

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UTILIZAÇÃO DE *PLEUROTUS SAJOR-CAJU* NA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E
CELULOSE

PATRICIA BONFANTI

Caxias do Sul

2006

PATRICIA BONFANTI

**UTILIZAÇÃO DE *PLEUROTUS SAJOR-CAJU* NA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO
DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE
PAPEL E CELULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Co-orientador: Prof. Dr. Lademir Luiz Beal**

Caxias do Sul

2006

Aos meus incentivadores:
Ivai, Jandira e Darwin.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de registrar meu sincero agradecimento às pessoas que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho:

- aos meus pais, Ivai e Jandira, por serem minha base, meu norte, meu refúgio. Pelo amor e incentivo. Amo vocês;
- ao Darwin A. M. Neto pelo estímulo diário, amor e por compreender que minha ausência fazia parte deste trabalho;
- ao Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon por ter entrado na minha vida, por ser um exemplo a ser seguido, e por ser muito mais que um orientador;
- ao Prof. Dr. Lademir Luiz Beal pela orientação;
- à futura colega de profissão Luciana Brancher pelo carinho, colaboração e companheirismo;
- aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos por terem sido a minha família durante dois anos;
- aos colegas de mestrado Diogo Hendges, Fabíola Peretti, Adriana De Carli, Fernanda Confortin e Kátia Raserá pelas horas de estudo em grupo e momentos de descontração;
- à Prof^ª Dra. Cláudia Echevengúá Teixeira pelo acompanhamento e revisão desta dissertação;
- aos Laboratórios de Óleos Essenciais, Processos Biotecnológicos e de Saneamento Ambiental pelo livre acesso e utilização de equipamentos;
- aos amigos Ana Lourdes e Geison pela acolhida e carinho;
- à amiga Renata Confortin pela amizade mesmo que distante;
- à UCS e ao CNPQ pelo apoio estrutural e financeiro;

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS	iii
NOMENCLATURA	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii

<u>1 INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
<u>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</u>	<u>4</u>
2.1 EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE.....	4
2.1.1 <i>Princípios da degradação aeróbia de compostos aromáticos</i>	7
2.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE.....	8
2.2.1 <i>Tratamento físico-químico</i>	10
2.2.2 <i>Tratamento biológico</i>	10
2.3 FUNGOS COM AÇÃO DE DECOMPOSIÇÃO.....	14
2.3.1 <i>Enzimas ligninolíticas e seu uso potencial</i>	17
2.3.2 <i>Tratamento fúngico de efluentes contendo compostos fenólicos</i>	24
2.3.3 <i>Cultivo em meio líquido</i>	31
<u>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	<u>34</u>
3.1 LINHAGEM.....	34
3.2 MEIOS DE CULTIVO.....	34
<i>Solução Salina (Ss)</i>	34
<i>Meio de Manutenção (MM)</i>	34
3.2.1 <i>Meios de cultivo utilizados nos ensaios em frascos agitados</i>	34
3.2.2 <i>Meios de cultivo para ensaios em reator de bancada</i>	36
3.2.3 <i>Meio para tratamento bacteriano aeróbio, em frascos agitados e em reator de bancada, sem tratamento fúngico do efluente</i>	37
3.2.4 <i>Meio para tratamento bacteriano aeróbio, em frascos agitados e em reator de bancada, após tratamento fúngico do efluente</i>	37
3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	38
3.3.1 <i>Manutenção de Linhagens</i>	38
3.3.2 <i>Preparação do pré-inóculo para os ensaios em frascos agitados</i>	38
3.3.4 <i>Estudos em frascos agitados para avaliar a remoção de fenol</i>	38
3.3.5 <i>Estudos em frascos agitados para avaliar a remoção de fenóis totais do efluente da IPC</i>	39
3.3.6 <i>Preparo do inóculo para os estudos em reator de bancada</i>	39

3.3.7	<i>Avaliação em reator de bancada da remoção de fenóis totais do efluente da IPC.</i>	39
3.3.8	<i>Tratamento bacteriano aeróbio em frascos agitados.</i>	40
3.3.9	<i>Tratamento bacteriano aeróbio em reator de bancada.</i>	41
3.4	DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS	42
3.4.1	<i>Lacases.</i>	42
3.4.2	<i>Manganês peroxidase.</i>	43
3.4.3	<i>Lignina peroxidase.</i>	43
3.4.4	<i>Oxidases do álcool veratrílico.</i>	44
3.5	DETERMINAÇÃO DO pH	44
3.6	DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	44
3.7	ANÁLISE DE ADSORÇÃO/DESORÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELA MASSA FÚNGICA	45
3.8	DETERMINAÇÃO DA COR	45
3.9	DETERMINAÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)	46
3.10	DETERMINAÇÃO DA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO (DBO)	46
3.11	DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO TOTAL	47
3.12	DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO TOTAL	48
3.13	DETERMINAÇÃO DA MASSA CELULAR	48
3.14	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	49
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	TESTE DE ADSORÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MICÉLIO	50
4.2	REDUÇÃO DE FENOL POR <i>PLEUROTUS SAJOR-CAJU</i> EM FRASCOS AGITADOS	52
4.3	REDUÇÃO DE FENÓIS TOTAIS DO EFLUENTE DA IPC POR <i>PLEUROTUS SAJOR-CAJU</i> EM FRASCOS AGITADOS	54
4.4	REDUÇÃO DE FENÓIS TOTAIS DO EFLUENTE DA IPC EM REATOR DE BANCADA	55
4.5	MATÉRIA ORGÂNICA (DQO) NO EFLUENTE DA IPC DURANTE O TRATAMENTO COM BACTÉRIAS AERÓBIAS EM FRASCOS AGITADOS	58
4.6	MATÉRIA ORGÂNICA (DQO) NO EFLUENTE DA IPC DURANTE O TRATAMENTO COM BACTÉRIAS AERÓBIAS EM REATOR DE BANCADA	72
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	73
6	OS EXPERIMENTOS COM A LINHAGEM PS 2001 DE <i>PLEUROTUS SAJOR-CAJU</i> CRESCENDO EM FENOL E EM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE PERMITIRAM CONCLUIR QUE:	77
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA REPRESENTATIVA DE PARTE DE UM POLÍMERO DE LIGNINA (BARR & AUST, 1994).....	6
.....	6
FIGURA 2- COMPOSTOS CHAVE INTERMEDIÁRIOS FORMADOS PELA DEGRADAÇÃO AERÓBIA E A DEGRADAÇÃO FUTURA POR TRÊS PRINCIPAIS VIAS CENTRAIS: VIA β-CETOADIPATO (A), VIA-META (B), E VIA GENTISATO (C). AS DIOXIGENASES QUE CLIVAM O ANEL ATACAM NAS POSIÇÕES INDICADAS PELA SETA (BRUNE, 1998).	8
FIGURA 3- ORGANOGRAMA DAS CLASSES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES (FREIRE ET AL., 2000).....	9
FIGURA 4- ESQUEMA CONVENCIONAL DE TRATAMENTO POR LODO ATIVADO. (FREIRE ET AL., 2000).	11
FIGURA 5- FOTO DE PLEUROTUS SAJOR-CAJU (DPB).....	17
FIGURA 6-MECANISMO DE AÇÃO DA LIP (BREEN & SINGLETON, 1999).....	18
FIGURA 7- MECANISMO DE AÇÃO DA MNP. (BREEN & SINGLETON, 1999).....	19
FIGURA 8-MECANISMO DE AÇÃO DAS LACASES (A) E DA ENZIMA COM A INTERFERÊNCIA DE UM MEDIADOR (B). (BREEN & SINGLETON, 1999; BAIOTTO ET AL., 2003).....	22
FIGURA 9- FOTO DO REATOR DE BANCADA UTILIZADO NO TRATAMENTO FÚNGICO DO EFLUENTE.	40
FIGURA 10 – BANHO TERMOSTATIZADO COM FRASCOS AGITADOS UTILIZADO NO TRATAMENTO BACTERIANO DO EFLUENTE.....	41
FIGURA 11- BIORREATOR DE BANCADA UTILIZADO NO TRATAMENTO BACTERIANO DO EFLUENTE.....	42
FIGURA 12-CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PRESENTES NO SOBRENADANTE DE CULTIVOS LÍQUIDOS COM P. SAJOR-CAJU REALIZADOS EM FRASCOS AGITADOS.....	51
OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA DE TRÊS REPLICATAS E AS BARRAS AO DESVIO PADRÃO.....	51

.....	51
FIGURA 13- PORCENTAGEM DE FENÓIS TOTAIS ADSORVIDOS NA BIOMASSA FÚNGICA DE CULTIVOS LÍQUIDOS COM P. SAJOR-CAJU REALIZADOS EM FRASCOS AGITADOS.....	51
OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA DE TRÊS REPLICATAS E AS BARRAS AO DESVIO PADRÃO.....	51
FIGURA 14- PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE P. SAJOR-CAJU EM CULTIVOS LÍQUIDOS EM FRASCOS AGITADOS.....	53
OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA DE TRÊS REPLICATAS E AS BARRAS AO DESVIO PADRÃO.....	53
FIGURA 15- EFEITO DA AGITAÇÃO DOS FRASCOS SOBRE A REMOÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PRESENTES NO MEIO DE CULTIVO.....	53
OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA DE TRÊS REPLICATAS E AS BARRAS AO DESVIO PADRÃO.....	53
FIGURA 16- CONCENTRAÇÃO DE FENOL NO INÍCIO E AO FINAL DO CULTIVO (168H) UTILIZANDO 50% DE UMA SUSPENSÃO FÚNGICA DE 7 DIAS DE CULTIVO.....	54
FIGURA 17- CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE NOS FRASCOS CONTROLES E NOS FRASCOS CULTIVO NO TEMPO ZERO E AO FINAL DO ENSAIO	56
OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA DE TRÊS REPLICATAS E AS BARRAS AO DESVIO PADRÃO.....	56
FIGURA 18- ANÁLISE DE FENÓIS TOTAIS EM CULTIVOS DE P. SAJOR-CAJU, FORMULADOS COM EFLUENTE DA IPC.....	58
OS VALORES CORRESPONDEM À MÉDIA DE TRÊS REPLICATAS E AS BARRAS AO DESVIO PADRÃO.	58
* LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ENTRE OS TRATAMENTOS COM P<0,05 PELO TESTE T.....	58
FIGURA 19- BIORREATOR DE BANCADA NO 8º DIA DE CULTIVO, MOSTRANDO A GRANDE QUANTIDADE DE BIOMASSA FORMADA.....	58
A.....	59
B.....	59

FIGURA 20- BIOMASSA AO FINAL DO CULTIVO (10 DIAS) (A) E CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO (B), FORMADOS NA PORÇÃO SUPERIOR DO VASO DE FERMENTAÇÃO.....	59
FIGURA 21- ATIVIDADE DE LACASES E CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS EM REATOR DE BANCADA COM EFLUENTE DA IPC.....	59
FIGURA 22- CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS, VARIAÇÃO DO PH E BIOMASSA EM REATOR DE BANCADA COM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE.	60
FIGURA 23- CONSUMO DE GLICOSE E CRESCIMENTO DA BIOMASSA (G/L DE PESO SECO) EM REATOR DE BANCADA, COM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE.	61
FIGURA 24- ATIVIDADES DE LACASES, LIP E VAO E CRESCIMENTO DA BIOMASSA EM CULTIVO SUBMERSO EM REATOR DE BANCADA COM EFLUENTE DA IPC.	63
FIGURA 25- BIORREATOR DE BANCADA: (A) NO INÍCIO DO ENSAIO; (B) NO QUINTO DIA.....	64
FIGURA 26- BIORREATOR DE BANCADA NO ÚLTIMO DIA DE ENSAIO COM A PRESENÇA DE CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO NA PARTE SUPERIOR INTERNA DO REATOR.....	64
FIGURA 27- VARIAÇÃO DE PH E CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS DO EFLUENTE DA IPC.....	65
FIGURA 28- DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E BIOMASSA (PESO SECO) EM REATOR DE BANCADA COM EFLUENTE DA IPC.	66
FIGURA 29- PERFIS DE ATIVIDADE DE LACASES, MNP E FENÓIS TOTAIS EM REATOR DE BANCADA COM EFLUENTE DA IPC.	67
.....	67
FIGURA 30- PERFIS DE ATIVIDADE DE LIP, VAO E FENÓIS TOTAIS EM REATOR DE BANCADA COM EFLUENTE DA IPC.	68
FIGURA 31- PERFIL DA ATIVIDADE DE LACASES E MNP E DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA PRESENTE EM CULTIVO SUBMERSO EM REATOR DE BANCADA DE PLEUROTUS SAJOR-CAJU PS-2001 EM MEIO, CONTENDO EFLUENTE DA IPC.....	70
FIGURA 32- VARIAÇÃO DA COR DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE DURANTE O CULTIVO COM A LINHAGEM PS-2001 DE P. SAJOR-CAJU.....	72

FIGURA 33- DETERMINAÇÃO DE DQO EM OITO DIAS DE CULTIVO DO EFLUENTE DA IPC BRUTO E APÓS O TRATAMENTO FÚNGICO.....	73
FIGURA 34- DETERMINAÇÃO DE DQO EM OITO DIAS DE CULTIVO DO EFLUENTE DA IPC BRUTO E APÓS O TRATAMENTO FÚNGICO EM FRASCOS AGITADOS.....	74
FIGURA 35- CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS EM OITO DIAS DE CULTIVO DO EFLUENTE DA IPC BRUTO E APÓS O TRATAMENTO FÚNGICO.....	74
FIGURA 36- DETERMINAÇÃO DE DQO EM OITO DIAS DE CULTIVO DO EFLUENTE DA IPC PURO E APÓS O TRATAMENTO FÚNGICO.....	75
FIGURA 37- CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS EM OITO DIAS DE CULTIVO DO EFLUENTE DA IPC PURO E APÓS O TRATAMENTO FÚNGICO EM REATOR DE BANCADA.....	76
MUNARI, F. M.; GAIO, T.A.; DILLON, A.J.P. (2006). PHENOL DEGRADATION AND COLOR REMOVAL IN SUBMERGED CULTURE OF PLEUROTUS SAJOR-CAJU WITH PAPER MILL EFFLUENTS. BIOCATALYSIS & BIOTRANSFORMATION. DOI 10.1080/10242420600906355.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Poluentes gerados nas etapas de produção de celulose e papel.....	5
---	---

NOMENCLATURA

- ABTS- 2,2'- azino-bis(3,6-etilbenzotiazolona-6-sulfonato)
- ADS- meio líquido para teste de adsorção de fenóis totais pela biomassa fúngica
- AOX - haletos orgânicos adsorvíveis
- COT - carbono orgânico total
- COV- composto orgânico volátil
- DBO – demanda bioquímica de oxigênio
- DQO- demanda química de oxigênio
- ETE- estação de tratamento de efluentes
- HBT- 1-hidroxibenzotriazol
- HPI - N-hidroxyphtalimide
- IPC- indústria de papel e celulose
- LAF- meio líquido para crescimento e adaptação na presença de fenol
- Lc- lacases
- LCE- meio líquido para crescimento na presença de efluente
- LCF- meio líquido para crescimento na presença de fenol
- LE- meio líquido para crescimento na presença de efluente
- LiP – ligina peroxidases
- MM- meio de manutenção
- MnP – manganês peroxidases
- PA- meio para pré-inóculo em frascos agitados
- PCP - pentaclorofenol

PR- meio para pré-inóculo em reator

Ss- solução salina

SS- sólidos suspensos

SSF- sólidos suspensos fixos

SST- sólidos suspensos totais

SSV- sólidos suspensos voláteis

SSVI- índice de volume de lodo movimentado

UC - unidades colorimétricas

VAO – veratril álcool oxidase

VLA - ácido vialurônico

VP- versátil peroxidase

RESUMO

Efluentes da indústria de papel e celulose (IPC) caracterizam-se por apresentar um alto conteúdo de compostos fenólicos que são prejudiciais para os microrganismos envolvidos nos tratamentos convencionais, necessitando a sua remoção por processos físicos e/ou químicos, antes do encaminhamento para as lagoas aeradas. Neste trabalho foi estudada a capacidade de degradação de fenol e de fenóis totais presentes no efluente da IPC, em cultivo submerso, pela linhagem de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 utilizada comercialmente para a produção de cogumelos. Também foi avaliado a alteração na concentração de DQO de efluentes da IPC por sistemas bacterianos aerados, após o tratamento fúngico. Foram realizadas análises de atividade de lacases, LiP, VAO e MnP, fenóis totais, pH, cor e DQO. Os estudos de crescimento de fungos e bactérias foram realizados em frascos agitados e em reator de bancada. A formulação do meio de crescimento fúngico continha 92% de efluente da IPC, suplementado com sais, glicose e proteína de soja. Em todos os ensaios observou-se uma diminuição da concentração de fenóis totais do meio, que foi interpretada como decorrente da ação do fungo pela atividade enzimática envolvendo degradação e precipitação, adsorção na massa fúngica e de atividade não biológica, desde que foram detectadas atividades de lacases, LiP, VAO e MnP; foi observado adsorção de fenóis totais pelo micélio; e também diminuição de fenóis totais na ausência de microrganismos. As análises de DQO e fenóis totais dos efluentes referentes aos ensaios com bactérias aeróbias, após o tratamento fúngico, mostraram uma diminuição de DQO mais rápida em relação ao efluente não tratado pelo fungo. A remoção de fenóis totais no processo bacteriano também foi favorecida pela ação fúngica, visto que a remoção dos compostos fenólicos foi superior no efluente tratado pelo fungo. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a atividade do fungo da degradação branca *Pleurotus sajor-caju* PS 2001 pode constituir-se como parte de um processo para tratamento de efluentes da IPC, associado ao tratamento bacteriano.

ABSTRACT

Wastewaters originated at paper and cellulose industries (PCI) are characterized by the presence of the high content of phenolics compounds, which assign prejudicial for the microorganisms involved in the conventional treatments, imposing physical and/or chemical removal before the discharge to the aerobic (secondary) pond. This work deals with the degradation capacity of phenol and total phenols present in the PCI wastewater, in submerged cultivation, by the strain of *Pleurotus sajor-caju* PS-2001, commercially utilized for the output of mushrooms. In addition, changes in the COD concentration in PCI wastewaters of aerobic bacterial systems treated with fungus were evaluated. Analyses of activity of laccases, LiP, VAO and MnP, total phenols, pH, colour and DQO were carried out. The fungi and bacteria growth studies were carried out using shaking flask and bioreactor. The formulation of the medium for fungus growth had 92% of PCI wastewater, supplemented with salts, glucose and soy protein. In all trials was observed a reduction in the concentration of total phenols in the medium, that may be caused by the enzymatic activity of the fungus, which involves degradation and haste, adsorption in the fungus mass and non-biological activity due to the fact that activities of laccases, LiP, VAO and MnP were detected; the adsorption of total phenols by the micelles was observed as well as a decrease in the total phenols in the absence of microorganisms. The COD and total phenols trial analyses of wastewaters with aerobic bacteria showed a faster decrease when treated with fungus, compared to the trials without fungus. Furthermore, the removal of total phenols in the bacterial trial was availed by the fungus action due to fact that the removal of the phenol compounds was higher in the wastewater treated with the fungus. Based in the obtained results, it was concluded th white-rot fungus *P. sajor-caju* PS 2001 activity can be used as a part of the PCI wastewater treatment associated to the bacterial treatment.

1 INTRODUÇÃO

O homem iniciou o registro de sua história por volta de 6.000 a.C. utilizando diferentes materiais para gravar as informações. Dentre esses materiais encontram-se os papéis que evoluíram de forma extraordinária, principalmente com o aproveitamento de espécies florestais de rápido crescimento, obtendo um produto de alta qualidade.

A celulose é a principal matéria-prima da fabricação do papel. Entretanto, atualmente, observa-se que nem todas as indústrias utilizam “celulose virgem”, visto que o uso da reciclagem do papel vem crescendo a cada dia, sendo estimulada pelas organizações de defesa ambiental. Em 1995, o consumo de aparas era de 1.840.000 toneladas passando para 3.360.000 toneladas em 2004. No Brasil, o estado de São Paulo é o que mais consome aparas e papéis usados, com 1.247,9 toneladas representando 37,1% do setor no ano de 2004. O Rio Grande do Sul representa 3,6% do consumo (www.bracelpa.org.br/br/index.htm, 2006).

A produção e o consumo mundial de celulose e papel tem aumentado significativamente nos últimos anos, aumentando também a competição pelo mercado mundial. Dentro desta perspectiva, o complexo brasileiro de celulose e papel tem apresentado um desempenho acima da média e enfrenta os concorrentes mundiais com preços mais baixos e produtos com padrões de qualidade compatíveis com os exigidos pelos demandantes internos e externos.

A busca da melhoria contínua dos processos e produtos, assim como a redução dos impactos ao meio ambiente, têm sido grandes desafios para a indústria de celulose e papel em todo o mundo. Para ser bem sucedida, a indústria deve encontrar novas formas de aprimorar

sua performance ambiental, ampliar a qualidade do produto e reduzir custos operacionais seguindo os conceitos da Ecologia Industrial.

Na fabricação do papel utiliza-se uma grande quantidade de água, pela qual, entre outros componentes, muitas fibras são desperdiçadas e carreadas, constituindo um fator de poluição dos corpos hídricos, o que aumenta a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) dos mesmos. Além disso, transmitem cor e turbidez e podem formar bancos de lodo que se decompõem anaerobiamente com produção de odores desagradáveis.

A fim de assegurar uma melhoria na qualidade ambiental, há uma pressão crescente no sentido de reduzir resíduos e melhorar o tratamento do efluente da indústria de papel e celulose (IPC). Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas com a finalidade de preencher esta lacuna no tratamento de resíduos, principalmente em relação aos compostos recalcitrantes. A tendência é que a biodegradação destes compostos seja incorporada ao setor produtivo, diminuindo os custos do tratamento.

Atualmente, os tratamentos realizados nos efluentes da indústria consistem basicamente de um tratamento primário realizado por processos físicos e químicos, que precipitam os compostos fenólicos, mas não os removem, e um posterior tratamento secundário com um processo aeróbio para a remoção dos compostos orgânicos vegetais.

Estudos têm demonstrado que fungos da degradação branca ou suas enzimas isoladamente apresentam a capacidade de oxidar ou mesmo mineralizar compostos fenólicos constituintes do efluente da indústria papelreira. Entretanto, apenas o uso destes fungos ou de suas enzimas não remove a quantidade de matéria orgânica como ocorre nos processos aeróbios.

Buscando contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa e econômica para o tratamento do efluente da indústria de papel e celulose, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a remoção de fenóis totais em efluentes da produção de papel e polpa de celulose num processo constituído de dois estágios que envolve o cultivo em efluentes de *Pleurotus sajor-caju* seguido de cultivo bacteriano aerado, tendo como objetivos específicos:

- verificar a capacidade de remoção de fenóis totais e cor de efluentes da etapa de branqueamento, durante o crescimento da linhagem PS 2001 de *Pleurotus sajor-caju*, em frascos agitados;
- verificar a capacidade de remoção de fenóis totais e cor de efluentes da etapa de branqueamento, durante o crescimento da linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju* em reator de bancada de 5 litros;
- comparar a capacidade de remoção de fenóis totais e cor de efluentes da etapa de branqueamento, *in natura* e após o cultivo com *P. sajor-caju*, em cultivos bacterianos aerados proveniente de lodos ativados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Efluente da indústria de papel e celulose

O efluente obtido durante a preparação da polpa de celulose e da etapa de branqueamento da polpa de papel tem sido definido como tóxico, carcinogênico, mutagênico e alergênico, tornando-se fundamental a sua remoção para minimizar os impactos nos corpos hídricos (Canet *et al.*, 2001). Essa toxicidade é atribuída aos compostos clorofenólicos, especialmente policlorados fenólicos que bioacumulam-se em peixes, sendo altamente persistentes (Davis & Burns, 1990).

