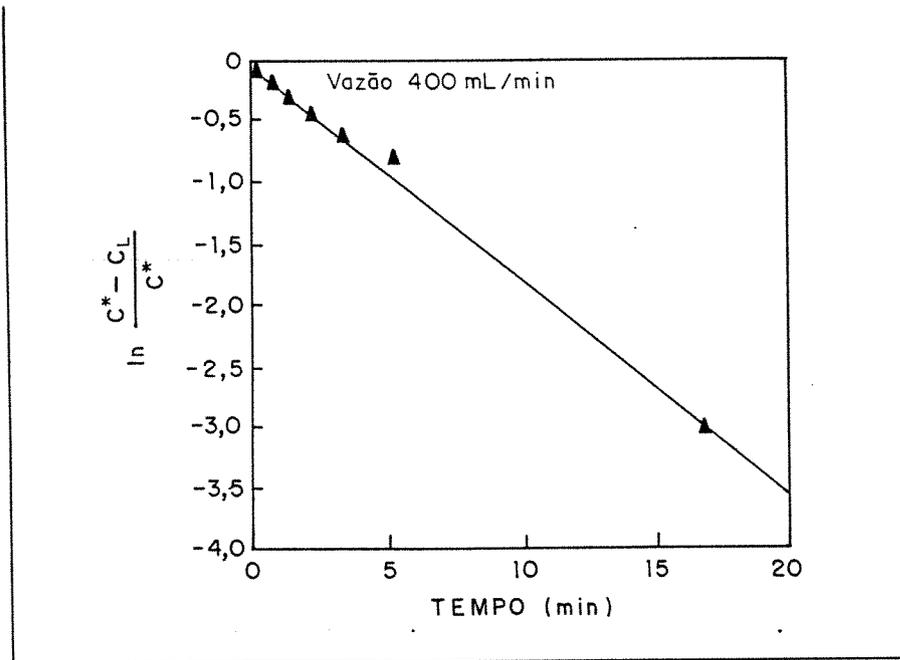


FIGURA 15) Cálculo de  $K_L a$  para sistemas livres em bioreator do tipo "air-lift" (modificado). Vazão de ar 400 mL/min  $K_L a = 0,18 \text{ min}^{-1}$  ou  $10,8 \text{ h}^{-1}$

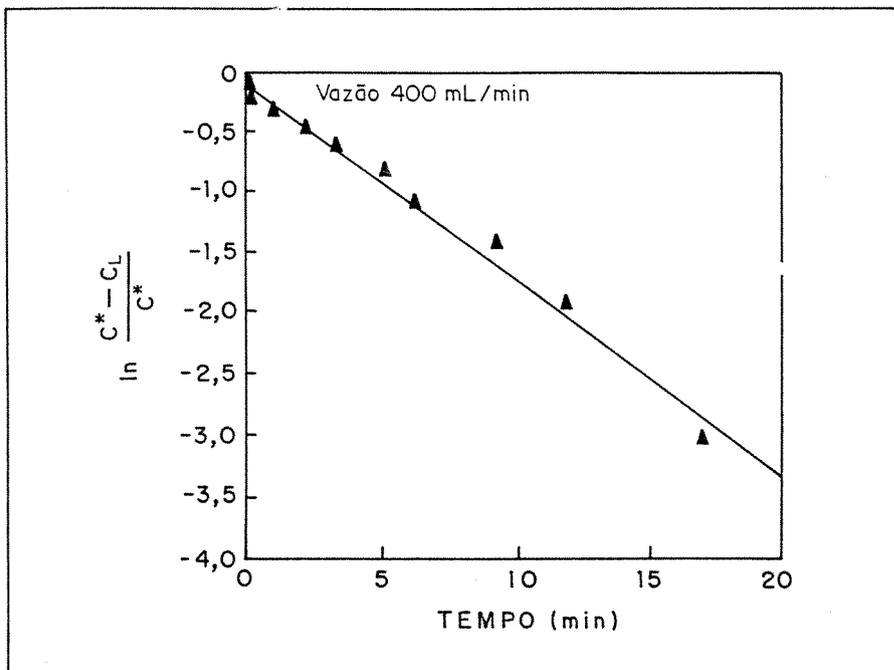


FIGURA 16) Cálculo de  $K_L a$  para sistemas imobilizados em bioreator do tipo "air-lift" (modificado). Vazão de ar 400 mL/min:  $K_L a = 0,16 \text{ min}^{-1}$  ou  $9,6 \text{ h}^{-1}$

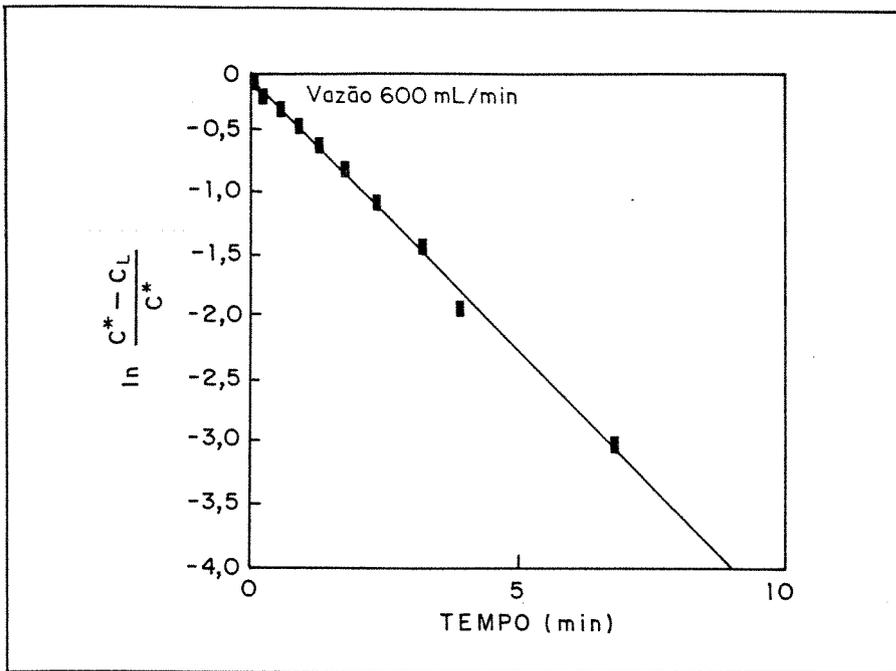


FIGURA 17) Cálculo de  $K_1a$  para sistemas livres em bioreator do tipo "air-lift" (modificado). Vazão de ar de 600 mL/min:  $K_1a = 0,44 \text{ min}^{-1}$  ou  $26,4 \text{ h}^{-1}$

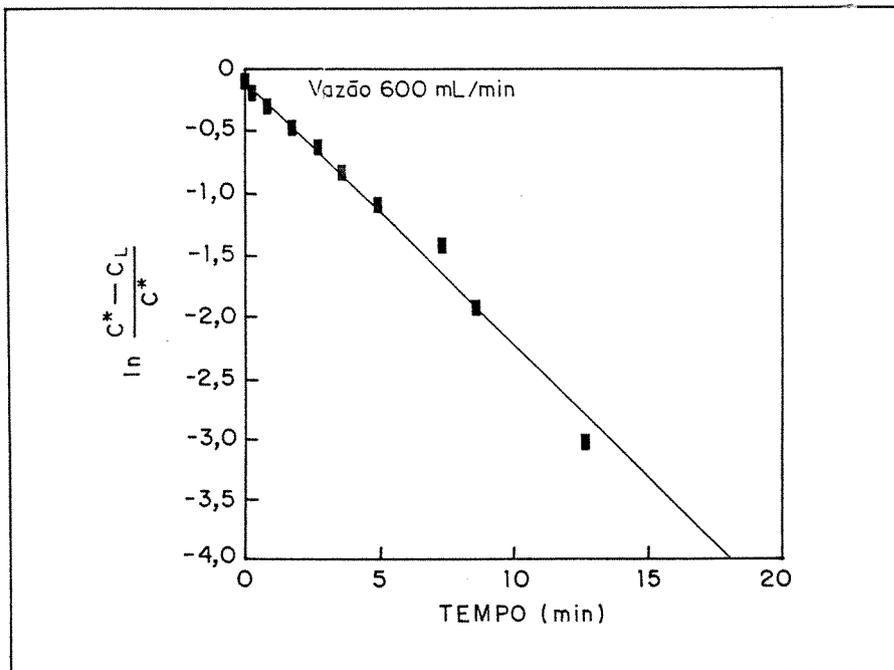


FIGURA 18) Cálculo de  $K_1a$  para sistemas imobilizados em bioreator do tipo "air-lift" (modificado). Vazão de ar de 600 mL/min:  $K_1a = 0,22 \text{ min}^{-1}$  ou  $13,2 \text{ h}^{-1}$

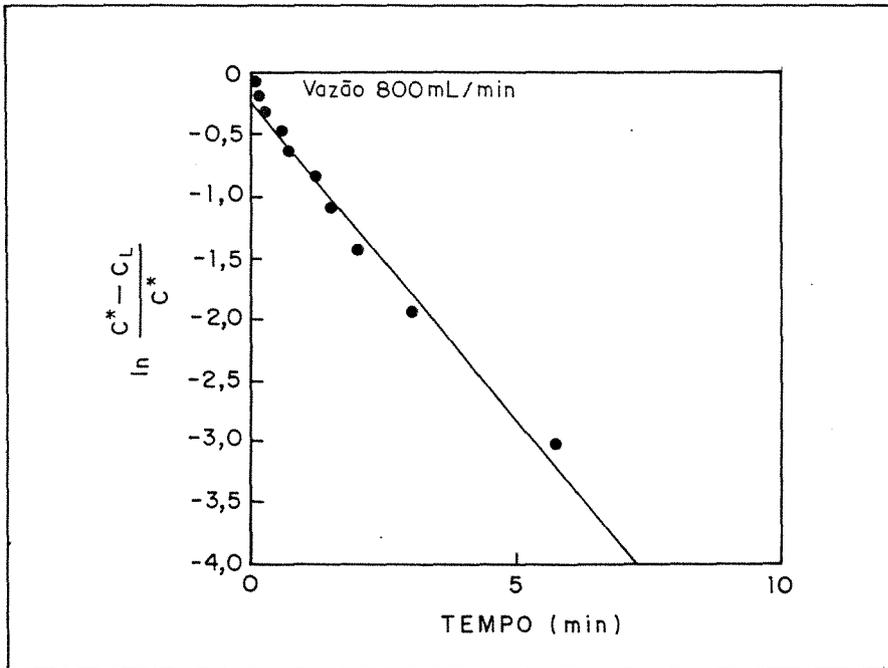


FIGURA 19) Cálculo de  $K_L a$  para sistemas livres em bioreator do tipo "air-lift" (modificado). Vazão de ar de 800 mL/min:  $K_L a = 0,52 \text{ min}^{-1}$  ou  $31,2 \text{ h}^{-1}$

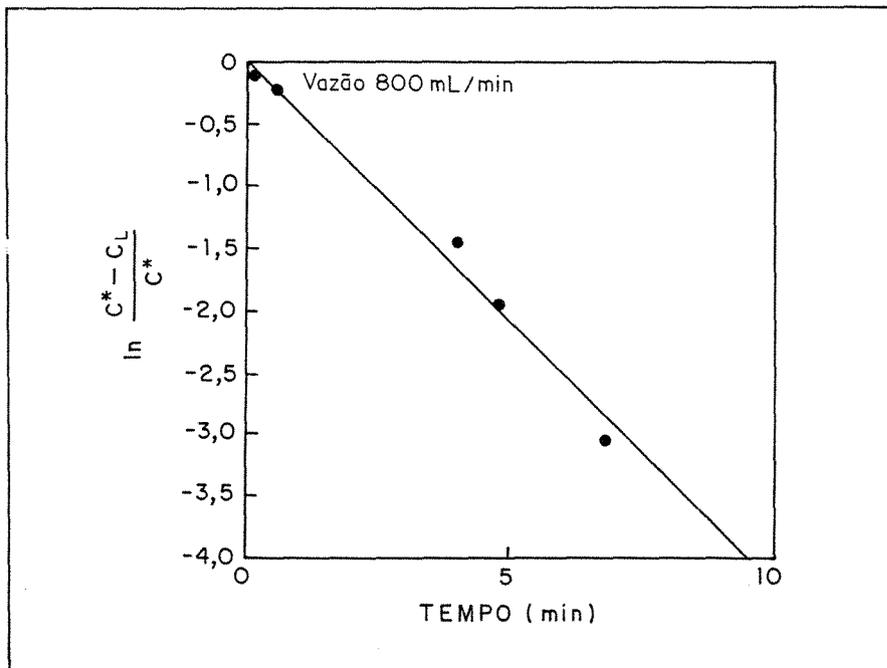


FIGURA 20) Cálculo de  $K_L a$  para sistemas imobilizados em bioreator do tipo "air-lift" (modificado). Vazão de ar de 800 mL/min:  $K_L a = 0,42 \text{ min}^{-1}$  ou  $25,2 \text{ h}^{-1}$

Nas TABELAS abaixo são apresentados os resultados de *L. edodes* em bioreator nos sistemas livre (TABELA 18) e imobilizado (TABELA 20), na mesma vazão (400 mL/min), respectivamente. Exceto pela descoloração, *L. edodes* é mais eficiente no sistema livre. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado em Erlenmeyer (TABELA 5), entretanto com relação à produção enzimática não ocorre o mesmo, já que em sistemas livres (TABELA 19) em bioreator há uma menor produção do que em sistemas imobilizados (TABELA 21). A menor redução de cor no primeiro caso poderia ser devido a uma menor concentração destas enzimas no meio, provavelmente inibidas por uma taxa de aeração inadequada para sistemas livres.

