

# Oertoxificação de águas de euzedure da cortiça em reactor biológico

Eisa MENDONÇA

Ana M<sup>a</sup> ANSELMO

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação

## RESUMO

O sector corticeiro em Portugal, maior produtor mundial de cortiça, enfrenta diversos problemas ambientais, nomeadamente a produção de águas residuais com elevada carga poluente pelas empresas preparadoras tradicionais, na operação de cozedura da cortiça. As águas de cozedura da cortiça têm elevada carga orgânica, elevado teor de sólidos suspensos e baixo valor de pH. A sua toxicidade e baixa biodegradabilidade estão associadas à presença de compostos naturais fenólicos e polifenólicos. Com base nestas características realizou-se um estudo de destoxificação por método biológico, utilizando o fungo filamentososo *Fusarium flocciferum*. O sistema consistiu num reactor do tipo coluna com borbulhamento de ar, em cultura contínua, estabelecendo-se um tempo de retenção hidráulico de 24 horas. Realizaram-se ensaios com e sem controlo de pH e com e sem adição de carvão activado. Estes ensaios demonstraram a capacidade degradativa deste fungo, sendo de salientar a diminuição da carga orgânica e da toxicidade e o aumento do pH. Representando a descarga destas águas residuais um problema ambiental e dada a inexistência de tecnologias de tratamento adequadas ao sector, estes resultados podem contribuir para a solução do problema num contexto de desenvolvimento sustentável.

**Palavras chave:** cozedura da cortiça, águas residuais, destoxificação, fungos, ensaios de ecotoxicidade.

## ABSTRACT

The cork industry in Portugal, the world's biggest cork producer, faces several environmental problems, namely the production of highly pollutant wastewaters in cork boiling operation by traditional preparation units. Cork boiling waters have high organic load, high concentrations of suspended solids and low pH. Its toxicity and low biodegradability are associated to the presence of natural phenolic and poliphenolic compounds. Based on these characteristics a detoxification study through a biological method was developed, by using the filamentous fungus *Fusarium flocciferum*. The system consisted in a column reactor with air bubbling, in a continuous system, establishing a time of hydraulic retention of 24 hours. Tests with and without pH control, and with and without activated carbon addition were performed. These assays showed the degrading capacity of this fungus, with relevance to the reduction of the organic load and toxicity and pH increase. Considering that the discharge of these wastewaters represents an environmental problem and due to the lack of treatment technologies adequate to this sector, these results can contribute to a technological solution in a context of sustainable development.

**Key words:** cork boiling, wastewaters, detoxification, fungi, ecotoxicity tests.

## 1. INTRODUÇÃO

O sector corticeiro em Portugal, maior produtor mundial de cortiça, enfrenta alguns problemas relacionados com a produção de águas residuais com elevada carga poluente. O subsector preparador, constituído maioritariamente por empresas de pequena e média dimensão, apresenta pelas suas características, dificuldades no cumprimento da legislação ambiental em vigor, nomeadamente no que diz respeito ao controlo das descargas de águas residuais. Este problema tem repercussões a nível económico e social particularmente no caso das pequenas unidades fabris que efectuem a cozedura pelo método tradicional em tanque aberto.

As águas de cozedura da cortiça em tanque aberto possuem características físico-químicas e ecotoxicológicas que dificultam o seu tratamento pelos processos convencionais, em geral aplicados ao tratamento de efluentes industriais. A elevada carga orgânica (valores médios de CQO e CBO5 de 8348 e 2156 mg/l O<sub>2</sub>, respectivamente) ligada a uma baixa biodegradabilidade (índice CBO5/CQO entre 17 e 33%) e elevada ecotoxicidade aguda (CE<sub>50</sub>-5 min para *Vibrio fischeri* entre 1,5 e 7,6%), ambas associadas à presença de compostos naturais fenólicos e polifenólicos, são as principais características que impedem a aplicação dos métodos convencionais de tratamento (Anselmo *et al.*, 1998; Mendonça, 2003).

O tratamento com fungos foi estudado por vários autores para a degradação e destoxificação de efluentes contendo compostos aromáticos de origem vegetal, com estrutura semelhante aos que se encontram nas águas de cozedura da cortiça.