A madeira, principal matéria-prima usada na indústria de polpa e papel, é composta por fibras de celulose (40%), hemicelulose (30%) e lignina (20-30%), que age como uma substância adesiva para as fibras de celulose (Thompson *et al.*, 2001; Tuomela *et al.*, 2000). A extração das fibras de celulose ocorre por um processo químico ou por um processo mecânico. No processo químico, a lignina é dissolvida e separada do restante das fibras pelo processo *Kraft*, no qual a madeira é cozida em uma solução de hidróxido de sódio e sulfito de sódio. Este processo é mais lento que o processo mecânico, porém requer menos consumo de energia (Breen & Singleton, 1999).

A poluição causada pela indústria de papel e celulose tem sua origem nas etapas de produção e branqueamento da polpa, na prensagem do papel, no preparo da madeira, na lavagem da polpa, na separação e no preparo do papel. Estas etapas geram um efluente que apresenta na sua composição sólidos suspensos (SS), alta demanda química de oxigênio (DQO), alta DBO, cor, basicidade, fenóis, organoclorados, cianeto, sulfetos e outras substâncias solúveis. Além disso, este efluente apresenta alta temperatura, o que pode

ocasionar impactos no corpo receptor. A cor marrom dos efluentes pode também inibir as atividades biológicas na água, pois impede a penetração da luz solar (Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Bajpai & Bajpai, 1994). O efluente pode conter, ainda, metais pesados, entretanto, as quantidades encontradas geralmente são inferiores às encontradas no efluente doméstico (Thompson *et al.*, 2001).

No quadro 1 estão relacionados os poluentes das várias etapas de produção citados por Pokhrel & Viraraghavan (2004).

Quadro 1- Poluentes gerados nas etapas de produção de celulose e papel.

Preparo da madeira	As impurezas e a casca são removidas da madeira e os cavacos são separados da casca. O efluente provindo da lavagem da madeira contém SS, DBO, terra, fibras, pó, etc.
Casa de digestão	Nesta etapa o efluente chama-se licor negro. A polpa <i>Kraft</i> contém compostos químicos para o cozimento bem como lignina e outros extratos da madeira. O efluente contém resinas, ácidos graxos, cor, DBO, DQO, AOX (haletos orgânicos adsorvíveis), compostos orgânicos voláteis (COVs) como terpenos, álcool, fenóis, metanol, acetona, clorofórmio, etc.
Lavagem da polpa	O efluente contém alto pH, DBO, DQO, SS e cor marrom escura.
Branqueamento da polpa	Nessa etapa o efluente contém dissolvidos carboidratos, lignina, cor, alta DQO, AOX, cloro inorgânico como cloreto ClO_3^- , compostos organoclorados como dioxinas, furanos, clorofenóis, COVs, etc.
Produção do papel	O efluente contém especialmente matéria-prima desperdiçada, compostos orgânicos, corantes inorgânicos, DQO, acetona, etc.

Há uma significativa diferença entre a qualidade do efluente proveniente do preparo da polpa e do preparo do papel em função da diversidade dos processos e dos produtos químicos utilizados. A principal delas é que o efluente da polpa contém substâncias derivadas da madeira dissolvida. Outra diferença é a cor do efluente ao final do processo. Todo efluente do processo

de preparo da polpa tem pouca descoloração em função da lignina dissolvida (Thompson *et al.*, 2001).

A lignina é composta por polímeros ramificados (Figura 1) de monômeros derivados do álcool cinamil, sendo o polímero orgânico aromático natural mais abundante nas plantas vasculares e considerado a segunda fonte de carbono no planeta, sendo superada apenas pela celulose (Putzke & Putzke, 2002).

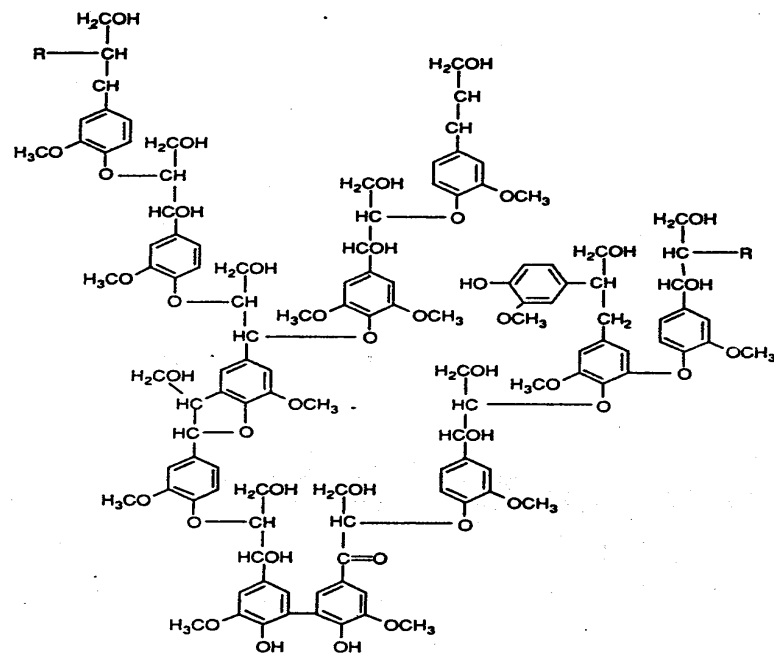


Figura 1- Estrutura representativa de parte de um polímero de lignina (Barr & Aust, 1994).

A lignina e seus derivados são de difícil degradação em função das ligações entre as moléculas, especialmente o bifenil, que é uma ligação tipo carbono-carbono (Eaton *et al.*, 1982; Bajpai & Bajpai, 1994; Barr & Aust, 1994). Os compostos de lenta degradabilidade são denominados de recalcitrantes, e os compostos denominados de xenobióticos referem-se

àqueles que possuem uma molécula essencialmente antropogênica não sendo, portanto, encontrados naturalmente (Mattiasson, 2001). Os compostos xenobióticos, como os pesticidas, também podem ser recalcitrantes.

2.1.1 Princípios da degradação aeróbia de compostos aromáticos

Via de regra, a ampla variedade de substratos aromáticos são transformados em intermediários antes da clivagem do anel. Muitas reações envolvidas neste caminho periférico são catalizadas por oxigenases específicas, que introduzem um grupo hidroxila e removem outros substituintes do anel. Dependendo do número de átomos de oxigênio incorporados no composto aromático, as oxigenases são diferenciadas em mono ou dioxigenases. A via periférica converge a poucos intermediários chave: fenóis diídricos com substituinte hidroxil na posição *orto* ou *para*, mutuamente. Estas constituições diminuem a estabilização do núcleo aromático consideravelmente e facilitam o ataque por dioxigenases específicas na clivagem do anel, iniciando a via central. (Brune, 1998).

A Figura 2 mostra o início da via central de degradação em que as dioxigenases clivam o anel aromático de três formas diferentes.

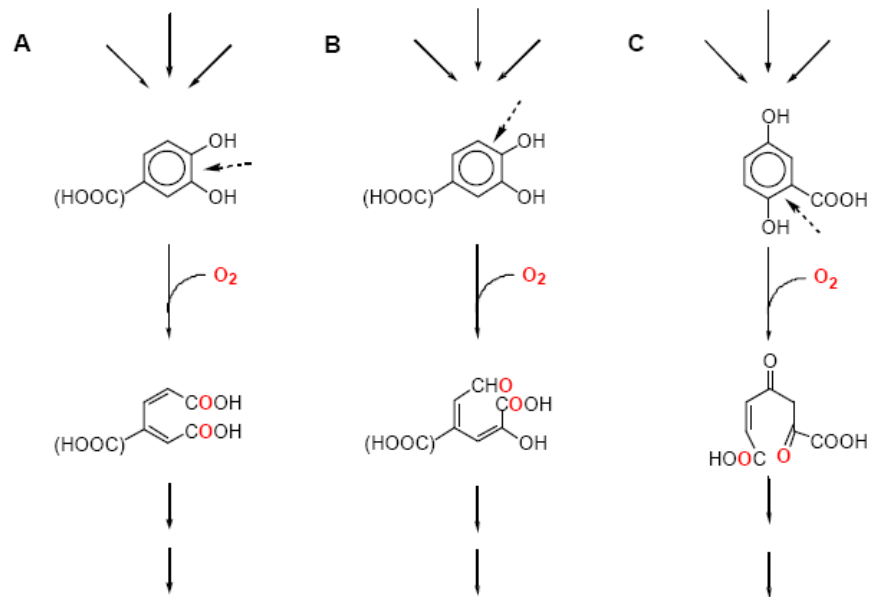


Figura 2- Compostos chave intermediários formados pela degradação aeróbia e a degradação futura por três principais vias centrais: via β -cetoadipato (A), via-*meta* (B), e via gentisato (C). As dioxigenases que clivam o anel atacam nas posições indicadas pela seta (Brune, 1998).

A habilidade de degradar compostos poliaromáticos não é tão comum quanto a habilidade em degradar os substratos monoaromáticos. Isto se deve ao fato de que a maioria das enzimas são intracelulares e, portanto, o substrato aromático precisa entrar na célula por um processo de difusão ou um transporte específico. Biopolímeros de alto peso molecular como a lignina são muito grandes para atravessar a membrana citoplasmática. Sua mineralização requer que enzimas sejam secretadas para fora da célula. Entretanto, as ligações fortes da lignina não são hidrolisáveis por enzimas convencionais, exceto se elas tiverem enzimas específicas, como as lacases (fenol-oxidases) (Brune, 1998).

2.2 Tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose

As indústrias como as de produção de óleo de oliva, amido de tapioca, destilarias, branqueamento de algodão e processos de polpa e papel geram anualmente, em todo o mundo,

bilhões de litros de efluentes coloridos, muitas vezes tóxicos e prejudiciais. Estes efluentes possuem altos valores de DQO, podendo conter altas concentrações de polifenóis, de proteínas, resíduos de lignina clorados e corantes (Coulibaly, 2003).

O processo de tratamento utilizado em indústrias papelarias consiste, primeiramente, numa clarificação que pode ser por sedimentação ou flotação e tem por objetivo a remoção de sólidos suspensos. O tratamento secundário pode ser aeróbio ou anaeróbio e permite a remoção da matéria orgânica. Segundo Larsson *et al.* (2006), o tratamento biológico remove os compostos do efluente capazes de masculinizar peixes. Há também um terceiro tratamento baseado em processos físico-químicos, que objetiva a remoção de cor e não é muito utilizado (Thompson *et al.*, 2001).

A Figura 3 esquematiza os principais métodos utilizados no tratamento de efluentes industriais.

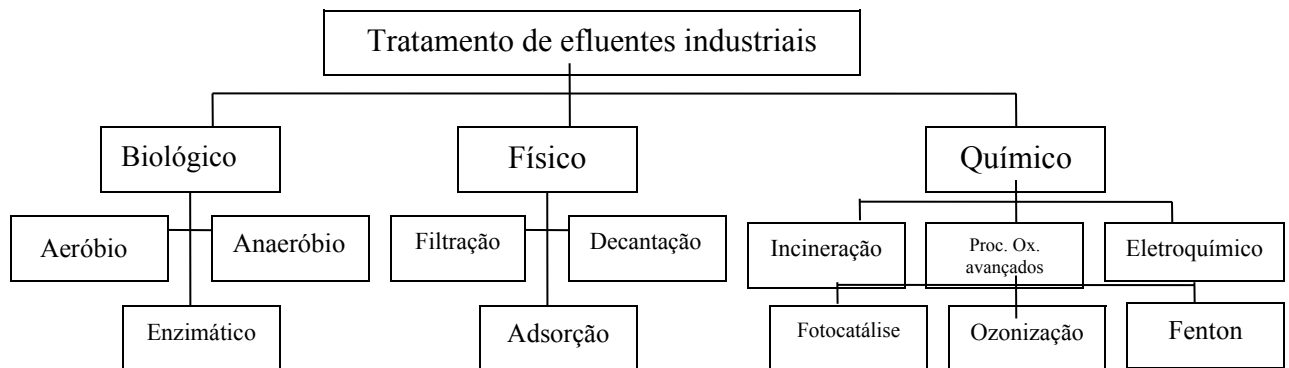


Figura 3- Organograma das classes de tratamento de efluentes (Freire *et al.*, 2000).

2.2.1 Tratamento físico-químico

O tratamento físico-químico inclui a remoção dos SS, dos compostos coloidais, da matéria livre flutuante, da cor e dos compostos tóxicos por meio de sedimentação, flotação, separação, adsorção, coagulação, oxidação, ozonização, eletrólise, osmose reversa, ultrafiltração e tecnologias de nanofiltração (Pokhrel & Viraraghavan, 2004). Estes tratamentos podem remover ligninas cloradas de alto peso molecular, toxicidade e DQO, mas DBO e compostos de baixo peso molecular não são removidos eficientemente, além de ser um processo bastante oneroso (Bajpai & Bajpai, 1994; Rangunathan & Swaminathan, 2004).

Zamora *et al.* (1998) relatam a degradação de compostos fenólicos e polifenólicos, usando avançados sistemas de oxidação, como fotocatalise com $O_2/ZnO/UV$ ou $O_2/TiO_2/UV$ que são considerados os melhores sistemas de oxidação em curto período de tempo.

Técnicas de separação por membranas foram relatadas como sendo adequadas para remover AOX, DQO e cor. Embora os compostos fenólicos clorados e AOX possam ser removidos por adsorção, ozonização e por membrana de filtração ainda são necessários mais estudos para melhorar a eficiência desses processos (Pokhrel & Viraraghavan, 2004).

2.2.2 Tratamento biológico

- **Processo de lodo ativado**

O processo de lodo ativado foi desenvolvido na Inglaterra em 1914 e é definido como um sistema no qual uma massa biológica cresce e floclula, sendo colocada em contato com a matéria orgânica do despejo líquido, na presença de oxigênio (Jordão & Pessôa, 1995). Modernos sistemas de lodos ativados com remoção de nutrientes foram introduzidos em larga escala a partir dos anos 80, em plantas de tratamento de efluentes (Wanner *et al.*, 2000).

Segundo Thompson *et al.* (2001), a tendência no Reino Unido é de que aproximadamente 40% das indústrias de polpa de celulose e papel usem tratamento biológico.

A Figura 4 mostra, de uma maneira simples, o processo de lodo ativado, onde o efluente entra em contato com o lodo no tanque de aeração, seguindo para o tanque de sedimentação, onde ocorre a separação entre o lodo, que recircula, e o efluente tratado, que é então, liberado.

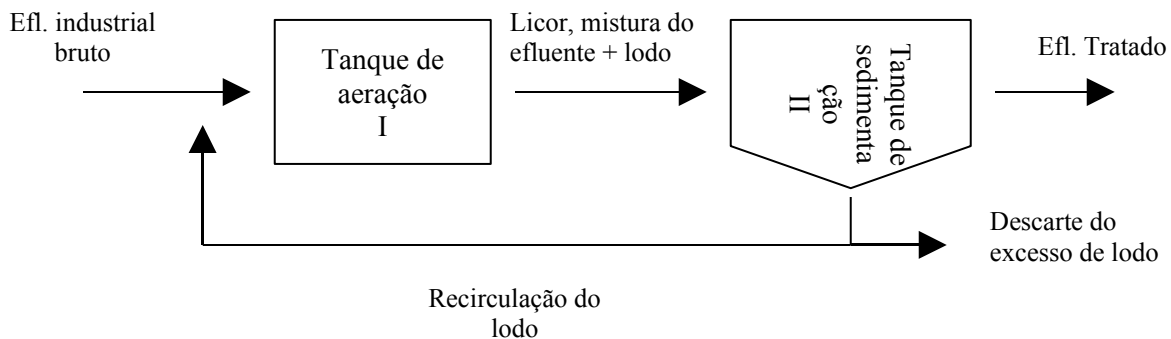


Figura 4- Esquema convencional de tratamento por lodo ativado. (Freire *et al.*, 2000).

O floco do lodo ativado é formado por componentes biológicos e componentes não biológicos. Os componentes biológicos consistem em uma variedade de bactérias (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Zoogloea*), fungos, protozoários e alguns metazoários (Jenkins, 2003).

O peróxido de hidrogênio utilizado pela indústria papeleira no branqueamento da polpa de papel pode afetar o tratamento biológico, se uma quantidade residual muito grande for lançada no sistema. O peróxido de hidrogênio é considerado um dos oxidantes mais prejudiciais à eficiência do tratamento biológico, pois inibe o crescimento bacteriano, mesmo em doses baixas (Dalvi & Silva, 2002). Este efeito negativo poderia ser diminuído através da oxidação de compostos fenólicos por estes resíduos. Os autores evidenciaram também, que resíduos de peróxido de hidrogênio e do ânion clorito em concentrações de 1,7mg/L causam

modificações significativas na estrutura do floco, deixando-o leve e disperso, tornando turvo o efluente.

Chandra *et al.* (2006) relatam que os pentaclorofenóis (PCPs) são considerados recalcitrantes à biodegradação aeróbia em função da alta concentração de cloro. Estes compostos são prejudiciais ao microrganismo, porque destroem a função da membrana diretamente na habilidade de desacoplar a fosforilação oxidativa. Apesar disso, alguns organismos foram isolados de meios contaminados com PCPs e mecanismos de degradação estão sendo elucidados. Microrganismos como *Flavobacterium* sp., *Mycobacterium chlorophenolicus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Pseudomonas* sp. e *Rhodococcus* sp. foram isolados por metabolizar completamente compostos clorados intermediados pela hidroquinona, sendo que os mais potentes e novos microrganismos degradadores de PCPs têm sido designados de *Bacillus cereus* ITRC S₆ e *Serratia marcescens* ITRC S₉.

Cordi *et al.* (2003) estudaram o impacto na microbiota do lodo ativado, durante a aclimação com diferentes efluentes industriais, e verificaram que houve uma adaptação desta aos efluentes da indústria papelreira e queijeira, demonstrando assim uma possível eficiência do processo. Verificaram que a população de rotíferos, protozoários ciliados e fixos, os quais são indicativos da eficiência do processo, aumentou bastante. Gilbride *et al.* (2006) concluíram que entender como os parâmetros abióticos afetam a comunidade microbiológica é um importante passo para melhor interpretar as mudanças percebidas durante a operação do processo.

Numerosas bactérias podem decompor monômeros de lignina, mas somente poucas linhagens são capazes de atacar a lignina obtida de diferentes processos da produção da polpa. Durante o ataque das bactérias à lignina, um número pequeno de compostos aromáticos como ácido varílico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxi benzóico e ácido siríngico são produzidos

(Bajpai & Bajpai, 1994). Os autores consideram ainda, que linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* são capazes de reduzir a cor de efluente de polpa *kraft* em 26-54% ou mais em condições aeróbias.

Buitrón *et al.* (1998) isolaram e identificaram os microrganismos presentes no lodo ativado envolvidos na degradação de polifenóis. Quatro tipos de bactérias gram-negativas foram identificadas como potenciais degradadoras de clorofenóis em lodo ativado aclimatizado: *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavonomas oryzihabitants* e *Chryseomonas luteola*.

Bactérias nitrificantes são capazes de desalogenar vários compostos alifáticos halogenados e compostos aromáticos encontrados no efluente da indústria papelreira. Produtos da desalogenação são menos tóxicos e mais facilmente degradáveis. Neste trabalho, Altinbas *et al.* (1999) utilizaram um sistema de lodo ativado, seguido de um processo de nitrificação para avaliar a remoção de matéria orgânica do efluente. Nos testes com lodo ativado, a eficiência na remoção de AOX aumentou de 15 para 33%; a remoção de carbono orgânico total (COT) subiu de 67 para 85% e a quantidade de cloro inorgânico aumentou de 4,5 para 8,5mg/L. No processo de nitrificação, a desalogenação não obteve resultados satisfatórios, a remoção de AOX foi de 5-25% e a remoção de NH₄ foi de 94-98%. Os resultados mostram que a performance da bactéria nitrificante é muito sensível ao efluente branqueado. Segundo Amor *et al.* (2005) o processo de nitrificação pode ser inibido na presença de compostos tóxicos, mesmo que em pequenas concentrações, causando um acúmulo de amônia e nitrito no meio.

Demirbas *et al.* (1999) estudaram a aplicação do lodo ativado no tratamento do cloro orgânico proveniente de efluente de indústria papelreira e determinaram o mecanismo de remoção de AOX pelo balanço de materiais:

⇒ AOX do afluente = AOX do efluente + AOX adsorvido no lodo + AOX metabolizado.

Os autores observaram que no tratamento em que não houve a reposição de lodo fresco continuamente, a maior remoção de AOX foi com o lodo que tinha maior tempo de retenção, a qual se deveu exclusivamente a ação de metabolização microbiológica. Já a baixa remoção de AOX em lodo com menor tempo de retenção foi justificada pela ação de adsorção. Resultados contrários foram observados no tratamento em que houve reposição contínua de lodo.

Schnell *et al.* (2000) estudaram o tratamento do efluente da etapa de branqueamento da polpa *Kraft* em escala de laboratório com lodo ativado, lagoa aerada e sistema sequencial de lagoas aeróbias/anaeróbias. Os resultados obtidos consistiram em uma alta remoção de compostos fenólicos policlorados, AOX, DQO e toxicidade, mostrando ser o tratamento biológico uma importante ferramenta na remoção deste tipo de resíduo.

Estudos do efeito do pré-tratamento do efluente de branqueamento com oxidação fotocatalítica com TiO₂, seguida de um tratamento com lodo ativado foram realizados por Balcioglu & Çeçen (1999). Os autores observaram que houve um aumento na biodegradabilidade e que a eficiência na fotocatalise é dependente da concentração de DQO no efluente. A aplicação da fotocatalise antes do biotratamento com lodo ativado mostrou-se não vantajoso. A aplicação após o biotratamento pode ser uma alternativa físico-química na remoção de compostos biorefratários.

2.3 Fungos com ação de decomposição

Apenas alguns fungos são capazes de mineralizar completamente a lignina até dióxido de carbono e água, sendo esta degradação realizada para facilitar o acesso do fungo aos demais polissacarídeos existentes na madeira (Putzke & Putzke, 2002).

Os fungos, de acordo com a sua habilidade em degradar a lignina, podem ser classificados em: fungos da degradação branca, fungos da degradação marrom e fungos da degradação macia. A degradação branca é a mais eficiente e a mais estudada. É causada por basidiomicetes e alguns ascomicetes, que são hábeis em degradar lignina e uma grande variedade de compostos aromáticos altamente recalcitrantes, devido à ação de suas enzimas ligninolíticas (Lo *et al.*, 2001; Barr & Aust, 1994; Boyle *et al.*, 1992; Leonowicz *et al.*, 1999; Tuomela *et al.*, 2000). Estes organismos podem ser promissores para futuras tecnologias de descoloração de efluentes, bem como a remoção por absorção de haletos orgânicos e diminuição de DQO (Levin *et al.*, 2002; Ragunathan & Swaminathan, 2004; Akhtar *et al.*, 1997). Fungos da degradação marrom são basidiomicetes que degradam celulose e hemicelulose (Kirk & Farrell, 1987). Os fungos da degradação macia são ascomicetes e deuteromicetes que degradam polissacarídeos sendo que as duas últimas classes, acima citadas, possuem capacidade limitada de degradação da lignina (Tuomela *et al.*, 2000). Curiosamente, os fungos não utilizam a lignina como fonte de carbono para crescer, mas degradam-na para obter a celulose no interior da fibra (Barr & Aust, 1994).

No filo basidiomicota estão reunidos os fungos mais evoluídos, englobando aproximadamente 22.244 espécies em 1.428 gêneros. A maioria das espécies forma um corpo de frutificação macroscópico com hifas modificadas que originam pseudotecidos, e estruturas de reprodução características chamadas de basídios, os quais são importantes estruturas de identificação sistemática (Putzke & Putzke, 1998).

O gênero *Pleurotus* pertence à classe dos Basidiomicetes, ordem Agaricales e família Polyporaceae. Caracteriza-se por apresentar em seu corpo de frutificação um talo não cêntrico

atado ao píleo, o qual se abre mostrando uma morfologia semelhante a uma ostra durante a morfogênese (Putzke & Putzke, 2002).