TABELA 18. Tratamento de efluente EOP em bioreator com micélio de *L. edodes* UEC-2021 livre,  $K_{1a} = 0,18 \text{ min}^{-1}$  ou  $10,8 \text{ h}^{-1}$ , Vazão: 400 mL/min.

TEMPO (h)	pH	COR (% Red.)	FENÓIS (% Red.)	CLOROLIGNINA (% Red.)	AOX (% Red.)
0	5.0	-	-	-	-
24	5.2	0.0	17.0	4.0	5.0
48	5.0	3.0	48.0	10.0	17.5
72	5.1	11.0	63.0	32.0	37.5

Massa micelial formada: 477 mg (peso seco)

Valores iniciais em  $t_0$ : Cor  $_{Ab=465nm}$  0.53, Clorolignina: 2.5 mg/L, Fenóis Totais: 6.0 mg/L, AOX: 40 mg/L.

Foi realizado um teste para determinar a toxicidade (MICROTOX) antes e após tratamento do efluente com *L. edodes* em sistema livre com vazão de 400 mL/min. O efluente não tratado apresentou EC50 (vide Material e Métodos, ítem 3.22 , pg. 24) de 83.5% após 5 min e 73.3% após 15 min de exposição, demonstrando ser este um efluente pouco tóxico. Com o tratamento fúngico a toxicidade foi eliminada totalmente, o EC50 foi superior a 100% tanto em 5 min quanto em 15 min. Este resultado significa que com o efluente puro, sem diluição, após o tratamento com o fungo, não foi determinado qualquer traço de toxicidade aguda.

Um estudo recente realizado por Ângelo e col. (1995) com *L. edodes* UEC-2021 no tratamento de um efluente TCF (totally chlorine free) de madeira dura analisa a toxicidade por MICROTOX

antes e após o tratamento biológico. A polpa de *Eucalyptus* sp. foi branqueada pelo processo TCF, utilizando xilanase (X) não comercial (Curotto e col. 1993) em combinação com, ozônio (Z) e Peróxido alcalino (P), estágio XZP. Foi analisada a biotoxicidade de cada estágio. Destes, o que apresentou maior toxicidade foi o da etapa P, com um EC50 de 5% antes do tratamento enzimático (xilanase) e de 11% após. *L. edodes* UEC-2021 foi capaz de descontaminar totalmente todos os três tipos de efluente, atingindo um EC50 de 100%, como observado no efluente EOP (TABELA 18). A partir destes dados e outros apresentados anteriormente (ex. TABELAS 8, 13, 15) pode-se concluir uma vez mais, que a cepa *L. edodes* UEC-2021 é extremamente eficiente e versátil na eliminação de compostos tóxicos. Essa conclusão corrobora com o que foi dito acerca da mesma no ítem 4.5 de RESULTADOS (página 48).

TABELA 19. Atividade enzimática durante o tratamento biológico do efluente EOP com *L. edodes* UEC-2021 livre em bioreator, vazão de 400 mL/min.

TEMPO (h)	Mn-P (U/L)	LiP (U/L)
0	0.00	0.0
24	0.38	0.0
48	2.40	0.0
72	0.55	0.0

As condições do ensaio são as mesmas descritas na TABELA 18.

TABELA 20. Tratamento de efluente EOP em bioreator com micélio imobilizado de *L. edodes* UEC-2021,  $K_{La} = 0,16 \text{ min}^{-1}$  ou  $9,6 \text{ h}^{-1}$ , vazão: 400 mL/min.

TEMPO (h)	pH	COR (% Red.)	FENÓIS (% Red.)	CLOROLIGNINA (% Red.)	AOX (% Red.)
0	5.0	-	-	-	-
24	6.5	30.0	23.7	4.0	5.7
48	5.9	40.0	25.0	10.3	17.3
72	6.0	36.0	48.0	7.0	6.0

Massa micelial formada: 500 mg (peso seco)

Valores iniciais em  $t_0$ : Cor<sub>Abs465nm</sub> 0.24, Clorolignina: 3.2 mg/L, Fenóis Totais: 6.0 mg/L, AOX: 52 mg/L.

TABELA 21. Atividade enzimática durante o tratamento biológico do efluente EOP com *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em bioreator, vazão de 400 mL/min.

TEMPO (h)	Mn-P (U/L)	LiP (U/L)
0	0.0	0.0
24	5.0	0.3
48	3.0	0.6
72	3.8	0.4

As condições do ensaio são as mesmas descritas na TABELA 20.

Havia a suposição de que aumentando-se a taxa de aeração ou o  $k_L a$ , a eficiência do sistema seria incrementada para *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em bioreator. Considerando a mesma vazão nos sistemas livres e imobilizados, o  $K_L a$  é menor nos sistemas imobilizados, provavelmente devido a resistência oferecida pelo nylon, o que dificulta a dispersão do oxigênio no líquido. Entretanto os resultados demonstraram que em sistema livre com aeração de 400 mL/min (TABELA 18), a taxa de descontaminação do efluente foi notavelmente mais eficiente. Quando se trabalha com sistemas biológicos deve-se considerar a influência de uma série de fatores que estão envolvidos na determinação de uma dada condição.

Aumentando-se a vazão para 600 mL/min no sistema livre (TABELA 22), ocorre também um aumento considerável da biomassa formada (1000 mg), provavelmente devido ao excesso de aeração. Foi observado um aumento da cor e dos fenóis totais. O aumento observado nos valores de clorolignina poderia ser atribuído ao fato de que muitos compostos coloridos absorvem nesta região de 280 nm. O aumento da cor no efluente indica que ocorreu formação de compostos cromofóricos. A formação de quinonas e produtos de polimerização do efluente EOP pelo fungo *Trametes versicolor*, foi estudada por Bergbauer e Eggert (1994). Este organismo não ataca a lignina do efluente EOP, mas promove um escurecimento acentuado (56%), devido a produção de grupos cromóforos.

TABELA 22. Tratamento de efluente EOP em bioreator com micélio de *L. edodes* UEC-2021 livre,  $K_{La} = 0,44 \text{ min}^{-1}$  ou  $26,4 \text{ h}^{-1}$ , vazão: 600 mL/min.

TEMPO (h)	pH	COR (% Red.)	FENÓIS (% Red.)	CLOROLIGNINA (% Redução)	AOX (% Red.)
0	5.0	-	-	-	-
24	5.4	-15.0	10.0	-18.0	13
48	5.6	3.0	11.5	-17.5	25
72	6.4	0.0	12.3	-17.6	25

Massa micelial formada: 1000 mg

Valores iniciais em  $t_0$ : Cor  $Abs_{465nm}$  0.20, Clorolignina: 3.2 mg/L, Fenóis Totais: 10.1 mg/L, AOX: 43 mg/L.

Não foram detectadas as atividades de MnP e LiP durante o tratamento biológico em sistema livre (TABELA 22), com vazão de 600 mL/min. Este pode ser um dos fatores responsáveis pela ineficiência do sistema. Em sistemas imobilizados (TABELA 24) observam-se melhores resultados. Neste caso provavelmente as enzimas são protegidas da alta taxa de aeração, pelo fato do fungo estar imobilizado em um suporte, fornecendo portanto maior estabilidade frente a qualquer modificação ou condição desfavorável. Entretanto foi obtida uma alta taxa de redução de AOX (58%) (TABELA 23), superior a todas as demais vazões. A remoção de compostos organoclorados do efluente é um dado muito importante num processo de descontaminação.

A capacidade de adsorção do micélio, determinada pela técnica de OX (vide Material e Métodos, ítem 3.13, pg. 21), foi avaliada em apenas 14%, logo de 58%, 25% aproximadamente seria devido a remoção por via não enzimática. Além das atividades de MnP e LiP, presentes em baixos níveis (TABELA 24), outras enzimas podem estar implicadas.

TABELA 23. Tratamento de efluente EOP em bioreator com micélio imobilizado de *L. edodes* UEC-2021,  $K_{La} = 0.22 \text{ min}^{-1}$  ou  $13.2 \text{ h}^{-1}$ , vazão: 600 mL/min.

TEMPO (h)	pH	COR (% Red.)	FENÓIS (% Red.)	CLOROLIGNINA (% Red.)	AOX (% Red.)
0	5.0	-	-	-	-
24	5.5	17.0	12.0	27.0	16.3
48	5.4	-9.0	24.0	25.0	58.0
72	5.5	-13.0	22.0	14.0	58.0

Massa micelial formada: 1.387 mg (peso seco)

Valores iniciais em  $t_0$ : Cor  $Abs_{465nm}$  0.14, Clorolignina: 3.2 mg/L, Fenóis Totais: 11.63 mg/L, AOX: 43 mg/L.

TABELA 24. Atividade enzimática durante o tratamento biológico do efluente EOP com *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em bioreator, vazão de 600 mL/min.

TEMPO (h)	Mn-P (U/L)	LiP (U/L)
0	0.0	0.0
24	0.4	0.0
48	0.4	0.0
72	0.0	0.7

As condições do ensaio são as mesmas descritas na TABELA 24.

A TABELA 25 mostra os resultados da descontaminação do efluente por *L. edodes* UEC-2021 em sistema livre, com uma vazão de 800 mL/min. Os resultados mostram que a eficiência do sistema se mantém até 48 h. Após este período ocorre um retrocesso de todos os parâmetros testados (cor, fenóis, clorolignina).

TABELA 25. Tratamento de efluente EOP em bioreator com micélio de *L. edodes* UEC-2021 livre,  $K_{t,a} = 0,52 \text{ min}^{-1}$  ou  $31,2 \text{ h}^{-1}$ , vazão: 800 mL/min.

TEMPO (h)	pH	COR (% Red.)	FENÓIS (% Red.)	CLOROLIGNINA (% Red.)	AOX (% Red.)
0	5.0	-	-	-	-
24	4.8	34.0	0.0	15.0	10.0
48	5.5	42.0	23.0	20.0	37.0
72	5.5	37.0	16.0	18.0	40.0

Massa micelial formada: 326 mg (peso seco). Valores iniciais em  $t_0$ : Cor  $_{\text{Abs}465\text{nm}}$  0.20, Clorolignina: 2.0 mg/L, Fenóis Totais: 6.2 mg/L, AOX: 40 mg/L.

Referente a determinação de MnP e LiP com vazão de 800 mL/min sistema livre (TABELA 25), foi detectada apenas em 48 h uma baixa atividade de MnP de 0.5 U/L, possivelmente devido a alta taxa de aeração, fato também observado com a vazão de 600 mL/min (TABELA 22).

Igualmente como foi visto com as demais vazões, há uma maior eficiência com micélio livre atingindo um 37% de redução de cor e 40% de redução de organoclorados determinados como AOX (TABELA 25).

TABELA 26. Tratamento de efluente EOP em bioreator com micélio imobilizado de *L. edodes* UEC-2021,  $K_{t,a} = \text{min}^{-1}$  ou  $\text{h}^{-1}$ , vazão: 800 mL/min.

TEMPO (h)	pH	COR (% Red.)	FENÓIS (% Red.)	CLOROLIGNINA (% Red.)	AOX (% Red.)
0	5.0	-	-	-	-
24	5.9	7.0	20.0	-24.0	10.9
48	5.7	23.0	20.3	-8.0	8.7
72	5.7	31.0	23.1	28.0	6.5

Massa micelial formada: 403 mg (peso seco). Valores iniciais em  $t_0$ : Cor  $_{\text{Abs}465\text{nm}}$  0.14, Clorolignina: mg/L, Fenóis Totais: 10.86 mg/L, AOX: 46 mg/L.

A TABELA 26 mostra o tratamento de efluentes EOP, com vazão de 800 mL/min no sistema

imobilizado. Como pode ser observado o processo não é eficiente com esta taxa de aeração, reduzindo em três dias apenas 31% da cor, 23.1% de fenóis totais, 28% de clorolignina e 6.5% de AOX. Quanto as enzimas presentes, foi detectada apenas MnP (TABELA 27).

TABELA 27. Atividade enzimática durante o tratamento biológico do efluente EOP com *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em bioreator, vazão de 800 mL/min.

TEMPO (h)	MnP (U/L)	LiP (U/L)
0	0.0	0.0
24	0.4	0.0
48	1.3	0.0
72	1.5	0.0

As condições do ensaio são as mesmas descritas na TABELA 27.

Como conclusão geral desta etapa pode-se dizer que as condições mais adequadas foram o cultivo de *L. edodes* UEC-2021 em bioreator a uma vazão de 400 mL/min em sistema livre, com um  $K_La$  de  $0.44 \text{ min}^{-1}$  e a vazão de 600 mL/min em sistema imobilizado, com um  $K_La$  de  $0.22 \text{ min}^{-1}$ . No primeiro caso, reduzindo totalmente a toxicidade aguda em três dias de tratamento, atingindo 63% de remoção de fenóis, 32% das cloroligninas e 37.5% de AOX. Entretanto, no segundo caso, com vazão de  $600 \text{ mL/min}^{-1}$ , houve uma redução muito significativa de AOX (58%), porém com relação aos demais parâmetros foi a vazão que menos resultou. Neste caso, uma possibilidade seria a utilização de um tratamento em conjunto destas duas vazões em um sistema contínuo. O menor  $K_La$  em sistema livre ( $0.18 \text{ min}^{-1}$ ) é semelhante ao  $K_La$  intermediário de ( $0.22 \text{ min}^{-1}$ ) na vazão de 600 mL/min. O suporte para a imobilização do fungo diminui a dispersão de ar no interior do bioreator. Uma menor vazão propicia uma melhor taxa de descontaminação por *L. edodes* UEC-2021 em bioreator.

