

Identificação da diversidade biológica em lodos ativados tratando efluentes de celulose

Identification of biological diversity in activated sludge treating pulp mill effluent

RESUMO

Com a crescente ascensão das indústrias de celulose e papel no mundo, busca-se desenvolver métodos mais eficientes e sustentáveis nos processos de tratamento de seus efluentes. Diante disso, a técnica de bioaumentação destaca-se entre os processos biológicos de tratamento. Os grupos de bactérias tipicamente encontradas em sistemas de tratamento de efluente de celulose são: *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus agri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae* no qual foram observadas boas remoções dos parâmetros físico-químicos como DQO, DBO₅, cor e lignina. Nesse trabalho, foram identificados alguns dos grupos de bactérias de um reator biológico de leito móvel (MBBR), utilizando meio suporte esponjoso (APG) tratando efluente de celulose kraft. Foram empregadas análises microbiológicas e de extração de DNA para a identificação dos microrganismos aderidos ao meio suporte. Em seguida, os grupos isolados e purificados foram identificados através do gene rRNA 16s. Até o presente foram identificadas as espécies *Pseudomonas stutzeri* e *Bacillus pumilus*. A partir desse isolamento e caracterização os organismos podem ser cultivados e usados em bioaumentação para melhorar o desempenho do tratamento biológico destes efluentes.

PALAVRAS-CHAVE: Biorremediação. Isolamento de bactérias. Tratamento biológico.

ABSTRACT

With the growing of the pulp and paper industries in the world, sought to develop more efficient and sustainable methods in the processes of treating its effluents. That said, the bio increase process stands out among the biological treatment processes. The groups of bacteria typically found in cellulose effluent treatment systems are: *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus agri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumoniae* in which the removal of physical-chemical parameters such as COD, BOD₅, color and lignin. In this study, some of the groups of bacteria from a moving bed biofilm reactor (MBBR) were identified, using spongy support media (APG) treating kraft cellulose effluent. Microbiological and DNA extraction analyzes were used to identify the microorganisms attached to the support media. Then, the isolated and purified groups were identified using the 16s rRNA gene. To date, the species *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus pumilus* have been identified. From this isolation and characterization, the organisms can be cultivated and used in bio increase improve the performance of the biological treatment of these effluents.

KEYWORDS: Bioremediation. Bacteria isolation. Biological treatment.

Mac Wendell Barbosa da Silva

Mac.wbarbosa@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Claudia Regina Xavier

Cxavier.utfpr@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Izadora Cervelin Flôr

Izadoracervelinflor@gmail.com

Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Jackeline Valendorf Nunes

Jacke.valendorf@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Recebido: XX set. 2020.

Aprovado: XX out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

As indústrias brasileiras de papel e celulose constituem um grande segmento para a economia do país. A crescente ascensão deste setor produtivo se dá devido às diversas condições de cultivo e disponibilidade de recursos para a produção (SAKURAI, 2016). De acordo com dados da Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ), atualmente o Brasil ocupa a segunda posição no ranking de países produtores de celulose, com produção média anual de 21 mil toneladas de celulose e produção média anual de 10 mil toneladas de papel (IBÁ, 2019).

Em contrapartida aos consideráveis benefícios na economia, as indústrias de papel e celulose são responsáveis por emitir grande quantidade de poluentes nos vários estágios de produção, destacando-se os poluentes na forma líquida, uma vez que são gerados cerca de 60m³ de efluente por tonelada de celulose produzida, o qual possui um alto potencial poluidor (TOCZYŁOWSKA-MAMIŃSKA, 2017). Há um grande interesse no estudo e desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis nos tratamentos biológicos desses efluentes os quais são reconhecidamente recalcitrantes.