Em seu trabalho Bao *et al.* (2004) coletaram 25 espécies de *Pleurotus* no continente asiático, em função da ampla distribuição do gênero e por ser este continente o principal recurso genético de fungos comestíveis. Os autores classificaram o gênero *Pleurotus* em 5 grupos, biologicamente compatíveis (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus* e *P. salmoneostramineus*) e 7 espécies independentes e não compatíveis (*P. calyptratus*, *P. corticatus*, *P. dryinus*, *P. eryngii*, *P. nebrodensis*, *P. smithii* e *P. ulmarius*). As espécies *P. sajour-caju* e *P. sp. florida* são os mais comumente comercializados e ambos apresentaram características morfológicas similares ao *P. pulmonarius*, quando crescidos em laboratório, pertencendo assim ao grupo *Pleurotus pulmonarius*.

Segundo Rajarathnam & Bano (1987) *P. sajour-caju* (Figura 5) tem sido cultivado mundialmente devido a sua habilidade saprofítica de colonizar resíduos de plantas rapidamente e com alta produtividade. Os cogumelos são comestíveis e de aroma agradável, possuem grande valor nutricional, sendo ricos em proteínas, vitaminas e sais minerais. Seu complexo enzimático possibilita que sejam utilizados em diversas aplicações ambientais e biotecnológicas (Cohen *et al.*, 2002). Os autores Ragunathan & Swaminathan (2004) relatam que *P. ostreatus* e *P. sajour-caju* são conhecidos por descolorir efluente de polpa Kraft.



Figura 5- Foto de *Pleurotus sajor-caju* (DPB)

As principais enzimas ligninolíticas oxidativas são as fenol-oxidases lacases, manganês-peroxidases (MnP) e lignina-peroxidases (LiP) (Gill & Arora, 2003). Segundo Cohen *et al.* (2002), os fungos do gênero *Pleurotus* são dependentes da secreção destas enzimas ligninolíticas.

2.3.1 Enzimas ligninolíticas e seu uso potencial

O ataque fúngico à fragmentação inicial dos polímeros de lignina envolve várias enzimas, incluindo LiP, MnP e lacases, e resulta em produtos isolados de baixo peso molecular (Akhtar *et al.*, 1997). A atividade das enzimas ligninolíticas em vários fungos não cultiváveis é regulada por vários nutrientes, incluindo nitrogênio, carbono e manganês (Moreira *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 1997; Tien & Kirk, 1984; Pandey *et al.*, 2000); entretanto, nem todos os fungos produzem todas as três enzimas (Akhtar *et al.*, 1997).

- **Peroxidases**

A LiP (EC1.11.1.7) é uma glicoproteína, que contém grupos heme em sua molécula, secretada durante o metabolismo secundário, em resposta a limitação de nitrogênio. São oxidases fortes, capazes de catalizar a oxidação de fenóis e aminas aromáticas, éteres aromáticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pela remoção de um elétron, gerando

radicais fenoxi e radicais catiônicos ao mesmo tempo. O resultado é uma combustão enzimática em que as ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio são rompidas, despolimerizando o polímero e abrindo os anéis aromáticos (Akhtar *et al.*, 1997, Breen & Singleton, 1999).

Para oxidar o substrato as peroxidases necessitam de H_2O_2 extracelular como acceptor final de elétrons. Este peróxido é produzido pela glioxal oxidase, que oxida o glioxal e reduz o O_2 a H_2O_2 formando o ácido glioxílico (Akhtar *et al.*, 1997; Breen & Singleton, 1999), como mostrado na Figura 6.

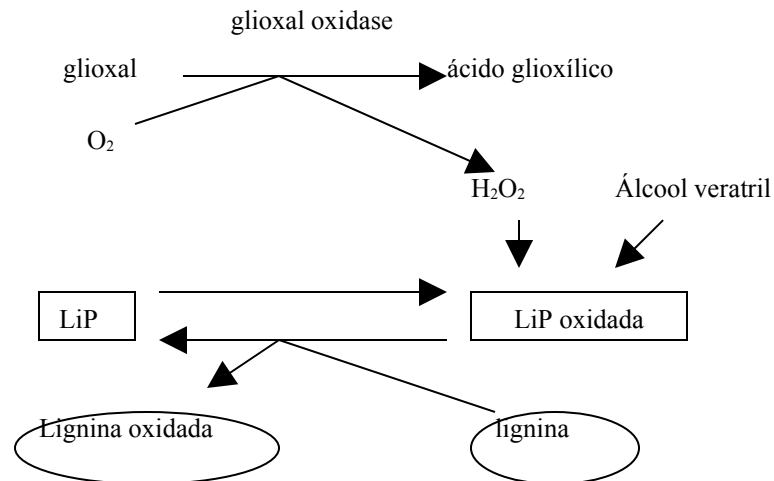


Figura 6-Mecanismo de ação da LiP (Breen & Singleton, 1999).

Em muitos casos os produtos químicos não estão diretamente acessíveis à enzima e a oxidação direta não pode acontecer. Assim, a adição de um composto químico que pode ser oxidado pela enzima, forma radicais livres que posteriormente oxidam o produto, resultando na oxidação indireta pela enzima. O álcool veratril é um exemplo de composto químico, produzido por alguns fungos, que funciona como uma substância oxidante (Barr & Aust, 1994; Min *et al.*, 2001).

A MnP, assim como a LiP, também é uma enzima glicosilada contendo grupos heme e que requer H_2O_2 no ciclo catalítico (Min *et al.*, 2001) e segundo Sasaki *et al.* (2001) é considerada uma enzima chave na ligninólise realizada pelos fungos da degradação branca.

A Figura 7 mostra que a MnP oxida o Mn^{2+} a Mn^{3+} que torna a oxidar a lignina. Por outro lado, o Mn^{3+} pode também oxidar ácidos orgânicos quelantes como o lactato (Akhtar *et al.*, 1997; Sundaramoorthy *et al.*, 1994; Ha *et al.*, 2001) e malonato, formando complexos capazes de oxidar compostos fenólicos (Breen & Singleton, 1999; Glenn *et al.*, 1983).

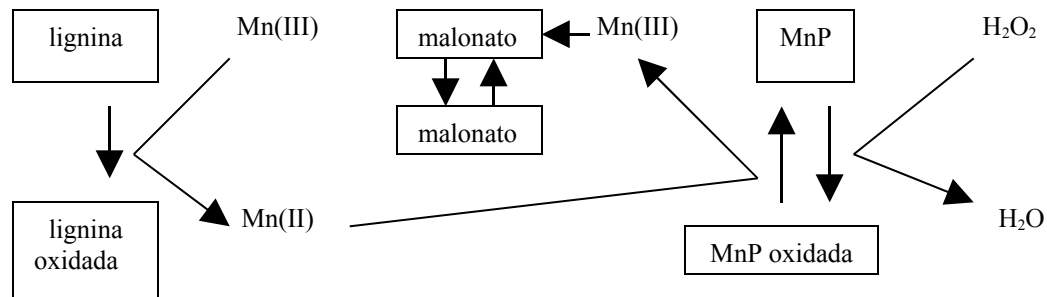


Figura 7- Mecanismo de ação da MnP. (Breen & Singleton, 1999).

A LiP e MnP são produzidas em resposta a baixos níveis de nutrientes, como carbono e nitrogênio (Tien & Kirk, 1984; Pandey *et al.*, 1999). Fungos como *P. sajor-caju* e *L. edodes* apresentam níveis de atividade de MnP variáveis em relação à concentração de nitrogênio, o que pode ser explicado em parte pela habilidade dos dois cogumelos de crescerem em diferentes resíduos lignocelulósicos (Zadrazil & Puniya, 1994). Sanjust *et al.* (1991) observaram que os títulos enzimáticos e o tempo de aparecimento de MnP foram afetados pela concentração de manganês no meio de cultura. Níveis mais altos de enzima foram obtidos em culturas suplementadas com 15 ppm de manganês. Já os pesquisadores Zadrazil & Puniya (1994) relataram que a biomassa fúngica produzida em culturas contendo 30 e 100 ppm de

manganês foi 58% e 26% mais alta, respectivamente, quando comparada com culturas não suplementadas após 21 dias de crescimento.

O uso de MnP em escala piloto na etapa de clareamento da polpa de papel, além de aumentar o brilho e diminuir a lignina, melhora a qualidade física do papel como taxa de tensão e taxa de rompimento (Barr & Aust, 1994).

Velázquez-Cedeño *et al.* (2002) relatam que o aumento da atividade de MnP produzida por *P. pulmonarius* e *P. ostreatus* ocorre juntamente com a diminuição de fenóis solúveis em água, entre o quarto e oitavo dia e concluem que MnP e lacases agem juntas na degradação de compostos fenólicos de polpa de café.

Camarero *et al.* (1999) mostraram em estudos que há uma terceira peroxidase ligninolítica envolvida na degradação da lignina produzida por *P. eryngii*. Esta enzima foi chamada de versátil peroxidase, pois possui as características tanto da MnP (oxidação do Mn^{2+} a Mn^{3+}) quanto da LiP (oxidação de substratos aromáticos não fenólicos via radicais). Cohen *et al.* (2002) sugerem que *Pleurotus spp.* não produzem LiP, somente MnP, versátil peroxidase (VP) e lacases.

- **Veratril Álcool Oxidase**

A veratril álcool oxidase (VAO) é um componente do sistema enzimático das peroxidases. É produto secundário do metabolismo fúngico e tem sido reportado como estimulador da degradação da lignina. A função da VAO é reciclar a LiP e prevenir sua inativação pelo excesso de H_2O_2 pois a LiP, quando em substratos pobres e com excesso de

H₂O₂ forma um tipo de LiP inativa. A VAO é favorável a esta forma de LiP, convertendo a LiP inativa à sua forma original (Breen & Singleton, 1999).

- **Lacases**

As lacases têm sido objeto de estudos contínuos desde o século XIX. Foram descobertas nos exsudatos da árvore japonesa produtora de verniz *Rhus vernicifera* e pertencem ao pequeno grupo de enzimas chamadas oxidases do cobre azul, que utilizam oxigênio como aceptor de elétrons para remover hidrogênio de grupos fenólicos (Thurston, 1994). São encontradas na maioria dos fungos da degradação branca descritos até o momento, sendo também produzidas por outros tipos de fungos, algumas bactérias e insetos (Thurston, 1994, Gianfreda *et al.*, 1999).

As lacases são fenol-oxidases que têm um papel importante na degradação da lignina e na remoção de fenóis potencialmente tóxicos produzidos durante sua degradação (Thurston, 1994; Fountoulakis *et al.*, 2002). Elas podem interagir diretamente com o composto fenólico da lignina ou, na presença de um mediador, reagir com uma ampla faixa de substratos (Bourbonnais *et al.*, 1997).

O 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfônico (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-hidroxyphthalimide (HPI) e ácido vialurônico (VLA) têm sido observados como substratos artificiais para as lacases agindo como mediadores e possibilitando a oxidação de compostos não fenólicos da lignina que não são substratos próprios para estas enzimas (Cohen *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 1999).

O uso de mediadores combinados com lacases tem ganhado atenção especial para o uso no branqueamento da polpa *Kraft* (Bourbonnais & Paice, 1990; Baiocco *et al.*, 2003).

A Figura 8 mostra um esquema de como ocorre a oxidação dos resíduos fenólicos com ou sem a interferência de mediadores.

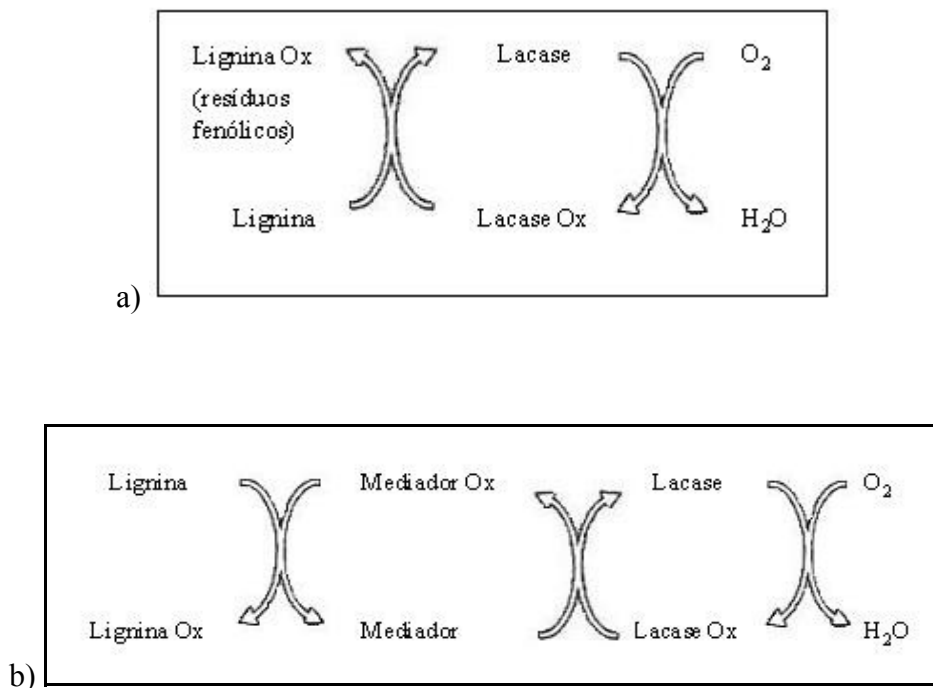


Figura 8-Mecanismo de ação das lacases (a) e da enzima com a interferência de um mediador (b). (Breen & Singleton, 1999; Baiocco *et al.*, 2003)

Devido às múltiplas ações dos sistemas mediados por lacases elas tornaram-se alternativas promissoras para o uso em processos biotecnológicos de interesse ambiental como o branqueamento de polpa, a descoloração de corantes têxteis e a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Tinoco *et al.*, 2001). Entretanto, Bourbonnais *et al.* (1997) verificaram que lacases sozinhas têm efeito limitado no clareamento da polpa em função dos compostos fenólicos da lignina.

A redução da concentração de fenol parece envolver outros mecanismos, pois Tsioulpas *et al.* (2002) observaram que as linhagens de *Pleurotus* sp que mais reduziram a concentração de fenol não foram as que mais produziram lacases.

Segundo Sanjust *et al.* (1991), a produção de lacases pode ser induzida por compostos fenólicos, aminas aromáticas e por outros compostos metabolicamente relacionados à lignina. Na presença de um indutor, os fungos secretam grande quantidade de lacases ao meio líquido. No estudo que desenvolveram, os autores observaram que a produção de lacases teve uma fase lag de 10 ou 15 dias de crescimento, atingindo o pico em 25 dias, decrescendo sua produção vagarosamente. Koroljova-Skorobogat'ko *et al.* (1998) estudaram a produção de lacases em cultivos líquidos de um isolado de *Coriolus hirsutus* em presença de diferentes indutores como a siringaldazina, 3,4-xilidina, ácido húmico, ácido cafeico, guaiacol, ácido sinapínico, *o*-toluidina e composto de lignina quelante. Destes, siringaldazina e lignina quelante mostraram, respectivamente, 1000% e 450% de aumento na produção de lacases com relação ao controle.

A atividade de lacases em *P. sajor-caju* é afetada pela concentração de nitrogênio e carbono e pela adição de cobre e manganês no meio de crescimento (Silva *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2002). Baldrian & Gabriel (2002) desenvolveram importantes estudos de secreção de lacases, em meio líquido, com limitação de nitrogênio na presença de metais, demonstrando que a adição de cobre ou cádmio resulta na indução das mesmas, independentemente do tempo em que este é adicionado ao meio, aumentando também a estabilidade destas enzimas.

Em culturas de *P. ostreatus*, onde houve a adição de CuSO₄ ao meio de cultivo, ocorreu um forte aumento na atividade total de lacases e na produção de suas isoenzimas (Giardina *et al.*, 1999). As isoenzimas chamadas de “lacases amarelas” são capazes de oxidar compostos

não fenólicos na ausência de mediadores, pois se sugere que elas possam conter mediadores endógenos derivados da lignina (Pozdnyakova *et al.*, 2004).

Archibald & Roy (1992) sugerem que as lacases de *Trametes versicolor*, na presença de substâncias fenólicas, são capazes de produzir quelantes que reduzem o Mn(II) a Mn(III), similares aos produzidos pela MnP e que foram descritas como responsáveis pela oxidação de efluentes branqueados.

Segundo Lo *et al.* (2001), os efeitos de vários dos monômeros fenólicos no crescimento do cogumelo comestível *P. sajor-caju* e na produção de lacases podem ser comparados. Os autores observaram que enquanto 4-hidroxibenzaldeído e vanilina inibem o crescimento do fungo, culturas suplementadas com estes componentes mostraram um grande aumento de lacases.

Sanjust *et al.* (1991) observaram em seus estudos que *P. ostreatus* e *P. floridae* secretaram, em cultivo submerso, uma grande quantidade de lacases em condições estáticas, porém *P. eryngii* e *P. sajor-caju* somente produziram estas enzimas sob agitação.

2.3.2 Tratamento fúngico de efluentes contendo compostos fenólicos

Os fungos da degradação branca, que têm-se mostrado eficientes na completa degradação da lignina, podem ser empregados em uma rápida descoloração dos efluentes (Bajpai & Bajpai, 1994). Para Rodríguez *et al.* (2003) *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, e *Pleurotus spp.* são os fungos identificados como grandes potencialidades para serem empregados no descoloramento de efluentes industriais.

Os testes de biodegradabilidade de Lima *et al.* (2006) com corantes têxteis tratados com *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* e *T. versicolor*, em meio sólido e líquido, obtiveram uma

eficiência de remoção de 98,07% e 97,10% para os corantes reativos tratados com *P. chrysosporium* e *T. versicolor*, respectivamente. Para o corante ácido tratado com *P. ostreatus* a remoção foi de 91,10%.

Tychanowicz *et al.* (2004) estudaram a descoloração de corantes industriais por *P. pulmonarius*, em culturas em estado sólido, demonstrando a aplicação do fungo como uma opção atrativa para o tratamento de efluentes industriais contaminados com corantes.

O efeito de várias condições de cultivo sobre a formação de aglomerados do fungo *F. troglitii* ATCC 200800 na descoloração do corante Antrazone Blue foi estudada por Yesilada *et al.* (2003). Os autores observaram que os aglomerados deste fungo são capazes de descolorir o corante que normalmente é tóxico em baixas concentrações.

Liu *et al.* (2004) testaram quatro linhagens de fungos da degradação branca e uma linhagem de lacase, na descoloração de corantes azo, antraquinona e trifenilmetano. Observaram que *T. versicolor* foi a linhagem mais eficiente nas condições de estudo. Nenhuma das linhagens mostrou atividade de LiP ou VAO e nenhum dos corantes foi descolorido completamente pela lacase isoladamente. Isso mostra que provavelmente existam outras fenol-oxidases, como Mn-dependente peroxidase e VP, envolvidas na descoloração.

Sanjust *et al.* (1991) evidenciaram que entre as espécies de *Pleurotus* que mais descoloriram o efluente da indústria de óleo de oliva, com adição de sacarose ou lactose foram as de *P. floridae* (40 e 60%) e *P. sajor- caju* (20%). Já Fountoulakis *et al.* (2002) observaram que apenas houve descoloração deste tipo de resíduo nos ensaios com o efluente estéril. A redução da cor iniciou após a degradação dos compostos fenólicos, o que sugere que os mesmos eram responsáveis pela cor escura do efluente.

Lacases de *T. versicolor* e *P. cinnabarinus* com HBT como mediador atingiram 20% de descoloração do resíduo lignocelulósico. O decréscimo do número Kappa de 9 para 3 também foi verificado pelos autores (Camarero *et al.*, 2004).

Rodríguez *et al.* (2003) determinaram a absorção de cor pelo micélio de *Pleurotus ostreatus* usando os aglomerados crescidos em resíduo de polpa de café e vinhaça. Os autores observaram um efeito inibitório do resíduo a partir de 50% de concentração, sendo estas diferenças significativas quando comparadas com o crescimento do fungo em concentrações de 100% de resíduo com o controle. Os autores relacionam este efeito inibitório ao efeito tóxico, em função da presença de compostos recalcitrantes e inibidores de crescimento, como os fenóis, provenientes da pasteurização da polpa de café.

Nagarathnamma & Bajpai (1999) estudaram a descoloração do efluente de branqueamento de polpa de papel. *Rhizopus oryzae* foi o fungo que atingiu a maior descoloração (92%) em 24h nas condições do estudo.

Estudos mostram que 1mM de fenol no meio não apresenta efeito inibitório na formação do esporóforo de *Pleurotus* spp., e que corpos de frutificação podem ser formados em concentrações de até 4mM de fenol no meio de cultivo, o que justifica a possibilidade de aplicar *Pleurotus* spp em processos de descontaminação (Upadhyay & Hofrichter, 1993; Atagana, 2004).

Bollag *et al.* (1988) observaram que a composição química dos efluentes lançados por muitas indústrias pode inibir o desenvolvimento de fungos. Entretanto, reações de detoxificação podem prevenir o acúmulo de compostos fenólicos, permitindo desta maneira o crescimento dos fungos.

O desenvolvimento de *P. sajor-caju* é notadamente inibido por 4-hidroxibenzaldeído e vanilina, e culturas suplementadas com estes dois compostos exibem um acréscimo na atividade enzimática específica de lacases (Lo *et al.*, 2001).

Com o tratamento fúngico do efluente da etapa de branqueamento da polpa *Kraft* com *Rhizopus oryzae* verificou-se completa remoção de 2-clorofenol, 2,6-diclorofenol, 5-cloroguaiacol, 4-clorocatecol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,5-diclorocatecol, 4,5-dicloroguaiacol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,4,5- tricloroguaiacol, 4,5,6- tricloroguaiacol, triclorosiringaldeído, e 2,6-diclorosiringaldeído (Nagarathnamma e Bajpai, 1999).

Para Fountoulakis *et al.* (2002), os principais problemas do tratamento do resíduo líquido do processamento da oliva são os fenóis e a alta concentração da DQO. Os fenóis da oliva são semelhantes estruturalmente à lignina e, assim, de difícil biodegradação. A capacidade do fungo *P. ostreatus* de degradar os fenóis em diferentes condições foi estudada e observou-se que ele degradou 78,3% dos fenóis, em meio estéril constituído de 50% de efluente de polpa de oliva. Verificou-se que as arqueias metanogênicas são afetadas pelos compostos fenólicos e que a digestão anaeróbia foi aumentada com o pré-tratamento fúngico do resíduo líquido.

Aggelis *et al.* (2003) verificaram que *P. ostreatus* cresceu bem no efluente de óleo de oliva diluído e estéril, com ou sem adição de nutrientes, e causou uma significativa remoção de fenóis durante o crescimento. Entretanto, em concentrações baixas de fenol, a porcentagem de remoção do mesmo foi maior. Os autores, pelo fato de terem detectado apenas lacases entre as demais fenol-oxidases, atribuíram a estas toda a degradação do fenol. Observaram também uma absorção de fenol, em micélio seco, de 105mg/g de micélio seco, o que correspondeu a 8% da concentração inicial de fenol. O efluente estéril foi considerado melhor para a

degradação do fenol, provavelmente por causar alterações físico-químicas, como oxidação de fenol à quinona, seguido pela precipitação. Cerca de 25% dos fenóis precipitaram, enquanto a DQO dissolvida decresceu muito pouco após a esterilização. Conseqüentemente, quando o efluente não estéril foi usado, a redução de fenol não foi satisfatória.

O fungo *P. ostreatoroseus* foi testado no tratamento de efluente do primeiro estágio de extração alcalina da etapa de branqueamento da polpa *Kraft*. Santos (1997) observou que a maior descoloração ocorreu com a maior quantidade de fungo inoculada, e que a agitação e o ajuste inicial de pH afetaram negativamente a descoloração e positivamente a remoção de fenóis totais. A máxima descoloração atingida foi de 61,2% com 10% de fungo, sem agitação, sem indução enzimática e sem ajuste de pH, após 120 h, e a máxima redução de fenóis foi de 99,9%, após 96h com 10% de inóculo, sem agitação e indução e com ajuste de pH.