## 5. CONCLUSÕES

O objetivo primordial deste trabalho foi a determinação dos parâmetros ótimos para o tratamento do efluente kraft E1 por *Lentinula edodes* em bioreator.

As conclusões parciais podem ser divididas em 4 ítems:

### A) Seleção das Melhores Condições para a Obtenção de Manganês peroxidase (MnP) e Lignina peroxidase (LiP) em Meio de Cultura de *L. edodes* e Definição do Papel das Mesmas no Tratamento de Efluentes:

Em meio de cultura, as enzimas estudadas apresentam maior atividade no 5º dia de cultivo. Entre as duas cepas de *L. edodes* (UEC-2019 e UEC-2021), *L. edodes* UEC-2021 mostrou-se mais eficiente na produção de LiP e MnP. Portanto decidiu-se otimizar as condições de produção enzimáticas apenas para a cepa UEC-2021, com o intuito de avaliar a ação das mesmas sobre o efluente.

Houve maior produção enzimática em meio líquido do que em meio sólido.

A redução ou excesso da fonte de carbono, aparentemente, não exerce influência sobre as atividades enzimáticas.

Observou-se uma resposta favorável na produção de LiP, em excesso de nitrogênio no meio. Ao contrário do que observou-se com MnP, onde a maior atividade deu-se em condições limites de nitrogênio no meio.

Tanto LiP como MnP apresentam maior atividade com o micélio livre.

Também foram estudados outros meios de cultivos (Tien e Kirk, 1988 e Leatham e Kirk, 1983), entretanto o meio mais adequado foi extrato de malte.

Uma vez otimizada as condições de LiP e MnP por *L. edodes* UEC-2021, foi avaliada a importância destas enzimas no tratamento de efluentes Kraft da indústria papelreira, em culturas

agitadas e estacionárias. Em ambas as culturas foi observado um pico de redução de cor e de fenóis totais no 3º dia de cultivo, bem como um pico da produção enzimática de LiP e MnP nas culturas agitadas.

Houve uma maior produção enzimática das culturas submetidas a agitação.

Há uma relação entre as atividades enzimáticas e a descoloração do efluente, visto que, a máxima descoloração coincide com o máximo de produção das enzimas, ambas enzimas são importantes, entretanto MnP demonstra claramente ser predominante sobre LiP. Logo, na segunda parte deste trabalho foram utilizadas as condições mais adequadas para a produção de MnP.

Aparentemente a redução de fenóis não se relaciona com as enzimas estudadas, pois a maior porcentagem de redução ocorreu quando as atividades encontravam-se a um nível baixo.

#### B) Efluente de Madeira Dura x Efluente de Madeira Mole

*L. edodes* UEC-2021 é uma cepa capaz de atuar de forma muito eficiente na descontaminação de ambos efluente (branqueamento de polpa obtida através de madeira dura e madeira mole).

#### C) *Lentinula edodes* Imobilizado em Nylon Modificado Quimicamente.

O tratamento químico do suporte não melhora significativamente as propriedades de imobilização do fungo. Assim sendo o tratamento prévio do suporte é desnecessário.

#### D) Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio ( $K_L a$ ) Mais Adequado para a Descontaminação Biológica do Efluente.

O  $K_L a$  representa um dado essencial no planejamento de bioreatores para processos aeróbios. Com uma vazão de 400 mL/min em sistema livre ocorre uma descontaminação mais eficiente do efluente do que com 600 mL/min e 800 mL/min. Entretanto, com vazão de 600 mL/min no sistema imobilizado ocorre uma redução de AOX (58%) superior a todas as demais vazões testadas. Logo, uma possibilidade seria a utilização de um sistema contínuo. O primeiro

bioreator operaria com uma vazão de 600 mL/min com *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em nylon e o segundo em sistema livre com uma vazão de 400 mL/min, objetivando desta forma obter o máximo de descontaminação com menos tempo.

Os resultados de *L. edodes* UEC-2021 imobilizado em nylon em bioreator, são menos significativos do que em sistemas livres.

## 6. PROJEÇÕES

Efluentes provenientes do branqueamento da polpa kraft podem ser descontaminados eficientemente pelo fungo de decomposição branca *Lentinula edodes* UEC-2021.

O tratamento realizado em bioreator "air-lift" (modificado) com o fungo livre a uma vazão de 400 mL/min, é interessante para a redução de fenóis totais e cloroligninas. Entretanto o mesmo fungo imobilizado com uma vazão de 600 mL/min, reduz eficientemente AOX.

Os próximos passos para aumentar a eficiência deste sistema seria a utilização destas duas vazões em um sistema contínuo e o aumento de escala. O estudo do tratamento de efluentes da indústria papelreira em um bioreator de maior porte, analisando todas as dificuldades implicadas neste sistema é imprescindível para uma futura aplicação industrial deste processo.

## 7. REFERÊNCIAS

- Ângelo, R., Esposito, E., Curotto, E., Sacon, V.M., Baeza, J., Freer, J. e Durán, N. (1995), Tappi J. (submetido)
- Anônimo. (1994). Pulp Paper Inter., 5, 80.
- Anônimo. (1993). O Papel, agosto, 42.
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (1989) 17 Ed. Amer. Publ. Health Ass. N°5550B p. 5.68, N.Y.
- Armenante, P.M., Kafkewitz, D., Lewandowski, G. e Kung, C-M.(1992). Environ. Progress, 11, 113.
- Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L. e Klibanov, A.M. (1984). Biotechnol. Bioeng., 26, 599.
- Bajpai, P. e Bajpai, P.K. (1992). Process Biochem., 27,319
- Bajpai, P. e Bajpai, P.K. (1994). J. Biotechnol., 33, 211.
- Barr, D.P. e Aust, S.D. (1994). Environ. Sci. Technol., 28, 79.
- Bergbauer, M. e Eggert, C. (1994). Can. J. Microbiol., 40, 192.
- Blenke, H. (1979). Adv. in Biochem. Eng., 13, 121.
- Bonnarme, P.; Delattre, M.; Drouet, H.; Crieu, G. e Asther, M.(1993). Biotechnol. Bioeng., 41, 440.
- Brunelo, G. e Concione, B.R.V. (1986). Em Borzani, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. Engenharia Bioquímica. S.P., Edgar Blucher.
- Camarotta, M.C. e Sant'Anna (1992). Environ. Technol., 13, 65.
- Cao, Y.S. e Alaerts, G.J. (1995). Wat. Res., 29, 107.
- Çeçen, F. (1994). Wat. Sci. Technol., 30, 183.
- Chang, H.M.; Halard, B.; Moo-Young, M. (1989). Biotechnol. Bioeng., 34, 1147.
- Chang, C-M., Lu, W.J., Own, K.S. e Hwang, S-H. (1994). Process Biochem., 29, 133.
- Chisti, Y. (1989). Chem. Eng., Feb., 41.

- Cocci, A., Landine, R., Brown, G.J., McCarthy, P.J. e McMullin, M.J. (1993). *Pulp Paper Can.*, 94, 35.
- Curotto, E., Aguirre, C., Concha, M., Nazal, A., Campos, V., Esposito, E., Angelo, R., Milagres, A.M.F. e Durán, N. (1993). *Biotechnol. Techn.* 7, 821.
- Daneault, C., Leduc, C. e Valade, L. (1994). *Tappi J.*, 77, 125.
- Dezotti, M. (1992). "Um Novo Processo para o Tratamento de Efluente Kraft: Biológico e Fotoquímico". Tese de Doutorado, Inst. Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P.
- Durán, N. e Esposito, E. (1993). *Quím. Ind.* 2, 17.
- Durán, N., Dezotti, M. e Rodriguez, J. (1991). *J. Photochem. Photobiol.* 62, 269.
- Eaton, D.; Chang, H.-M. e Kirk, T.K. (1980). *Tappi J.*, 63, 103.
- Eriksson, K.-E.L. (1992). Em Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp. (N. Durán and E. Esposito, Eds.), Campinas, Brazil, 3, 274.
- Esposito, E., Canhos, V. e Durán, N. (1991). *Biotechnol. Lett.* 13, 571.
- Esposito, E. (1992). "Processos Envolvidos no Tratamento Biológico de Efluentes: Utilização de um Bioreator de Leito Recheado". Tese de Mestrado. FEQ, Dept. Tecnol. Polimeros, UNICAMP, Campinas, S.P.
- Esposito, E., Durán, N., Freer, J., Baeza, J. e Inocentinni-Mei, L.H. (1993). Em Proc. CHEMPOR, Porto, Portugal, p. 201.
- Fengel, D. and Wegener, G. (1984). *Wood, Chemistry, Ultra-structure, Reactions.* Water de Gruyter Publ., N.Y.
- Ferrer, I., Dezotti, M. e Durán, N. (1991). *Biotechnol. Lett.*, 13, 577.
- Franta, J., Helmreich, B., Pribyl, M., Adamietz, E. e Wilderer, P.A. (1994). *Wat. Sci. Technol.* 30, 199.
- Forrester, I.T., Grabski, A.C., Burgess, R.R. e Leatham, G.F. (1988). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 157, 992.
- Forrester, I.T., Grabski, A.C., Mishra, C., Kelley, B.D., Strickland, W.N., Leatham, G.F. e Burgess, R.R. (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 359.

- Furusaki, S. e Seki, M. (1992). Em "Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 46. (A. Fiechter Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gold, M.H. e Alic, M. (1993). *Microbiol. Rev.*, 57, 605.
- Grant, R. (1993). *Pulp Paper Inter.*, setembro, 56.
- Guadalupe, M.F. (1985). "Tratamento Sequencial de Vinhoto em Reatores de Leito Submerso Anaeróbio e Aeróbio". Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Coope/UFRJ, R.J.
- Hall, E.R. e Randle, W.G. (1992). *Wat. Sci. Technol.*, 26, 387.
- Hernández, M., Rodriguez, J., Soliveri, J., Copa, J.L., Perez, M.I. e Arias, M. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3909.
- Hatakka, A.I., Lankinen, V.P., Lundell, T.K., Hietanen, P., Fabricius, B.-O. e Pellinen, J. (1990). Em *Cellulose Sources & Exploitation: Industrial Utilization, Biotechnology and Physico-Chemical Properties* (J.F. Kennedy, G.O. Phillips & P.A. Williams Eds.). Ellis Horwood Limited, Chichester, 18, 149.
- Hornby, W.E. e Goldstein, L. (1976). *Methods Enzymol.*, 46, 118.
- International Organization for Standardization (ISO) (1987). *Water Quality. Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC)*. ISO 8245.
- International Organization for Standardization (ISO) (1989). *Water Quality. Determination of the determination of adsorbable organic halogen (AOX)*. ISO 9562.
- Jaspers, C.J., Jimenez, G. e Penninckx, M.J. (1994). *J. Biotechnol.*, 37, 229.
- Johnson, J. (1995). *Environ. Sci. Technol.*, 29, 24.
- Kautsky, H. (1992). *AMBIO*, 21, 308.
- Kirk, T.K. (1993). Em *Cellulosics: Pulp, Fibre and Environmental Aspects*, (J.F. Kennedy; G.O. Phillips e P.A. Williams Eds.) Ellis Horwood Ser. in *Polymer Sci. Technol.*, 63, 421.
- Kirkpatrick, N.; Reid, I.D., Ziomek, E. e Paice, M.G. (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 105.
- Knudsen, L., Pedersen, J.A. e Munck, J. (1994). *Wat. Sci. Technol.*, 30, 173.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. e Gold, M.H. (1984). *FEBS Lett.*, 169, 247.

- Lankinen, V.P., Inkeroinen, M.M., Pellinen, J. e Hatakka, A.I. (1991). *Wat. Sci. Technol.*, 24, 189.
- Leatham, G.F. e Kirk, T.K. (1983). *FEMS Microbiol. Lett.*, 16, 65.
- Leatham, G.F. (1986). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24,51.
- Leonardsson, K. (1993). *AMBIO*, 22, 359.
- Lindert, M., Kochbeck, B., Pruss, J., Warnecke, H-J. e hempel, D.C. (1992). *Chem. Eng. Sci.*, 47, 2281.
- Linko, S. e Zhong, L.-C. (1987). *Biotechnol. Tech.*, 1, 251.
- Masten, S.J. e Davies, S.H.R. (1994). *Environ. Sci. Technol.*, 28, 180.
- Martín, C. e Manzanares, P. (1994). *Biores. Technol.*, 47, 209.
- McCubbin, N. (1994). *Pulp Paper Can.*, 95, 12.
- Merchunk, J.C., Ladwa, N., Cameron, A., Bulmer, M. e Pickett, A. (1994). *AIChE J.*, 40, 1105.
- Merchunk, J.C., Osemberg G., Siegel, M. e Shacham, M (1992). *Chem. Eng. Sci.*, 47, 3517.
- Michel, F.C., Dass, S.B., Grulke, E.A. e Reddy, C.A. (1991). *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2368.
- Miller, G.L. (1959). *Anal. Chem.* 31, 426.
- Mobius, C.H. e Cordes-Tolle, M. (1993). *Wat. Sci. Technol.*, 29, 273.
- Mobius, C.H. e Cordes-Tolle, M. (1994). *Wat. Sci. Technol.*, 30, 193.
- Momohara, I., Matsumoto, Y, Ishizu, A e Chang, H.-M. (1989). *Mokuzai Gakkaishi*, 35, 1110.
- Momohara, I., Matsumoto, Y e Ishizu, A (1990). *Mokuzai Gakkaishi*, 36, 588.
- Mounteer, A.H.; Colodette, J.L.; Gomide, J.L. e Campos, A.S. (1992). *O Papel*, 25.
- Odendahl, S. (1994). *Pulp Paper Can.*, 95, 30.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D, Archibald, F.S. e Jurasek, L. (1994). *Em Proc. Intl. Pulp Bleaching conf.*, p. 211.