Isto posto, faz-se necessário o emprego de sistemas de tratamentos que sejam eficientes e economicamente viáveis. No Brasil, o emprego de tratamentos biológicos aerados são frequentes, destacando-se os sistemas de lodos ativados e lagoas aeradas. Como uma variação dos sistemas de lodos ativados, têm-se o reator biológico de leito móvel (MBBR) do inglês *moving bed biofilm reactor*, nele os meios suporte disponibilizam superfície de adesão para biomassa microbiana permitindo um maior contato com os substratos no licor misto e conferindo estabilidade ao processo biológico de tratamento (ASSUNÇÃO; VANZETTO; XAVIER, 2015; PEITZ et al., 2019; XAVIER et al., 2011).

Também, mais recentemente, os processos de bioaugmentação tem se destacado entre os tratamentos biológicos. Ele se baseia na identificação, cultivo e uso de microrganismos que são capazes de remover matéria orgânica e compostos específicos (HOSSAIN; ISMAIL, 2015; HUBBE et al., 2016).

Diversos estudos estão sendo desenvolvidos sobre o isolamento e a introdução de um ou mais microrganismos no tratamento de efluentes de celulose e papel, os quais apresentam resultados promissores, como mostrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Microrganismos em sistemas de tratamento de efluente de celulose e papel.
(continua)

Tipo de reator	Condições de operação	Eficiência de remoção (%)	Microrganismo(s)	Referência
N.i.	pH: 7,0 – 8,0 Temp.: (35 ± 2)°C Agitação: 140 rpm TDH: 168h	DQO: 63,4 DBO ₅ : 64 Cor: 65 Lignina: 95	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Bacillus cereus</i>	Chandra et al. (2012)
Reator semi-batelada	pH: 7,0 – 8,2 Temp.: (35 ± 2)°C Agitação: 200 rpm TDH: 32h	DQO: 62±8 DBO: N.d. Cor: 37±8 Lignina: 30±8	<i>Brevibacillus agri</i>	Hooda et al. (2015)
Reator semi-batelada	pH: 7,0 – 8,2 Temp.: (35 ± 2)°C Agitação: 200 rpm TDH: 32h	DQO: 62,3 DBO: N.d. Cor: 51,6 Lignina: 42,6	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	Hooda et al. (2018)

Tipo de reator	Condições de operação	Eficiência de remoção (%)	Microrganismo(s)	Referência
N.i.	pH: N.d. Temp.: (35 ± 2)°C Agitação: 140 rpm TDH: 144h	DQO: 79 DBO ₅ : 85 Cor: 82 Lignina: 58	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yadav et al. (2015)
N.i.	pH: 7,6 Temp.: 30°C Agitação: 120 rpm TDH: 144h	DQO: 85 DBO ₅ : N.d. Cor: 72 Lignina: 58	<i>Serratia liquefaciens</i>	Haq et al. (2015)
N.i.	pH: 9,0 Temp.: 45°C Agitação: 200 rpm TDH: 48h	DQO: 22 DBO ₅ : N.d. Cor: 41,8 Lignina: 58	<i>Bacillus Pumilus</i>	Oliveira et al. (2009)

Nota: N.i. – Não informado; N.d. – Não determinado; Temp. – temperatura; TDH – tempo de detenção hidráulica; DQO – demanda química de oxigênio; DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio.

Fonte: Autoria própria (2020).

De acordo com o Quadro 1, para se obter uma melhor performance nas reduções de DBO₅, DQO, cor, derivados de lignina, entre outros, alguns grupos de bactérias requerem condições ambientais específicas por serem sensíveis a temperatura e o pH, por exemplo. Como mostrado no Quadro 1 a temperatura esteve entre 30 e 37°C, o pH entre 6,8 e 8,4, em sistemas com agitação, aeração e TDH entre 1,3 e 7 dias. No geral os autores concluem seus trabalhos com a recomendação da aplicação de um consórcio com mais de um grupo bacteriano, o qual pode inclusive ocorrer em proporções apropriadas. Em Chandra (2012) os grupos *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* e *Bacillus cereus*, tiveram um excelente desempenho quando usados na bioaumentação na proporção de 4:1:1 respectivamente. Nessas condições as bactérias removeram 63%, 64%, 65%, 95%, 72%, e 63% de DQO, DBO₅, cor, lignina, sólidos totais e fenol, respectivamente.