Experimentos com *Fomes lividus*, em escala de laboratório, removeram 66,7% da cor do efluente da indústria papelreira, após 4 dias de incubação. A liberação de cloro inorgânico foi aumentada em 227% (756mg/L) durante 10 dias, e a DQO foi reduzida em 59,7%. Com *Trametes versicolor* a remoção da cor foi de 63,9% em 4 dias, e a liberação de cloro inorgânico aumentou 197% (695mg/L) e a DQO reduziu 67%. Em escala piloto, *F. lividus* removeu a cor em 72,8% durante 6 dias, 57,7% (369 mg/L) de cloro inorgânico foi liberado no 7º dia, e a redução da DQO foi de 59,3%. *T. versicolor* removeu 68% da cor, aumentou 103% o cloro inorgânico e reduziu 69,2% da DQO (Selvam *et al.*, 2002). Os autores referem que o estudo foi o primeiro a reportar *F. lividus* para descloração da lignina em efluente da indústria papelreira e sugerem, por essa razão, que este organismo possa ser componente de uma metodologia muito simples, barata e eficiente para remover cloro orgânico do efluente.

No trabalho desenvolvido por Rodríguez *et al.* (2003), para remoção de cor da vinhaça e polpa de café, a maior parte da cor desapareceu nos primeiros 10 dias, coincidindo com o período de maior atividade de lacases. Cerca de 39 e 44% de cor foi reduzida em 10 dias de tratamento, não se evidenciando uma absorção significativa de cor pelo micélio. Para o efluente da vinhaça, a remoção de cor tem estreita relação com a remoção de DQO, mostrando que grande parte dos compostos coloridos é de origem orgânica, o que não ocorre com o efluente da polpa de café.

No tratamento de efluente de polpa de papel com *Penicillium* spp., Taseli & Gokcay (1999) encontraram que o fungo é capaz de remover o cloro dos efluentes de branqueamento. Testes com ácido tricloroacético, 2-clorofenol e pentaclorofenol sugerem que a descoloração ocorre melhor em aromáticos clorados, se comparados com os alifáticos, e que os compostos circulares com numerosos átomos de cloro são mais bem degradados do que aqueles com poucos átomos de cloro. Ainda, os fenóis de menor massa molecular são completamente removidos, reduzindo a toxicidade do efluente.

O pré-tratamento fúngico de efluentes fenólicos sob condições aeróbias mostram ser possível uma redução de fenol (51-100%), boa descoloração (31-100%), redução de DQO superior a 85,4% e produção de enzimas (Coulibaly, 2003). Efeitos benéficos do pré-tratamento fúngico do efluente da indústria papelreira com subsequente digestão anaeróbia têm sido relatados. A digestão anaeróbia de polpa *kraft* pré-tratada com *P. chrysosporium* teve um aumento na degradação de compostos de alto peso molecular (79%).

A adição de uma fonte carbono e uma fonte de nitrogênio podem promover a descoloração do efluente pelo fungo *Aspergillus niger* em 19% e reduzir, aproximadamente, 43% de DBO e 41% DQO, após dois dias de incubação. Entretanto, o fungo da degradação

branca *S. commune* é capaz de descolorir o efluente, mas só é capaz de degradar a lignina com um suplemento de carbono. A adição de carbono e nitrogênio não só promove a eficiente descoloração, como também resulta na redução de DBO e DQO do efluente. A sacarose foi encontrada como sendo a melhor fonte de carbono para a degradação da lignina. *S. commune* removeu, nas condições de estudo, 90% de cor do efluente, 70% de DBO e 72% de DQO, em dois dias de incubação (Bajpai & Bajpai, 1994).

É essencial adequar a concentração de uma fonte de carbono, já que o excesso desta, não só não aumenta a degradação como também pode inibir a degradação da lignina. Baixas concentrações de carbono (1g/L) e nitrogênio (0,2g/L) no meio podem promover a secreção de enzimas ligninolíticas e a rápida degradação da lignina (Wu, *et al.*, 2005).

Observações feitas por Bano & Rajarathnam (1988) indicaram que *P. sajor-caju*, juntamente com *P. flabellatus* foram bons coletores de metais pesados e também mostraram as mais altas taxas de degradação do meio. Isto levou à conclusão de que a mobilização de metais pesados do meio e a subsequente transferência para corpos de frutificação estão relacionados com o grau de degradação do meio. Entretanto, os resultados indicaram que os corpos de frutificação de *P. sajor-caju*, crescidos em resíduos celulósicos, não mostraram bioacumulação de metais pesados. Eaton *et al.* (1982) sugerem ainda que o tratamento de efluentes fenólicos com estes fungos imobilizados pode, inclusive, degradar compostos tóxicos.

Soares *et al.* (2005) estudaram a habilidade de diferentes fungos da degradação branca em degradar o composto nonilfenol, um ruitor endócrino, em meio sólido. Os fungos *Bjerkandera* sp. BOL13 e *T. versicolor* foram, entre os fungos testados, os mais resistentes à toxicidade e principalmente, capazes de remover altas taxas do composto tóxico. A atividade de lacases foi claramente desencadeada pela presença de nonilfenol no meio inoculado com *T.*

versicolor, o que pode explicar a boa remoção do composto durante os primeiros dias de incubação. Já o fungo *Bjerkandera* não mostrou níveis significantes de atividade enzimática, em comparação com os controles (sem nonilfenol). Entretanto, a produção de radicais hidroxilas e radicais acil observados, pode sugerir que estes compostos sejam os responsáveis pelo ataque inicial na degradação do composto xenobiótico, visto que há um retardo no crescimento deste fungo (provavelmente pela toxicidade do composto) e explica por que a atividade enzimática alcança taxas similares ao *T. versicolor*, após sete dias de incubação, quando a concentração de nonilfenol decresceu 75%.

Em seus estudos, Reddy & Gold (2000) mostraram que o fungo da degradação branca *P. chrysosporium* é capaz de degradar o pentaclorofenol pela combinação do sistema oxidativo extracelular e reações redutoras de descloração intracelular. Segundo os autores, as enzimas LiP e MnP são capazes de realizar somente a primeira oxidação da molécula que segue sendo metabolizada por sucessivas reações redutoras de descloração.

2.3.3 Cultivo em meio líquido

O cultivo em meio líquido de basidiomicetes apresenta-se como uma alternativa no processo produtivo, visto que, comparado com o cultivo sólido, permite produzir uma quantidade maior de massa em menos tempo, além de favorecer a produção de enzimas ligninolíticas importantes (Guillén-Navarro *et al.*, 1998).

Durante o crescimento de basidiomicetes em cultivos submersos, existe a formação de aglomerados de micélio (*pellets*), que podem ser detrimenais ao crescimento e à secreção de enzimas. Moreira *et al.* (2004) controlaram o diâmetro dos *pellets* variando a frequência de pulso de ar injetado em um reator de leito fluidizado. Quanto menos freqüente a pulsação de ar,

maior era o diâmetro do *pellet* e menor a atividade de MnP. Segundo Moreira *et al.* (2004) e Ha *et al.* (2001) o aumento da atividade enzimática está relacionado à condição de maior superfície ativa do micélio, permitindo maior disponibilidade de oxigênio, considerado um fator crítico para a síntese de enzimas ligninolíticas.

Wesenberg *et al.* (2003) concluíram, em seu trabalho, que a produção de LiP e MnP é geralmente ótima em altas taxas de oxigênio, mas é reprimida pela agitação em cultivos submersos, enquanto a produção de lacases é freqüentemente aumentada pela agitação. Ainda, estes autores referem que, freqüentemente, mais de uma isoforma destas enzimas são expressas em diferentes taxas e condições de cultivo.

Estudos de crescimento de *Pleurotus ostreatus* realizados por Guillén-Navarro *et al.* (1998), em cultura líquida sob agitação, visando à produção de biomassa e de enzimas ligninolíticas, mostraram valores máximos de velocidade específica de crescimento (μ) iguais a 0,023 em pH inicial de 4,5 e 5,5 à temperatura de 26°C, com valores de massa seca respectivamente de 3,89 e 3,91g/L. Nesse trabalho, verificou-se um aumento de biomassa em maiores concentrações de glicose, mas com diminuição no rendimento. Com relação às ligninases, detectaram-se lacases (307 U/L) e MnP (41 U/L), mas LiP não foi detectada.

Sanjust *et al.* (1991) verificaram que algumas espécies de *Pleurotus* cresceram rápido em efluente puro proveniente da produção de óleo de oliva, e que o micélio não demonstrou alteração morfológica, se comparado ao crescido por substratos convencionais. Já Fountoulakis *et al.* (2002) observaram que o fungo foi capaz de crescer com o efluente como único substrato.

Nos estudos realizados por Bettin (2005) a linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju* produziu lacases na presença de efluentes provenientes da industrialização de papel e polpa de celulose,

na presença de fenol, siringaldazina, vanilina, ácido benzóico e ácido gálico e, ainda, quando estes compostos aromáticos foram combinados com CuSO_4 , ocorreram efeitos aditivos na atividade de lacases.

Nüske *et al.* (2002) estudaram o escalonamento para a produção de MnP, em cultivos líquidos, até um volume de 300L com uma linhagem de *Nematoloma frowardii*. Nesse estudo, foi verificado que acetato de sódio como fonte de carbono aumenta a secreção da MnP em relação à glicose. Estes autores propuseram que o acetado teve uma função importante no crescimento de fungos da degradação branca, visto que muitas madeiras apresentam alto grau de acetilação, quando ricas em xilanos. Uma importante observação foi a inexistência de perda da atividade, quando o escalonamento passou de 5 para 300L.

Cultivos submersos de *Pleurotus pulmomaris* foram desenvolvidos para a produção do álcool insaturado aromático 1-octa-3-ol, que é o responsável pela maior parte do aroma volátil da maioria das espécies de cogumelos (Belinky *et al.*, 1994). Verificou-se que a adição de substratos ricos em nitrogênio e ácidos graxos, como a farinha de soja e o óleo de soja, aumentou em duas vezes a massa, chegando a valores de $7,2 \pm 0,8$ g/L que consistiu em 7 vezes a quantidade de 1-octa-3-ol comparativamente a um meio sem estes substratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem

Utilizou-se a linhagem de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 empregada na produção comercial de cogumelos, pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Processos Biotecnológicos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

3.2 Meios de Cultivo

- **Solução Salina (Ss)**

A solução mineral de nutrientes e micronutrientes concentrada dez vezes (10x) utilizada nos meios de cultivo foi baseada na formulação de Mandels & Reese (1957) e constituiu-se em g/L: KH_2PO_4 , 20 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g; uréia, 3 g; CaCl_2 , 4 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 15,6 mg; FeSO_4 , 50 mg; ZnSO_4 14 mg; CoCl_2 , 20 mg; H_2O destilada q.s.p. 1 litro.

- **Meio de Manutenção (MM)**

O meio de manutenção continha 2% (p/v) de serragem de *Pinus* sp moída; 2% (p/v) de farelo de trigo moído; 2% (p/v) de ágar-ágar; 0,2% de Ca_2CO_3 ; H_2O destilada q.s.p. 100mL. O meio foi autoclavado a 1 atm por 15 min.

3.2.1 Meios de cultivo utilizados nos ensaios em frascos agitados

Em todos os ensaios realizados em frascos agitados, os meios foram autoclavados a 1 atm por 15 minutos.

- **Meio para pré-inóculo (PA)**

O meio líquido para preparação do pré-inóculo utilizado nos ensaios com frascos agitados foi constituído de 10mL de Ss; 0,1g de proteína de soja; 0,5g de glicose; H₂O destilada q.s.p. 100mL. Após a esterilização em autoclave, foi adicionado 0,1mL de solução de gentamicina (4,4 mg/mL).

- **Meio líquido para crescimento e adaptação na presença de fenol (LAF)**

Utilizou-se um meio para adaptação do micélio ao fenol, constituído de 10mL de Ss; 1g de sacarose; 0,1g de caseína; 1mL de uma solução de fenol (0,5µg/mL); H₂O destilada q.s.p. 100mL. Após a esterilização em autoclave foi adicionado 0,1mL de solução de gentamicina (4,4mg/mL) e 0,1mL de solução de benomil (6g/L).

Em alguns experimentos utilizou-se proteína de soja como fonte de nitrogênio em substituição à caseína e glicose como fonte de carbono, em substituição à sacarose.

- **Meio líquido para crescimento na presença de fenol (LCF)**

Este meio continha 45mL de solução de fenol (400mg/L); 5mL de Ss (20x) e 0,5g de sacarose.

- **Meio líquido para crescimento na presença de efluente (LCE)**

O meio contendo efluente da IPC para estudos em frascos agitados foi constituído de 52,8mL de uma solução autoclavada, composta de 40mL de efluente da IPC; 10mL de Ss; 1mL de uma solução de CuSO₄ (0,156mg/mL); 1mL de uma solução de fenol (0,5µg/mL); 0,1mL de

solução de gentamicina (4,4mg/mL); 0,1mL de solução de benomil (6g/L) ; 0,01g de proteína de soja e 1g de glicose.

Cabe salientar que o efluente utilizado nos meios de cultivo dos ensaios continha diferentes concentrações de fenóis totais, visto que o efluente era produzido a partir de uma etapa de branqueamento e uma etapa de delignificação da polpa (responsável pela grande parte dos fenóis presentes). De acordo com a produtividade da empresa, o efluente continha diferentes proporções destas etapas, variando assim a concentração de fenóis totais.

- **Meio para teste de adsorção de fenóis totais pela biomassa fúngica (ADS)**

O meio utilizado para testar a capacidade de adsorção de fenóis totais pela biomassa fúngica foi constituído de 1g de glicose; 0,01g de proteína de soja; 10mL de Ss; 93,8mL de efluente da IPC (60mg/L de fenóis totais); 1mL de CuSO₄(100mg/L); 0,1mL de solução de gentamicina (4,4mg/mL) e 0,1mL de solução de benomil (6g/L).

3.2.2 Meios de cultivo para ensaios em reator de bancada

- **Meio para inóculo em reator de bancada (PR)**

O meio líquido para preparação do inóculo foi constituído de 10ml de Ss; 0,1g de proteína de soja; 0,5g de glicose; H₂O destilada q.s.p. 100mL. Após ser autoclavado o meio recebeu 0,1mL de solução de gentamicina (4,4mg/mL).

Em outro ensaio foi adicionado 5mL de efluente da IPC no inóculo para propiciar uma adaptação do fungo aos compostos do efluente.

- **Meio líquido para crescimento na presença de efluente (LE)**

O meio líquido de ensaio continha 8g de KH_2PO_4 ; 5,6g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,6g de CaCl_2 ; 1,2g de MgSO_4 ; 1,2g de uréia; 0,4mL de solução de micronutrientes; 190mL de água destilada; 40g de glicose; 0,4g de proteína de soja; 40mL de solução de CuSO_4 (1,56mg/L); 3.610mL de efluente da IPC. O meio foi autoclavado por 30min a 1atm, exceto a glicose e a água destilada, que foram autoclavadas por 15min a 1 atm.

3.2.3 Meio para tratamento bacteriano aeróbio, em frascos agitados e em reator de bancada, sem tratamento fúngico do efluente

O meio para o ensaio aeróbio continha 76,85% de efluente da IPC; 3,15% de Ss (concentrada 20X); 20% de biomassa da estação de tratamento de efluentes (ETE) de uma indústria papelreira com uma DQO de 585,07mg/L. Nos ensaios em reator de bancada utilizou-se 3,15% de Ss (concentrada 20X); 7,5% de biomassa bacteriana e 89,35% de efluente.

3.2.4 Meio para tratamento bacteriano aeróbio, em frascos agitados e em reator de bancada, após tratamento fúngico do efluente

O meio para o ensaio aeróbio continha 76,85% de efluente da IPC pré-tratado pelo fungo *P. sajor-caju*; 3,15% de Ss (concentrada 20x); 20% de biomassa da ETE com uma DQO de 585,07mg/L. Nos ensaios em reator de bancada utilizou-se 3,15% de Ss (concentrada 20X), 7,5% de biomassa bacteriana e 89,35% de efluente pré-tratado pelo fungo.

3.3 Condições de Cultivo

3.3.1 Manutenção de Linhagens

Um disco de 4mm de meio colonizado com a linhagem *de P. sajor-caju* foi transferido para placas contendo MM. As placas foram mantidas a $\pm 28^{\circ}\text{C}$, durante 8 dias e armazenadas a 4°C .

3.3.2 Preparação do pré-inóculo para os ensaios em frascos agitados

Para preparação do pré-inóculo, dois discos de 1,5 cm de diâmetro de colônias de oito dias crescidas no MM foram dispostos em frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 100mL de PA e 15 esferas de vidro com 0,5cm de diâmetro. Os frascos foram mantidos em agitação (180 rpm) a 28°C , durante 7 dias.

3.3.3 Adaptação para crescimento em meio contendo fenol.

Frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 95mL de meio LAF foram inoculados com 5mL de suspensão obtidas a partir dos frascos de pré-inóculo. Os controles consistiram de frascos sem inóculo. O cultivo foi mantido sob agitação a 180 rpm, 28°C , durante 48 horas.

3.3.4 Estudos em frascos agitados para avaliar a remoção de fenol

Após 48 horas de crescimento e adaptação da biomassa fúngica ao fenol no meio LAF, 50mL dos cultivos e controles foram adicionados a 50mL do meio LCF. Amostras de 2mL foram retiradas, de 8 em 8 horas, para a determinação de pH, fenóis totais e atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata. Alternativamente, a suspensão após o crescimento foi reutilizada para a remoção de fenol.

3.3.5 Estudos em frascos agitados para avaliar a remoção de fenóis totais do efluente da IPC

Após 48 horas de crescimento e adaptação da biomassa fúngica ao fenol em meio LAF, 37,8mL do cultivo foram adicionados a 52,2mL de meio LCE. Amostras de 2mL foram retiradas, de oito em oito horas, para a determinação de pH, fenóis totais e atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.6 Preparo do inóculo para os estudos em reator de bancada

Para o preparo do inóculo, dois discos de 1,5cm de diâmetro de colônias de 8 dias crescidas no MM foram dispostos em frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 100mL do meio PR e 15 esferas de vidro de 0,5cm de diâmetro. Os frascos foram mantidos em agitação (180 rpm), a 28°C, durante 3 dias.

3.3.7 Avaliação em reator de bancada da remoção de fenóis totais do efluente da IPC

Após 3 dias de crescimento no meio PR, 200mL da suspensão fúngica foram adicionados ao reator de bancada (capacidade para 5L) contendo 3.800mL do meio LE. O reator utilizado (Figura 9) foi construído em um projeto com financiamento do PADCT-CNPq, pela Mecatrônica-SENAI – Caxias do Sul e a Universidade de Caxias do Sul. Este apresenta controles de agitação, temperatura, oxigênio dissolvido e pH. A agitação é possibilitada por um sistema de quatro pás paralelas, com 2,5cm de largura, distanciadas uma da outra em 3,5cm. A distribuição do ar injetado é feita por um cilindro circular oco e com furos de 1,0mm distribuídos em toda sua extensão, localizado na base do fermentador.

Amostras de 100mL foram retiradas a cada 24h, para a determinação de pH, cor, fenóis totais, atividade enzimática, açúcares redutores e biomassa sendo o micélio separado por filtração em papel Whatman n° 1.

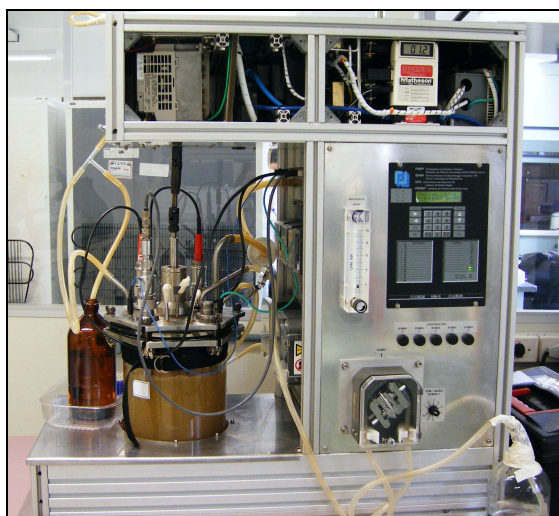


Figura 9- Foto do reator de bancada utilizado no tratamento fúngico do efluente.

3.3.8 Tratamento bacteriano aeróbio em frascos agitados

O efluente puro já caracterizado foi colocado em nove frascos Erlenmeyer de 250mL (Figura 10). O processo foi realizado em batelada e o suprimento de O₂ foi realizado através de um sistema de distribuição contendo esferas de pedras porosas (2cm de diâmetro), não sendo medida a vazão. Os frascos foram agitados (60rpm) em banho, e a temperatura foi mantida em 32°C. Diariamente, água evaporada dos frascos foi repostada, e procedeu-se a retirada de um frasco para realizar as análises de DQO, pH, cor e fenóis totais.

Concomitantemente, o efluente tratado com *P. sajor-caju* entrou no processo aeróbio de lodo ativado, seguindo a mesma metodologia descrita acima. Desta forma, pôde-se inferir uma

possível contribuição de fenóis, advinda do próprio licor (mistura de biomassa + efluente contido no tanque de aeração).

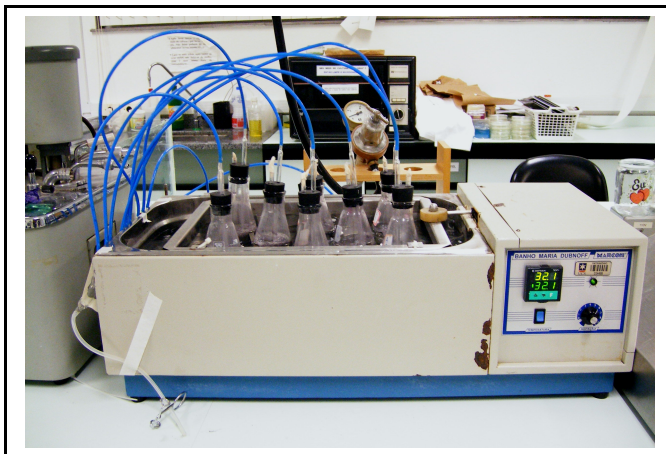


Figura 10 – Banho termostatizado com frascos agitados utilizado no tratamento bacteriano do efluente.

3.3.9 Tratamento bacteriano aeróbio em reator de bancada

Da mesma forma que no tratamento em frascos agitados, o efluente previamente caracterizado foi colocado no reator e o suprimento de oxigênio ocorreu por uma mangueira de silicone circular perfurada localizada na base do reator, não sendo medida a vazão. O reator foi mantido em banho a 32°C. Diariamente, água evaporada do reator foi repostada e retirou-se uma alíquota de 50mL para realizar as análises de DQO, pH, cor e fenóis totais.

O efluente tratado com *P. sajor-caju* entrou no processo aeróbio de lodo ativado, seguindo a mesma metodologia descrita acima. Desta forma, pôde-se inferir uma possível contribuição de fenóis, advinda do próprio licor (mistura de biomassa + efluente contida no tanque de aeração).

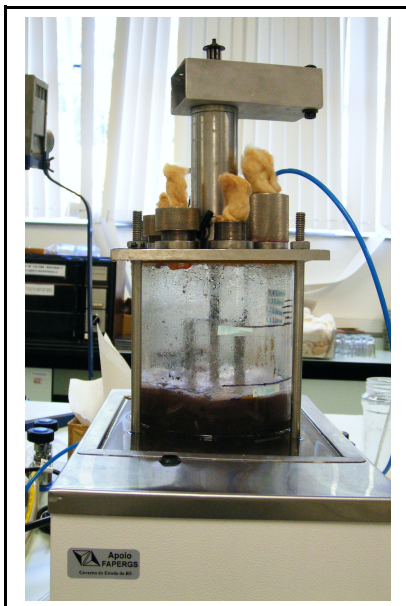


Figura 11- Biorreator de bancada utilizado no tratamento bacteriano do efluente.

3.4 Determinações Enzimáticas

3.4.1 Lacases

A atividade de lacases foi determinada com 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS).

A mistura reacional continha 0,45mM do substrato; 90mM de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 1mL de amostra adequadamente diluída, em volume final de 2,2mL. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420nm, durante 90 segundos, a 25°C. Para a determinação da concentração do ABTS oxidado, utilizou-se um $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 / \text{cm/M}$ (Wolfenden e Wilson, 1982).