- Peck, V. e Daley, R. (1994). *Environ. Sci. Technol.*, 28, 524.
- Perez, J. e Jeffries, T.W. (1990). *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1806.
- Prasad, D.Y. e Joyce, T.W. (1993). *Bioresource Technol.*, 44, 141.
- Presnell, T.L., Fukui, H., Joyce, T.W. e Chang, H-M. (1992). *Enzyme Microbiol. Technol.*, 14, 184.
- Ragauskas, A.J., Poll, K.M. e Cesternino, A.J. (1994). *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 492.
- Reis, L.J.C. e Sant'Anna, G.L. (1985). *Wat. Res.*, 19, 1341.
- Ribó, J.M. (1992). *Afinidad* 51, 437.
- Rintala, J.A. e Puhakka, J.A. (1994). *Bioresource Technol.*, 47, 1.
- Ronco, A.E. (1992). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 316.
- Rosemarin, A., Lehtinen, K-J., Notini, M. e Mattsson, J. (1994). *Environ. Pollution*, 85, 3.
- Rusten, B., Mattsson, E., Broch-Due, A. e Westrum, T. (1994). *Wat. Sci. Technol.*, 30, 161.
- Shuen, S.K. e Buswell, J.A. (1992). *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 12.
- Siegel, M., Merchuk, J.C. e Schugerl, K. (1986). *AIChE J.*, 32, 179.
- Siegel, M. e Merchuk, J.C. (1987). *Bioreactors and Biotransformations* (G.W. Moody and P.B. Baker, Eds.), Elsevier, London, p. 350.
- Siegel, M. e Merchuk, J.C. (1988). *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 301.
- Stanbury, P. e Whitaker, A. (1986). *Principles of Fermentation Technology*. Oxford, Pergamon Press, p. 169.
- Terrón, M.C., Manzanares. P., Martín, C., Galleti, G.C. e González, A.E. (1993). *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 7, 659.
- Tien, M. e Kirk, T.K. (1984). *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 81, 2280.
- Tien, M. e Kirk, T.K. (1988). *Methods Enzymol.* 161, 238.

- Vares, T., Lundell, T.K. e Hatakka, A. (1993). Em Proc. FEMS Symp. Lignin Biodegradation and Transformation Applications, (J.C. Duarte, M.C. Ferreira and P. Ander, Eds.), Forbitec Editions. Lisboa, Portugal, p. 65.
- Yang, J.L., Sacon, V.M., Law, S.E. e Eriksson, K-E.L. (1993). Tappi J., 76, 91.
- Yin, C.-F.; Joyce, T.W.; Chang, H.-M. (1989). J. Biotechnol., 10, 67.
- Yu, P. e Welander, T. (1994). Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 806.
- Zini, C.A. (1993). O Papel, agosto, 26.
- Wang, S-H., Fergusson, J.F. e McCarty, J.L. (1992). Holzforschung, 46, 219.
- Wang, X. e Ruckenstein, E. (1993). Biotechnol. Prog., 9, 661.

APÊNDICE I

APENDICE I.

As TABELAS 6 e 7 são referentes as TABELAS 6 e 7 da página 36.

TABELA 6. Efluente tratado por *L. edodes* (a)

Parâmetro	E1 Contrôle NNT	E1 Contrôle NT	<i>L. edodes</i> UEC-2021 NNT	<i>L. edodes</i> UEC-2021 NT	<i>L. edodes</i> UEC-2019 NNT	<i>L. edodes</i> UEC-2019 NT
COR Abs. <sub>465nm</sub>	0.52	0.53	0.09	0.06	0.29	0.33
FENÓIS (mg/L)	23.7	24.4	11:2	10.0	20.4	21.0
TOC (ppm)	902.0	855.0	358.0	562.0	639.0	678.0
Cl <sup>-</sup> (ppm)	518.0	450.0	518.0	450.0	570.0	476.0
pH	5.0	5.0	5.6	5.6	3.7	4.3

a) NNT: imobilização sobre nylon não tratado (quimicamente) e NT: nylon tratado (quimicamente). Em ambos casos seguiu-se um tratamento biológico por 5 dias, a 28°C, 150 rpm, sem iluminação.

TABELA 7. Efluente tratado por *L. edodes* imobilizado em Nylon previamente tratado com Glutaraldeído.

Parâmetros	E1 Contrôle	<i>L. edodes</i> UEC-2021	<i>L. edodes</i> UEC-2019
COR (Abs. <sub>465 nm</sub> )	0.15	0.09	0.12
FENÓIS (mg/L)	10.0	4.8	8.0
TOC (ppm)	1632.0	1586.0	1521.0
CLOROLIGNINA (mg/L)	2.4	1.9	2.3
pH	5.0	6.0	5.6

As condições são as mesmas da TABELA 6.

APÊNDICE II

ATIVIDADE DESENVOLVIDAS NO PERIODO DE DOUTORADO (JULHO 1992-JANEIRO 1995).

CURSOS EXTRACURRICULARES

1. "Organosolv and New Techniques Applied to Chemical Bleaching", Profs. Drs. Rudolph Patt and Oskar faix (Alemanha), Universidad de Concepción, 8-9 Outubro 1992, Chile.
2. II Curso de Tratamento Biológico de Resíduos, Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia, Prof. V. N.C. Martins, IPT-SP, Setembro 1993, Brazil.

CONGRESSOS :

1. J. Rodriguez, J. Baeza, J. Freer, E. Esposito, N. Durán and A. Faljoni-Alario, "Biotreatment of Kraft Pulp Bleaching Effluent", Second European Workshop on Lincellulosics and Pulp (EWLP), Grenoble, September 1992, França.
2. E. Esposito, L.H. Innocentini-Mei, V.P. Canhos and N. Durán, "Bio-transformation and Biodegradation of Chlorolignins in Kraft Effluent", First LABS, Latimamerican Biodeterioration Symposium, Campos do Jordao, S.P. Setembro 1992, Brasil.
3. E. Esposito, J. Baeza, J. Freer and N. Durán, "Biotreatment of Kraft Effluent from *Pinus radiata* D. Don". IV National Graduate Students Chemistry Congress, Universidad de Concepción, Concepción, Novembro 1992, Chile.
4. N. Durán, E. Esposito, J. Baeza, Juanita Freer and J. Rodriguez, "Integrated Photochemical and Biological Treatment of Pulp Bleaching Effluent", International Seminar on Clean Technologies and Advanced Treatment System for the Process Industry, Chemical Engineering Faculty, Universidad de Concepción, Concepción, Novembro 1992, Chile.
5. E. Esposito, J. Baeza, J. Freer, V.P. Canhos and N. Duran, "Combined Bacterial and Fungal Treatment of Kraft El Effluent from *Pinus radiata*". International Environmental Symposium. Pulp and Paper Technologies for a Cleaner World, Paris, Abril 1993, França.
6. J. Rodriguez, E. Esposito, J. Baeza, J. Freer, and N. Durán, "Fungal Treatment of Soft- and Hardwood Kraft Effluent", International Environmental Symposium Pulp and Paper Technologies for a Cleaner World, Paris, Abril 1993, França.
7. N. Durán, E. Esposito, J. Baeza, J. Freer, and L.H. Innocentini-Mei, "Immobilized Fungal Treatment on Kraft El Effluent from Softwood", International Environmental Symposium Pulp and Paper Technologies for a Cleaner World, Paris, Abril 1993, França.
8. E. Esposito, N. Durán, J. Freer, J. Baeza and L. H. Innocentini-Mei, "Performance of a Modified Packed-bed Reactor to Evaluate Immobilized *Lentinus edodes* Acting on Kraft Effluent", CHEMPOR-93 International Chemical Engineering Conference, Porto, Abril 1993, Portugal.
9. E. Esposito, J. Baeza, J. Freer, L. H. Innocentini-Mei and N. Durán, "Ligninolytic Enzymes and Beta-Glucosidase Production by *Lentinus edodes* and their Effect on Softwood Chlorolignins", XXII Annual Meeting of Brazilian Biochemical Society, Caxambu, MG, Maio 1993, Brasil.
10. E. Esposito, N. Duran and L. H. Innocentini-Mei, "Performance Evaluation of a Modified Fungal Packed-bed Bioreactor in the Industrial Effluent Treatment", 6th European Congress on Biotechnology, Firenze, Junho 1993, Itália.
11. R.S. Angelo, C. Aguirre, E. Curotto, E. Esposito and N. Durán,

- "Xylanase Production by *Aspergillus* sp. Isolated from Wood", XXII Annual Meeting of Brazilian Biochemical Society, Caxambu, MG, Maio 1993, Brasil.
12. J. Ruiz, S. Urizar, J. Baeza, J. Freer, E. Curotto, E. Esposito, N. de M. Erismann and N. Durán, "Deslignification of Organosolv Pulps and Kraft: Short Sequence of Treatment Xylanase/Hydrogen Peroxide", XVI Annual Meeting of Brazilian Chemical Society, Caxambu, MG, Maio 1993, Brasil.
  13. L. Sette, E. Esposito and N. Durán, "Production of Lignin and Manganese Peroxidases for *Lentinus edodes* in Solid and Liquid Medium", XVII Brazilian Congress of Microbiology, Santos, SP, Novembro 1993.
  14. N. Durán, E. Esposito, A.M.F. Milagres, D. Attili and E. Curotto. "Xylanases for Pulp and Paper Industry", III Latinoamerican Congress of Biotechnology, Santiago de Chile, Chile, Novembro 1993.
  15. M. Speranza, E. Esposito, L. Bettucci and N. Durán, "Degradation of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus globulus* Wood by *Punctularia artropurpurascens*", 9th. Inter. Biodeterioration and Biodegradation Symp.", Univ. Leeds, U.K., Setembro (1993).
  16. N. Durán, J. Baeza, J. Freer, J. Rodriguez, L.H. Innocentini-Mei, E. Esposito, R.L. Reyes and V.P. Canhos", Bioremediation: Photochemical, Fungal and Bacterial Treatments of Kraft Effluents", III Latinoamerican Congress of Biotechnology, Santiago de Chile, Chile, Novembro 1993.
  17. N. Durán, E. Esposito and L. Sette. "Production of Manganese Peroxidases and Lignin Peroxidases of *Lentinus edodes* and Its Role in Decontamination of Kraft Bleach Plant Effluent", 207th Natl. ACS Meeting, San Diego, USA, Março 13-18 (1994).
  18. N. Durán, A.M.F. Milagres, E. Esposito and M. Haun. "Xylanases Delignification on Traditional and Chlorine Free Bleaching Sequences in Hardwood Kraft Pulps", 207th Natl. ACS Meeting, San Diego, USA, Março 13-18 (1994).
  19. E. Esposito, C.A.M. Da Silva and N. Durán, "Mn-peroxidases and lignin peroxidases of *Lentinus edodes* and from *Phanerochaete chrysosporium* and their role in decontamination of Kraft bleach effluent". IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Maringá, PR, Dezembro 5-9, 1994, Brasil.
  20. R. Angelo, E. Esposito, A.M. Milagres, E. Curotto, C. Aguirre, A. R de Toledo and N. Durán, "Fungal extract with hemicellulases, phenol oxidases and esterases in *Eucalyptus grandis* pulp bleaching", IV Seminário Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, PR, Dezembro 5-9, 1994, Brasil.
  21. R. Angelo, A.M.F. Milagres, E. Esposito, E. Curotto, V.M. Sacon and N. Durán "Bleaching of *Eucalyptus* Kraft pulp with Asperzyme 2M1": Ozone-peroxide and oxygen-peroxide sequences", IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas", Maringá, PR, Dezembro 5-9, 1994, Brasil.
  22. M.F.S. Teixeira, L.P. de Oliveira, R.M. Pena, A. Machuca, E. Esposito and N. Durán, "Enzymes for pulp and paper industry: Production of xylanases, cellulases and lipases from Deuteromycetes" IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas", Maringá, PR, Dezembro 5-9, 1994, Brasil.
  23. A.L. Ferraz, A. Castro e Silva, E. Esposito, R. E. Bruns and N. Durán, "Utilization of DRIFT, SEM, as tool of wood biodegradation monitoring of *Eucalyptus grandis*", IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Maringá, PR, Dezembro 5-9, 1994, Brasil.
  24. E. Esposito and L. Sette, "Induction of Ligninolytic System of *Lentinula edodes* and its Role in Decontamination of Kraft El Effluent", XXIII, Reunião Anual da SBBq, Caxambú, MG., Maio 14-17, 1994, Brasil.
  25. N. Durán, M.F.S. Teixeira, L.P. De Oliveira, R.M.L. Pena,

- A. Machuca e E. Esposito, "Production of xylanases, amylases, proteases, cellulases, phenoloxidases and lipases from Hyphomycetes", XXIII, Reunião Anual da SBBq, Caxambú, M.G., Maio 14-17, 1994, Brasil.
26. N. Durán and E. Esposito, "Microbial Degradation of Chlorophenols in Contaminated Soil: Difficulties and Progress, 17 Reunião Anual da SBQ, Caxambú, MG, Maio 24-27, 1994, Brasil.
27. N. Durán, E. Esposito and L.J. Reyes, "Photo-and biodegradation of organochloride derivatives in Kraft Effluent", 17 reunião Anual SBQ, Caxambú, M.G., Maio 24-27, 1994, Brasil.

