

TRATABILIDADE COMPARATIVA DE FILTRADOS DE BRANQUEAMENTO ECF E TCF DE POLPA KRAFT DE EUCALIPTO

Ann H. Mounteer

Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa; ann@ufv.br

RESUMO

A carga poluente de efluentes de fábricas de celulose kraft branqueada varia em função do tipo e das condições de branqueamento praticado. A eficiência do tratamento biológico desses efluentes depende da capacidade metabólica do lodo biológico, o que, por sua vez, depende da adaptação dos microrganismos presentes no lodo ao efluente sendo tratado. Um melhor conhecimento da dinâmica das comunidades bacterianas e seu impacto sobre as taxas de degradação nos sistemas de tratamento de efluentes fornecerá subsídios para um melhor gerenciamento desses sistemas. Efluentes de branqueamento ECF [seqüência D(EO)DD] e TCF [seqüência Q(OP)(QZ)(PO)] de polpa kraft-O de eucalipto foram gerados no laboratório a partir da mesma amostra de polpa kraft-O de eucalipto. A eficiência do tratamento dos efluentes de branqueamento ECF e TCF foi avaliada pela análise de DBO, DQO e AOX nos efluentes e suas frações de alta (>3000 Da) e baixa (< 3000 Da) massa molecular antes e após tratamento em sistema de lodos ativados de bancada. A remoção de DBO foi similar para os dois efluentes (>97%), enquanto a de DQO foi maior no efluente TCF (77-85%) que no ECF (47-68%). Este resultado foi atribuído, em parte, à remoção de matéria orgânica de massa molecular alta, a qual representou fração expressiva do efluente TCF, ao contrário do ECF. A toxidez aguda Microtox foi eliminada, enquanto a crônica a algas, mesmo reduzida, continuou significativa após o tratamento. As comunidades microbianas presentes nos lodos ECF e TCF foram claramente diferenciadas, baseadas na sua capacidade metabólica, mediante análise estatística de componentes principais de seus perfis de utilização de substratos em microplacas BiologGN[®]. A comparação da estrutura das comunidades de bactérias nos lodos ECF e TCF foi realizada por hibridização *in situ* (FISH) usando sondas complementares ao rRNA da Eubactéria (EUB), das subclasses alfa (ALF), beta (BET) e gamma (GAM) da Proteobactéria, e das gram positivas com teor alto de G+C (HGC). A principal diferença taxonômica detectada foi a maior proporção de células da subclasse ALF (27%) no lodo TCF do que no lodo ECF (6%). Os resultados evidenciaram a existência de diferenças no potencial metabólico e na estrutura taxonômica das comunidades microbianas presentes nos lodos ECF e TCF, em razão da adaptação da microbiota. Estas diferenças metabólicas e estruturais foram responsáveis pela maior velocidade e pelo maior grau de degradação da matéria orgânica dissolvida no efluente TCF que no ECF. O uso de lodo biológico adaptado ao efluente ECF aumentou sua capacidade de degradar a matéria orgânica dissolvida no mesmo efluente, principalmente, na fração com MM < 3000, na qual foi encontrada a maior parte do AOX nesse efluente. Os resultados indicam que a principal diferença funcional entre as comunidades bacterianas que se estabelecem no sistema de tratamento biológico, e que teria impacto sobre a eficiência do tratamento dos efluentes, é a maior capacidade de degradar matéria organoclorada encontrada nos lodo adaptado ao efluente ECF.

ABSTRACT

The pollutant load of bleached kraft pulp mill effluents varies with the bleaching sequence and conditions used. Biological treatment efficiency of these effluents depends on the metabolic capacity of the biological sludge, that in turn depends on adaptation of the microorganisms present in the sludge to the effluent being treated. A better understanding of the dynamics of the bacterial communities and their impact on degradation rates in effluent treatment systems will aid in developing better treatment system management programs. ECF and TCF bleaching effluents were generated in the laboratory from the same eucalypt kraft-O pulp. Effluent treatment efficiency was evaluated by analyzing BOD, COD and AOX in the effluents and their high (> 3000 Da) and low (< 3000 Da) molecular mass fractions before and after treatment in a bench scale activated sludge system. BOD removal was similar for both effluents (>97%) whereas removal of COD was greater in TCF (77-85%) than in ECF (47-68%) effluent, attributed largely to the removal of high molecular mass organic matter, which represented a significant fraction of TCF effluent but not ECF effluent. Microtox toxicity was consistently eliminated from both effluents, whereas chronic toxicity to algae was reduced but not removed during treatment. Microbial communities present in the ECF and TCF adapted sludges were readily differentiated based on their metabolic capacity, through principal components analysis of their substrate utilization profiles in Biolog GN[®] microplates. Microbial community structure in the ECF and TCF sludges was analyzed by the fluorescent *in situ*

hybridization (FISH) technique, using probes complementary to the rRNA of Eubacteria, alfa, beta and gamma subclasses of the Proteobacteria, and gram positive bacteria with high G+C content. The main taxonomic difference detected was the greater proportion of cells belonging to the alfa subclass in TCF adapted sludge (27%) than in ECF adapted sludge (6%). These results indicate the existence of metabolic and structural differences in the bacterial communities present in ECF and TCF sludges arising from adaptation to the different effluents. These metabolic and structural differences were responsible for the greater degree and rate of degradation of dissolved organic matter in TCF effluent as compared to ECF effluent. Adaptation of sludge microbial biomass to ECF effluent positively affected its capacity to degrade the more recalcitrant chlorinated organic matter in this effluent. The results indicate that the main functional difference between the bacterial communities established during biological treatment that will affect effluent treatment efficiency is the increased capacity to degrade chlorinated organic matter found in the ECF adapted sludge community.