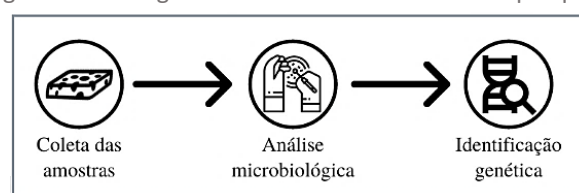
Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar os grupos de bactérias de um reator biológico de leito móvel (MBBR), utilizando meio suporte esponjoso (APG) tratando efluente de celulose kraft empregando técnicas de análises microbiológicas e de extração de DNA para a identificação dos microrganismos aderidos ao meio suporte.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o processo de isolamento, identificação e classificação dos microrganismos presentes no efluente, foram feitas análises microbiológicas e de identificação genética no laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As atividades centrais da pesquisa estão representadas no fluxograma abaixo:

Figura 1 – Fluxograma das atividades centrais da pesquisa.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Coleta das amostras. As amostras utilizadas foram provenientes de um sistema de tratamento de lodos ativados do tipo MBBR modificado utilizando meio suporte APG (AQUAPOROUSGEL®). O APG possui um formato cúbico e é feito à base de polietilenoglicol sendo resistente à abrasão, absorvendo água na sua superfície hidrofílica. É nela que as bactérias se fixam e promove a degradação da matéria orgânica biodegradável dos efluentes de celulose. Esse trabalho de operação do reator MBBR foi realizado pela estudante Camila Peitz como parte do acordo de cooperação técnica UTFPR-COCELPA ACT 14/2016. (PEITZ; XAVIER, 2018)

Análise microbiológica. Para o processo de isolamento e identificação dos microrganismos presentes no meio de suporte APG, seguiu-se os protocolos elaborados por DINIZ (2018), utilizando os meios de culturas ágar bacteriológico e o Luria-Bertani (LB). As amostras foram incubadas em placas de Petri em estufa a 25°C por um período de 24 horas. Finalizada a incubação, realizou-se a contagem das colônias de bactérias formadas na placa e posteriormente os isolamentos de acordo com os diferentes morfotipos encontrados. Os isolados de cada morfotipo identificado foram novamente incubados em meio de cultura e em estufa a 25°C durante 24 horas.

Em seguida, as amostras foram caracterizadas morfologicamente aplicando o método da coloração de Gram conforme Stinghen (2002) no qual também foi possível categorizá-las por suas características coloniais, *Bacillus* ou *Coccus* (MARTINS et al., 1997).

Identificação genética. Inicialmente os tubos contendo meio nutriente e o isolado de bactérias foram submetidos a um processo de centrifugação para aumentar a concentração das bactérias no fundo do recipiente, desse modo, pôde-se dar início ao processo de extração do DNA bacteriológico.

- a) **Extração do DNA.** O processo de extração do DNA bacteriológico iniciou-se com a centrifugação de 1 mL do cultivo das bactérias em tubos de Eppendorf de 2 mL durante 7 minutos a 12.000 rpm. Posteriormente, o tubo foi ressuspensionado em 600 µL da solução tampão de extração STES (Tris base, Cloreto de sódio, EDTA e TE). Depois a amostra foi homogeneizada em um agitador vórtex por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 120 µL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) pré-aquecida. Seguidamente, adicionou-se 10 µL de proteinase K e incubou-se por 60 minutos a 55°C em banho-maria. Homogeneizou-se em vórtex por 2 minutos. Logo após a homogeneização foi adicionado 120 µL de cloreto de sódio e 85 µL de brometo de hexadecil trimetil amônio catiônico (CTAB) 10%. Novamente, incubou-se a amostra por 60 minutos a 55°C em banho-maria. Após isto, adicionou-se 500 µL de CIA, um composto na razão 24:1 de clorofórmio: álcool isoamílico. Depois, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 14.000 rpm e logo em seguida por 7 minutos a 12.000 rpm. Após essa centrifugação, transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo adicionando 500 µL de CIA, novamente centrifugou a mistura como descrito acima e transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo.