#### SEMINARIOS :

1. E. Esposito, "Tratamento Biológico de Efluentes", Laboratório de Recursos Renováveis, Universidade de Concepción, Concepción, Setembro 1992, Chile.
2. E. Esposito, Mini-Simpósio. "Tratamento de Efluentes Utilizando um Bioreator de Leito Recheado", Aplicação Biotecnológica na Indústria de Polpa e Papel, Orientado a Proteção Ambiental", Departamento de Engenharia Química, Universidad de la Frontera, Temuco, Setembro 1992, Chile.
3. N. Durán, E. Esposito, J. Baeza, J. Freer and Jaime Rodriguez, "Fungal Treatment of Kraft Effluent", Conference, I-Workshop of Environmental Biotechnology, Departamento de Engenharia Química, Universidad de Concepción, Concepción, Outubro 1992, Chile.
4. E. Esposito, "Microorganismos Aplicados ao Tratamento de Efluentes", Faculdade de Ciências Biológicas, Universidad de Talca, Talca, Novembro 1992, Chile.
5. E. Esposito, "Bioremediação de Efluentes na Indústria de Polpa e Papel", Faculdade de Ciências, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Novembro 1992, Chile.
6. E. Esposito and N. Durán, "Biodegradação de Madeira e Polpa", Laboratório de Bioquímica (Dr. R. Vicuna), Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Novembro 1992, Chile.
7. E. Esposito and N. Durán, "Produção de Xilanases por Fungos", Laboratório de Macromoléculas (Dr. I. Ferrer), Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Novembro 1992, Chile.
8. E. Esposito, "Desenvolvimento de Novas Técnicas na Indústria de Polpa e Papel para Redução do Impacto Ambiental", Semana de Tecnologia Industrial, Manaus, AM., (UTAM), Novembro 21-25, 1993, Brasil.

#### PUBLICAÇÕES :

1. N. Durán and E. Esposito (Editors). Proceeding of the Second Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood components (FAPESP Editorial), Campinas, September 1991, 415 pp. (1992).
2. J. Rodriguez, J. Baeza, J. Freer, E. Esposito and N. Durán, "Biotreatment of Kraft Pulp Bleached Effluents", Proc. Second European Workshop on Lignocellulosics and Pulps (EWLP), Oxidation of Lignocellulosic Materials, Grenoble, France, 221-222 (1992).
3. E. Esposito, V.P. Canhos and N. Durán, "Photochemical Pre-treatment of Kraft Effluent: Biobleaching with *Lentivirus edodes*", Proc. 2nd Braz. Chem. Lignin and Other Wood Comp., Campinas, (N. Durán and E. Esposito Eds.) 3, 356-361 (1992).
4. I. Ferrer, E. Esposito and N. Duran. "Lignin Peroxidase from *Chrysonilia sitophila*: Heat-Denaturation Kinetics and pH Stability". Enzyme Microb. Technol., 14, 402-406 (1992).

5. E. Esposito, "Related Processes with Biological Effluent Treatment: Application of a Packed-bed Reactor", Master Thesis, Chemical Engineering Faculty, Universidade Estadual de Campinas, 129 pp. (1992).
6. S.M.D S. Carvalho, M.F. Teixeira, E. Esposito, A. Machuca, A. Ferraz and N. Durán, "Amazonian Lignocellulosic Materials-I: Fungal Screening from decayed Laurel and Cedar Trees", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 37, 33-41 (1992).
7. N. Durán, E. Esposito and V.P. Canhos, "Kraft Mill Effluent: Biological Treatment", In *Cellulosics: Pulp, Fibre and Environmental Aspects* (Ellis Horwood Series in Polymer Science and Technology) ( J.F. Kennedy, G.O. Phillips and P.A. Willians Eds), 493-498 (1993).
8. A. Castro e Silva, E. Esposito, A. Ferraz and N. Duran, "Decay of *Parkia oppositifolia* in Amazonia by *Pycnoporus sanguineus* and Potential use for Effluent Decolorization" *Holzforchung*, 47, 361-368 (1993).
9. N. Durán y E. Esposito, "Nuevas Tecnicas en la Reducción del Impacto Ambiental en la Indústria de Pulpa y Papel", *Quimica & Indústria* (Chile), (2) 17-31 (1993).
10. E. Esposito, L. H. Innocentini-Mei, A. Ferraz, V.P. Canhos and N. Duran, "Phenoloxidases and Hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* UEC-2050 strain), Its Applications". *J. Biotechnol.* 29, 219-228 (1993).
11. E. Curotto, C. Aguirre, M. Concha, A. Nazal, V. campos, E. Esposito, R. Angelo, A.M.F. Milagres and N. Durán, "New methodology for Fungal Screening: Xylanolytic Enzymes", *Biotechnol. Tech.* 7, 821-822 (1993).
12. E. Esposito, N. Durán, J. Freer, J. Baeza and L. H. Innocentini-Mei, "Perfomance of a Modified Packed Bed Reactor to Evaluate Immobilized *Lentinus edodes* Acting on Kraft Effluent", *Em Proc. Inter. Chem. Engineering Conf. CHEMPOR-93. Porto, Portugal*, 201-207 (1993).
13. E. Esposito, J. Baeza, J. Freer, V.P. Canhos and N. Duran, "Combined Bacterial and Fungal Treatment of Kraft El Effluent from *Pinus radiata*", *Em Proc. Intern. Environ. Symp. Pulp Paper Technol. Cleaner World, Paris, France*, 185-189 (1993).
14. E. Esposito, "Seleção de Fungos produtores de Xilanase: Aplicação na Indústria de Polpa e Papel", *Em Proc. ENZITEC'93, 1 Seminário Nacional de Tecnologia de Enzimas.*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 30-32 (1993).
15. N. Durán, J. Rodriguez, V. Campos, A. Ferraz, J. L. Reyes, J. Amaya-Farfán, E. Esposito, F. Adao, J. Baeza, J. Freer and S. Urizar, "Single cell Protein Quality Produced from Lignocellulosic Materials by the Ascomycete *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441 strain)", *Rev. Microbiol.*, 25, 31-36(1994).
16. E. Esposito, M. Speranza, L.H. Innocentini-Mei and N. Duran, "Pulp and Paper Industrial Effluents: Decontamination by Fungi Immobilized on Modified Nylon Foam", *In Proc. 3th. Symp. Chem. Lignins Wood Comp., Belo Horizonte, M.G., Brazil.* 4, 19 (1994).
17. D. Attili, A.P. Macedo and E. Esposito, "Screening of *Aspergillus* From Juréia Ecological Reserve: Enzymes From Solid Medium", *In Proc. 3th. Symp. Chem. Lignins Wood Comp. Belo Horizonte, M.G., Brazil.* 4, 22 (1994).
18. J. Ruiz, J. Baeza, J. Freer, E. Curotto, E. Esposito and N. Durán, "Asperzyme 2M1: Chlorine Free Bleaching Process on Pinus Pulp", *In Proc. 3th. Symp. Chem. Lignins Wood Comp. Belo Horizonte, M.G., Brazil.* 4, 5 (1994).
19. J. Rodriguez, E. Esposito, E. Esposito, J. Baeza, J. Freer and N. Durán, "Decolorization Mechanism of Kraft Pulp Bleaching Mill Effluents from Soft and Hardwoods", *In Proc. 3th. Symp. Chem. Lignins Wood Comp., Belo Horizonte, M.G., Brazil.* 4, 21 (1994).
20. E. Curotto, C. Aguirre, R. Angelo, E. Esposito and N. Duran, "Characterization and Production of Extracellular Xylanases From *Aspergillus* sp. 2M1 Strain", *In Proc. 3th. Symp. Chem. Lignins Wood*

Comp., Belo Horizonte, M.G., Brazil. 4, 7 (1994).

21. N. Durán, E. Curotto, E. Esposito, C. Aguirre and R. Angelo "Aspergillus sp. 2M1 xylanases: production, characterization and application in pulp and paper industry", In Advances in Bioprocess Engineering, (E. Galindo and O.T. Ramirez, Eds.) Kluwer Acad. Publi. Netherland, 489-494 (1994).
22. N. Durán, E. Esposito, L. H. Innocentini Mei and V. Canhos. "A New Alternative Process for Kraft Effluent Treatment: A Combination of Photochemical and Biological Method", Biodegradation, 5, 13-19(1994).
23. N. Durán, A.M.F. Milagres, E. Esposito, E. Curotto, M.F.S. Teixeira, S.M.S. Carvalho and O.C.C. Fernandez, "Amazonian Lignocellulosic Materials - V: Screening of Xylanolytic Fungi", App. Biochem. Biotechnol. 53, 000(1995).
24. N. Durán, A.M.F. Milagres, E. Esposito and M. Haun, "Xylanases delignification on traditional and chlorine free bleaching sequence in hardwood kraft pulp", In Advances in Bioconversion of Lignocellulosics (ACS Ser.) in press (1995).
25. N. Durán and E. Esposito, "Ligninas y Cloroligninas: Tecnicas Biotecnologicas para la Reduccion del Impacto Ambiental de Efluentes" In CYTED-Lignins Transformation into High Aggregated Values Products (A.A. Curvelo, Ed.) Spain-Brazil, in press (1995).
26. A. Ferraz, E. Esposito, A. Castro e Silva and N. Durán, "Decay of **Eucalyptus grandis** by xylophagous fungi foolowed by DRIFT-IR, SEM and chemical analyses", Holzforschung, submitted (1995).
27. R. Angelo, C. Aguirre, E. Curotto, E. Esposito, A.M.F. Milagres and N. Durán, "Stability and chemical modification of xylanase from Aspergillus sp.(2M1 strain)", Biotechnol. Appl. Biochem. submitted (1995).
28. J. Rodriguez, A. Ferraz, R.F.P. Nogueira, I. Ferrer, E. Esposito and N. Durán, "Lignin biodegradation by Ascomycetes Chrysonilia sitophila", Appl. Biochem. Biotechnol. submitted (1995).
29. N. Durán, J.L. Reyes, J. Amaya-Farfán, E. Esposito, F. Adao, J. Baeza, J. Freer, S. Urizar, J. Rodriguez, V. Campos and A. Ferraz, "Lignocellulosic Materials: A Binational Project in Single Cell Protein Production", Bol. Micol. (Chile) submitted (1995).

APÊNDICE III

NESTE APÊNDICE ESTÃO ANEXADAS AS PUBLICAÇÕES DE MINHA AUTORIA MAIS RELEVANTES CITADAS NOS SEGUINTE ÍTENS: INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS E DISCUSSÃO.

**SCREENING OF LIGNIN-DEGRADING FUNGI FOR REMOVAL OF COLOR FROM KRAFT MILL WASTEWATER WITH NO ADDITIONAL EXTRA CARBON-SOURCE.**

Elisa Esposito\*, Vanderlei P. Canhos# and Nelson Durán \*\*

Instituto de Química, Biological Chemistry Laboratory, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6154, Campinas, CEP 13081, S.P., Brazil\* and Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas, S.P. Brazil#.

**ABSTRACT**

A screening of 51 ligninolytic strains of fungi to examine their ability to decolorized phenolic industrial effluent was carried out. The selection showed that *Lentinus edodes* (UEC-2019) strain removed 73% of colour in 5 days, without any additional carbon sources. Under these conditions, *L. edodes* was more efficient than the known *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767) strain (e.g. COD reductions were 60% and 26%, respectively).

**INTRODUCTION**

Bleaching Kraft mills usually discharge large volumes of brown coloured effluents as a result of the different processes applied in wood and pulp. Processing the brown color of the effluents originates mainly from lignin degradation products which are mostly chlorinated.

Several others white-rot fungi besides *Phanerochaete chrysosporium* can readily decolorize Kraft bleach lignins (Momohara et al., 1953). Attempts have been made to remove the color of effluent from a Kraft mill by *P. chrysosporium* (Chang et al., 1987), by *Tricoporia* sp (Royer et al., 1987), by *Aspergillus* sp (Dutta et al., 1985) and by *Coriolus versicolor* (Archibald et al., 1990). A mycelial color removal process (MyCor) for decolorizing E1 bleach plant effluent have been published (Yin et al., 1989a; Yin et al., 1989b). The potential use of white-rot fungi for biopulping, biobleaching and treatment of pulp mill waste effluents has been reviewed (Durán et al., 1990).