1. INTRODUÇÃO

Efluentes de branqueamento, ricos em matéria orgânica dissolvida, são responsáveis por até 85% do volume total dos efluentes de uma fábrica de celulose kraft branqueada. Valores típicos de carga poluente em filtrados de branqueamento de modernas fábricas de celulose kraft de eucalipto variam de 500 a 1500 mg DQO/L, 200 a 800 mg DBO/L e 10 a 20 mg AOX/L (1-3), dependendo do tipo de branqueamento ("standard", ECF ou TCF) e dosagem de reagentes utilizados. Os sistemas de tratamento de fábricas de celulose, geralmente lagoas aeradas ou lodos ativados, conseguem redução média de 90 a 95 % para DBO, mas de apenas 40 a 60 % para a DQO (4-7). Há relatos que a fração de DQO ou AOX de efluentes de branqueamento de baixa massa molecular é mais rapidamente degradada do que a fração de alta massa molecular fazendo com que a proporção da matéria orgânica com massa molecular alta aumente após o tratamento (8-10), mas já foi demonstrado que a biodegradabilidade da matéria orgânica de massa molecular alta dissolvida no efluente depende do tipo de branqueamento praticado (3). Sabe-se que efluentes de branqueamento TCF geralmente apresentam maiores níveis de DBO que efluentes ECF, em virtude da maior degradação oxidativa da fração celulósica da polpa (11). Acredita-se, no entanto, que os efluentes de branqueamento ECF e TCF são igualmente tratáveis em sistemas que operam com eficiência (11-13). No entanto, variações no tipo de efluente que está sendo tratado podem alterar as características do lodo biológico e tais alterações podem afetar a eficiência do tratamento biológico (13-15).

Uma das chaves para assegurar a estabilidade e eficiência de um sistema de tratamento biológico é o conhecimento da dinâmica da comunidade microbiana presente no lodo biológico e sua correlação com os parâmetros operacionais do sistema (15-19). Comunidades microbianas podem ser consideradas como unidades funcionais que são caracterizadas pela soma das propriedades metabólicas e pelos grupos taxonômicos microbianos envolvidos. Desde a introdução do uso dos perfis de utilização de substratos em microplacas BiologGN[®] para diferenciar comunidades de bactérias heterotróficas por Garland e Mills (20), o mesmo tem se mostrado um método rápido, simples, reproduzível e econômico para discriminar comunidades microbianas baseada nas suas funções metabólicas (21-24). Na última década, a hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) complementares ao RNA ribossômico (rRNA) tem se afirmado como ferramenta útil para a análise taxonômica de bactérias em comunidades complexas, (25), sendo que a comparação da composição de duas comunidades bacterianas pode ser realizada adequadamente utilizando sondas de diferentes níveis taxonômicos (17).

Um melhor conhecimento da natureza e biodegradabilidade da matéria orgânica dissolvida nos diferentes tipos de filtrados de branqueamento de celulose kraft de eucalipto e a influência da adaptação da microbiota presente no lodo biológico a esses filtrados fornecerá subsídios para um melhor gerenciamento dos sistemas de tratamento biológico no intuito de minimizar o impacto dos efluentes tratados nos ecossistemas aquáticos.

Os objetivos do presente estudo foram: 1) comparar a eficiência do tratamento de efluentes branqueamento ECF e TCF de polpa kraft de eucalipto e a influência da massa molecular sobre a biodegradação da matéria orgânica dissolvida nos efluentes, 2) comparar a estrutura e função das comunidades bacterianas que se desenvolvem durante o tratamento dos efluentes ECF e TCF, e 3) avaliar a importância da adaptação do lodo biológico para a eficiência do tratamento. A eficiência do tratamento foi avaliada pela quantificação dos valores de DBO, DQO, cor e AOX nos efluentes e suas frações de alta e baixa massa molecular, antes e após o tratamento em sistema de lodos ativados de bancada. A função da

comunidade heterotrófica dos lodos foi avaliada pelos perfis de utilização de substratos e pela assimilação de frações da matéria orgânica com massa molecular definida nos efluentes ECF e TCF. A estrutura da comunidade bacteriana foi caracterizada pela contagem de grandes grupos de bactérias presentes nos lodos, utilizando-se da técnica de hibridização *in situ*.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.2 Polpa e efluentes

Amostra de polpa kraft de eucalipto pré-deslignificada com oxigênio com número kappa = 14,0; viscosidade = 31,9 cP; e alvura = 44,3% ISO foi obtida de uma fábrica brasileira. A polpa foi branqueada até alvura final de 88%ISO, em sequência ECF (DEoDD) e TCF [Q(OP)(QZ)(PO)], sob as condições descritas no Quadro 1. Os estádios D e Q foram efetuados com polpa acondicionada em sacos de polietileno, em banho a vapor munido de termoregulador. Os estádios Z, (OP) e (PO) foram efetuados em reator/misturador de intensidade alta, Quantum Mark IV (Twinsburg, OH, EUA). O estágio Eo foi efetuado em autoclave rotativa com aquecimento elétrico, equipada com manômetro, termômetro e válvulas de engate rápido para a injeção e a liberação de gás. Após cada um dos estádios, o licor residual foi extraído por centrifugação da polpa e, em seguida, a polpa lavada, exaustivamente, com água destilada antes de se ajustar sua consistência para o estágio seguinte. Foram produzidos 100 L de cada tipo de efluente pela mistura de volumes iguais dos licores residuais de cada estágio, uma vez que todos foram realizados à mesma consistência (10%). Os efluentes de cada um dos processos de branqueamento foram divididos em alíquotas de 5 L e armazenados a -20°C até serem utilizados para a alimentação do reator do sistema de lodo ativado. Para alimentar o reator, as alíquotas dos efluentes TCF e ECF foram descongeladas, suplementadas com nitrogênio ((NH₄)₂SO₄) e fósforo (K₂HPO₄), na relação DBO:N:P de 100:5:1. O efluente ECF foi utilizado sem outros ajustes, enquanto o TCF foi neutralizado (pH 6 a 8) com H₂SO₄ antes de entrar no reator. O efluente, suplementado e neutralizado, foi acondicionado em caixa de isopor contendo gelo para minimizar as possíveis modificações químicas durante os cinco a seis dias de funcionamento de alimentação do reator com os 5 L do efluente. As possíveis modificações durante este período foram verificadas pela quantificação da DQO do efluente restante no último dia de uso da alíquota de 5 L.