Uma unidade enzimática corresponde à quantidade (μmol) de produto liberada/min./mL de amostra, calculada pela fórmula que segue:

$$U = (\text{Abs} \times 60\text{seg} \times \text{volume final} \times 10^6) / (\epsilon_{420} \times \text{volume da amostra})$$

3.4.2 Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional consistiu de 50µg/mL de vermelho de fenol; 50µM de sulfato de manganês; 50µM de peróxido de hidrogênio; 12,5mM de lactato de sódio; 500µg/mL de albumina bovina e tampão succinato de sódio 20mM pH 4,5, sendo adicionados 0,5mL de amostra, resultando em volume final de 2mL. Após 5 minutos, a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40µL de NaOH 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância, utilizando-se $\epsilon_{610} = 4,46 \cdot 10^4$ /M/cm, sendo considerada a absorbância zero, uma amostra com tempo zero de reação. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1µmol de vermelho de fenol/mL de amostra/min, como mostra a fórmula abaixo:

$$U = (\text{Abs} \times \text{volume final} \times 10^6) / (\epsilon_{610} \times \text{volume da amostra})$$

3.4.3 Lignina peroxidase

A atividade de lignina peroxidase foi determinada pela formação de veratríaldeído ($\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3$ /M/cm), numa mistura reacional contendo 0,5mL de álcool veratrílico dissolvido (4mM) em tampão tartarato de sódio (250mM) pH 3,0 em presença de 0,5mL de H₂O₂ (2mM) e 0,5mL de extrato enzimático com volume final de 2mL (Tien & Kirk, 1984). A variação da absorbância foi observada durante 5 min, a 30°C e uma unidade enzimática foi definida como a

quantidade de enzima que oxida 1 μmol de álcool veratrílico/mL de amostra/min, como mostra a fórmula que segue:

$$U = (\text{Abs} \times \text{volume final} \times 10^6) / (\epsilon_{310} \times \text{volume da amostra})$$

3.4.4 Oxidases do álcool veratrílico

Para a determinação da atividade de oxidases do álcool veratrílico, foi observada a formação de aldeído veratrílico, a partir de uma reação contendo 1,0mL de álcool veratrílico (2mM), dissolvido em tampão tartarato de sódio (250mM) pH 5,0; 0,5mL de amostra e 0,5mL de água destilada com volume final de 2mL, sendo a reação monitorada durante 5min, a 30°C, utilizando-se $\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3$ /M/cm (Bourbonnais & Paice, 1988). Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de álcool veratrílico/mL de amostra/min, como mostra a fórmula, acima citada.

3.5 Determinação do pH

Para todas as determinações de pH utilizou-se pH-metro digital marca Orion, modelo 920A.

3.6 Determinação de fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados espectrofotometricamente a 765nm, com o uso do reagente de Folin-Ciocalteau (2N), pela formação de um complexo azul, resultante da oxidação dos fenóis presentes na amostra e em meio tamponado com carbonato de sódio (10%) (Box, 1983). A concentração dos fenóis totais foi estimada correlacionando a absorbância das

amostras a uma curva padrão com concentrações de 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L de fenol.

3.7 Análise de adsorção/desorção de fenóis totais pela massa fúngica

Após 3 dias de crescimento no meio PA, 5mL da suspensão fúngica foi inoculada em 14 frascos Erlenmeyer com capacidade de 500mL que foram mantidos sob agitação a 180rpm a 28°C. A cada dia foram retirados dois frascos para a determinação da biomassa, fenóis totais do sobrenadante e fenóis totais adsorvidos. A suspensão contida nos frascos foi filtrada em papel Whatman nº1 e a biomassa foi ressuspensa em 5mL de uma solução de metanol 30% v/v e centrifugada por 2h, 600rpm, conforme Denizli *et al.* (2005). Após a centrifugação, a biomassa foi novamente filtrada para a determinação do peso seco. Os fenóis totais do sobrenadante do cultivo e da solução em metanol foram determinados conforme metodologia descrita no ítem 3.6.

3.8 Determinação da Cor

A cor do cultivo com efluente foi monitorada pela determinação da absorbância em 465nm, utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU530. A conversão da absorbância em unidades colorimétricas (UC) foi feita pela equação a seguir (Davis & Burns, 1990):

$$UC = (500 \times Abs_{465}) / 0,132$$

O valor 0,132 corresponde à absorbância de uma solução padrão de cobalto-platina, com 500 UC.

3.9 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

Para obter a DQO das amostras, utilizou-se o método do refluxo com dicromato, conforme APHA (1998), o qual pode ser aplicado para águas naturais, efluentes domésticos e industriais. O método não é aplicável a amostras que contenham mais do que 2000 mg de cloreto por litro. Aplica-se à determinação de valores acima de 50 mg DQO/L, quando se utiliza solução de dicromato de potássio 0,25 N. Valores entre 5 e 50 mg DQO/L podem ser determinados com solução de dicromato de potássio 0,025 N, porém com menor exatidão.

O método consiste em oxidar a amostra com um excesso de dicromato de potássio, em meio fortemente ácido e sob refluxo, e determinar, depois, a quantidade de dicromato de potássio remanescente, por titulação com sulfato ferroso amoniacal. Como a quantidade inicial do oxidante é conhecida, pode-se calcular quanto foi consumido na oxidação da matéria orgânica presente na amostra e estabelecer a quantidade equivalente de oxigênio para promover essa mesma oxidação.

O resultado final do teste expressa a quantidade (em mg) de oxigênio que foi utilizada para a oxidação de um litro de amostra, e pode ser, assim, entendido como uma medida do teor de matéria orgânica nela contido.

3.10 Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

Para a determinação da DBO, empregou-se o método da diluição e incubação por 5 dias a 20°C, conforme APHA (1998), o qual é recomendado para águas naturais, efluentes domésticos e industriais e em lodos. A metodologia consistiu em incubar a amostra por 5 dias, à temperatura de 20 °C, em local escuro. Ao iniciar o teste, preparam-se dois frascos com amostra, exatamente da mesma maneira. Um dos frascos é incubado e no outro determina-se o teor de

oxigênio dissolvido inicial, pelo método de Winkler, modificado pela azida sódica. Findo o período de incubação, determina-se quanto de oxigênio dissolvido que restou no segundo frasco. A concentração de OD foi mensurada pela titulação com tiosulfato de sódio 0,025N.

A diferença entre o teor inicial e o teor final de oxigênio dissolvido corresponde à demanda de oxigênio na oxidação biológica da matéria orgânica e na oxidação de materiais inorgânicos presentes na amostra.

3.11 Determinação do fósforo total

A amostra foi digerida com ácido sulfúrico e ácido nítrico concentrado para oxidar a matéria orgânica completamente liberando o fósforo como ortofosfato.

A determinação do fósforo foi feita pelo método do ácido ascórbico (APHA, 1998), onde o molibdato de amônio e o tartarato de antimônio e potássio reagiram em meio ácido com o ortofosfato formando o ácido fofomolibdico, onde a intensa coloração do molibdênio azul foi reduzida pelo ácido ascórbico.

A absorbância da amostra foi medida em 880nm no espectrofotômetro e a concentração de fósforo foi estimada correlacionando a absorbância das amostras a uma curva padrão com concentrações de 0; 0,05; 0,10; 0,20; 0,35 e 0,50 mg/L de fósforo.

O cálculo da concentração de fósforo foi feita pela equação:

$$\text{mg/L de P} = (\text{mg/L P} \times \text{V}) / \text{Vam}$$

onde: mg/L P: é o valor obtido da curva de calibração

V: é o volume usual da amostra, em mL (100 mL)

Vam: é o volume de amostra empregado para desenvolvimento da cor (50 mL)

3.12 Determinação do nitrogênio total

O método utilizado para a determinação de nitrogênio total foi o método Kjeldahl, que é um procedimento de oxidação úmida (APHA, 1998).

Na presença de H_2SO_4 , K_2SO_4 e $CuSO_4$ o nitrogênio amino de muitos materiais orgânicos são convertidos em amônio. A amônia livre também é convertida em amônio. Após a adição de uma base a amônia é destilada em um meio alcalino e absorvida pelo ácido bórico ou sulfúrico. A amônia pode ser determinada por colorimetria ou titulação com H_2SO_4 0,02N padronizado.

O método titulométrico com destilação prévia aplica-se à determinação de nitrogênio orgânico e nitrogênio total em amostras que contenham quantidades acima de 5,0 mg/L de nitrogênio na forma de amônia.

Os cálculos para expressão dos resultados foram realizados pela fórmula que segue:

$$N \text{ total (mg/L)} = [(A - B) \times 280 \times 500] / (100 \times VA)$$

onde:

A: volume de solução de H_2SO_4 0,02 N utilizado para a amostra

B: volume de solução de H_2SO_4 0,02 N utilizado para o branco

VA: volume de amostra que se utilizou para digestão.

3.13 Determinação da massa celular

As amostras dos cultivos líquidos fúngicos foram filtradas em papel Whatman nº 1, previamente tarados, por 24h, em mufla, a 80°C, sendo posteriormente pesados em balança

analítica, antes e após a filtração. O resultado foi expresso em gramas de peso seco por litro de cultivo.

3.14 Determinação de açúcares redutores

A concentração de glicose foi estimada com a utilização do reagente de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) segundo Miller (1959).

A reação foi lida em espectrofotômetro em 545nm e a concentração de açúcares redutores foi estimada correlacionando a absorbância das amostras a uma curva padrão construída com soluções de glicose hidrolisada em concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5mg/mL.

3.15 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados pela análise de variância (one-way ANOVA), utilizando um nível de probabilidade (P) inferior a 5%, com o programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, San Diego, California, USA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos experimentos nos quais a linhagem PS 2001 de *Pleurotus sajor-caju* foi cultivada em meio líquido para avaliar a remoção de fenóis totais, de efluentes da indústria de produção de papel e polpa de celulose, num processo em dois estágios que envolve o cultivo em efluentes de *P. sajor-caju* seguido de cultivo bacteriano aerado.

4.1 Teste de adsorção de fenóis totais pelo micélio

O objetivo deste ensaio foi avaliar a capacidade de adsorção de fenóis totais pela biomassa da linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju*. A Figura 12 mostra a concentração de fenóis totais no início e ao final do cultivo, durante os 7 dias de ensaio, onde observa-se a redução da concentração de fenóis totais em todos os dias de cultivo. Já a Figura 13 mostra que parte dos fenóis totais removidos, do 3º ao 7º dia, foram adsorvidos, indicando que a biomassa desta linhagem é capaz de adsorver fenóis totais corroborando os dados mostrados por Aggelis *et al.* (2003) que observaram adsorção de fenol na biomassa seca de *P. ostreatus*, de 105mg/g de biomassa seca, o que correspondeu a 8% da concentração inicial de fenol. O estudo realizado por Denizli *et al.* (2005) mostrou que a capacidade máxima de adsorção de fenol pela biomassa de *P. sajor-caju* foi de 0,95mmol/g de fenol, 1,24mmol/g de *o*-clorofenol, 1,47mmol/g de *p*-clorofenol e 1,89mmol/g de 2,4,6-triclorofenol. A adsorção de fenóis totais pelo micélio concentrando o composto, pode também ser utilizada como uma forma de tratamento do efluente.

Convém ressaltar que no sexto dia de ensaio houve uma diferença importante na remoção de fenol entre as réplicas (duas), o qual justifica o desvio padrão maior nesta data, em comparação aos demais dias do ensaio, que as réplicas apresentam valores próximos.

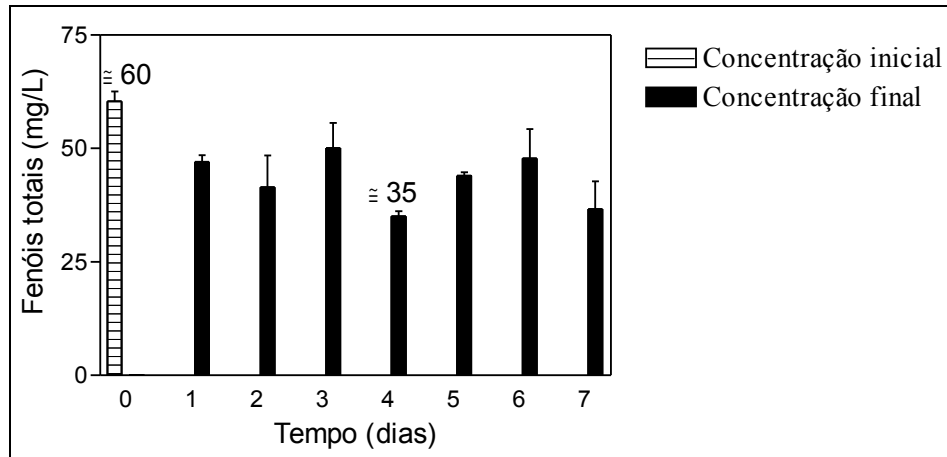


Figura 12-Concentração de fenóis totais presentes no sobrenadante de cultivos líquidos com *P. sajor-caju* realizados em frascos agitados

Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão

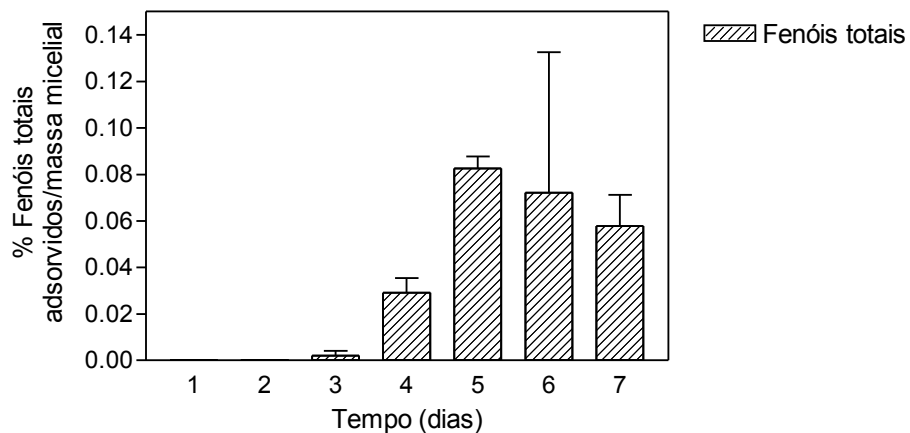


Figura 13- Porcentagem de fenóis totais adsorvidos na biomassa fúngica de cultivos líquidos com *P. sajor-caju* realizados em frascos agitados

Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão

4.2 Redução de fenol por *Pleurotus sajor-caju* em frascos agitados

O objetivo desse experimento foi avaliar o comportamento da linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju* na presença de uma alta concentração de fenol bem como a degradação do composto pelo fungo.

Na Figura 14, são apresentados dados do ensaio conduzido por 7 dias (168 h), em frascos contendo 200mg/L de fenol, inoculados com a linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju*, com o meio LCF, após a etapa de adaptação no meio LAF. Como se verifica, a curva de concentração de fenol mostra alterações durante o desenvolvimento do experimento no cultivo e também no controle (que não continha inóculo). Entretanto, visualiza-se que todos os valores de concentração de fenol no cultivo apresentam médias inferiores às observadas pelas amostras do controle. Esses resultados podem ser explicados tanto pela ocorrência de degradação biológica de fenóis como também devido à adsorção de fenol pela biomassa, como visto na Figura 13. Já Rodríguez *et al.* (2004) detectaram em seus estudos de degradação de 2,4-diclorofenol, realizados com quatro espécies de *Pleurotus*, que houve também um decréscimo da concentração de fenóis do ensaio controle (35%) do composto após 24h de incubação. Munari *et al.* (2006) também observaram um decréscimo na concentração de polifenóis totais, presentes no efluente da IPC, no controle. Isso sugere que um fenômeno, provavelmente físico, como volatilização, não medido, também possa ter ocorrido no cultivo, de acordo com a Figura 14, já que em um outro ensaio realizado para avaliar o efeito da agitação dos frascos sobre a remoção do composto, mostrou que tanto nos frascos que permaneceram sob agitação quanto nos frascos que permaneceram estáticos houve um decréscimo na concentração do composto (Figura 15).

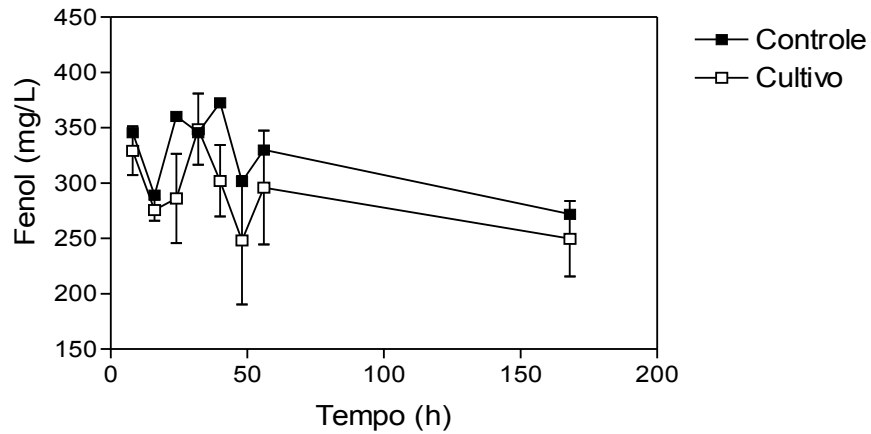


Figura 14- Perfil da concentração de fenol durante o desenvolvimento de *P. sajor-caju* em cultivos líquidos em frascos agitados

Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão

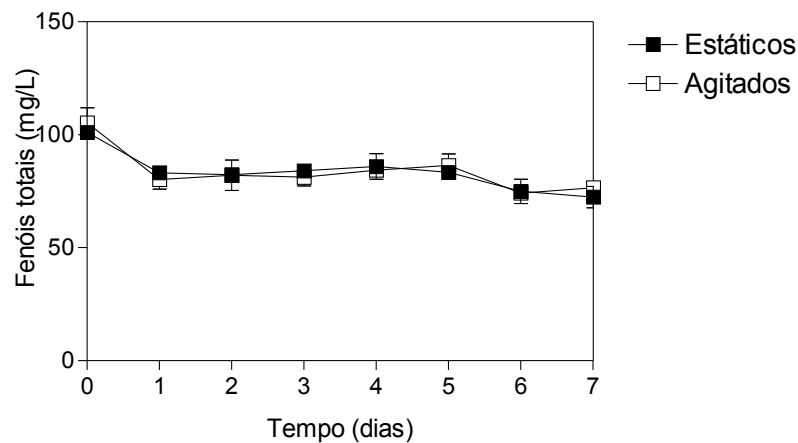


Figura 15- Efeito da agitação dos frascos sobre a remoção de fenóis totais presentes no meio de cultivo

Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão

Nas amostras do cultivo, conforme Figura 14, não foi detectada atividade das enzimas lacases e MnP. Nagarathnamma & Bajpai (1999) que, apesar de não detectarem lacases, MnP e LiP no sobrenadante do cultivo de *Rhizopus oryzae*, observaram a completa remoção de

2-clorofenol, 2,6-diclorofenol, 5-cloroguaiacol, 4-clorocatecol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,5-diclorocatecol, 4,5-dicloroguaiacol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,4,5- tricloroguaiacol, 4,5,6-tricloroguaiacol, triclorosiringaldeído, e 2,6-diclorosiringaldeído. Contudo, estes autores verificaram atividade enzimática na biomassa, o que demonstra que as enzimas foram produzidas pelo fungo.

A utilização de 50mL de um dos cultivos de 7 dias (Figura 14) como inóculo permitiu a completa remoção de 200mg/L de fenol, dado este, que foi observado em 168h de cultivo (Figura 16). A capacidade de reutilização do micélio, embora apenas a massa fúngica, também foi observada em *P. ostreatus* por outros autores. Neste trabalho, foi verificado a atividade de degradação de efluentes do processamento de óleo de oliva, mesmo após três ciclos de tratamento envolvendo reutilização da massa fúngica (Martirani *et al.*, 1996). Já Denizli *et al.* (2005) observaram na biomassa seca de *P. sajor-caju* uma possibilidade de remoção de compostos fenólicos, visto que a biomassa foi capaz de adsorver e desorver os fenóis estudados por até cinco ciclos de tratamento sem perda da capacidade.

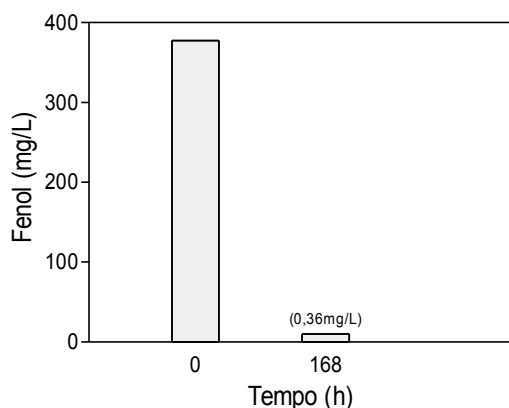


Figura 16- Concentração de fenol no início e ao final do cultivo (168h) utilizando 50% de uma suspensão fúngica de 7 dias de cultivo

4.3 Redução de fenóis totais do efluente da IPC por *Pleurotus sajor-caju* em frascos agitados

Nesta etapa avaliou-se o comportamento de remoção de fenóis totais do efluente de uma indústria de papel e celulose pela linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju*. Foram também avaliadas as atividades de lacases e MnP, em experimentos conduzidos por 174h, com coletas no início e no final do cultivo.

Nesses experimentos utilizou-se o meio PA para o pré-inóculo e um período de adaptação no meio LAF, que continha 40% v/v de efluente da indústria de papel e celulose. Volumes de 49mL da suspensão em desenvolvimento serviram como inóculo e ao mesmo tempo para completar 100mL de meio, que continha 40% de efluente. Neste meio, utilizou-se glicose em substituição à sacarose e proteína de soja em substituição à caseína e 1mL de CuSO₄ (0,156mg/L) como indutor de lacases (Malhotra *et al.*, 2004; Peralta *et al.*, 2004). Utilizou-se uma solução de gentamicina como inibidor de bactérias e uma solução de benomil como inibidor de fungos, sabendo-se que a linhagem de *P. sajor-caju* é resistente à concentração de benomil utilizada.

Na Figura 14, verifica-se que após 174h, tempo em que se realizou a análise de fenóis totais, a concentração destes compostos no cultivo é menor em relação ao tempo zero e cerca de 50% da concentração encontrada no controle. Ainda, a análise de atividade de lacases às 174h do cultivo mostrou uma baixa atividade desta enzima em dois frascos, com uma média de 4,31U/mL.

Na Figura 17, os valores diferentes encontrados no início do experimento (tempo zero) entre o controle e o cultivo devem-se ao fato de que o cultivo foi preparado com uma

suspensão fúngica, com 48h de fase de adaptação, cuja concentração de fenóis totais já estava diminuída comparativamente à solução que foi utilizada para o preparo do controle.

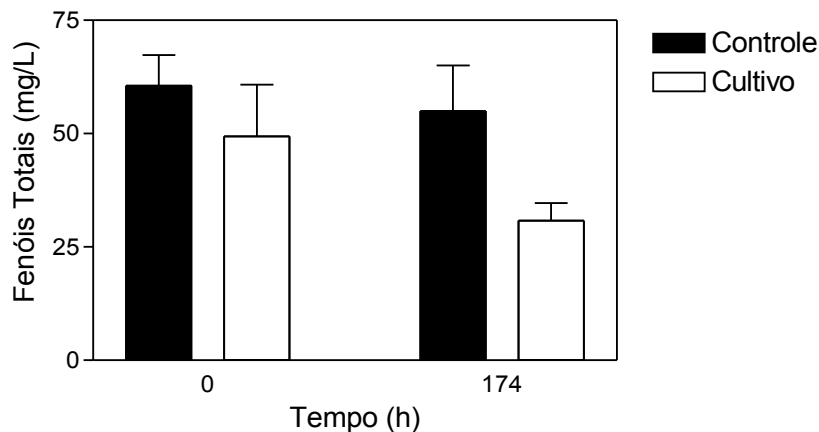


Figura 17- Concentração de fenóis totais do efluente da indústria de papel e celulose nos frascos controles e nos frascos cultivo no tempo zero e ao final do ensaio

Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão.