To obtain the best possible species for use in new biotechnological processes, numerous species of wood-rotting fungi have been screened for rapid growth and superior rates of lignin degradation (Kimura et al., 1990; Paice et al., 1989). Three papers dealt with screening of fungi for effluent treatment. One reported the screening of fifteen strains of white-rot fungi for their ability to decolorize combined bleached Kraft effluent in the presence of 2% of glucose. *Coriolous versicolor* in liquid culture removed over 80% of the color of the effluent in six days in the presence of 0.5% sucrose (Paice et al., 1989), no COD or molecular weight changed were reported. Another one evaluated *Polyporus* sp, *Coriolus* sp and *Polyporus sanguineous* in the presence of 1% of glucose for 9 days (Lambais, 1988). *Coriolus* sp was the species that showed the greatest efficiency for biodecolorization (85%) and COD reduction of 80% was observed. In the third study, *Coriolus versicolor*, *Poria placenta*, *Gloeophillum trabeum*, *Ramaria* sp. and several unidentified ligninolytic basidiomycetes fungi (Galeano et al., 1990) was evaluated. *Ramaria* sp. showed the highest potential with a 90% color removed under air and C-limited medium after 8 days, but slight depolymerization was observed. No information on COD change was reported.

In the present study, we devised a rapid and efficient method to assay ligninolytic activity and to evaluate decolorization capacity of Kraft effluent, without any extra carbon sources. By this method we isolated some fungi with higher capacities and selectivities than those reported to date.

---

\*\*To whom correspondence should be addressed

## MATERIAL AND METHODS

**STRAINS.** The fungal strains were obtained from UNICAMP Culture Collection, ICN Culture Collection (Instituto de Ciências Naturais, UFRGS, Porto Alegre, R.S, Br.) and from CCT (Coleção de Culturas Tropical, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", Campinas, S.P, Br.) (TABLE I and TABLE II). Stock cultures were maintained in malt agar medium at 5°C.

**CULTURE CONDITIONS.** Cultures of strains were grown in agitated conditions for ligninase and phenoloxidase production, using malt extract as carbon source, in 125 Erlenmeyer flasks at 25°C. A culture medium (50 ml) malt liquid at pH 5.0 was used.

**ENZYME ASSAYS.** Enzyme activities were measured directly in the samples of growth medium after 5 days. Ligninase activity (Durán et al., 1987a) was measured by UV spectroscopy of veratrylaldehyde formed by oxidation of veratryl alcohol (expressed as U/L).

**PHENOLOXIDASE ACTIVITY.** Laccase and peroxidase activities (U/L) were measured using syringaldazine as a substrate in the absence and presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectively (Szkwarz et al, 1989).

**EFFLUENT.** The effluent (RIGESA S.C.) used in this study was the first alkaline extraction stage (pH 9.5 - 13.0) from a bleached kraft pulp (Eucalyptus) and paper mill.

**MEASUREMENT OF COLOR IN TREATED KRAFT EFFLUENT.** Color removal by fungal strains was measured in duplicate in 25 ml of effluent at 25°C and 150 rpm. The effluent was diluted to give an initial absorbance of 0.30. The effluent was adjusted to pH 5.0 for standard fungal growth around 50 mg of mycelium was added. After treatment, effluent solutions were filtrated with millipore filters to remove insoluble polyphenolics and mycelial mass and than adjusted to pH 7.6. The colour of effluent was measured spectrophotometrically at 465 nm. (CPA standard methods, 1975).

**SUGAR DETERMINATION.** The carbohydrate determination of kraft effluent was carried out by the DNS procedure (Miller, 1959).

**COD DETERMINATION.** The Chemical Oxygen Demand (COD) was determined by Standard Methods (APHA, 1985).

## RESULTS AND DISCUSSION

Fifty one strains of fungi were screened and the basidiomycete *P.chryso sporium* BKM-F-1767 and ascomycete *Chrysonilia sitophila* TFB 27441 (Durán et al., 1987a; Durán et al., 1987b, Durán, 1989) were used as controls (TABLE I and TABLE II). Among the 25 species which decolorized the effluent efficiently in five days (TABLE I, Fig. 1) were *Lentinus edodes* (UEC-2019), *L.edodes* (UEC-2021), *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2015), *Xylaria sp.* (ICN-155) and *Phaeocoriolellus trabeus* (UEC-2013). No additional carbon source was added to the E1 effluent which contains 0.06% carbohydrates. The remaining 25 strains increased the effluent color (Fig. 2) The decolorization capacity did not present any apparent correlation with the lignin peroxidase production capacity. However, when the lignin peroxidase/phenoloxidase ratio of their activities increased, a high decolorization was observed. In other words, when laccase decreases, the fungi decolorization and oxidation capacities increase. This observation is in contradiction with a recent report in which laccase appeared as an efficient decolorizing factor (Davis and Burns, 1990). This is presumable due to the effluent studied which was rich in phenolic groups.

In a selective study, *L. edodes* (UEC-2019 strain) was further analyzed. This mycelium after 120 h exhibited 11 U/L of laccase, 0.5 U/L of peroxidase and 19.3 U/L of lignin

peroxidase, 3.5 U/L of Mn-peroxidase, 14 U/L of  $\beta$ -glucosidase and a 73% of decolorization with 60% of COD reduction. Only 13% of the decolorization was due to mycelial adsorption. With *P. chrysosporium* (BKM-1767 strain) under the same conditions, 0.41 U/L of laccase, 0.01 U/L of peroxidase, 7.8 U/L of lignin peroxidase, 12 U/L of Mn-peroxidase, 5.5 U/L of  $\beta$ -glucosidase and a 52% decolorization and with COD reduction of 26% were observed. *C. sitophila* exhibited no phenoloxidase and 7.8 U/L of lignin peroxidase, 7.7 U/L of Mn-peroxidase, 7.0 U/L of  $\beta$ -glucosidase and a 41% of either decolorization or COD reduction. The enzyme expression in the growth culture medium (TABLE I) was different than in the effluent (similar in Archibald et al., 1990). In general, lignin-peroxidase activity decrease while laccase and peroxidase activity increased in both cases.

From our observations it seems that  $\beta$ -glucosidase exert an important role in the effluent decolorization. The most efficient strain for decolorization, *L. edodes* (UEC-2019), exhibited a high  $\beta$ -glucosidase activity, besides those of lignin peroxidase, peroxidase and Mn-peroxidase; meanwhile *P. trabeus* (UEC-2023) although exhibited high Mn-peroxidase (280 U/L) and high lignin peroxidase (273 U/L) was extremely inefficient for decolorization, probably due the complete absence of  $\beta$ -glucosidase activity in the effluent.

Although for *P. chrysosporium* as well as *L. edodes* it is known that the ligninolytic activities are developed after the fungus ceases vegetative growth (Leatham, 1986) and require both O<sub>2</sub> and an exogenous carbon source such as glucose, in our study we have shown that both white-rot basidiomycetes and their enzymes have potential applications in decolorization of the kraft effluent, without any extra oxygenation or carbon source.

Previous results from others studies, mainly with carbon source variation, emphasize the importance of executing the biological treatment under strictly defined conditions. It was clear that glucose, among the various carbon source enhance the decolorization process (Archibald et al., 1990). This was generally, attributed to the fungus growth conditions. However, holocellulose or xylan were more effective in lignin-model degradation at low sugar concentration (Prasad and Joyce, 1991). Recently, it was showed that this degradation depends on the transglucosylation activity of glucosidase secreted by the majority of wood-rot fungi (Kondo et al., 1989). For instances, glucosidated DHP-Lignin can be degraded by peroxidase readily, suggesting that there must exist a system where the formation of glucoside prevents polymerization and accelerates efficient degradation reactions (Kondo et al., 1990).

Probably this is one of the reason for the efficient decolorization by the fungi with the low reducing carbohydrate concentration (0.06%) present in our effluent and for the presence of a relative high  $\beta$ -glucosidase activity. These results are in agreement with the observations of Yin et al. (1989) that a critical amount (between 0.1 a 0.2%) of glucose was needed to maintain the decolorization activity, but only a very low consumption of glucose was observed (around 0.06%). The majority of the glucose remained unmetabolized in the effluent (Yin et al., 1989). This was recently confirmed by Prasad and Joyce (1991) who found that 0.05% glucose was the most efficient for decolorization. Probably the efficiency of fungi in decolorization is not only due to lignin-peroxidase activity, but also to the  $\beta$ -glucosidase production capacity. This new aspect is currently under study.

In summary, the rapid screening of 51 strains led us to select five fungi with good decolorizing quality in a five days process with effluents which contain very low carbohydrate content.

TABLE I. Enzyme assay (U/L) in liquid culture, after 120 hours.

Strains	Legend	Lac	Perox.	Lign.	%Decol.
<i>Xylaria</i> sp. ICN-207 (Ascomycete)	1	32.00	0.00	8.5	0.0
Basidiomycete unknown UEC-2001	2	2.00	0.00	0.0	1.0
<i>Coriolus</i> sp. UEC-2002	3	0.10	0.00	37.0	2.0
<i>Pleurotus ostreatus</i> UEC-2003	4	6.00	2.50	0.0	3.0
<i>Cordiopsis rigida</i> UEC-2004	5	8.20	3.00	3.0	3.0
Corticaceae UEC-2005	6	3.30	0.00	0.0	10.0
<i>P. chrysosporium</i> BKM-F-1767	7	0.00	0.00	49.0	51.0
<i>Trametes</i> sp. UEC-2006	8	9.30	0.00	1.0	30.0
<i>Cordiopsis rigida</i> UEC-2007	9	3.00	0.00	0.0	30.0
<i>Trametes rigida</i> UEC-2008	10	4.20	0.50	0.0	25.0
<i>Coriolallus sepium</i> UEC-2009	11	3.00	1.00	38.0	41.0
<i>Cordiopsis rigida</i> UEC-2010	12	0.00	0.00	6.0	28.0
Basidiomycete unknow UEC-2011	13	2.00	3.00	0.0	45.0
<i>Xylaria</i> sp. UEC-1002 (Ascomycete)	14	0.80	1.20	8.0	45.0
<i>Pycnoporus sanguineus</i> UEC-2012	15	8.00	0.00	23.0	48.0
<i>Phaeocoriolallus trabeus</i> UEC-2013	16	0.00	0.00	19.0	18.0
<i>P. chrysosporium</i> 446-ME	17	0.02	2.00	50.0	50.0
<i>Xylaria</i> sp. ICN-155 (Ascomycete)	18	0.80	1.20	8.0	50.0
<i>Pycnoporus sanguineus</i> UEC-2015	19	3.00	2.00	15.2	50.0
<i>Cyathus pallidus</i> UEC-2016	20	0.40	1.60	0.0	34.0
<i>Cyathus striatus</i> UEC-2017	21	0.70	0.50	0.0	30.0
<i>Lentinus edodes</i> UEC-2019	22	0.00	0.00	12.7	73.0
<i>Cyathus stercoreus</i> UEC-2020	23	0.50	0.88	7.0	15.0
<i>Lentinus edodes</i> UEC-2021	24	0.13	0.05	16.0	42.0
<i>Polyporus</i> sp. UEC-2022	25	23.70	6.00	15.0	25.0
<i>Phaeocoriolallus trabeus</i> UEC-2023	26	0.00	0.00	273.0	24.0
<i>C. sitophila</i> TFB 27441 (Ascomycete)	27	0.00	0.00	13.0	41.0

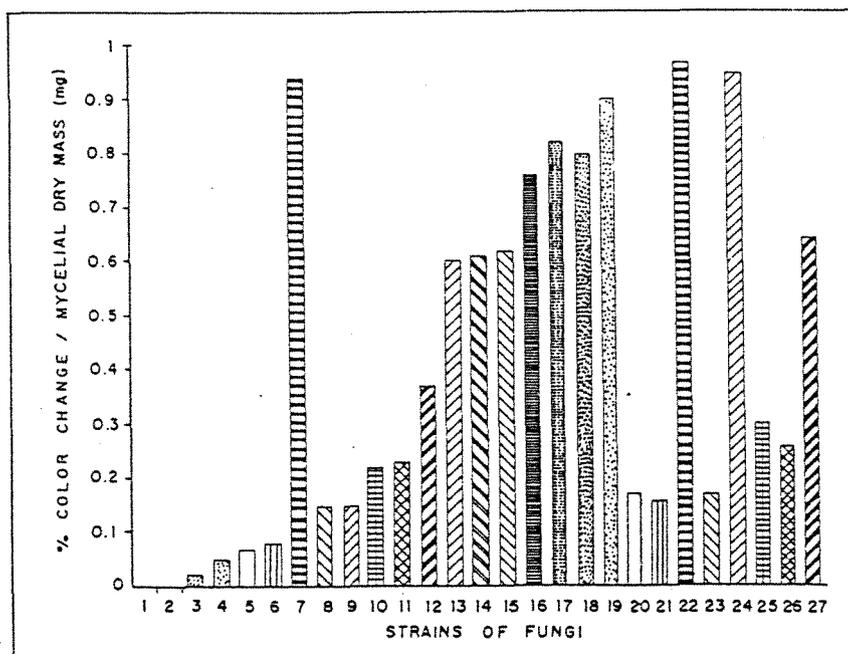


Fig.1. The fungal strains (TABLE I) and their decolorization efficiency (ratio: % colour change / mycelial dry mass (mg)) of the treated effluent , after 120 hours

TABLE II. Enzyme assay (U/L) in liquid culture after 120 hours.