Field e Lettinga (1991) com *Aspergillus niger* obtiveram uma eliminação de 63% da CQO solúvel e uma redução parcial da toxicidade em quatro dias de incubação, em extractos aquosos de casca de abeto. Os autores observaram a subida do pH e referiram que o pH superior a 6 promove reacções auto-oxidativas levando a uma polimerização extensiva dos taninos, que resistem à biodegradação.

Num estudo de destoxificação de águas de extracção de azeite com uma estirpe de *Penicillium*, Robles *et al.* (2000) referem uma redução de 45% no conteúdo fenólico, de 40% na CQO e de 20% na cor, após 14 dias de incubação. Os autores detectaram um aumento nos valores de pH, variando entre 6,2 e 7,6, que pode estar relacionado com a metabolização de ácidos orgânicos. Foi observada uma total depleção de actividade anti-bacteriana.

Kissi *et al.* (2001) utilizaram amostras de águas de extracção de azeite diluídas a 20 e 50% em ensaios de descoloração e destoxificação por *Phanerochaete chrysosporium*, e referiram uma remoção da CQO de cerca de 60% após 15 dias de incubação, uma redução de 50% na cor e no conteúdo fenólico e a completa destoxificação. Os autores salientam a importância do pH no processo de degradação, mostrando que os valores iniciais de pH de 4,0 a 5,0 levaram a uma remoção mais eficiente de fenol, cor e CQO.

O fungo *Fusarium flocciferum*, isolado a partir de um efluente industrial contendo fenol (Anselmo e Novais, 1984), é capaz de utilizar este composto como única fonte de carbono e energia e demonstrou possuir versatilidade metabólica na utilização de outros compostos fenólicos (Anselmo, 1992). *Fusarium flocciferum* apresenta também capacidade de degradar, como substrato simples ou misto, vários compostos aromáticos monocíclicos naturais, ácidos benzoícos (ácidos gálico, protocatecuico, vanílico e siríngico), ácidos cinâmicos (ácidos cafeico e ferúlico) e o aldeído siríngico, vulgarmente presentes em resíduos agro-industriais (Mendonça *et al.*, 2004b).

A capacidade de algumas estirpes de fungos degradarem e destoxificarem águas de cozedura da cortiça foi estudada pelos presentes autores (Mendonça *et al.*, 2004 a) tendo sido seleccionado *Fusarium flocciferum* pelas suas capacidades degradativas, quer em termos de diminuição da carga orgânica total, quer em termos de metabolização de compostos aromáticos específicos presentes nestas águas residuais (Mendonça *et al.*, 2004b) e associados à toxicidade.

Neste contexto, e tendo em vista a sua posterior aplicação à escala industrial, realizou-se o estudo da destoxificação destas águas residuais por método biológico num reactor em contínuo, utilizando o fungo filamentoso *Fusarium flocciferum*. A eficiência deste processo foi avaliada em termos físico-químicos e ecotoxicológicos.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. AMOSTRAGEM**

A amostra de águas de cozedura da cortiça foi colhida numa empresa preparadora da zona do Montijo (Portugal), que realiza a cozedura em caldeira aberta. A água de cozedura, após arrefecimento, foi filtrada sob vácuo por algodão hidrófilo e esterilizada em autoclave a 121 °C, 1 atmosfera, durante 15 minutos, sendo conservada a 4 °C.

### **2.2. ORGANISMO**

A partir de micélio de *Fusarium flocciferum* crescido em tubo com Agar de Extracto de Malte (Difco) suplementado com 1 g/l de fenol, foram inoculados 200 ml de meio de cultura, Yeast Nitrogen Base (Difco) a 1,7 g/l enriquecido com nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) a 5 g/l e fenol a 500 mg/l, em frascos Erlenmeyer de 1000 ml. A cultura foi incubada a 25 °C ± 1°C, com agitação orbital de 150 r.p.m. e com renovação diária do meio de cultura por filtração do micélio. Após 3 dias, o meio de cultura foi substituído por Czapek Dox Broth (Oxoid) com 200 mg/l de fenol e incubado durante mais 2 dias.

Após o período de incubação, o micélio foi filtrado por membrana de 0,45 µm, obtendo-se a biomassa utilizada nos ensaios, cuja concentração final foi de aproximadamente 2 g/l (peso seco). Todas as operações de preparação do inóculo foram realizadas em condições de assepsia.