Os resultados que mostram a diminuição da concentração de fenóis totais no cultivo indicam a remoção do composto. A remoção dos fenóis totais, como discutido anteriormente, pode ter sido devido a um conjunto de ações envolvendo a atividade enzimática exógena ou endógena, adsorção dos fenóis na biomassa fúngica ou precipitação dos compostos fenólicos. A capacidade que as lacases têm de precipitar compostos fenólicos foi observada por Hublik & Schinner (2000) que mostraram que a oxidação de siringaldazina, 2,6-dimethoxifenol e *o*-dianisidina pela lacase formou precipitados e que o precipitado de 2,6-dimethoxifenol não mostrou-se solúvel; o precipitado de *o*-dianisidina mostrou-se solúvel em acetona e clorofórmio e o precipitado de siringaldazina mostrou-se solúvel apenas em clorofórmio e água a 80°C, pH 13 e 14. Desta maneira, os precipitados formados a partir dos substratos estudados não são solúveis nas condições predominantes dos efluentes industriais e as lacases podem ser utilizadas na remoção dos compostos fenólicos, precipitando-os e concentrando-os. Segundo

Bollag *et al.* (1988) o processo de detoxificação causado pelas lacases pode ser o resultado, não da alteração da forma química do composto mas também de uma remoção física por precipitação de produtos complexos. Para os autores a habilidade das lacases de detoxificar fenóis pode ser dependente do composto fenólico, do organismo testado, de outros parâmetros ambientais ou da combinação destes fatores. Durán & Esposito (2000) já haviam descrito que as lacases são capazes de eliminar compostos fenólicos completamente por processos de polimerização.

Na Figura 18, estão representados os dados de um outro ensaio, semelhante ao apresentado na Figura 17, entretanto conduzido por 192h. Verifica-se que as médias de fenóis totais do cultivo nos tempos 12, 24, 36, 48 e 60h são inferiores às observadas no controle. Às 192h, verifica-se que a concentração de fenóis totais no cultivo é de 44% da concentração do controle. A diferença obtida na remoção de fenóis totais entre o cultivo e o controle é estatisticamente significativa com $p < 0,05$ pelo teste t. A análise de atividade enzimática, nas diferentes amostras analisadas, mostrou atividade de lacases e LiP no cultivo em 60h. A remoção dos fenóis totais pode ter sofrido a ação dos fatores já descritos anteriormente, como atividade enzimática, adsorção ou precipitação.

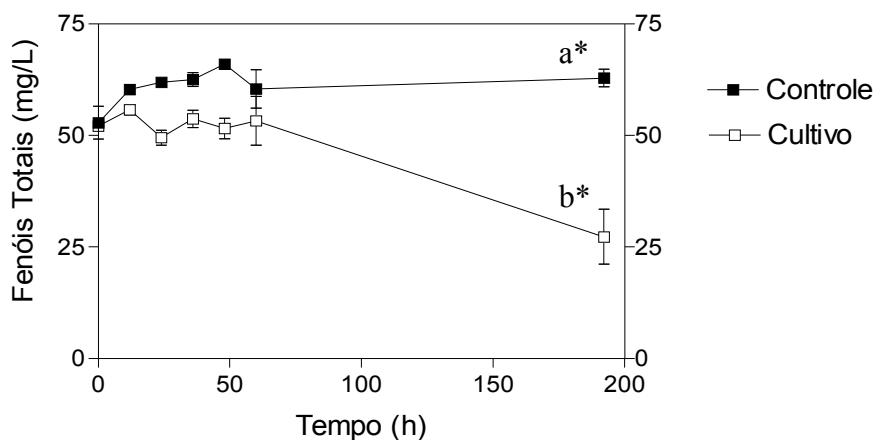


Figura 18- Análise de fenóis totais em cultivos de *P. sajor-caju*, formulados com efluente da IPC

Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão.

* Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos com $p < 0,05$ pelo teste t.

4.4 Redução de fenóis totais do efluente da IPC em reator de bancada.

Os estudos em reator de bancada foram realizados objetivando obter informações de degradação dos fenóis totais da IPC em condições controladas de temperatura, pH e aeração e também estabelecer o início de um processo de escalonamento. A concentração de oxigênio no meio foi mantida acima de 30% de saturação, variando-se a frequência do agitador e o fluxo de ar.

Na Figura 19 observa-se o aspecto do cultivo no reator após 8 dias, onde se visualiza a presença de *pellets* no meio. A Figura 20A corresponde à biomassa fúngica, após filtração ao final do cultivo, e na Figura 20B, presencia-se corpos de frutificação na parte superior interna do vaso do reator.



Figura 19- Biorreator de bancada no 8º dia de cultivo, mostrando a grande quantidade de biomassa formada.

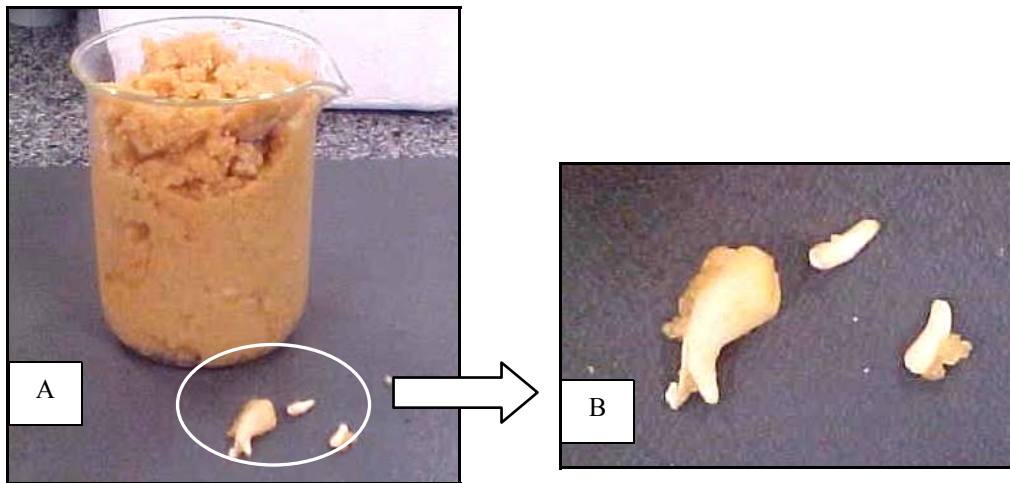


Figura 20- Biomassa ao final do cultivo (10 dias) (A) e corpos de frutificação (B), formados na porção superior do vaso de fermentação.

Pela análise da Figura 21 verifica-se que ocorreu redução da concentração de fenóis totais, chegando a 39% da concentração inicial em 144h de cultivo (6º dia), havendo, entretanto, aumento de concentração do composto após este tempo. A atividade de lacases foi detectada entre 100 e 120h de cultivo (5º dia), atingindo o pico em 144h, com 54,27U/mL.

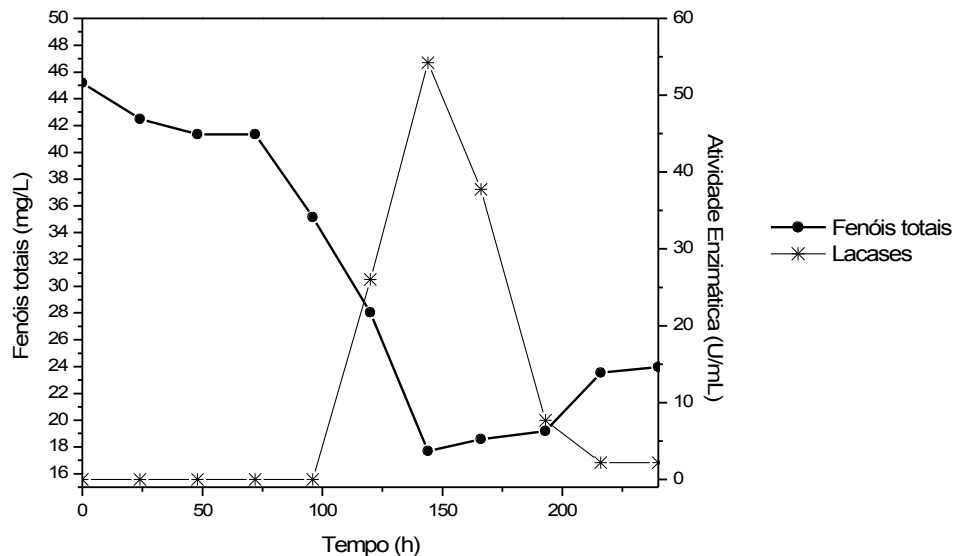


Figura 21- Atividade de lacases e concentração de fenóis totais em reator de bancada com efluente da IPC.

A análise da Figura 22, em que são apresentados os dados de concentração de fenóis totais, juntamente com os valores de pH e biomassa, permite sugerir a existência de correlação entre a queda do pH e a diminuição da concentração de fenóis totais no período entre as 120 e 166h. Adicionalmente, admitindo que a queda do pH de uma cultura microbiana indica a existência de metabolismo energético, levando ao aumento da biomassa, como observado anteriormente por Sternberg & Mandels (1979) para o crescimento de *Trichoderma reesei*, pode-se sugerir que a diminuição de fenóis totais foi associada ao aumento da biomassa fúngica, como consequência de ações enzimáticas ou físicas, como adsorção ou precipitação. Esta suposição é corroborada pelo fato de que, às 120h do cultivo, observou-se uma alteração no aspecto da massa no reator (1,85g/L), indicando a ocorrência de crescimento. Anteriormente às 120h, a biomassa não foi determinada, visto que as amostras colhidas mostravam uma menor e heterogênea biomassa, o que poderia não refletir a condição interna do reator.

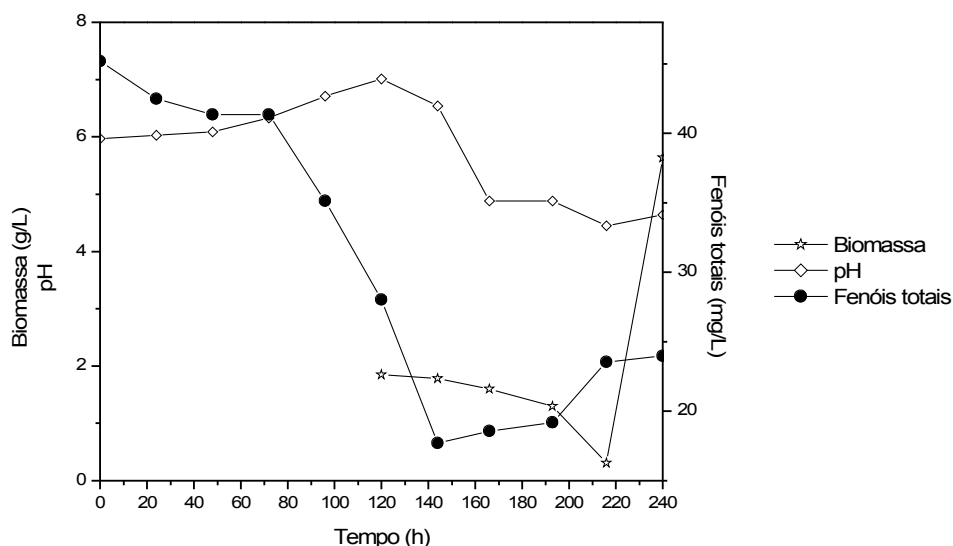


Figura 22- Concentração de fenóis totais, variação do pH e biomassa em reator de bancada com efluente da indústria de papel e celulose.

O resultado obtido no crescimento do fungo concordou com os resultados obtidos por Upadhyay & Hofrichter (1993) e Atagana (2004), que mostraram que 1mM de fenol (36mg) no meio não apresenta efeito inibitório na formação do esporóforo de *Pleurotus* spp. e que corpos de frutificação podem ser formados em concentrações de até 4mM de fenol (144mg) no meio de cultivo, o que justifica a possibilidade de aplicar *Pleurotus* spp em processos de descontaminação.

A análise da Figura 23, que refere-se aos dados de biomassa e glicose, mostra que o fungo consumiu o açúcar lentamente nas primeiras 100h de cultivo, correspondendo possivelmente a um período requerido pelo fungo de adaptação ao meio. Após as 100h, observa-se uma queda mais acentuada na concentração da glicose. Estes dados também corroboram a análise dos dados da Figura 22.

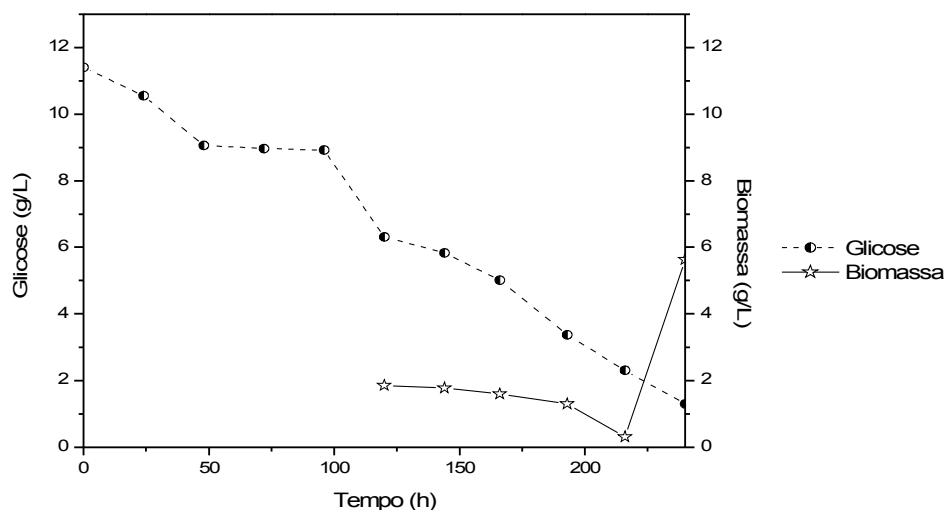


Figura 23- Consumo de glicose e crescimento da biomassa (g/L de peso seco) em reator de bancada, com efluente da indústria de papel e celulose.

Na Figura 24, são apresentados os valores de biomassa e atividade enzimática de lacases, LiP e VAO. Como visto anteriormente, verifica-se um pico de atividade de lacases às 144h. A atividade de LiP e VAO somente foram detectadas nos dois últimos dias do cultivo, enquanto a MnP não foi detectada. A observação da atividade de LiP e VAO durante o crescimento de *P. sajor-caju* na presença de compostos fenólicos provenientes de efluentes da IPC não corrobora as observações de Aggelis *et al.* (2003) que detectaram apenas lacases em cultivos contendo efluente de óleo de oliva inoculado com *P. ostreatus*. A estas enzimas, os autores atribuíram a significativa degradação de fenol durante o crescimento do fungo, fato que também pode ter ocorrido no presente trabalho, no qual as lacases podem ter participado na remoção dos fenóis totais, seja pela atividade enzimática, adsorção ou ainda pela polimerização e precipitação de moléculas complexas. Ainda, Das *et al.* (1997) sugerem que a produção de lacases está diretamente relacionada à quantidade de biomassa produzida.

Os dados de detecção de atividade de LiP para a linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju* no presente trabalho, tal como observado por Bettin *et al.* (2006) para a mesma linhagem, são diferentes em relação às descritas na literatura, uma vez que relatam que o gênero *Pleurotus* não produz LiP. Vyas & Molitoris (1995) não observaram a presença de LiP e VAO em experimentos realizados com *P. ostreatus*; Fu *et al.* (1997) observaram a produção de MnP e lacases pela linhagem PI-27 de *P. sajor-caju*, mas não observaram LiP; Muñoz *et al.* (1997) não detectaram LiP e MnP em estudos realizados com *P. eryngii*; Guillén-Navarro *et al.* (1998) e Hou *et al.* (2004) não detectaram LiP utilizando *P. ostreatus* no caldo do cultivo líquido em reator e em frascos agitados, respectivamente; Bourbonnais & Paice (1988) detectaram apenas VAO e lacases em estudos realizados com a linhagem *P. sajor-caju* 405.

A atividade de VAO e lacases apresentaram níveis superiores (1,98U/mL no 9° dia e 54,27U/mL no 6° dia de cultivo) aos encontrados por Bettin (2005) (1,59U/mL no 7° dia e 40,33U/mL no 6° dia de cultivo) para a mesma linhagem, em estudos realizados em reator de bancada. Estes resultados também foram superiores aos encontrados por Bourbonnais & Paice (1988) em estudos realizados com a linhagem de *P. sajor-caju* 405, cujos níveis de VAO chegaram a apenas 1U/mL aos 24 dias de cultivo. Cabe salientar que o propósito dos autores citados era a produção de fenol-oxidases.

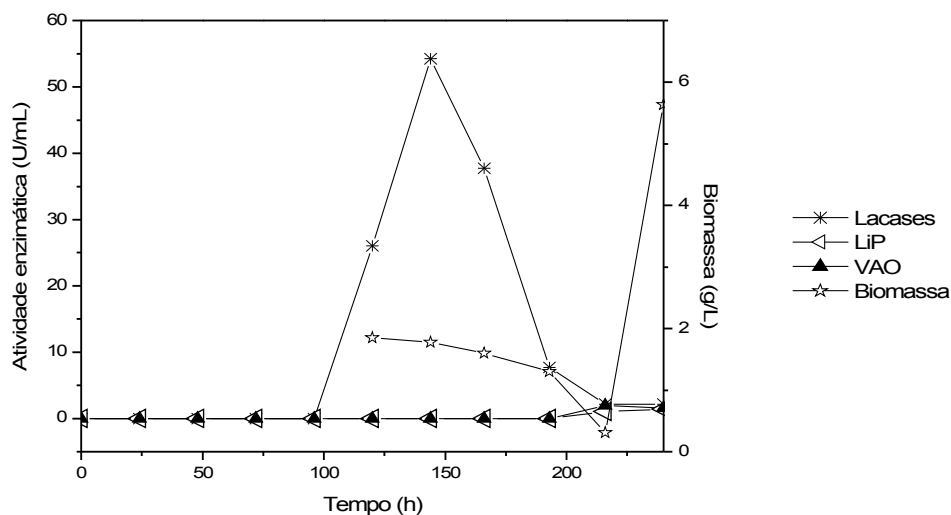


Figura 24- Atividades de lacases, LiP e VAO e crescimento da biomassa em cultivo submerso em reator de bancada com efluente da IPC.

Em outro ensaio em reator de bancada, o inóculo foi produzido no meio PR contendo 5% v/v de efluente com o objetivo de adaptar o fungo aos compostos tóxicos presentes no efluente. O meio foi constituído de 90% de efluente da IPC, sendo inoculado com 5% v/v da suspensão fúngica do cultivo pré-adaptado. O experimento foi conduzido por 15 dias, com coletas diárias para determinação da concentração de fenóis totais, pH, biomassa, açúcares redutores, cor e atividade enzimática.

A aparência turva do meio no início do cultivo é observada na Figura 25A, enquanto na Figura 25B (5º dia de cultivo) já se percebe uma grande quantidade de *pellets* e a turbidez se encontra diminuída. Tal como observado no primeiro experimento, verificou-se também a formação de corpos de frutificação na porção superior interna do vaso do reator (Figura 26).

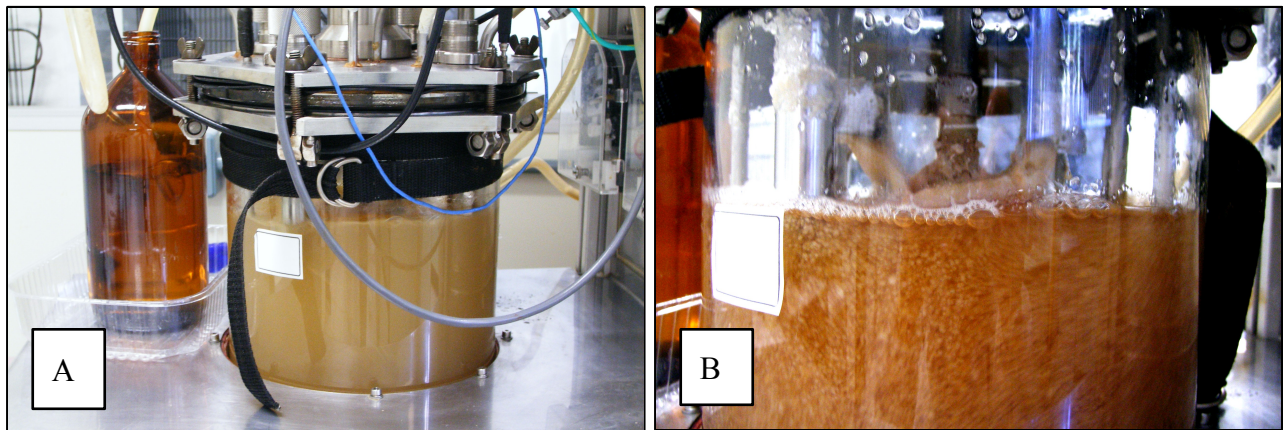
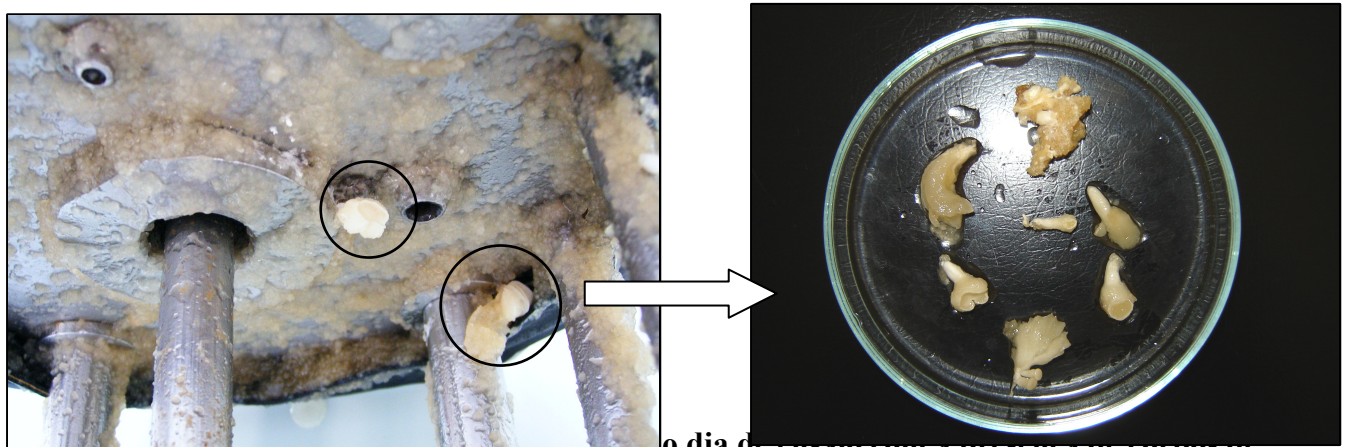


Figura 25- Biorreator de bancada: (A) no início do ensaio; (B) no quinto dia.



5º dia de ensaio com a presença de corpos de frutificação na parte superior interna do reator.

Na Figura 27 são apresentados os dados da concentração de fenóis totais e pH. Verifica-se que nas primeiras 144h de cultivo houve um decréscimo de 56,36% da concentração inicial de fenóis totais, chegando a 59,12% ao final do cultivo. O pH mostrou oscilação durante o cultivo, uma queda após 100h de cultivo, uma elevação às 175h, uma nova queda e elevação no final do cultivo.

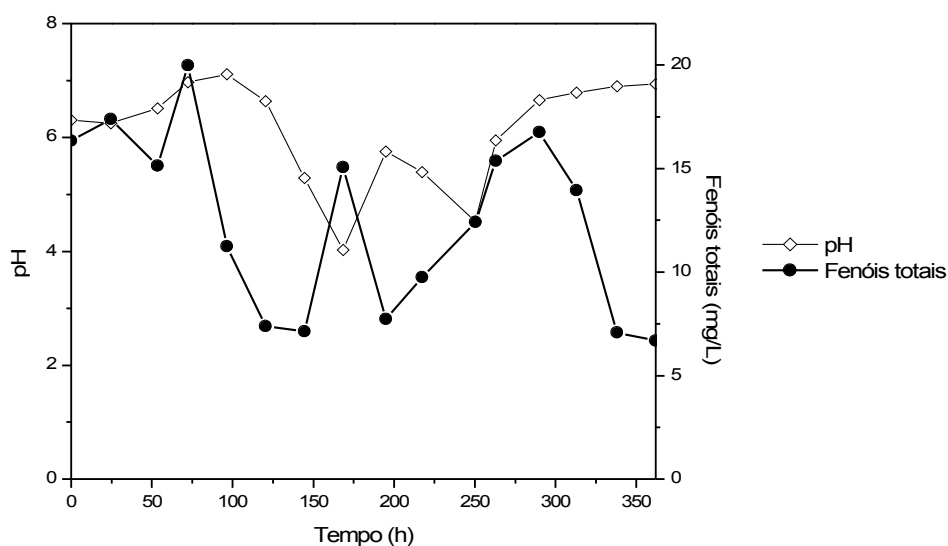


Figura 27- Variação de pH e concentração de fenóis totais do efluente da IPC.