Quadro 1 - Condições utilizadas no branqueamento da polpa kraft de eucalipto pré-deslignificada com oxigênio para a geração dos efluentes ECF e TCF de celulose kraft de eucalipto.

Parâmetro	ECF				TCF			
	D	Eo	D	D	Q	OP	QZ	PO
Temperatura, °C	70	90	70	70	70	100	70/amb.	100
Tempo, min	30	15+60	180	120	60	60	60	120
pH final	3	10-11	3,5-4	4-5	7	11	7/2,5	10,5-11
Polpa, g.a.s.	200	150	200	200	200	300	200/250	300
Consistência, %	10	10	10	10	10	10	10	10
Reagentes, % base polpa a.s.								
ClO ₂	1,0	-	0,8	0,2	-	-	-	-
O ₂	-	0,4	-	-	-	0,4	-	0,2
O ₃	-	-	-	-	-	-	0,4	-
NaOH	-	1,5	-	-	-	1,5	-	1,3
H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	1,0	-	3,0
DTPA	-	-	-	-	0,2	-	0,1	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	-	0,2	-	0,2

2.2. Sistema de lodos ativados

O sistema utilizado para estudo em bancada foi montado com o propósito de simular o tratamento do efluente por lodos ativados (Figura 1). O volume de trabalho do reator foi de 750 mL, e do decantador de 500 mL. O reator foi inoculado inicialmente com lodo ativado do sistema de tratamento de uma fábrica brasileira de polpa kraft de eucalipto branqueada. A estabilidade do sistema foi avaliada

pelas análises de DQO do efluente na saída do decantador e sólidos suspensos voláteis (SSV) dentro do reator, duas a três vezes por semana. A temperatura foi mantida a 30°C, a vazão de efluente mantida em 1 L/d, correspondendo ao tempo de retenção hidráulica de 18 horas, e o fluxo de reciclagem do lodo ajustado para manter o tempo de retenção do lodo entre 10 e 12 dias.

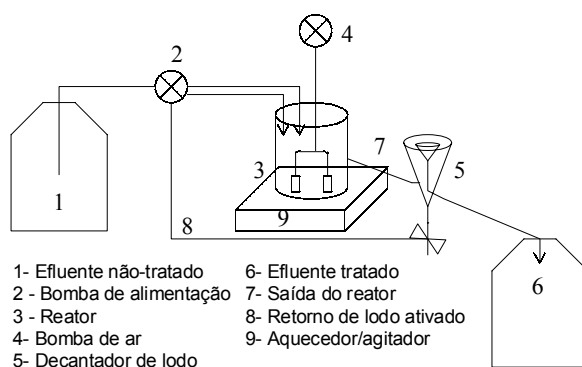


Figura 1 - Esquema do sistema de lodo ativado de bancada utilizado.

2.3. Caracterização das polpas e dos efluentes

Viscosidade, alvura e número kappa foram analisados de acordo com as normas da TAPPI. Os efluentes ECF e TCF foram caracterizados antes e após o tratamento, pela análise de DBO, DQO, AOX e cor, conforme as normas APHA (26), SCAN (27) e CPPA (28). Todas as análises dos efluentes foram realizadas em duplicata em cada avaliação.

A atividade biológica dos efluentes foi avaliada pela quantificação da toxidez aguda no sistema Microtox e toxidez crônica no teste de inibição de crescimento de algas, de acordo com normas da APHA (26) e da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo (29), respectivamente. A toxidez aguda Microtox foi realizada em sistema automatizado da Microbics Corp. (30). O resultado do teste foi expresso pelo valor de EC_{50} , a concentração do efluente que reduz em 50% a luminescência original das bactérias, conforme calculada pelo programa proprietário da Microbics Corp. A avaliação da toxidez crônica a algas foi realizada com a alga verde unicelular *Selenastrum capricornutum*. O resultado do teste foi expresso pelo valor de IC_{25} , a concentração que reduziu a taxa de crescimento das algas em 25%, conforme calculada pelo programa ICPIN, fornecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Uma cultura de *Selenastrum capricornutum* foi obtida da CETESB e mantida de acordo com a norma da mesma (29).

2.4. Fracionamento dos efluentes

Os efluentes originais e tratados foram fracionados pela massa molecular (MM) em célula de ultrafiltração Amicon, modelo CH2PR, munido de filtro Diaflo HP3-20 com limite de exclusão de 3000 Daltons (Da). As duas frações obtidas ($MM < 3000$ e $MM > 3000$) foram reconstituídas ao volume original com água desionizada para posterior caracterização quanto aos parâmetros ambientais.