Strains	Legend	Lac.	Perox.	Lign.
<i>Stereum sp.</i> UEC-2024	1	7.0	1.0	42.0
Polyporaceae UEC-2025	2	13.0	5.0	17.0
Basidiomycete unknown UEC-2026	3	20.0	0.0	11.0
Polyporaceae UEC-2027	4	6.4	0.0	0.0
<i>Fibroporia gossypia</i> UEC-2027	5	0.0	0.0	13.0
<i>Pycnoporus sanguineus</i> UEC-2028	6	7.2	2.0	0.0
Polyporaceae UEC-2029	7	1.0	0.0	0.0
<i>Panus aida</i> UEC-2030	8	5.0	2.0	45.0
<i>Rigidoporus lineatus</i> UEC-2031	9	33.0	2.0	0.2
<i>Pleurotus florida</i> UEC-2032	10	4.0	9.0	0.0
<i>Pleurotus sajor-caju</i> UEC-2033	11	7.0	2.0	25.0
<i>Hohenbuehlia grisea</i> UEC-2034	12	12.0	0.0	35.0
<i>Phaeocoriolellus trabeus</i> UEC-2035	13	0.0	0.0	25.0
<i>Trametes sp.</i> UEC-2036	14	0.6	0.0	0.0
Basidiomycete unknown UEC-2037	15	48.0	0.0	30.0
Polyporaceae UEC-2038	16	48.0	0.0	11.0
<i>Panus crinitus</i> UEC-2039	17	4.0	0.0	30.0
Ganodermataceae UEC-2040	18	0.3	0.0	0.0
<i>Cyathus striatus</i> UEC-2041	19	3.0	1.0	0.0
Basidiomycete unknown UEC-2042	20	5.0	0.4	0.0
<i>Stereum sanguinolentum</i> UEC-2043	21	6.0	2.0	34.0
<i>Trametes villosus</i> UEC-2044	22	4.0	1.0	10.0
<i>Phaeocoriolellus trabeus</i> UEC-2045	23	0.0	0.0	20.0
<i>Panus rudis</i> UEC-2046	24	4.0	2.0	47.0
<i>Coriallus versicolor</i> UEC-2047	25	10.0	2.0	40.0
Basidiomycete unknown UEC-2048	26	3.0	0.0	5.0

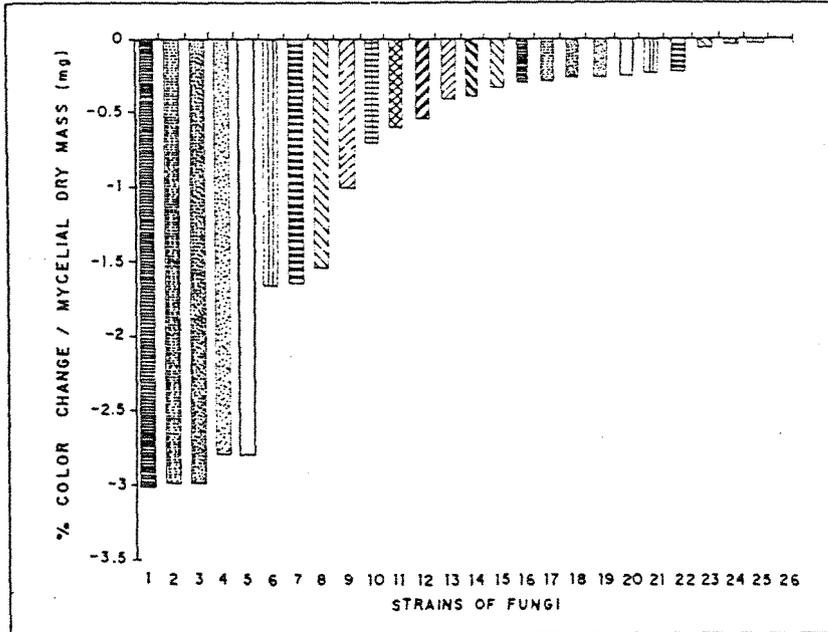


Fig.2. The fungal strains (TABLE II) and their decolorization inefficiency of the treated effluent, after 120 hours.

## ACKNOWLEDGEMENT

Support from FAPESP, CNPq and FINEP is acknowledged.

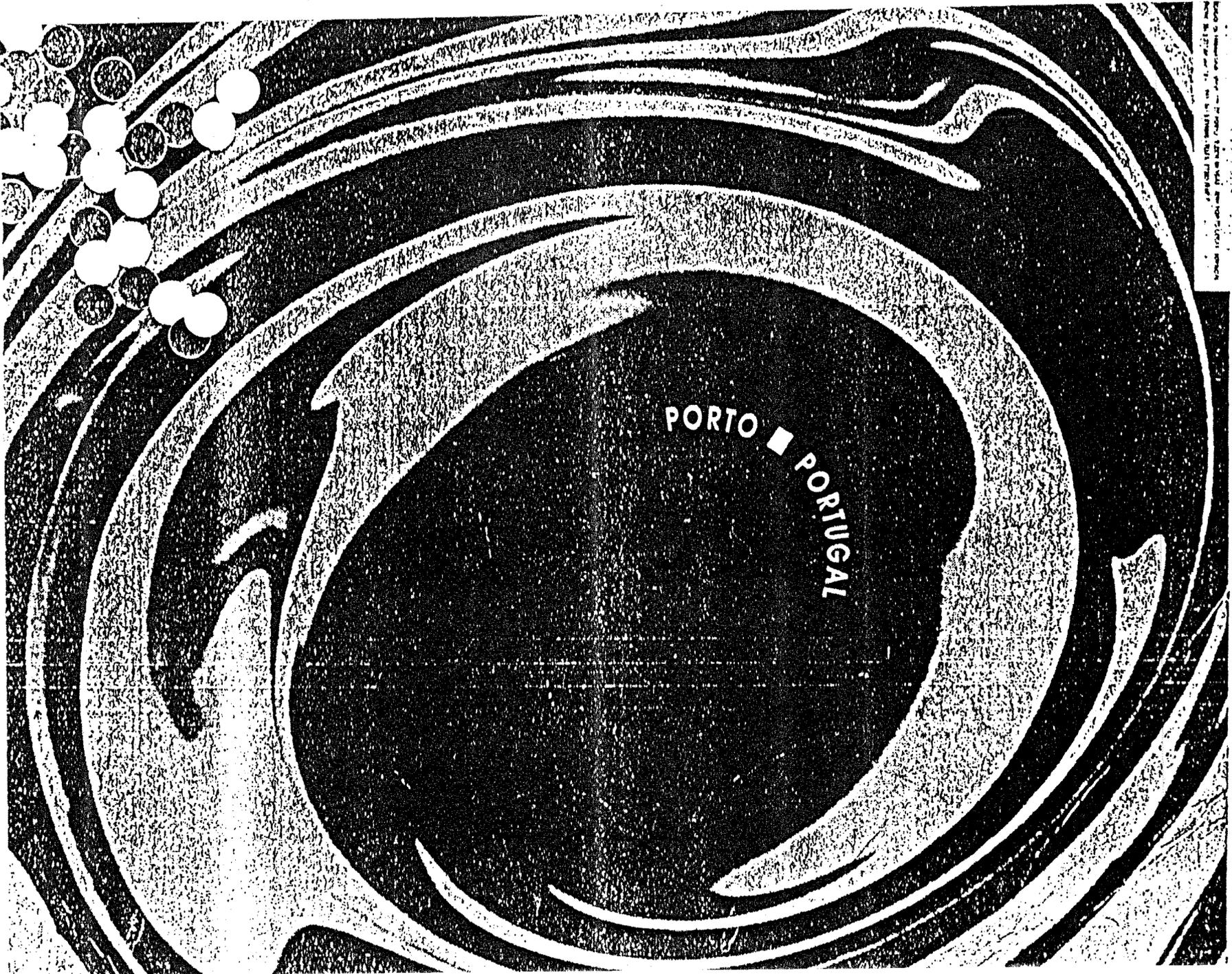
## REFERENCES

- Archibald, F.; Paice, M.G. and Jurasek, L.(1990). *Enzyme Microb. Technol.* 12, 846-853.
- APHA.(1975). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 14 ed. New York.
- Chang, H.-M.; Joyce, T.W. and Vasideravan, B.(1987). *Inter. Symp. Wood Pulping Chem. (Paris) 4th.* 2, 159-165.
- CPPA Technical Section Standard Method H5P.(1975).
- Davis, S. and Burns,R.G.(1990).*Appl.Microbiol.Biotechnol.* 32, 721-726.
- Durán, N.; Ferrer, I.; and Rodriguez, J.(1987). *Appl. Biochem. Biotech.*16,157-164.
- Durán, N.; Rodriguez, J.; Ferraz, A. and Campos, V.(1987). *Biotechnol. Lett.* 9(5), 357-360.
- Durán, N.; Ferraz, A. and Mansilla, H.(1990). *Arq. Biol. Tecno!* 33, 295-315.
- Dutta, S.A.; Parhad, N.M. and Joshi, S.R.(1985). *IAWPC Technol. Ann.* 12, 32-37.
- Galeano, G. and Agosin, E.(1990).*Biotechnol.Lett.*,12(11) 869-872.
- Kimura, Y.; Asada, Y. and Kuwahara, M.(1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 436-442.
- Kondo, R. and Imamura, H.(1989).*Mokuzai Gakkaishi.* 35,1001-1007.
- Kondo, R.; Iimore, T.; Imamura, H. and Nishida, T.(1990). *J. Biotechnol.* 13, 181-188.
- Leatham, G.F.(1986).*Appl. Microbiol. Biotechnol.*24,51-58.
- Lambais, M.R.(1988). *Rev. Microbiol. (S.Paulo)* 19, 425-429.
- Miller, G.L. (1959). *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Momohara, I., Matsumoto, Y. Ishizu, A. and Chang, H.-M.(1989). *TAPPI Proc.Inter.Symp.Wood and Pulp.Chem.Raleigh N.C.* 373-376.
- Paice, M.G.; Jurasek, L.; Ho, C.; Bourbonnais, R. and Archibald, F. (1989). *TAPPI J.* 72, 217-221.
- Prasad, D.Y. and Joyce, T.W.(1991). *TAPPI J.* 74, 165-169.
- Royer, G.; Desrochers, M.; Jurasek, L.; Rouleau, D.; Mayer, R.C.(1987). *J. Chem. Technol. Biotechnol.*35B, 14-22.
- Szklarz, G.D.; Antibus, R.K.; Sinsabaugh, R.L. and Linkins, A. (1989). *Fungi.Mycol.* 81, 234-240.
- Yin, C.-F.; Joyce, T.W. and Chang, H.-M.(1989). *J. Biotechnol.* 10: 67-76.

# CHEMICAL ENGINEERING CONFERENCE

INTERNATIONAL CHEMICAL ENGINEERING CONFERENCE APRIL 4.5.6

Organized by the Institution of Chemical Engineers, 179, Russell Square, London WC1B 5DH, U.K.



## Performance of a Modified Packed-bed Reactor to Evaluate Immobilized *Lentinus edodes* Acting on Kraft Effluent.

Elisa Esposito<sup>#</sup>, Nelson Durán<sup>\*</sup>, Juanita Freer<sup>@</sup>, Jaine Baeza<sup>@</sup> and Lúcia H. Innocentini Mei<sup>#</sup>

Chemical Engineering College, Depart. Polymer Technol<sup>#</sup>. and Chemical Institute, Biological Chemistry Laboratory<sup>\*</sup>, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6066, Campinas, CEP 13081, S.P., Brazil. Renewable Resources Laboratory, Universidad de Concepción, Concepción, Chile<sup>@</sup>.

### ABSTRACT

The potential use of white-rot fungi, *Lentinus edodes* UEC-2019, *L. edodes* UEC-2021, *Pycnoporus sanguineus* UEC-2050 and *Aspergillus* sp UEC-2051 to kraft effluent treatment from softwood *Pinus radiata* was evaluated. The most efficient fungus, *L. edodes* UEC-2021 strain was immobilized in a modified packed-bed reactor. The bioreactor operating at a retention time of 3 days was able to promote 50 % decolorization, 72 % of total phenols and 58 % of AOX reduction. In order to increase the efficiency of this method a combined pre-photochemical treatment followed by biological treatment was studied. The combined process showed unsatisfactory decrease in total phenols and AOX, although a high decolorization was found.

### INTRODUCTION

Environmental policies are forcing the pulp and paper industry to develop new technologies to reduce the impact caused by highly polluted wastewater discharges. Conventional biological treatments as aerobic lagoon and activated sludge, are often inadequate for color removal (Davis and Burns, 1992). Wastewater release volumes range between 80-150 m<sup>3</sup>/ton of finished product (Sant Anna; 1992) representing the most important environmental problem. Bleaching effluent contains various chlorinated lignin derivatives which can be determined as adsorbable organic halogens (AOX). Some of these compounds are known to be stable to receive water systems and are, in part, toxic, mutagenic and may accumulate in vertebrates. Additionally, efforts are made by the pulp and paper industry to reduce the chloroorganic discharges by the substitution of chlorine. However, chlorine bleaching will remain the most common method worldwide in the next years (Bergbauer and Eggert, 1992).

Biological treatment of wastewater is an attractive alternative related to other processes in which it offers the advantage of being a relatively clean technology. Although immobilized enzymes are quite efficient in effluent treatment (Innocentini-Mei et al. 1992, Trevisan and Innocentini-Mei, 1992, Ferrer et al. 1991). The ability of white-rot fungi to degrade chlorolignins and to decolorize kraft bleach effluents has been

investigated more intensively in the last ten years (Cannarota and Sant Anna, 1992). *Phanerochaete chrysosporium* and *Transtes versicolor* are among the most effective microorganisms known in degrade chorolignins (Bergbauer and Eggert, 1992; Cannarota and Sant Anna, 1992). In previous papers (Esposito et al. 1991; Esposito, 1992, Esposito et al. 1992) effective treatments of bleach plant effluents with the white-rot fungi *Lentinus edodes* were reported.