A Figura 28 apresenta os resultados obtidos no segundo ensaio no reator (variação de glicose e biomassa). Neste ensaio, observou-se, desde o primeiro dia, produção de biomassa, chegando a um pico de crescimento (7,08g/L) aos 9 dias de cultivo, produção esta não obtida no primeiro ensaio conforme apresentado na Figura 23. Uma das possíveis justificativas para o crescimento da biomassa desde o início do ensaio é o fato de o fungo ter sofrido uma pré-adaptação aos compostos do meio.

O aumento da biomassa pode ser correlacionado com o consumo de glicose, já que o pico de crescimento ocorre quando os níveis de glicose atingem os valores mais baixos. Após o pico, a biomassa começa a diminuir, possivelmente em consequência de autólise.

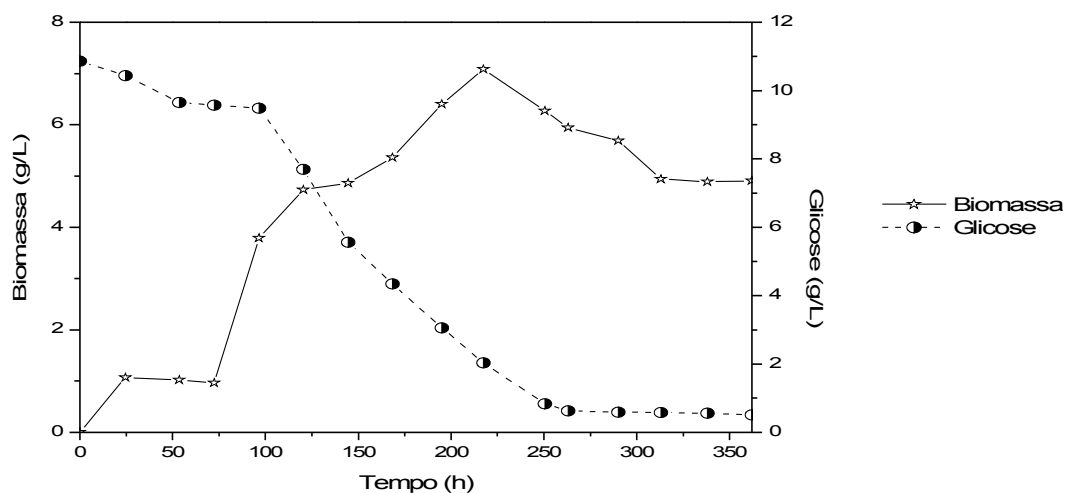


Figura 28- Determinação de glicose e biomassa (peso seco) em reator de bancada com efluente da IPC.

As Figuras 29 e 30 referem-se aos dados de atividade de lacases, MnP, LiP e VAO. Verifica-se que houve atividade de todas as enzimas estudadas. A atividade de lacases e MnP iniciaram em torno de 50h de cultivo. Para lacases, verificam-se três picos de atividade: o primeiro em 144h (6º dia) com 27,5U/mL, o segundo em 217,5h (9º dia) com 23,10U/mL; e o terceiro em 338h de cultivo (14º dia) com 33,19U/mL. As curvas de secreção de LiP e VAO tiveram perfis semelhantes, iniciando em 168,5h de cultivo (7º dia) e mantendo uma atividade crescente até 250,5h (10º dia), momento em que ambas atingiram o pico (19,27U/mL para LiP e 24,26U/mL para VAO), decrescendo lentamente em seguida. A secreção de MnP também

teve dois picos de atividade: o primeiro com 96,5h de cultivo (4º dia) com 6,04U/mL, e o segundo com 338h (14º dia) com 4,92U/mL.

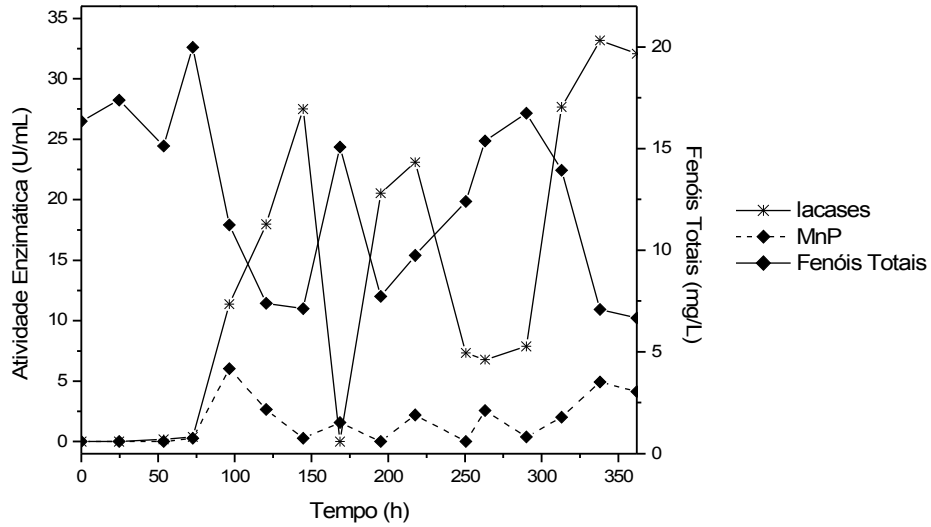


Figura 29- Perfis de atividade de lacases, MnP e fenóis totais em reator de bancada com efluente da IPC.

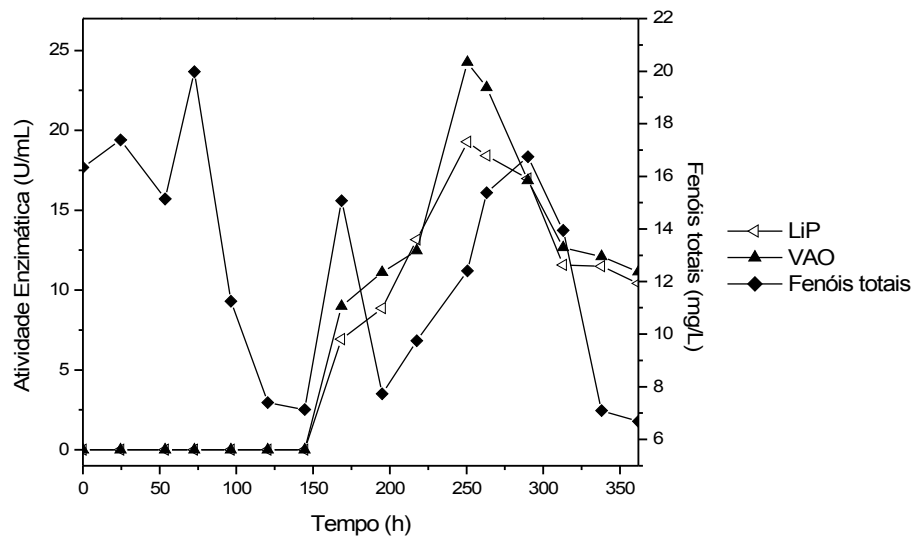


Figura 30- Perfis de atividade de LiP, VAO e fenóis totais em reator de bancada com efluente da IPC.

Os dados apresentados na Figura 29 estão de acordo com os dados observados por Velázquez-Cedeño *et al.* (2002) quando o aumento da atividade de MnP, produzida por *P. pulmonarius* e *P. ostreatus*, ocorreu juntamente com a diminuição de fenóis solúveis em água, entre o 4º e o 8º dia. Estes autores concluíram que lacases e MnP agem juntas na degradação de compostos fenólicos do efluente da polpa de café.

Os valores obtidos nos picos de atividade de LiP, VAO e MnP foram superiores aos encontrados por Bettin (2005) (0,5U/mL de MnP; 1,5U/mL de VAO e 1 U/mL de LiP) utilizando a mesma linhagem de *Pleurotus sajor-caju* no estudo em reator de bancada. Isto sugere que o conjunto de compostos fenólicos, como os contidos no efluente da IPC utilizados no presente trabalho, possibilita maior capacidade de indução de fenol-oxidases em relação ao emprego de diferentes compostos fenólicos de forma isolada.

Como discutido para o primeiro ensaio em reator de bancada, os dados de pH podem ser correlacionados ao crescimento fúngico, já que a queda de pH pode refletir o aumento do metabolismo aeróbio, que por sua vez, como já referido, ocorreu simultaneamente ao consumo de glicose (Figura 28).

Como observado (Figuras 29 e 30), o tempo de cultivo em que detectou-se a atividade das enzimas estudadas foi inferior ao verificado no ensaio anterior. Isso pode ser explicado pela adaptação do fungo aos compostos do efluente durante a preparação do inóculo.

Visualiza-se (Figura 29) que a queda na concentração de fenóis totais ocorreu quando houve aumento da atividade de lacases, sugerindo que estas enzimas estiveram envolvidas com a redução de fenóis totais, seja pela completa mineralização, adsorção, polimerização ou precipitação dos compostos.

Para Martirani *et al.* (1996) as fenol-oxidases não catalisam transformações nas condições em que se apresenta o efluente puro do processamento do azeite de oliva, o que seria devido ao fato de que estes efluentes são uma suspensão, muito mais que uma solução, de substâncias heterogêneas insolúveis incluindo polímeros de fenol, carboidratos, lipídios e proteínas que podem formar agregados heterogêneos durante o processamento do azeite de oliva. Os sólidos presentes no efluente podem ser decantados ou centrifugados, mas os microagregados não podem ser separados utilizando unicamente estes métodos. As atividades das fenol-oxidases podem então ser inibidas pelo efluente bruto por absorção ou por ligação com as estruturas mencionadas anteriormente. De fato, o tratamento com fenol-oxidases do efluente ultrafiltrado resultou num significativo decréscimo da concentração de fenóis totais.

Ainda, os autores (Maritani *et al.*, 1996) verificaram que a utilização de fenol-oxidases purificadas e isoladas não foram capazes de produzir detoxificação do efluente. Entretanto quando se utilizou uma suspensão fúngica no meio de cultivo ocorreu um decréscimo na toxicidade, sendo a atividade detoxificante de *P. ostreatus* concomitante com o progressivo aumento da atividade das fenol-oxidases. Isso sugere aos autores que a transformação de compostos tóxicos resulta de uma complexa via em que as fenol-oxidases participam, mas não são as únicas responsáveis pelos eventos de detoxificação. Adicionalmente, a observação de aumento de toxicidade do extrato fenólico retirado do efluente quando tratado com fenol-oxidases purificadas foi explicada pela provável formação de compostos ainda mais tóxicos ao microrganismos.

mo (*Bacillus cereus*) utilizado nos estudos de toxidez. Aggelis *et al.* (2003) observaram que o tratamento do efluente do processamento do azeite de oliva com *P. ostreatus* não diminuiu a toxicidade para *Daphnia magna* e *Heterocypris incognuens*, apesar da diminuição dos compostos fenólicos.

O incremento da biomassa paralelamente ao aumento na secreção enzimática de lacases e MnP (Figura 31) também foi verificado por Nüske *et al.* (2002) em reatores de 300L, que verificaram que a secreção de lacases acompanhou o crescimento do fungo mas cessou com o decréscimo da biomassa. Entretanto, Nüske *et al.* (2002) verificaram que a atividade de MnP continuou aumentando até o final do experimento, tal qual observado no presente trabalho, em que verifica-se a presença desta enzima durante todo o cultivo.

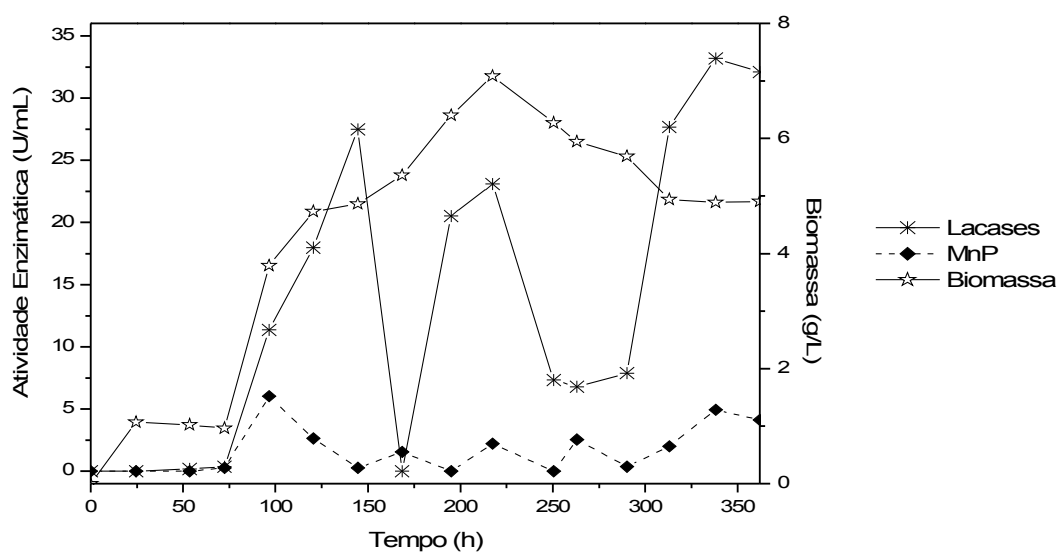


Figura 31- Perfil da atividade de lacases e MnP e da produção de biomassa presente em cultivo submerso em reator de bancada de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em meio, contendo efluente da IPC.

Ainda com relação à Figura 31, os valores de atividade de lacases encontrados foram semelhantes aos observados por Palmieri *et al.* (2000) e Pozdnyakova *et al.* (2006) (30U/mL

com *P. ostreatus*), inferiores aos encontrados por Bettin (2005) (40,33U/mL com *P. sajor-caju* PS 2001), Min *et al.* (2001) (48,20U/mL com *Phellinus ribis*) e superiores aos observados por Bourbonnais & Paice (1988)(0,85U/mL com *P. sajor-caju*) e Guillén-Navarro *et al.* (1998) (0,307U/mL com *P. ostreatus*).

Os resultados encontrados para MnP (4,94 U/mL) foram superiores aos encontrados por Guillén-Navarro *et al.* (1998) em cultivos de *P. ostreatus* em reator (0,41 U/L). Nüske *et al.* (2002) verificaram para o fungo *Nematoloma (Hypholoma) frowardii*, em reatores de cinco litros, que a atividade de MnP teve início no 4º dia e continuou crescendo até o 11º dia (final do cultivo), chegando a um pico de aproximadamente 1,5U/mL.

Os dados obtidos para o acompanhamento de cor do meio de cultivo pela análise da absorbância em comprimento de onda 465nm, cuja metodologia é utilizada na IPC, foram inesperados (Figura 32) pois, após 100% de redução de cor, no final do cultivo ocorreu aumento na absorbância do meio. A detecção de cor no ensaio após as 150 horas pode ser explicado pela produção de polissacarídeos pelo fungo e/ou pela oxidação de compostos fenólicos, formando outros compostos também detectados neste comprimento de onda.

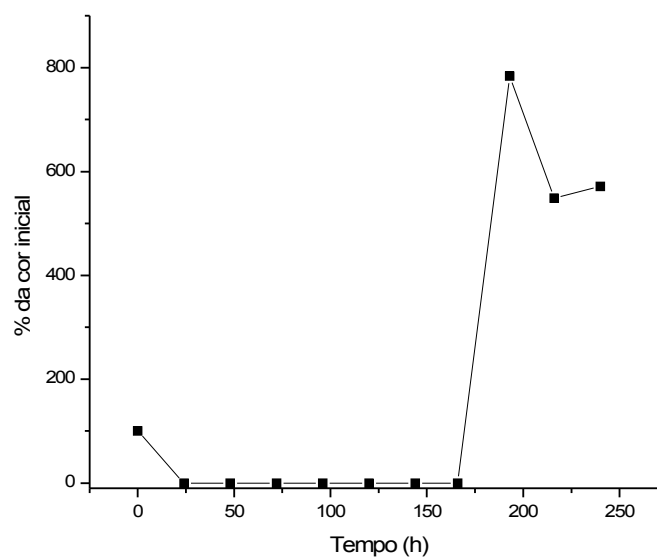


Figura 32- Variação da cor do efluente da indústria de papel e celulose durante o cultivo com a linhagem PS-2001 de *P. sajor-caju*.

4.5 Matéria orgânica (DQO) no efluente da IPC durante o tratamento com bactérias aeróbias em frascos agitados

A Figura 33 mostra a concentração de matéria orgânica como DQO contida no efluente da IPC, durante 8 dias de tratamento bacteriano aerado. O efluente da IPC foi utilizado na sua forma bruta e após o tratamento fúngico realizado em frascos agitados, com a linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju*. Verifica-se que a DQO do efluente não tratado pelo fungo, como esperado, apresenta uma concentração que permanece inalterada por aproximadamente 4 dias, decrescendo apenas no 5º e 6º dia. Entretanto, verifica-se um aumento na DQO no oitavo dia. A DQO no cultivo com efluente tratado pelo fungo apresenta uma diminuição que é verificada já no primeiro dia, cuja redução ocorre até o final do cultivo. Estes resultados sugerem que o crescimento da linhagem de *P. sajor-caju* no meio contendo efluente da IPC favorece a degradação dos compostos orgânicos pelas bactérias.

A elevação na DQO verificada no cultivo bacteriano contendo efluente bruto poderia ser explicada pela liberação de compostos orgânicos provenientes de lise bacteriana.

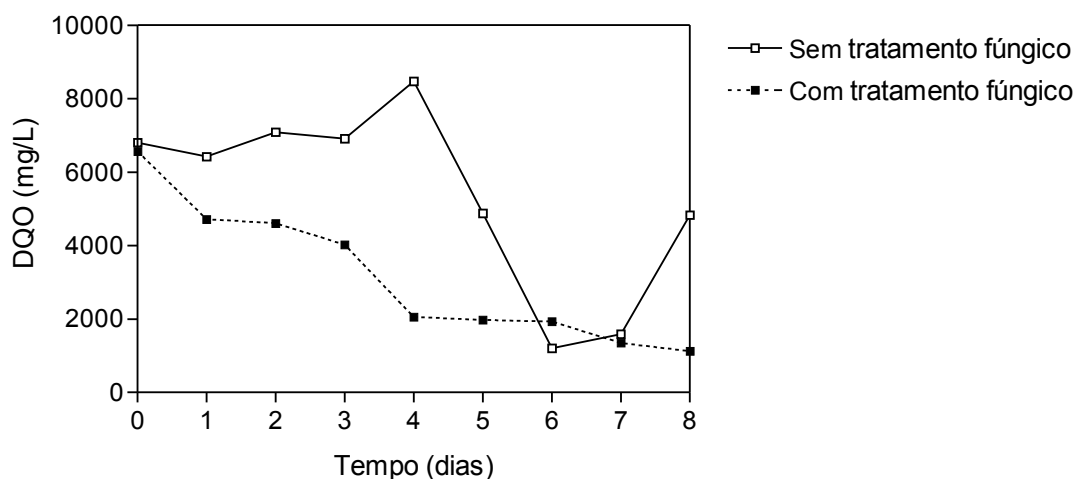


Figura 33- Determinação de DQO em oito dias de cultivo do efluente da IPC bruto e após o tratamento fúngico.

4.6 Matéria orgânica (DQO) no efluente da IPC durante o tratamento com bactérias aeróbias em reator de bancada

Alternativamente ao crescimento bacteriano em frascos agitados, avaliou-se a alteração de DQO do efluente da IPC por bactérias em biorreator contendo 2 litros de meio. O meio utilizado foi constituído de efluente bruto ou de efluente tratado pelo fungo durante crescimento em frascos agitados ou em biorreator, sendo acompanhado também as concentrações de fenóis totais.

Tal como observado na Figura 33, a remoção bacteriana de DQO do efluente tratado pelo fungo em frascos agitados (Figura 34) já é verificada às 24h de cultivo, situação que não ocorre na curva de DQO com efluente bruto. A DQO inicial muito superior no efluente tratado pelo fungo pode ser explicada pela ocorrência de lise do fungo resultando provavelmente de polissacarídeos produzidos pelo fungo, proteínas de membranas e resíduos de glicose do tratamento fúngico.. As elevações de DQO em ambas as curvas, verificadas no 4º dia de cultivo, podem ser devidas à liberação de substâncias orgânicas em consequência de lise

bacteriana. As análises de fenóis totais (Figura 35) mostram que, embora a concentração de fenóis totais após o tratamento fúngico seja alta, as bactérias foram capazes de removê-los rapidamente, sugerindo que estes compostos eram provenientes do crescimento fúngico, enquanto que os fenóis totais presentes no efluente bruto foram removidos pelo fungo.

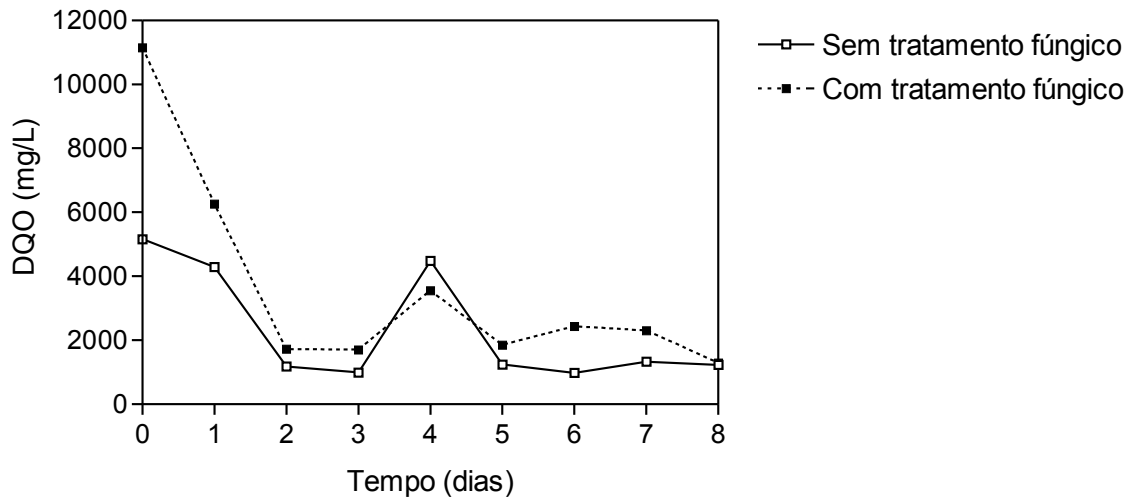


Figura 34- Determinação de DQO em oito dias de cultivo do efluente da IPC bruto e após o tratamento fúngico em frascos agitados.