2.5. Utilização das frações de massa molecular alta dos efluentes ECF e TCF como substratos, pelas comunidades microbianas

Alíquotas de 5 mL das duas frações dos efluentes ECF e TCF foram liofilizadas, ressuspensas em água desionizada na concentração desejada e utilizadas como substratos em microplacas BiologMT® (Biolog, Hayward, CA, EUA). Os 96 poços destas microplacas, contendo somente sais minerais e o corante violeta de tetrazolium, foram utilizados para testar a degradação dos efluentes pelos microorganismos presentes no lodo. O grau de desenvolvimento de cor resultante da redução do corante, após a inoculação da placa com suspensão de células, foi relacionado com o grau de degradação (oxidação) do substrato adicionado (20). Foram utilizadas quantidades correspondentes a 0,5 mg de sólidos dos dois efluentes,

em volume total de 50 μL , adotando-se a inclusão de 10 repetições de cada efluente por placa MT. As placas foram inoculadas com 100 μL de lodo, previamente lavado duas vezes com tampão fosfato 0,1M; pH 7; e diluído a 10^{-2} em NaCl a 0,85%. A seguir, as placas foram incubadas a 25°C. Em cada placa os tratamentos-controle foram constituídos de dois tipos de controle: no primeiro houve a adição de suspensão de lodo sem o efluente (substrato), para verificar o possível desenvolvimento de cor sem a presença de fonte externa de carbono; e no segundo controle, o efluente foi adicionado sem a suspensão de lodo, para verificar a contribuição do efluente à cor desenvolvida. O volume da mistura de reação foi completado até 150 μL com água desionizada, nos dois tipos de poços-controle. A absorbância a 590 nm foi lida em intervalos de 24 horas até 96 horas de incubação, em leitora de microplacas BioTek Elx808. A absorbância foi corrigida, subtraindo-se dela o valor da absorbância no poço-controle contendo o efluente correspondente.

2.6. Caracterização das comunidades microbianas

2.6.1. Função metabólica - perfis de utilização de substratos

Amostras de lodo foram avaliadas, em intervalos de sete a 10 dias, ao longo do tratamento dos efluentes ECF e TCF quanto ao perfil de utilização de substratos em placas BiologGN[®] (Biolog, Hayward, CA, EUA). Estas microplacas, com 96 poços incluem 95 substratos, divididos em seis grandes grupos, e um poço-controle, sem substrato. Cada poço contém também o corante redox violeta de tetrazolium e uma mistura tamponada de nutrientes. A oxidação das fontes de carbono conduz a redução do corante à sua forma colorida. O desenvolvimento diferenciado de cor nos diferentes poços reflete diferenças no grau de utilização dos substratos (20) e resulta no perfil de utilização de substratos da comunidade.

As placas BiologGN[®] foram inoculadas com alíquotas de 150 μL do inóculo do lodo lavado, por poço, a partir de diluições 10^{-2} em NaCl 0,85%. Cinco placas foram inoculadas para cada amostra. As placas foram incubadas a 25°C por até 96 horas e a absorbância a 590 nm lida em intervalos de 12 a 24 horas, em leitora de microplacas BioTek Elx808 (BioTek, OK, EUA). Os valores de absorbância de cada placa foram corrigidos, subtraindo-se deles o valor de absorbância do poço-controle da mesma placa, para produzir os dados pontuais corrigidos. Absorbâncias negativas foram ajustadas para zero. O valor da área sob a curva de absorbância (cor) *versus* tempo, até 72 horas de incubação para cada substrato, dividido pela área média de todos os poços da placa (31) foi calculado para cada substrato pela aproximação trapezoidal proposta por Guckert et al. (32). A comparação das amostras com base em diferenças nos perfis de utilização de substratos foi realizada por meio da análise de componentes principais (Statistica Versão 5.0, StatSoft) das áreas sob a curva de cinética de cor (20).

2.6.2. Estrutura taxonômica - hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH)

Sondas complementares ao RNA ribossômico (rRNA) da Eubactéria (EUB), das subclasses alfa (ALF), beta (BET) e gamma (GAM) da Proteobactéria e das bactérias gram positivas de teor alto G+C (HGC) foram com carboxifluoresceína foram adquiridas da Life Sciences/GIBCO do Brasil. Soluções-estoque das sondas foram preparadas em tampão TE (Tris.HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM), à concentração de 100 mM, e soluções de trabalho preparadas no mesmo tampão, à concentração de 50 ng/ μL . As soluções foram armazenadas a -20°C, no escuro, até seu uso. A fixação das células e o preparo das lâminas foram feitos de acordo com a metodologia descrita por Amann et al. (33). Esfregaços de 2 μL das células fixadas foram aplicadas em círculos de 10 mm de diâmetro, marcadas com lápis de cera em lâminas limpas. Após a secagem ao ar, as células foram imobilizadas nas lâminas pela imersão em soluções de etanol a 50, 80, e 96%, por três minutos cada, e as lâminas estocadas ao ar livre até seu uso.

A metodologia descrita por Manz et al. (34) foi utilizada, com algumas modificações, para a hibridização *in situ*. A solução de hibridização continha NaCl 0,9 M; Tris.HCl 20 mM, pH 7,4; Triton X114 0,5%; e formamida à concentração final de 20% (para hibridização com as sondas EUB e ALF) ou 35% (para hibridização com as sondas BET, GAM e HGC). Nove microlitros da solução de hibridização e 1 μL da sonda à concentração de 5 ng/ μL foram aplicados ao esfregaço, que foi então coberto por parafilme. As lâminas foram incubadas a 46°C no escuro por três horas em câmara isotônica (i.e. com atmosfera em equilíbrio com NaCl 0,9M), a fim de evitar a evaporação da solução. Após este período, as lâminas foram enxaguadas com 2 mL da solução de lavagem e, a seguir, mergulhadas na solução de lavagem por

15 min, a 48°C, enxaguadas com água desionizada e secas ao ar. A solução de lavagem foi composta por: Tris.HCl 20 mM; Triton X114 0,5%; EDTA 5 mM; e NaCl 180 mM (para as sondas EUB e ALF) ou NaCl 40 mM (para as sondas BET, GAM e HGC).