### **2.3. CARVÃO ACTIVADO**

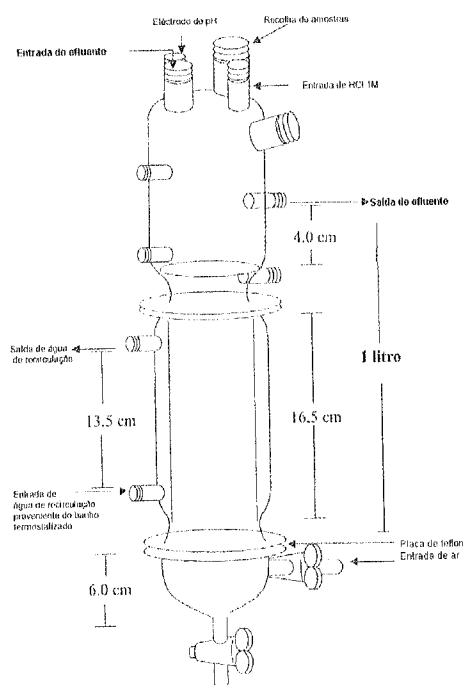
O carvão activado utilizado foi carvão activado granulado (Granulated Activated Carbon - GAC) 1,5 mm puris (Merck). O carvão activado foi previamente lavado com água desmineralizada (5 vezes), e utilizado numa concentração final de 50 g/l de efluente.

### **2.4. ENSAIOS DE DESTOXIFICAÇÃO**

Realizaram-se ensaios de destoxificação de águas de cozedura da cortiça por *Fusarium flocciferum* em cultura contínua, com e sem carvão activado.

Utilizou-se uma coluna de borbulhamento (Figura 1), constituída por um cilindro de vidro encamisado, ao qual se acoplou uma cabeça de vidro com várias tubuladuras para sondas, entrada da amostra, linha de saída, etc., e uma base de vidro com duas torneiras através das quais se efectuou o fornecimento do ar (2-3 vvm) e o controlo do nível da cultura. Entre esta base e o cilindro adaptou-se uma placa de teflon perfurada, que funcionou como difusor do ar.

FIGURA 1. Esquema de coluna de borbulhamento



A temperatura foi mantida constante a 25 °C, por recirculação de água na camisa que revestia a coluna do reactor. O caudal de entrada do efluente foi de 41 ml/hora permitindo um tempo de retenção hidráulico de 24 horas. O pH foi medido por um eléctrodo de vidro esterilizável e, em alguns ensaios, controlado na gama [4,4-5,5].

Realizaram-se três ensaios com *Fusarium flocciferum* em coluna, um ensaio sem controlo de pH com micélio e carvão activado (Ensaio A) e dois ensaios com controlo de pH, utilizando micélio e carvão activado (Ensaio B) ou só micélio (Ensaio C).

Retiraram-se amostras diárias das águas de cozedura na coluna. Preparou-se uma amostra composta do efluente de saída do reactor para cada ensaio, por recuperação diária do efluente após o período de estabilização.

## 2.5. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

A concentração de biomassa determinou-se por medida do peso seco e o pH por potenciometria, como descrito em "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1998).

A determinação da Carência Química de Oxigénio (CQO) realizou-se pelo método do Dicromato (Hach Company) utilizando um espectrómetro HACH modelo DR/2000.

A determinação de cor foi feita pela medida da absorvância a 455 nm (diluição da amostra 1:10).

A determinação dos compostos fenólicos foi feita por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) num cromatógrafo Beckman modelo System Gold (Beckman Instruments, High Wycombe, UK) com um detector de díodos (System Gold 168 detector). Utilizou-se uma coluna cromatográfica Chrompak Inertsil C8 (5 µm, 4,6x 250 mm), dois solventes para eluição, A: H<sub>2</sub>O - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (999:1 v/v) e B: CH<sub>4</sub>O - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (999:1 v/v).

O gradiente de eluição foi: 0-5 min, 90% A; 5-12,5 min, 80% A; 12,5-40 min, 60% A; 40-50 min, 30% A; 50 min, 90% A. Utilizou-se um caudal de fase móvel de 0,8 ml/min, e a temperatura do forno cromatográfico foi de 45 °C. A detecção foi realizada a 254 nm e 280 nm.

A determinação da CQO, pH e cor foi realizada em todas as amostras. A determinação dos compostos fenólicos fez-se na amostra de efluente de entrada e nas amostras compostas do efluente de saída do reactor.