Depois adicionou-se 225 μL de álcool etílico 96% e a amostra foi incubada no freezer por 12 horas. No outro dia, o incubado foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm ou 7 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O tubo foi lavado com 500 μL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Assim, as amostras foram colocadas em estufa para a secagem e por último o DNA foi ressuscitado em 100 μL de água ultrapura Milli-Q autoclavada.

b) Análise da qualidade da extração do DNA. Para avaliar a qualidade da extração de DNA bacteriano descrito acima, foi empregado o espectrofotômetro NanoDrop® 2000, o qual é capaz de analisar amostras de 0,5 a 2 μL . Foi colocado 1 μL de amostra no equipamento e feito a leitura onde através de um software e uma curva analítica apresentava a concentração de ácido nucleico na amostra com absorvância entre 260 a 280 nm. Quando a razão entre 260/280 nm esteve próxima de 1 a 2, o software apresentou um pico de onda elevado indicando que a extração foi eficiente. Já para as amostras que não apresentaram uma boa extração, os métodos acima foram realizados novamente.

c) Técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A mistura para a reação PCR ocorrer é constituída de: 2 μL de DNA; os primers (sequências iniciadoras complementares): 0,6 μL de primers F e 0,6 μL de primers R, 1,3 μL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), que são as bases nitrogenadas adenina, timina, guanina, citosina e uracila; 1,3 μL de buffer, que são tampões de Tris HCl 200 mM (pH 8,4) e KCl 500 mM responsáveis pelo recozimento dos primers; 0,2 μL de Taq DNA polimerase; 0,4 μL de Mg^{+2} que é obrigatório para o funcionamento da enzima e é um agente estabilizador; 6,1 μL de água. Após a preparação da reação, a amplificação foi realizada em termociclador, em que se teve 35 ciclos, no qual cada ciclo constitui-se com temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 30 segundos para desunir a fita de DNA; depois um anelamento a 55°C por 30 segundos, para os primers conectarem-se a fita de DNA, iniciando a síntese de uma nova fita; e a extensão a 72°C por 90 segundos, em que a Taq DNA polimerase irá iniciar a síntese da nova fita, produzindo milhões de cópias da fita molde. Após os 35 ciclos, foi feita uma extensão final a 72°C por 10 minutos e depois o resfriamento até 4°C.

d) Eletroforese em gel de agarose 1%. Após a amplificação de um segmento genômico na análise de PCR há a necessidade de purificação do produto caso esse DNA siga para reação de sequenciamento. Essa purificação tem como objetivo a remoção de oligonucleotídeos não utilizados, como primers, excesso de dNTPs e Taq DNA polimerase para que assim possa-se obter um DNA mais puro da bactéria. Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de agarose, preparado a partir de 1,6 g de agarose, 100 mL de tampão TBE 1X (ácido bórico 100 mM, Tris-borato 45 mM e EDTA 10 mM em pH 8,0) e aquecidos em forno micro-ondas de 30 em 30 segundos até ficar translúcido. Após a preparação do gel, 30 mL foi despejado em cada cuba; colocou-

se o suporte contendo os pentes próprios que serviram como molde para produzir os poços no gel; após este passo, aguardou-se 10 minutos para polimerização da matriz da agarose; depois de esfriar, retirou-se os pentes com cuidado para não danificar a matriz do gel; por fim, adicionou-se 2 μL de produto de PCR no gel (DNA extraído), 2 μL de licol para analisar a corrida de elétrons na eletroforese por meio da cor, e 2 μL do revelador GelRed. Após estes passos, o gel de agarose 1% foi colocado no interior da cuba de eletroforese em 108 Volts por cerca de 1 hora para as corridas dos elétrons, os quais fazem as separações das fitas de DNA posteriormente analisadas.