As lâminas foram montadas em solução “Anti-Fade” e observadas no aumento de 1.000x em microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse E600, munido de lâmpada de mercúrio de alta pressão e de filtro triplo DAPI/FITC/TRITC e calibrado com um micrômetro Olympus e ocular micrométrica Carl Zeiss OSM 203749. Foram preparadas no mínimo 10 lâminas para cada amostra, com cada sonda; e um número de campos contendo o equivalente a 2.000 células que hibridizaram com a sonda EUB foram contados. A contagem das células foi feita diretamente no microscópio, utilizando as diluições das amostras que permitiam distinguir células individuais, para estimar a concentração de cada tipo de célula/mL no lodo original.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Eficiência de tratamento dos efluentes ECF e TCF

A caracterização dos efluentes ECF e TCF produzidos pelo branqueamento da polpa kraft-O de eucalipto até 88% ISO está apresentada no Quadro 2. A maior degradação da polpa TCF resultou na geração de efluente mais rico em matéria orgânica, com valor de DBO 3,5 vezes maior e de DQO 2,4 vezes maior que o do efluente ECF. A maior parte da matéria orgânica (DBO, DQO e AOX) em ambos os efluentes se encontra na fração de baixa MM (< 3000 Da). A matéria orgânica no efluente TCF apresenta maior biodegradabilidade, caracterizada pelo valor da relação DBO/DQO, do que o efluente ECF. Por outro lado, a matéria orgânica no efluente ECF apresenta maior grau de cloração (AOX/DQO) do que o efluente TCF, sendo que este último apresentou valor irrisório de AOX. Os efluentes ECF e TCF apresentaram toxicidade aguda no teste Microtox e crônica a algas, sendo o efluente ECF mais tóxico nos dois ensaios.

Quadro 2 – Caracterização da matéria orgânica dissolvida nos efluentes de branqueamento ECF e TCF de polpa kraft de eucalipto.

	DQO, mg/L	DBO, mg/L	AOX, mg/L	$\frac{DBO}{DQO}$	$\frac{AOX}{DQO}$	Toxidez aguda, EC ₅₀ ¹ , %	Toxidez crônica, IC ₂₅ ² , %
ECF total	515	207	6,1	0,40	0,012	32,0	0,8
> 3000 Da	86	36	1,2	0,42	0,014	-	-
< 3000 Da	378	150	7,3	0,40	0,027	-	-
% recuperado	90,1	89,9	139,3	-	-	-	-
TCF total	1246	738	0,2	0,59	<0,001	73,7	5,1
> 3000 Da	293	127	0	0,43	<0,001	-	-
< 3000 Da	840	546	0,2	0,65	<0,001	-	-
% recuperado	90,9	91,2	100	-	-	-	-

¹ EC₅₀ = concentração que reduziu a fluorescência das células de *Vibrio fischeri* em 50% (Microtox).

² IC₂₅ = concentração que reduziu o crescimento da alga *Selenastrum capricornutum* em 25%.

No Quadro 3 estão apresentados os dados da eficiência do tratamento dos efluentes ECF e TCF no sistema de lodos ativados de bancada. A concentração de matéria com massa molecular alta no efluente TCF não foi impedimento à remoção alta de DQO neste efluente durante o tratamento biológico, embora em termos percentuais, a remoção tenha sido maior na fração de baixa massa molecular. A caracterização química do material orgânico dissolvido em efluentes ECF e TCF tem demonstrado que o material de massa molecular alta (>1.000 Da) em efluentes de branqueamento TCF contem mais carboidratos, principalmente xilanas, que em efluentes ECF (8). Por outro lado, o material de massa molecular alta (>1.000 Da) no efluente de branqueamento ECF tem poucas estruturas aromáticas, originárias da degradação de estruturas fenólicas da lignina (8). A natureza da matéria orgânica dissolvida no efluente de branqueamento afeta a sua biodegradabilidade durante o tratamento por lodo ativado, e a remoção de

DQO em efluentes com níveis mais altos de carboidratos é mais completa que a remoção de DQO em efluentes com níveis maiores de lignina (3).

Quadro 3 – Caracterização dos efluentes ECF e TCF de polpa kraft de eucalipto após tratamento em sistema de lodos ativados de bancada.

	DQO		DBO		AOX		Toxidez aguda, EC ₅₀ ¹ , %	Toxidez crônica, IC ₂₅ ² , %
	mg/L	% remoção	mg/L	% remoção	mg/L	% remoção		
ECF total	192	62,7	5,4	97,4	4,1	34	>100	16,1
> 3000 Da	17	80,2	1,2	96,7	-	-	-	-
< 3000 Da	91	75,9	3,6	97,6	-	-	-	-
TCF total	236	81,1	17,3	97,7	n.d.	-	>100	17,4
> 3000 Da	64	78,2	0,1	99,9	-	-	-	-
< 3000 Da	116	86,2	2,2	99,6	-	-	-	-

¹ EC₅₀ = concentração que reduziu a fluorescência das células de *Vibrio fischeri* em 50% (Microtox).

² IC₂₅ = concentração que reduziu o crescimento da alga *Selenastrum capricornutum* em 25%.