## 2.6. ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

A avaliação ecotoxicológica das amostras foi realizada através dos seguintes ensaios:

**Ensaio Microtox (Microtox® Test):** A toxicidade é avaliada pela medida da inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* (estirpe NRRL B-11177) para um período de exposição de 5 minutos, de acordo com o protocolo da Microbics (1992).

**Ensaio Dáfnia:** A toxicidade é avaliada pela medida da inibição da mobilidade do crustáceo *Daphnia magna* (clone IRCHA-5), para um período de exposição de 48 horas, de acordo com a Norma EN ISO 6341 (1996).

**Ensaio Lemna:** A toxicidade é avaliada pela medida da inibição do crescimento da planta *Lemna minor* (clone ST), para um período de exposição de 7 dias, de acordo com a Norma ISO/DIS 20079 (2003) e tomando como parâmetro de avaliação a área total das frondes.

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade são expressos em  $CE_{50}$ , a concentração efectiva responsável pela inibição de 50% da população ensaiada, após o período de exposição. Estes valores são calculados por análise Probit.

O ensaio Microtox foi aplicado a todas as amostras. Para avaliação ecotoxicológica da amostra do efluente de entrada e das três amostras compostas do efluente de saída do reactor, foram também aplicados o ensaio Dáfnia e o ensaio Lemna.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando em conjunto os resultados dos três ensaios de destoxificação de águas de cozedura da cortiça por *Fusarium flocciferum* e carvão activado considerou-se que a estabilização do sistema ocorreu após 5 dias de funcionamento (Figura 2).

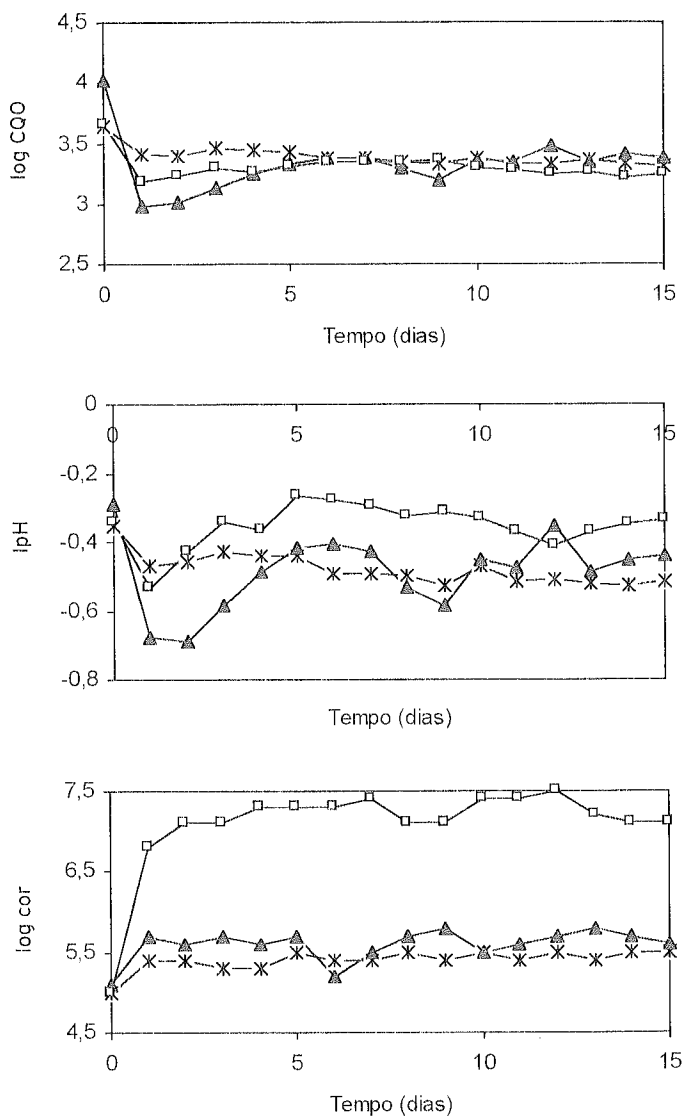
Os resultados do ensaio com micélio e carvão activado e sem controlo de pH, permitiram verificar uma tendência para a subida de pH. No 1º dia de funcionamento do reactor, observou-se uma subida de pH de 5,0 para 6,8 e durante todo o período de ensaio os valores oscilaram entre 7,1 e 7,5. Após estabilização a redução de CQO foi de  $63,0 \pm 4,2\%$  e a redução de cor de  $17,6 \pm 7,5\%$ .