- e) **Análise das bandas.** Após a análise de Eletroforese em gel de agarose, o gel precisou ser avaliado quanto as bandas presentes. Utilizou-se um transiluminador para produzir a imagem, *PhotoDoc-It™ Imaging System*, que reproduz uma imagem pela seleção do comprimento de onda UV de 365 nm, 302 nm e 254 nm, com o auxílio dos softwares *GeneSnap™* para captura de imagem e *GeneTools™* para análise de fluorescência. E com as imagens obtidas através desses softwares, no qual mostraram as bandas de DNA das bactérias, foi possível avaliar a viabilidade no prosseguimento de sequenciamento da extração do DNA do microrganismo.
- f) **Sequenciamento.** A análise de sequenciamento das amostras de DNA extraído do laboratório são realizadas no laboratório de bioquímica da UFPR por um técnico responsável. Apesar desse laboratório ser multiusuário o equipamento é operado por um técnico especializado, não sendo possível o acompanhamento da análise ou execução por outras pessoas.
- g) **Avaliação do sequenciamento.** Diante dos resultados das análises de sequenciamento do DNA das amostras, as fitas de DNA *forward* e *reverse* obtidas no sequenciamento foram editadas no software BioEdit e depois transferidas para o software Mega7 onde foi criado a fita *reverse complement* para fazer o alinhamento das duas fitas para então criar a fita consenso. Com a fita consenso obtida, a mesma foi então inserida no site BLAST, que compara as sequências biológicas primárias com o banco de dados do NCBI, retornando as sequências mais similares e de significância estatística da busca, e assim a bactéria foi identificada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No Quadro 2 são apresentados os resultados do sequenciamento obtidos para algumas amostras separadas da biomassa aderida ao meio suporte APG contido no reator MBBR.

As amostras foram identificadas através de sua morfologia, do tipo cocos ou bacilos e por meio do teste da coloração de Gram. Em duas amostras foi possível identificar quanto ao gênero e a espécie do microrganismo isolado, sendo eles *Pseudomonas stutzeri* e *Bacillus pumilus*.

Quadro 2 – Microrganismos encontrados.

Origem das amostras	Código do isolado	Morfologia	ID molecular 16s	Similaridade (BLAST)
Meio suporte APG em tratamento de efluente da indústria de celulose	1B001	Cocos gram positivos	-	-
	1B004	Bacilos gram negativos	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	97%
	1C005 1	Bacilos gram positivos	-	-
	1C005 2	Bacilos gram positivos	-	-
	1A004 1	Bacilos gram positivos	<i>Bacillus pumilus</i>	99%
	1A004 2	Bacilos gram positivos	-	-
	1B1C001	Bacilos gram positivos	-	-

Fonte: Autoria própria (2020).

De acordo com Oliveira (2009), em seu trabalho, a espécie *Bacillus pumilus* obteve eficiência de remoção nos parâmetros DQO e cor superiores a 41% e 22%, respectivamente, nas condições de pH 9,0, agitação de 200 rpm a uma temperatura de 45°C em um período de 48 horas tratando efluente de celulose.

Com relação a espécie *Pseudomonas stutzeri* não foram encontrados estudos relacionando essa espécie ao processo de bioaugmentação em efluentes de celulose.

CONCLUSÕES

As análises microbiológicas e de identificação genética realizadas nesse trabalho permitiram identificar até o momento os seguintes grupos de bactérias: *Pseudomonas stutzeri* e *Bacillus pumilus*. Porém, para a *Pseudomonas stutzeri* não se tem estudos suficientes na utilização especificamente dessa espécie de bactéria na remoção de compostos como DBO₅, DQO, Cor, Lignina e compostos recalcitrantes. As bactérias do gênero *Pseudomonas sp.* e *Bacillus sp.*, aos quais os grupos identificados pertencem, tem sido frequentes em muitos trabalhos em que avaliam seu potencial de remoção de parâmetros específicos e matéria orgânica biodegradável de interesse no efluente de celulose. Sendo assim, as espécies *Pseudomonas stutzeri* e *Bacillus pumilus* são promissoras para o uso em processos de bioaugmentação a fim de avaliar suas contribuições para a melhoria do desempenho de sistemas de tratamento para a remoção de matéria orgânica e compostos específicos de efluentes de celulose.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica, ao Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias (LATAR-UTFPR), ao Laboratório de Microbiologia da UFPR, à indústria COCELPA pela cessão das

amostras para estudo, a Ma. Camila Peitz, a Professora Dra. Vânia Aparecida Vicente e aos demais colaboradores.