A massa molecular não é, necessariamente, o fator limitante para a remoção de alguns compostos recalcitrantes, em particular os organoclorados (35), que contêm estruturas químicas desconhecidas na natureza, como a ligação C-Cl. A menor remoção percentual da DQO na fração do efluente ECF com MM <3000 Da foi atribuída, em parte, à presença desses compostos recalcitrantes. Essa fração contribuiu com a maior parte da DBO, DQO e AOX do efluente original.

A semelhança entre os níveis de toxidez dos efluentes tratados indica que a atividade biológica de efluentes após o tratamento biológico não está relacionada com o tipo de branqueamento praticado, mas com a provável existência de compostos específicos nos efluentes, corroborando a interpretação adotada anteriormente por Tana e Lehtinen (36).

3.2. Degradação da matéria orgânica dissolvida nos efluentes ECF e TCF por lodo biológico adaptado e não adaptado

A avaliação da degradação da matéria orgânica dissolvida nos efluentes pelos lodos biológicos adaptados aos efluentes ECF e TCF (Figura 3) mostra a existência de diferenças relativas à capacidade de remoção da matéria orgânica dissolvida nos dois tipos de efluentes pela microbiota existente nos lodos, bem como a importância relativa da adaptação do lodo ao efluente que está sendo tratado. A matéria orgânica no efluente TCF foi degradada mais rapidamente (maior inclinação das curvas de tempo *versus* A590) e de forma mais completa (maiores valores máximos de A590), tanto pelo lodo adaptado ao efluente TCF como pelo lodo adaptado ao efluente ECF, do que a matéria orgânica no efluente ECF. Os dois tipos de lodo atingiram o mesmo grau de degradação da matéria orgânica do efluente TCF, mas o lodo adaptado ao efluente ECF foi capaz de degradar a matéria orgânica do efluente ECF de forma mais completa do que o lodo adaptado ao efluente TCF. O uso de lodo biológico adaptado aumentou a capacidade de degradar a matéria orgânica dissolvida no efluente ECF, principalmente, na fração com MM < 3000, na qual foi encontrada a maior parte do AOX.

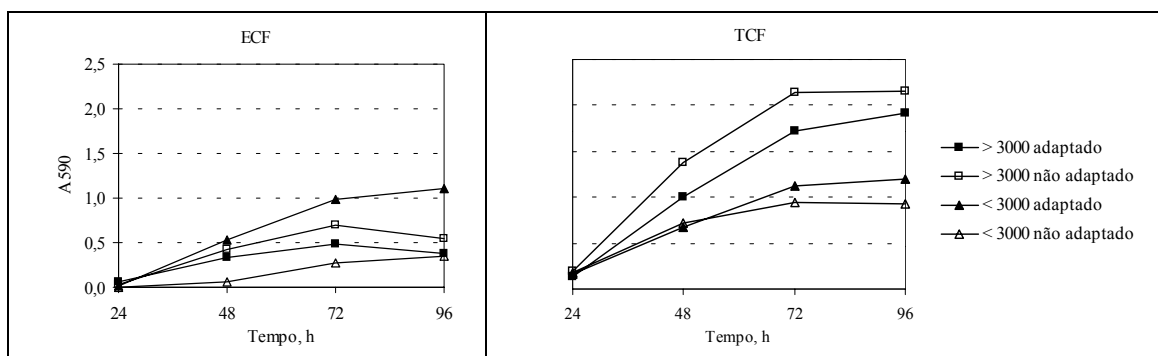


Figura 2 - Velocidade e grau relativos de degradação da matéria orgânica dissolvida nas frações de alta (MM > 3000) e baixa (MM < 3000) de efluentes ECF e TCF, após inoculação com lodo biológico adaptado ou não a esses efluentes.

3.3. Caracterização das comunidades microbianas presentes nos lodos biológicos

3.3.1. Função das comunidades microbianas nos lodos - perfis de utilização de substratos

A ordenação das amostras de lodo biológico nos dois primeiros componentes principais (CPs) produzidas pela ACP realizada com dados de área sob a curva de cinética de cor, estão representadas na Figura 3, construída com os valores médios das cinco repetições de cada amostra. As amostras de lodo TCF foram agrupadas de maneira mais compacta que as de lodo ECF. A diferenciação das amostras do lodo ECF das do TCF necessitou da extração de dois CPs. No entanto, a separação obtida neste segundo CP foi reproduzível para amostras de cada tipo, coletadas ao longo de seis semanas, aproximadamente, demonstrando que os perfis de utilização de substratos refletem diferenças metabólicas estáveis entre as diferentes comunidades bacterianas. Os dois primeiros CPs extraídos explicaram em torno de 50% da variância total nos dados originais, com 60 a 75% desta variância explicada pelo primeiro CP.

3.3.2. Estrutura taxonômica das comunidades microbianas – FISH

A composição das comunidades de bactérias presentes nas amostras de lodo ECF e TCF, relativa às células de Eubactéria nas amostras, está apresentada na Figura 4. Foi possível classificar 62% das células que hibridizaram com a sonda específica para a Eubactéria no lodo TCF e apenas 40% da Eubactéria no lodo ECF, com as sondas para as subclasses alfa, beta e gamma da Proteobactéria e para as bactérias gram positivas de teor alto de G+C. A principal diferença entre as amostras foi a maior densidade de células da subclasse alfa da Proteobactéria no lodo TCF, comparadas ao lodo ECF. A Proteobactéria representou de 40 (lodo TCF) a 60% (lodo ECF) das células da Eubactéria. Já foi mostrada que a maioria das bactérias em lodos ativados pertence às subclasses alfa, beta e gamma da Proteobactéria (17, 25, 37). Neste filo encontram-se a maioria das bactérias gram negativas mais comuns, inclusive aquelas já isoladas de sistemas de tratamento de efluentes da indústria de celulose, tais como *Acinetobacter spp.*, *Acidovorax spp.*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ancylobacter aquaticus*, *Klebsiella spp.*, *Comamonas testosteroni*, *Methylobacterium spp.*, *Pseudomonas stutzeri*, *P. fluorescens*, e *P. putida* (38, 39). A diferença encontrada entre as proporções de bactérias da subclasse alfa nos lodos ECF e TCF poderia estar relacionada com as diferenças encontradas nos perfis de utilização de substratos (Figura 3) destes dois tipos de amostras.