Relativamente ao ensaio com micélio e carvão activado e com controlo de pH, após estabilização a redução de CQO foi de  $56,9 \pm 7,1\%$  e a redução de cor de  $37,7 \pm 9,3\%$ .

No caso do ensaio só com micélio e com controlo de pH, após estabilização, a redução de CQO foi de  $58,3 \pm 2,1\%$  e a redução de cor de  $40,5 \pm 12,4\%$ .

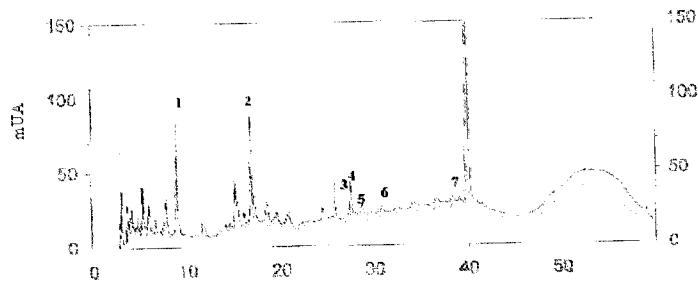
Os cromatogramas obtidos por análise em HPLC (Figura 3) permitiram observar a redução dos compostos fenólicos nas águas de cozedura da cortiça, não se detectando diferenças entre as três amostras compostas do efluente de saída dos ensaios de destoxificação em contínuo.

**FIGURA 2.** Análise da tendência dos valores de CQO, cor e pH nas amostras diárias de efluente de saída do reactor biológico nos ensaios de destoxificação de águas de cozedura da cortiça (Ensaio A (□) - micélio e GAC, sem controlo de pH; Ensaio B (△) - micélio e GAC, com controlo de pH; Ensaio C (x) - micélio, com controlo de pH)

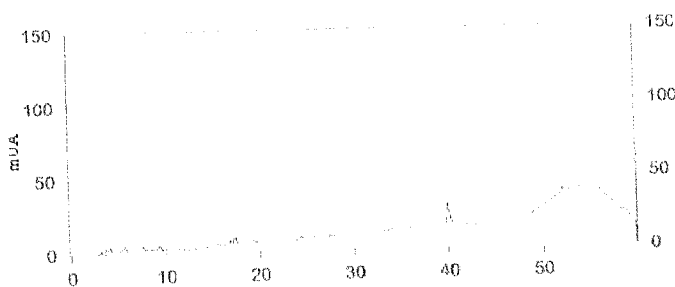


**FIGURA 3.** Cromatogramas obtidos por análise em HPLC (---- 254 nm, \_\_\_\_\_ 280 nm) das amostras dos ensaios de biodestoxificação de águas de cozedura da cortiça: Efluente de entrada e efluente de saída do reactor biológico nos ensaios A, B e C. Picos identificados: 1) ácido gálico, 2) ácido protocatecuico, 3) ácido vanílico, 4) ácido cafeico, 5) ácido siríntrico, 6) aldeído siríntrico, 7) ácido ferúlico

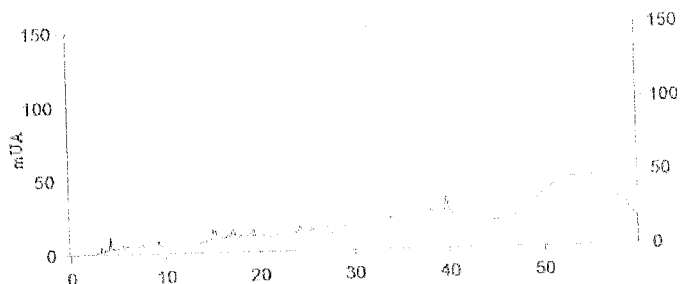
Entrada



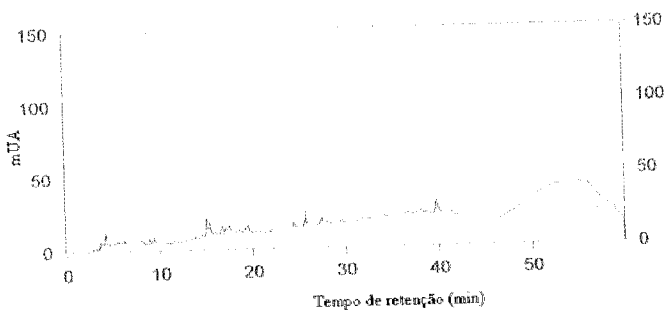
A]