REFERÊNCIAS

ASSUNÇÃO, A.; VANZETTO, S. C.; XAVIER, C. R. Lodos ativados vs MBBR no tratamento de efluente de indústria de celulose Kraft. **28º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária**. Rio de Janeiro, 2015.

CHANDRA, R.; SINGH, R.; YADAV, S. Effect of bacterial inoculum ratio in mixed culture for decolourization and detoxification of pulp paper mill effluent. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 87, n. 3, p. 436-444, 2012.

HOSSAIN, K., ISMAIL N. Bioremediation and detoxification of pulp and paper mill effluent: A Review. **Research Journal of Environmental Toxicology**. vol. 9, n. 3, p. 113-134, 2015.

HAQ, I. et al. Evaluation of bioremediation potentiality of ligninolytic *Serratia liquefaciens* for detoxification of pulp and paper mill effluent. **Journal of hazardous materials**. v. 305, p. 190-199, 2016.

HOODA, R.; BHARDWAJ, K.; SINGH, P. Screening and identification of ligninolytic bacteria for the treatment of pulp and paper mill effluent. **Water, Air, & Soil Pollution**. v. 226, n. 9, p. 305 - 316, 2015.

HOODA, R.; BHARDWAJ, K.; SINGH, P. *Brevibacillus parabrevis* MTCC 12105: a potential bacterium for pulp and paper effluent degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 34, n. 2, p. 31 - 41, 2018.

HUBBE, M. A. et al. Wastewater Treatment and Reclamation: A review of pulp and paper industry practices and opportunities. **BioResources**. vol. 11, n. 3, p. 7953-8091, 2016.

IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores. Celulose. Dados estatísticos, 2019. Disponível em: <https://iba.org/dados-estatisticos>. Acesso em 21 mar. 2020.

MARTINS, L. F. et al. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. 61928, 2013.

OLIVEIRA, P. et al. Use of *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and *Paenibacillus sp.* CBMAI 868 for colour removal from paper mill effluent. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 354-357, 2009.

PEITZ C.; XAVIER C. Tratamento de efluente de indústria de celulose kraft por reator de leito móvel com APG. **Relatório Final de Pesquisa**. ACT 14/2016, COCELPA-PR-UTFPR, 2018

PEITZ, C. et al. **Desempenho de sistema modificado de lagoa aerada com meio de suporte em leito móvel no tratamento de efluente de celulose kraft**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SAKURAI, K. S. I. et al. Post-treatment of effluent from the pulp and paper industry using microfiltration and ultrafiltration membranes combined with the Photo-Fenton process. **Scientia Forestalis**, v. 44, n. 112, p. 937-945, 2016.

STINGHEN, A. E. M.; ALBINI, C. A.; SOUZA, H. A. P. H. M. Coloração de Gram: Como fazer, Interpretar e Padronizar. **Microscience**, 2002.

TOCZYŁOWSKA-MAMIŃSKA, R. Limits and perspectives of pulp and paper industry wastewater treatment - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 78, p. 764 - 772, 2017.

XAVIER, C. et al. Genotoxic effects of kraft pulp mill effluents treated by biological aerobic systems. **Interciencia**, v. 36, n. 6, p. 412-416, 2011.

YADAV, S.; CHANDRA, R. Syntrophic co-culture of *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae* for degradation of kraft lignin discharged from rayon grade pulp industry. **Journal of Environmental Sciences**. v. 33, p. 229-238, 2015.