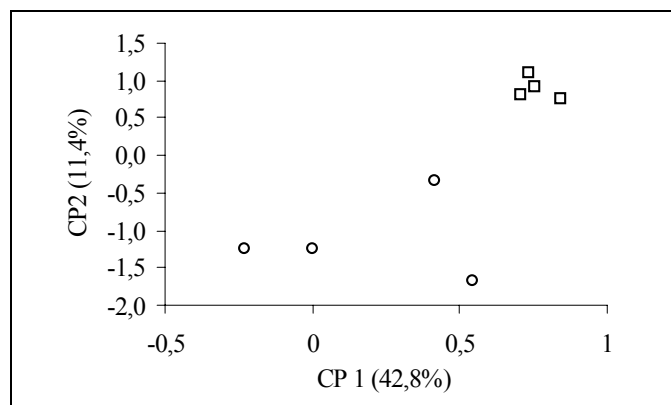


Figura 3 - Ordenação de amostras de lodo biológico ECF (círculos) e TCF (quadrados) produzida pela análise de componentes principais dos perfis de utilização de substratos em placas BiologGN[®], realizada com dados de estimativa da área sob a curva de absorvância de cada substrato até 72 horas de incubação. Os valores entre parênteses nos eixos representam a percentagem da variância total extraída pelo CP.

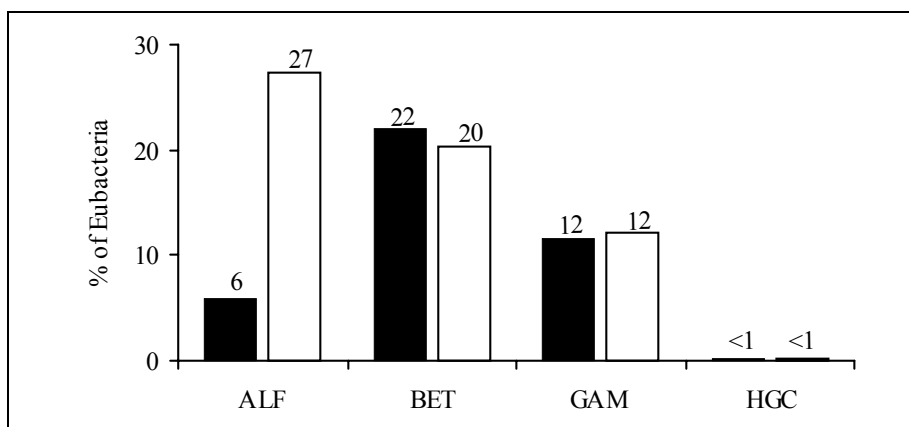


Figure 4 - Composição relativa das comunidades de bactérias presentes em lodos biológicos do tratamento de efluentes de branqueamento ECF e TCF, com base na hibridização *in situ* com sondas específicas para Eubacteria, subclasses alfa (ALF), beta (BET) e gamma (GAM) da Proteobacteria, e bactérias gram positivas de teor alto de G+C (HGC).

4. CONCLUSÃO

Diferenças funcionais e estruturais entre as comunidades bacterianas nos lodos adaptados aos efluentes ECF e TCF foram encontradas indicando que diferentes funções metabólicas sejam importantes e diferentes populações microbianas se estabeleçam durante o tratamento de efluentes ECF e TCF. A matéria orgânica dissolvida em efluente TCF é degradada mais rapidamente e de forma mais completa pelos microrganismos presentes no lodo biológico do que a dissolvida em efluente ECF, levando à maior redução percentual de DQO em efluente TCF do que em efluente ECF, mesmo sem a adaptação prévia do lodo. A adaptação do lodo biológico ao efluente ECF afeta, positivamente, a sua capacidade de degradar a matéria orgânica dissolvida neste efluente, como consequência da alteração da estrutura da comunidade microbiana presente no lodo.

AGRADECIMENTO

Este trabalho teve o apoio da CAPES, na forma de uma bolsa de pós-graduação.