B]



C]



### 3.1. AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA

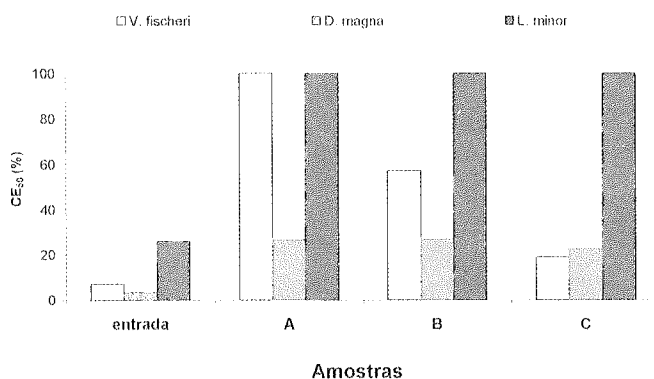
A avaliação ecotoxicológica do efluente de saída de todos os ensaios em reactor biológico, indicou uma redução de ecotoxicidade relativamente à amostra de águas de cozedura da cortiça que alimentou o reactor.

Relativamente aos ensaios com *Vibrio fischeri* de amostras diárias do reactor em que se utilizou uma cultura contínua de *Fusarium flocciferum* sem carvão activado, e para uma  $CE_{50}$ -5min do efluente de entrada de 7,2%, a  $CE_{50}$ -5min do efluente de saída apresentou valores próximos de 40%. Nos ensaios em que se utilizou o micélio e carvão activado, a  $CE_{50}$ -5min do efluente de saída não foi determinável para as amostras do 1º dia em ambos os ensaios, assim se mantendo após 15 dias no ensaio sem controlo de pH e apresentando um valor de 32,9 % no caso em que se efectuou o controlo de pH.

Os resultados dos ensaios com *Vibrio fischeri* das amostras compostas mostraram que o efluente de saída nos ensaios com *Fusarium* e carvão activado tinham baixa toxicidade, sendo a  $CE_{50}$ -5 min não determinável no caso do ensaio sem controlo de pH (Figura 4).

Os valores de  $CE_{50}$ -48h para *Daphnia magna* obtidos para todas as amostras compostas de efluente de saída foram semelhantes, entre 22,6 e 26,7%, traduzindo uma destoxificação relativamente ao efluente de entrada, cujo valor de  $CE_{50}$ -48h foi de 3,4%.

**FIGURA 4.** Resultados da avaliação ecotoxicológica com *Vibrio fischeri* ( $CE_{50}$ -5min), *Daphnia magna* ( $CE_{50}$ -48h) e *Lemna minor* ( $CE_{50}$ -7d) das amostras compostas do efluente de entrada e de saída do reactor biológico nos ensaios de destoxificação de águas de cozedura da cortiça (Ensaio A - micélio e GAC, sem controlo de pH; Ensaio B - micélio e GAC, com controlo de pH; Ensaio C - micélio, com controlo de pH).



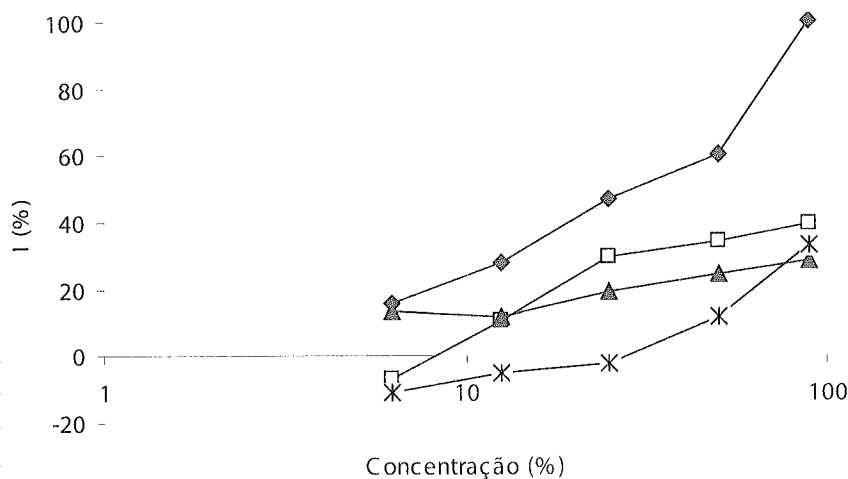
Utilizando a classificação de águas residuais proposta por Tonkes *et al.* (1999) na qual valores de  $CE_{50}$  inferiores a 10% permitem classificar as amostras como tóxicas, pode concluir-se que as amostras do efluente de entrada são tóxicas para a bactéria e o crustáceo e que as amostras dos efluentes de saída do reactor biológico são pouco tóxicas ou não tóxicas para estes organismos.