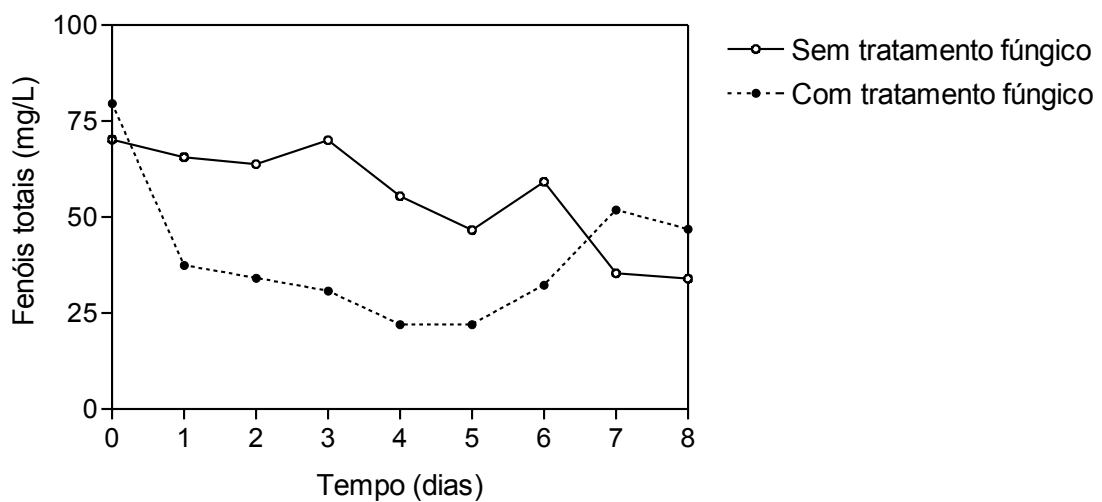


Figura 35- Concentração de fenóis totais em oito dias de cultivo do efluente da IPC bruto e após o tratamento fúngico.

Resultados inesperados foram obtidos no experimento quando comparou-se a remoção de DQO em reator utilizando efluente da IPC tratado pelo fungo em reator de bancada. Como se observa na Figura 36, ocorreu diminuição na DQO do efluente bruto nas primeiras 24h. Entretanto este comportamento de rápida redução de DQO, não esperado, pode ter sido devido a uma pré-adaptação das bactérias a meios contendo fenol, já que o lodo utilizado como inóculo era proveniente de uma indústria de papel e celulose, embora, como se verifica na Figura 37, a rápida diminuição de DQO não foi acompanhada de redução na concentração de fenóis totais, pelo menos nos primeiros 4 dias.

Por outro lado, constata-se, ainda na Figura 36, que a remoção bacteriana de DQO do efluente tratado pelo fungo não mostrou alteração dos valores nas primeiras 24h de cultivo, o que possivelmente foi devido a uma reduzida taxa de crescimento bacteriano. Como visto, os dados de 48h já mostram redução na DQO. Ainda, como se observa na Figura 37, a concentração de fenóis totais reduzida no início deste cultivo, deve-se ao tratamento fúngico do efluente da IPC.

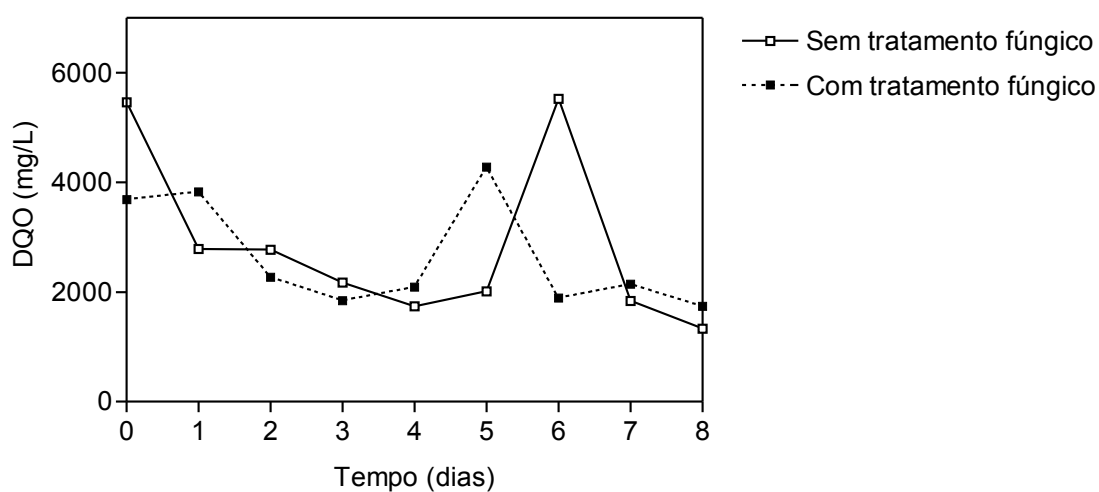


Figura 36- Determinação de DQO em oito dias de cultivo do efluente da IPC puro e após o tratamento fúngico.

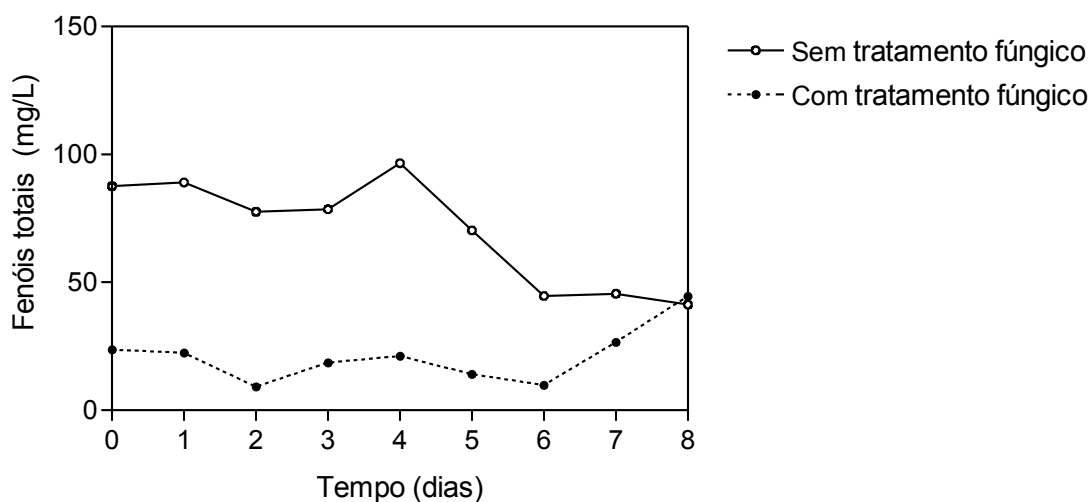


Figura 37- Concentração de fenóis totais em oito dias de cultivo do efluente da IPC puro e após o tratamento fúngico em reator de bancada.

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que o efluente da indústria de papel e celulose em estudo, quando empregado para crescimento da linhagem de *P. sajor-caju* PS 2001, apresenta redução de toxidez para bactérias provenientes de lodos ativados de uma indústria de papel e celulose, possibilitando, portanto, remoção de matéria orgânica. Estas observações sugerem que efluentes da indústria de papel e celulose, em vez de sofrerem tratamentos físicos ou químicos para a remoção de fenóis tóxicos às bactérias, poderiam alternativamente ser tratados por processos microbianos envolvendo *P. sajor-caju*, antes de serem encaminhados para lagoas aeradas.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os experimentos com a linhagem PS 2001 de *Pleurotus sajor-caju* crescendo em fenol e em efluente da indústria de papel e celulose permitiram concluir que:

- a linhagem cresce na presença de 200mg/L de fenol e na presença de 100mg/L de compostos fenólicos do efluente proveniente da indústria de papel e celulose (IPC);
- durante o crescimento, ocorre a remoção de fenóis totais do meio;
- não existe remoção de compostos cromóforos do efluente da IPC pelo crescimento do fungo;
- o crescimento do fungo em efluentes da IPC proporciona uma melhora na degradação da matéria orgânica quando o mesmo é tratado por bactérias aeróbias;
- a conclusão anterior mostra que a linhagem apresenta potencial para a aplicação em sistemas de tratamento de efluentes da IPC quando associada a lodos ativados.

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas sobre a utilização de *Pleurotus sajor-caju* no tratamento de efluentes da IPC, em cultivo submerso, sugerem-se as seguintes atividades:

- identificação dos compostos fenólicos e não fenólicos presentes no efluente da IPC antes e após o tratamento fúngico;
- identificação das substâncias formadas a partir da ação das enzimas ligninolíticas sobre os compostos fenólicos;
- seleção e identificação de bactérias de rápido crescimento em efluentes IPC;
- desenvolvimento de uma tecnologia para tratamento de efluentes envolvendo um processo fúngico e lodo ativado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggelis, G.; Iconomou, D.; Christou, M.; Bokas, D.; Kotzailias, S.; Christou, G.; Tsagou, V.; Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. **Water Res.** 37: 3897-3904.
- Akhtar, M.; Blanchette, R.A.; Kirk, T. K. (1997) Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of wood. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 57: 159-195
- Altinbas, U.; Eroglu V.; Öztürk, I. (1999). Treatment of bleaching effluents in sequential activated sludge and nitrification systems. **Water Res.** 40: 269-274.
- American Public Health Association (1998) **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater** – 20 ed.
- Amor, L.; Eiroa, M.; Kennes, C.; Veiga, M.C. (2005). Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. **Water Res.** 39:2915-2920.
- Archibald, F.; Roy, B. (1992) Production of Manganic chelates by laccase from the lignin-degrading fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 1496-1499.
- Atagana, H.I. (2004). Biodegradation of phenol, *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 20:851-858.
- Baiocco, P.; Barreca, A. M.; Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. (2003). Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. **Org. Biomol. Chem.** 1: 191-197.

- Bajpai, P.; Bajpai, P.K. (1994). Biological colour removal of pulp and paper mill wastewaters. **J. Biotechnol.** 33:211-220.
- Balcioglu, I.A.; Çeçen, F. (1999). Treatability of kraft pulp bleaching wastewater by biochemical and photocatalytic oxidation. **Water Sci. Technol.** 40: 281-288.
- Baldrian, P.; Gabriel, J. (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 206: 69-74.
- Bano, Z.; Rajarathnam, S. (1988) *Pleurotus* mushrooms, Part II. Chemical composition nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. **CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.** 27:87-158.
- Bao, D.; Kinusaga, S.; Kitamoto, Y. (2004). The biological species of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) from Asia based matong compatibility tests. **J. Wood Sci.** 50: 162-168.
- Barr, D. P.; Aust, S. D. (1994). Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. **Environ. Sci. Technol.** 28: 78-87.
- Belinky, P. A *et al.* (1994) Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulmonaris*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40: 629-633.
- Bettin, F. (2005) Produção de lacases pela linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer em cultura submersa. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Bettin, F.; Malvessi, E.; Calloni, R.; Gaio, T.A.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2006) Produção de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator de bancada em regime descontínuo. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC) **Anais – Livro de Resumos**. Caxias do Sul-RS.

- Bollag, J.M.; Shuttleworth, K.L.; Anderson, D.H. (1988). Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 54:3086-3091.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G. (1988). Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochem. J.** 255: 445-450.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Lett.** 267: 99-102.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Freiermuth, B.; Bidoe, E.; Borneman, S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4627-4632.
- Box, J. D. (1983). Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. **Water Res.** 17: 511-525.
- Boyle, C. D.; Kropp, B. R.; Reid, I. (1992). Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58: 3217-3224.
- Breen, A.; Singleton, F. L (1999). Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 252-258.
- Brune, A. (1998) Microbial degradation of aromatic compounds: aerobic versus anaerobic process. In: Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft. 87:65-78.
- Buitrón, G.; González, A.; López-Marín, L. M. (1998) Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. **Water Sci. Technol.** 37:371-378.
- Camarero, S.; García, O.; Vidal, T.; Colom, J.; del Rio, J. C.; Gutiérrez, A.; Gras, J. M.; Monke, R.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. (2004). Efficient bleaching of non-wood-high-quality paper pulp using laccase-mediator system. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 113-120.

- Camarero, S.; Sarkar, S.; Ruiz-Dueñas, F.J.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T. (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. **J. Biol. Chem.** 274:10324-10330.
- Canet, R.; Birnstingl, J. G.; Malcolm, D. G.; Lopez-Real, J. M.; Beck, A. J. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar combined soil. **Bioresour. Technol.** 76: 113-117.
- Chandra, R.; Ghosh, A.; Jain, R.K.; Sigh, S. (2006). Isolation and carachterization of two potencial pentachlorophenol degrading aerobic bacteria from pulp and paper effluent sludge. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 52:125-130.
- Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58: 582-594.
- Coulibaly, L.; Gourene, G.; Agathos, N.S. (2003) Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. **African J. Biotechnol.** 2: 620-630.
- Cordi, L.; Spier, K. F.; Assalin, M. R.; Almeida, E.; Moraes, S. G.; Durán, N. (2003). Impacto na microbiota do lodo ativado durante a aclimatação com diferentes efluentes industriais. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM). **Anais – CD-Room.** Florianópolis, 2003.
- Dalvi, L.C.; Silva, C.M. (2002). Efeito do residual de H₂O₂ e ClO₂ – sobre um sistema de lodos ativados da indústria de celulose kraft branqueada. **Disponível (online)** <http://www.celuloseonline.com.br/pagina/pagina.asp?iditem=3214>(12/03/2005).

- Das, N.; Sengupta, S.; Mukherjee, M. (1997). Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63:4120-4122.
- Davis, S.; Burns, R. G. (1990). Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32: 721-726.
- Demirbas, G.; Gokcay, C.F.; Dilek, F.B. (1999). Treatment of organic chlorine in pulping effluents by activated sludge. **Water Sci. Technol.** 40: 275-279.
- Denizli, A.; Cihangir, N.; Tüzmen, N.; Alsancak, G. (2005). Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus *Pleurotus sajor-caju*. **Bioresour. Technol.** 96: 59-62.
- Durán, N.; Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Catal. B: Environ.** 28: 83-99.
- Eaton, D. C.; Chang, H. -M.; Joyce, T. W.; Jeffries, T. W.; Kirk, T. K. (1982). Method obtains fungal reduction of the color of extraction-stage kraft bleach effluents. **Tappi J.** 65: 89-92.
- Fountoulakis, M. S. *et al.* (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Water Res.** 36: 4735-4744.
- Freire, R.S.; Pelegrini, R.; Kubota, L.T.; Durán, N. (2000) Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova.** 23:504-511.
- Fu, S.Y.; Yu, H.S.; Buswell, J.A. (1997) Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. **FEMS Microbiol. Lett.** 147:133-137.

- Gianfreda, L.; Xu, F.; Bollag, J. M. (1999). Laccases: a useful group of oxireductive enzymes. **Biorem. J.** 3:253-259.
- Giardina, P.; Palmieri, G.; Scaloni, A.; Fontanella, B.; Faraco, V.; Cennamo, G.; Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochem. J.** 341: 655-663.
- Gilbride, K.A.; Frigon, D.; Cesnik, A.; Gawat, J.; Fulthorpe, R.R. (2006) Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community. **Water Res.** 40:775-787.
- Gill, P. K.; Arora, D. S. (2003). Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 30: 28-33.
- Glenn, J.K.; Morgan, M.A.; Mayfield, M.B.; Kuwahara. M.; Gold, M.H. (1983). An extracelular H₂O₂ - requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 144: 1077-1083.
- Guillén-Navarro, G. K.; Márquez-Rocha, F.J.; Sanchez-Vázquez, J. E. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. **Rev. Iberoam. Micol.** 15: 302-306.
- Ha, H. C.; Honda, Y.; Watanabe, T.; Kuwahara, M. (2001). Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55:704-711.
- Hou, H.; Zhou, J.; Wang, J.; Du, C.; Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochem.** 39: 1415-1419.

- Hublik, G.; Schinner, Franz. (2000). Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme Microb. Technol.** 27:330-336.
- Jenkins, D. (2003) **Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems.** 3 ed. London: Lewis Publishers.190p.
- Jordão, E.P.; Pessôa, C.A. (1995). **Tratamento de esgotos domésticos.** 3 ed. Rio de Janeiro: ABES. 720p.
- Kirk, T. K. e Farrell, R. L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Ann. Ver. Microbiol.** 41: 465-505.
- Koroljova-Skorobogat’ko, O.V.; Stepanova, E.V.; Gavrilova, V.P.; Morozova O.V.; Lubimova, N. V.; Dzchafarova, A. N.; Jaropolov, A. I.; Makower, A. (1998). Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsitus* and effect of inducers on laccase synthesis. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 28: 47-54.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ – dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.** 169: 247-250.
- Larsson, D.G.; Adolfsson-Erici, M.; Thomas, P. (2006) Characterization of putative ligands for a fish gonadal androgen receptor in a pulp mill effluent. **Environ. Toxicol. Chem.** 25:419-427.
- Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Lutereck, J.; Ziegenhagen, D.; Wojtas-Wasilewska, M.; Cho, N.-S.; Holfrichter, M.; Rogalski, J. (1999). Review – Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genet. Biol.** 27: 175-185.

- Levin, L.; Forchiassin, F.; Ramos, A. M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. **Mycologia**. 94: 377-383.
- Li, K.; Xu, F.; Eriksson, K.L. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 2654-2660.
- Lima, J. A.; Mendes, G.P.; Andraus, J.; Blosfeld, A.M.; (2006). Avaliação da biodegradabilidade de corantes têxteis. In: II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, III Workshop de Biocatálise. **Anais- Livro de Resumos**. São Paulo, 2006.
- Liu, W.; Chao, Y.; Yang, X.; Bao, H.; Qian, S. (2004). Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 31: 127-132.
- Lo, S. C.; Ho, Y. S.; Buswell, J. A. (2001). Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase component. **Mycologia**. 93: 413-421.
- Malhotra, K.; Sharma, P.; Capalash, N. (2004). Copper and dyes enhance laccase production in γ -proteobacterium JB. **Biotechnol. Lett.** 26: 1047-1050.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.
- Martirani, L.; Giardina, P.; Marzullo, L.; Sannia, G. (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Water Res.** 30:1914-1918.

- Mattiasson, B. (2001). Biodegradation of recalcitrant and xenobiotic compounds. In: Euro Summer School Programe. **Anais**. Suecia, 2001.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducinf sugar. **Anal. Chem.** 31:426-428.
- Min, K. L.; Kim, Y. H.; Kim, Y. W.; Jung, H. S.; Hah, Y. C. (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Arch. Biochem. Biophys.** 392: 279-286.
- Moreira, M.T.; Feijoo, G.; Canaval, J.; Lema, J.M. (2003). Semipilot-scale bleaching of kraft pulp with manganese peroxide. **Wood Sci. Technol.** 37:117-123.
- Moreira, M.T.; Viacava, C.; Vidal, G. (2004). Fed-batch decolorization of poly R-478 by *Trametes versicolor*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 47: 179-183.
- Munari, F. M.; Gaio, T.A.; Dillon, A.J.P. (2006). Phenol Degradation and Color Removal in Submerged Culture of *Pleurotus sajor-caju* with Paper Mill Effluents. **Biocatalysis & Biotransformation**. DOI 10.1080/10242420600906355
- Muñoz, C.; Guillén, F.; Martínez, A. T; Martínez, M. J. (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Curr. Microbiol.** 34:1-5.
- Nagarathnamma, R.; Bajpai, P. (1999). Decolonization and detoxification of extraction-stage effluent from chlorine bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1078-1082
- Nüske, J.; Scheibner, K.; Dornberger, U.; Ullrich, R.; Hofrichter, M. (2002). Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 556-561.

- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Fontanella, B.; Sannia, G.; (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 920-924.
- Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R.; Nigam, P. (1999). Solid State Fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.** 77: 149-162.
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem.** 35: 1153-1169.
- Peralta, R. M.; Souza, C. G. M.; Bôer, C. G. (2004). **As principais oxidorreduções de uso industrial.** In: Said, S.; Pietro, R. C. L. R. (Editores). **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa. pp. 161-184.
- Pokhrel, D.; Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater – a review. **Sci. Total Environ.** 333: 37-58.
- Pozdnyakova, N. N.; Rodakiewicz-Nowak, J.; Turkovskaya, O. V. (2004). Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 30: 19-24.
- Pozdnyakova, N. N.; Rodakiewicz-Nowak, J.; Turkovskaya, O. V., Haber, J. (2006). Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in presence of syntetic mediators. **Enzyme. Microb. Technol.** 39: 1242-1249.
- Putzke, J.; Putzke, M.T.L. (1998). **O reino dos fungos.** Vol. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 606p.
- Putzke, J.; Putzke, M.T.L. (2002). **O reino dos fungos.** Vol. 2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. pp 615-829.
- Ragunathan, R.; Swaminathan, K. (2004). Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Pleurotus spp.* **World J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 389-393.

- Rajaratnam, S.; Bano, Z. (1987). *Pleurotus* mushrooms, part IA morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. **CRC Crit Rev Food Sci Nutr.** 26: 157-171.
- Reddy, G.V.B.; Gold, M.H. (2000). Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. **Microbiol.** 146:405-413.
- Rodríguez, E.; Nuero, O.; Guillén, F.; Martínez, A.T.; Martínez, M.J. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biol. Biochem.** 36:909-916.
- Rodríguez, S.; Fernández, M.; Bermúdez, R.C. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. **Rev. Iberoam. Micol.** 20:164-168.
- Sanjust, E.; Pompei, R.; Rescigno, A.; Rinaldi, A.; Ballero, M. (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 31: 223-235.
- Santos, A.Z. (1997). Tratamento de efluentes da indústria de celulose e papel com fungo filamentoso lignocelulósico. **Dissertação de mestrado.** Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Brasil.
- Sasaki, T.; Kajino, T.; Li, B.; Sugiyama, H.; Takahashi, H. (2001). New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2208-2212.
- Schnell, A.; Steel, P.; Melcer, H.; Hodson, P.V.; Carey, J.H. (2000). Enhanced biological treatment of bleached kraft mill effluents – I. removal of chlorinated organic compounds and toxicity. **Water Res.** 34: 493-500.

- Selvam, K.; Swaminathan, K.; Song, M.H.; Chae, K.S. (2002). Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Fomes lividus* and *Trametes versicolor*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 18:523-526.
- Silva, C. M. M. S.; Melo, I. S.; Oliveira, P. R. (2004) Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa.** Jaguariúna, 18p.
- Soares, A.; Jonasson, K.; Terrazas, E.; Guieysse, B.; Matiasson, B. (2005) The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 66:719-725.
- Sternberg, D.; Mandels, G. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. **J. Bacteriol.** 139:761-769.
- Sundaramoorthy, M.; Kishi, K.; Gold, M.H.; Poulos, T.L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. **J. Biol. Chem.** 269: 32759-32767.
- Taseli, B.; Gokcay, C.F. (1999). Biological treatment of paper pulping effluents by using a fungal reactor. **Water Sci. Technol.** 40: 93-99.
- Thompson, G.; Swain, J.; Kay, M.; Forster, C.F. (2001). The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. **Bioresour. Technol.** 77: 275-286.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.** 140: 19-26.
- Tien, M.; Kirk, T. K. (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterisation, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 81: 2280-2284.

- Tinoco, R.; Pickard, M. A.; Vazquez-Duhalt, R. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Lett. Appl. Microbiol.** 32: 331-335.
- Tsioulpas, A.; Dimou, D.; Iconomou, D.; Angelis, G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. **Bioresour. Technol.** 84: 251-257.
- Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresour. Technol.** 72: 169-183.
- Tychanowicz, G.K.; Zilly, A.; Souza, C.G.M.; Peralta, R.M. (2004). Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochem.** 39: 855-859.
- Upadhyay, R. C.; Hofrichter M. (1993). Effect of phenol on the mycelial growth and frutification in some of basidiomycetous fungi. **J. Basic. Microbiol.** 33: 343-347.
- Velázquez-Cedeño, M. A.; Mata, G.; Savoie, J. –M. (2002). Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 201-207.
- Vyas, B. R. M.; Molitoris, H. P. (1995). Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3919-3927.
- Wanner, J.; Ruzickova, I.; Krhutkova, O.; Pribyl, M. (2000). Activated sludge population dynamics and wastewater treatment plant design and operation. **Water Sci. Technol.** 41: 217-225.
- Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol. Adv.** 22: 161-187.

- Wolfenden, R. S.; Wilson, R. L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin Trans.** 02:805-812.
- Wu, J.; Xiao, Y-Z.; Yu, H-Q. (2005). Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. **Bioresour. Technol.** 96:1357-1363.
- Yesilada, O.; Asma, D.; Cing, S. (2003). Decolorization of textile dyes by fungal pellets. **Process Biochem.** 38: 933-938.
- Zadrazil, F.; Puniya, A. K. (1994) Influence of carbon dioxide on lignin degradation and digestibility of lignocellulosics treated with *Pleurotus sajor-caju*. **Int. Biodeterioration Biodegradation.** 237-244.
- Zamora P.P; Esposito, E.; Pelegrini, R.; Groto, R.; Duran, N. (1998) Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilised horseradish peroxidase. **Environ. Technol.** 19:55-63.