LITERATURA CITADA

1. Asplund, C. Germgard, U. Bleaching of eucalypt kraft pulp. Part 3. *Appita*, v.44, n.2, p.95-99, 1991.
2. Boyden, B.H., et al. Treatment of bleachery effluents from kraft mills pulping mature eucalypts. *Wat. Sci. Tech.*, v.29, n.5-6, p.247-258, 1994.
3. Herstad-Svärd, S., Basta, J., Jour, P. and Wäne, G., Caracterização comparativa dos efluentes de modernas plantas de branqueamento (ECF) – celulose de eucalyptus e de fibra longa., 30º Congresso Anual de Celulose e Papel, 1997, São Paulo, ABTCP, p.49-62.
4. ; Heimburger, S.A., et al. Kraft mill bleach plant effluents: recent developments aimed at decreasing their environmental impact, Part 2. *Tappi*, v.71, n.11, p.69-78, 1998
5. Bryant, C. W., Avenell, J. J., Barkley, W. A. and Thut, R. N., The removal of chlorinated organics from conventional pulp and paper wastewater treatment systems., *Wat. Sci. Tech.* 26(1-2): 417, 1992.
6. HALL, E.R., RANDLE, W.G. AOX removal from bleached kraft mill wastewater: a comparison of three biological treatment processes. *Wat. Sci. Tech.*, v. 26, n.1-2, p.387-396, 1992.
7. Graves, J.W., Joyce T.W. A critical review of the ability of biological treatment systems to remove chlorinated organics discharged by the paper industry. *Water*. V.20, n.2, p.155-160, 1994.
8. Dahlman, O., Reimann, A. K., Stomberg, L. M. and Mörck, R. E., High-molecular-weight effluent materials from modern ECF and TCF bleaching., *Tappi* 78(12): 99, 1995.
9. Martin, V.J.J., et al. Chlorophenolics from high molecular weight chlorinated organics isolated from bleached kraft mill effluent. *Holzforschung*, v.49, n.5, p.453-461, 1995.
10. Sonnenberg, L.B., et al. Transformations of wastewater during biological treatment. In: *International Environmental Conference, 1995. Tappi Proceedings...*, Atlanta: Tappi Press, 1995. p.219-231.
11. Cates, D. H., Eggert, C., Yang, J. L. and Eriksson, K-E. L., Comparison of effluents from TCF and ECF bleaching of kraft pulps., *Tappi* 78(12): 93, 1995.
12. Saunamäki, R., Treatability of wastewaters from totally chlorine-free bleaching., *Tappi* 78(8): 185, 1995.
13. Buitrón, G. and González, A., Characterization of the microorganisms from an acclimated activated sludge degrading phenolic compounds., *Wat. Sci. Tech.* 34(5-6): 289 (1996).
14. Larisch, B. C. and Duff, S. J. B., Effect of H₂O₂ and DTPA on the characteristics and treatment of TCF (totally chlorine free) and ECF (elementally chlorine free) kraft pulping effluents., *Wat. Sci. Tech.* 35(2-3): 163(1997).
15. Liss, S. N. and Allen, D. G., Microbiological study of a bleached kraft pulp mill aerated lagoon., *J. Pulp Paper Sci.* 18(6): J216, 1992.
16. Fulthorpe, R.R., Allen, D.G. Evaluation of Biolog MT plates for aromatic and chloroaromatic substrate utilization tests. *Can. J. Microbiol.*, v. 40, p.1067-1071, 1994.
17. Manz, W., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K-L. In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.*, v. 28, n.8, p.1715-1723, 1994.
18. SCHNEIDER, C.A., MO, K., LISS, S.N. Applying phenotypic fingerprinting in the management of wastewater treatment systems. *Water Sci. Tech.*, v. 37, n.4 - 5, p.461-464, 1998.
19. KAISER, S.K., GUCKERT, J.B., GLEDHILL, D.W., Comparison of activated sludge microbial communities using Biolog microplates. *Water Sci. Tech.*, v. 37, n.4-5, p.57-63, 1998.
20. Garland, J. L. and Mills, A. L., Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community –level sole-carbon-source utilization., *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8); 235, 1991.
21. Wünsche, L., Brüggemann, L. and Babel, W. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17: 295-306, 1995
22. Konopka, A., Oliver, L. and Turco Junior., R.F. 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb. Ecol.* 35: 103-115.
23. Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W-T. and Forney, L. 1998. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1220-1225.
24. Victorio, L., Gilbride, K.A., Allen, D.G., Liss, S.N. Phenotypic fingerprinting of microbial communities in wastewater treatment systems. *Wat. Res.*, v. 30, n.5, p.1077-1086, 1996.

25. Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K-L. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169, 1995.
26. APHA - American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19, Washington, 1995
27. SCAN. Test Methods, Estocolmo: Scandinavian Pulp, Paper and Board Testing Committee, 1989.
28. CPPA - CANADIAN PULP AND PAPER ASSOCIATION. Technical Section Standard Test Methods. Montreal: 1986.
29. Cetesb - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo. 1986. Toxicity test with *Chlorella vulgaris*. Standard L5.020. São Paulo. 7p.
30. Microbics Corp. Microtox™ Manual, Carlsbad, 199., 5 v.
31. Choi, K.H. and Dobbs, F.C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J. Microbiol. Meth.* 36: 203-213, 1999.
32. Guckert, J.B., Carr, G.J., Johnson, T.D., Hamm, B.G., Davidson, D.H. and Kumagai, Y. Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *J. Microbiol. Meth.* 27: 183-197, 1996.
33. Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A.. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770, 1990
34. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K-L. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15: 593-600, 1992.
35. Jokela, J. K., Laine, M., Ek., M. and Salkinoja-Salonen, M., Effect of biological treatment on halogenated organics in bleached kraft pulp mill effluents studied by molecular weight distribution analysis., *Environ. Sci. Technol.* 27(3): 547, 1993.
36. Tana, J. and Lehtinen, K-J., The Aquatic Environmental Impact of Pulping and Bleaching Operations – An Overview, Finnish Environment Institute, Helsinki, 1996, 103 pp.
37. Kämpfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Böhringer, J., Wagner, M. and Amann, R. Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb. Ecol.* 32: 101-121, 1996.
38. Fulthorpe, R.R., Liss, S.N. and Allen, D.G. Characterization of bacteria isolated from a bleached kraft pulp mill wastewater treatment system. *Can. J. Microbiol.* 39: 13-24, 1993.
39. Valenzuela, J., Bumann, U., Céspedes, R., Padilla, L. and González, B. Degradation of chlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) in bleached kraft mill effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 227-232, 1997.