Another point of interest in non-classical method for effluent treatment is based on photochemical degradation (Durán, 1992). Mc Kelvey and Dugal (1975) demonstrated the decolorization of extraction filtrate using ultraviolet (UV) light, which was greatly enhanced by the addition of photosensitizers (Caron and Reeve, 1992). A photocatalyzed reaction using a semi-conductor as photocatalyst might also be a potential method of effluent treatment, since it is known that the photodecomposition of kraft lignin using  $TiO_2$ , ZnO and others is quite efficient. In addition  $TiO_2$  produce efficient photochemical degradation of chlorophenols (Durán et al. 1991, Durán, 1992, Hisaga et al. 1990).

The purpose of this research was to develop and evaluate the performance of a modified packed-bed reactor with two alternative treatment process, biological and combined pre-photochemical followed by biological treatment.

## MATERIAL AND METHODS

Strains and Growth Conditions: *Aspergillus* sp., *Lentinus edodes* UEC-2019, *L. edodes* UEC-2021 and *Pycnoporus sanguineus* UEC-2050 were obtained from our culture collection. *Aspergillus* sp. was maintained on nutrient agar medium (meat extract 0.3 %, peptone 0.5 %, agar 1.5 %) and *L. edodes* and *P. sanguineus* were maintained on malt extract agar 1.25 % at 28 °C. The inoculum was prepared as follow. Twelve 0.5 cm diameter from malt extract agar plate incubated for 5 days were placed in 50 mL of liquid malt extract (1.25 % w/v) or liquid nutrient medium in 125 mL Erlenmayer flasks. The inoculum flasks were incubated at 28 °C on reciprocating shaker (40 %) for 5 days. Fungal pellets were used to inoculate non-sterile 250 mL flasks containing 100 mL of E1 effluent (initial pH adjusted to 5.0, absorbance 465 nm 0.5) of *Pinus radiata* for 5 days without any additional carbon source, in the similar conditions described above (Tables 1-4).

Bioreactor: The experiments with the selected strain *L. edodes* UEC-2021 were carried out in a modified packed-bed reactor (Figure 1). The reactor was made from glass with capacity of 330 mL. An internal (air-lift) tube ensured an adequated recirculation liquid. Air was released at the reactor bottom through a porous glass plate (Cannarota and Sant Anna, 1992). Cubic particles of polyurethane foam (0.5 cm side) were used as packing material (1 g per 250 mL). The polyurethane was distributed in the annular space between the internal tube and the reactor wall.

Operacional Procedure: 250 mL of malt extract 1.25 % containing inoculum (30 circles micelium-agar) were fed to the reactor. The bioreactor was operated in steady-state for 5 days. After this period, the culture medium was eliminated and 250 mL of non-sterile E1 Effluent (5.300 Color Units) was introduced. This retention time was chosen based on previous experiment carried out for 5 days in Erlenmeyer flasks, in which 70 % of color removal was obtained (result not shown). Air flow at a rate of 0.43 L/min was maintained.

Effluent: The first alkaline extraction E1 effluent of softwood *Pinus radiata*, pH 9.8 was obtained from Celulosa Arauco (Concepción, Chile). The effluent was stored at 0°C, pH 2 and filtered through a filter paper Watmann n° 2 to remove large suspended particles before use.

Color: Color removal by fungal strains was measured by standard method H5P (CPPA, 1975).

Total Phenols: Total phenols were determined by the standard method (APHA, 1989) using phenol as standard.

AOX: Adsorbable organic chloride was determined according to the DIN standard (DIN 38409) by microcoulometric titration with an Euroglas AOX analyzer (ISO, 1988).

Photocatalytic Reaction: The reaction was carried out in an open beaker containing 300 mL of effluent, at an initial pH value of 7.6, absorbance 1.4 at 465 nm and 1.5 g of ZnO. The solution was illuminated from the top using a 250 W GE lamp (withough the glass cover) at a fluence rate of 108 W/m<sup>2</sup>, 254 nm). During the illumination the solution was magnetically stirred and bubbled with oxygen at a rate of about 10 mL min<sup>-1</sup>.

Combined Experiments with Photochemical and Biological Treatment: This experiment was carried out by first pre-irradiating the effluent for a period of 25 min at 254 nm as described above. The pre-irradiated effluent (300 mL) (absorbance 1.6 at 465 nm, pH 7.6) was diluted to give an initial absorbance of 1.4 and pH adjusted to 5.0.

- internal air-lift tube (1)
- packing (2)
- external jacket (3)
- porous plate (4)

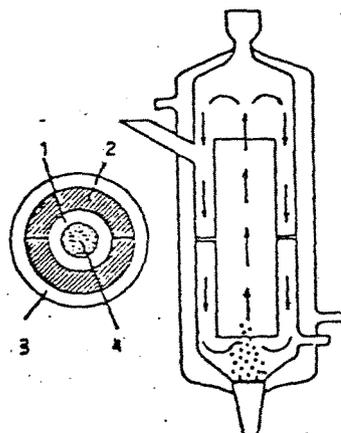


Figure 1. Modified packed-bed reactor.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of E1 effluent biodegradation by *Aspergillus* sp. UEC-2051, *Lentinus edodes* UEC-2019, *L. edodes* UEC-2021 and *Pycnoporus sanguineus* UEC-2050 are summarized in Table 1-4. The aim of this initial study was to select the best strain in decontamination process for the softwood effluent. These results are dealing with color, AOX and total phenols removals to a period of 5 days. *Aspergillus* sp. and *P. sanguineus* exhibited the most efficient kinetics at the first day of incubation in kraft E1 effluent. However the efficiency was markedly reduced after this period (Table 1-2).

TABLE 1. Decolorization of E1 effluent by *Aspergillus* sp. UEC-2051.

	Days			
	0	1	3	5
pH	5.0	6.4	7.1	7.2
Color reduction (%)	0.0	34.0	-33.0 <sup>a</sup>	8.0
AOX reduction (%)	0.0	52.0	64.0	49.0
Total phenols reduction (%)	0.0	79.0	40.0	48.0

(a) Negative values mean color increase.

TABLE 2. Decolorization of E1 effluent by *P. sanguineus* UEC-2050.

	Days			
	0	1	3	5
pH	5.0	7.0	7.9	8.1
Color reduction (%)	0.0	54.0	-22.0 <sup>a</sup>	-7.0 <sup>a</sup>
AOX reduction (%)	0.0	51.0	19.0	50.0
Total phenols reduction (%)	0.0	90.0	40.0	58.0

(a) Negative values mean color increase.

The Table 3-4 indicated a decolorization profile for both *L. edodes* strains against the color increase established in the *Aspergillus* sp. and *P. sanguineus* treatments (Table 1-2). The color increase (Table 1-2) probably is due to laccase induction in the first stage of *Aspergillus* sp. and *P. sanguineus* acting on effluent. These enzymes initiate a polymerization process, which can be easily eliminated by filtration. These aspects will be investigated in a future work.

Between the two white-rot fungi species of *L. edodes*, it was selected *L. edodes* UEC-2021 because exhibited the highest capacity of bioremediation of kraft E1 effluent, when immobilized with polyurethane foam (data not shown).

TABLE 3. Decolorization of E1 effluent by *L. edodes* UEC-2019.

	Days			
	0	1	3	5
pH	5.0	5.2	5.0	6.5
Color reduction (%)	0.0	40.6	25.2	11.6
AOX reduction (%)	0.0	17.4	50.0	12.7
Total phenols reduction (%)	0.0	80.0	40.0	58.0

TABLE 4. Decolorization of E1 effluent by *L. edodes* UEC-2021.

	Days			
	0	1	3	5
pH	5.0	5.4	5.4	6.0
Color reduction (%)	0.0	26.7	48.0	26.7
AOX reduction (%)	0.0	29.8	38.0	30.5
Total phenols reduction (%)	0.0	27.0	33.5	28.5

TABLE 5. Biological treatment: *L. edodes* UEC-2021 immobilized in a modified bioreactor.

	Days			
	0	1	3	5
pH	5.0	5.6	4.9	4.8
Color reduction (%)	0.0	24.0	50.0	60.0
AOX reduction (%)	0.0	25.0	58.0	57.0
Total phenols reduction (%)	0.0	22.0	72.7	73.0

TABLE 6. Combined treatments: pre-photochemical followed by biological treatment.

	Days			
	0	1	3	5
pH	5.0	5.6	4.9	4.8
Color reduction (%)	0.0	37.0	57.0	67.0
AOX reduction (%)	0.0	23.0	25.0	32.0
Total phenols reduction (%)	0.0	11.0	21.0	30.0

The Table 5 shows that biological treatment appeared to be an efficient method of decontamination of kraft E1 effluent (*Pinus radiata*). Organic halogen compounds in the aqueous environment are generally considered more recalcitrant to biodegradation than

other organic chemicals (Jokela et al. 1992). Within 3 days of incubation, *L. edodes* eliminated 58 % of the AOX and 73 % of total phenols. When it is compared with the combined processes (Table 8) it's clear that, neither AOX nor total phenols could be removed efficiently from E1 effluent. In other hand, the color reduction kinetics (Table 8) was higher than the reported in Table 5.

These results might be attributed to the pre-photochemical treatment which promotes a modification of the chromophoric groups, which are easily transformed by the fungus.

In summary, the combined process applied to E1 effluent showed relatively large and significative disadvantages. These results were different that those observed in E1 hardwood effluents (Esposito et al. 1992). Improvements in the process conditions (time of irradiation, air flow rate, etc) are in progress.

ACKNOWLEDGEMENT. Support from CNPq, FAPESP, FINEP (Brazil) and Fund. ANDES (Chile) are acknowledged.

#### REFERENCES

- APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 17 ed. New York. Amer. Publ. Health Ass. N° 5220, p.5.10-5.14.
- Bergbauer, M. and Eggert, C. (1992). Differences in the Persistence of Various Bleachery Effluent Lignins Against Attack by White-rot Fungi, *Biotechnol. Lett.*, 14: 869-874.
- Cannarota, M.C and Sant Anna, G.L. (1992). Decolorization of Kraft Bleach Plant E1 Stage Effluent in a Fungal Bioreactor, *Environm. Technol.*, 13: 65-71.
- Caron, R.J. and Reeve, D.W. (1992). Environmental Photolysis of Chlorinated Organic Matter Discharged in Kraft Pulp Bleaching Effluents, *Pulp & Paper Canada*, 93: 209-213.
- CPPA (1975). Technical Section Standard Method H5P.
- Davis, S. and Burns, R.G. (1992). Covalent Immobilization of Laccase on Activated Carbon for Phenolic Effluent Treatment, *Appl. Microbiol. Technol.*, 37: 474-479.
- Durán, N.; Dezotti, M. and Rodriguez, J. (1991). Biomass Photochemistry. XV: Photobleaching and Biobleaching of Kraft Effluent, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 62: 269-278.
- Durán, N. (1992). Reduction of Chemical Oxygen Demand in Bleach Plant Effluent by a Combination of Photochemical and Biological Methods, In *Proc. 2nd Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Comp.* (N. Durán and E. Esposito, Eds.), FAPESP publ., Campinas, S.P, Brazil, 3:323-333.
- Esposito, E.; Canhos, V.P. and Durán, N. (1991). Screening of Lignin Degrading Fungi for Removal of Color from Kraft Mill Wastewater with no Additional Carbon Source, *Biotechnol. Lett.* 13: 571-576
- Esposito, E.; Canhos, V.P. and Durán, N. (1992). Photochemical Pre-treatment of Kraft Effluent: Biobleaching with *Lentinus edodes*, In *Proc. 2nd Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Comp.*

- (N. Durán and E. Esposito, Eds.), FAPESP publ., Campinas, S.P., Brazil, 3: 356-361
- Esposito, E., Baeza, J., Freer, J. and Durán, N. (1992). Biotreatment of Kraft Effluent of *Pinus radiata*, IV Congreso Nacional de Pos-gradado en Química, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Ferrer, I., Dezotti, M. and Durán, N. (1991). Decolorization of Kraft Effluent by Free and Immobilized Lignin Peroxidases and Horseradish Peroxidase, *Biotechnol. Lett.*, 13: 577-582.
- Innocentini-Mei, L.H., Trevisan, H.C., Milagres, A.M.F. and Durán, N. (1992). Activated Silica as Support for Xylanolytic Enzymes, In Proc. 2nd Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Comp. (N. Durán and E. Esposito, Eds.), FAPESP publ., Campinas, S.P., Brazil, 3: 368-371
- International Organization for Standardization (ISO) (1989). Water Quality. Determination of Adsorbable Organic Halogens (AOX). ISO 9562.
- Hisaga, T., Harada, K. and Tanaka, K. (1990). Photocatalytic Degradation of Organochloride Compounds in Suspended  $TiO_2$ . *J. Photochem. Photobiol. Chem. A*, 54: 113-118.
- Jokela, J., Salkinoja-Salonen, M.S. and Elomaa, E. (1992). Adsorbable Organic Halogens (AOX) in Drinking Water and the Aquatic Environment in Finland, *J. Water STR-Aqua*, 41: 4-12.
- Trevisan, H.C. and Innocentini-Mei, L. (1992). Supports for Enzyme Immobilization. *An. Acad. Bras. Ci.*, 64: 111-116.