Relativamente aos ensaios com *Lemna minor*, e dada a menor sensibilidade demonstrada por este organismo de ensaio face a este tipo de efluente, foram analisadas as curvas de inibição do crescimento de *Lemna minor*, relativas às amostras do efluente de entrada e dos efluentes de saída do reactor biológico (Figura 5). A análise dos resultados permite afirmar que a amostra composta do efluente de saída do reactor sem carvão activado apresenta menor inibição do crescimento de *Lemna minor* nas meno-

res concentrações, apesar de o efeito na concentração de 90% ter sido semelhante nas três amostras de efluente de saída.

Analisando o parâmetro cor nos ensaios com *Lemna minor*, verificou-se ainda que a amostra que revela menor efeito a nível de necroses e cloroses é a amostra do ensaio realizado com *Fusarium flocciferum* e carvão activado e com controlo de pH. Os resultados das restantes amostras revelaram a existência de cloroses e necroses nas frondes de *Lemna minor*, tendo o ensaio com o efluente de entrada apresentado uma percentagem elevada de necroses na concentração de 90%.

**FIGURA 5.** Percentagem de inibição do crescimento de *Lemna minor* em ensaio de 7 dias das amostras compostas do efluente de entrada (♦) e de saída do reactor biológico nos ensaios de destoxificação de águas de cozedura da cortiça. (Ensaio A (□) - micélio e GAC, sem controlo de pH; Ensaio B (▲) - micélio e GAC, com controlo de pH; Ensaio C (x) - micélio, com controlo de pH).



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios em cultura contínua mostraram a capacidade degradativa de *Fusarium flocciferum*, sendo de salientar a estabilização do sistema em 5 dias com diminuição da carga orgânica e da toxicidade e o aumento do pH. Observou-se também uma redução no que diz respeito aos compostos fenólicos identificados e quantificados por HPLC.

A presença nas águas de cozedura da cortiça de azoto e fósforo (Mendonça, 2003), elementos essenciais ao crescimento microbiano, permitiu a implementação de um sistema de degradação biológico capaz de remover os compostos carbonáceos de baixa massa molecular presentes no efluente. Quanto aos micronutrientes, também não foi necessária qualquer suplementação, visto estarem presentes os principais elementos associados ao metabolismo celular (Mendonça, 2003), como seja o magnésio, o manganês, o cálcio, o ferro, o cobre e o zinco.

A adição de carvão activado é um método não específico usado para a remoção de cor em tratamentos de águas residuais (Eckenfelder, 1990; Ford, 1998), mas os resultados obtidos indicaram que podem ser obtidos bons desempenhos por ajuste da concentração de carvão activado e do tempo de contacto, revelando-se pois interessante integrar o carvão activado, na sua forma granular, num sistema de destoxificação de águas de cozedura da cortiça.

Os resultados obtidos para o efluente à saída do reator no ensaio com *Fusarium flocciferum* e GAC e sem controlo de pH, apontam para a melhor eficiência em termos de remoção de CQO mas uma baixa redução de cor. Os resultados obtidos à saída do reator nos ensaios com controlo de pH apresentam uma melhor eficiência de remoção de cor, sendo o processo em contínuo só com *Fusarium flocciferum* o mais eficiente em termos de cor.

A destoxificação das águas de cozedura da cortiça foi conseguida nos ensaios em contínuo, em particular no ensaio sem controlo de pH, as amostras à saída não apresentaram efeitos nos organismos ensaiados.

Para remover eficientemente os compostos fenólicos é necessário, por um lado, conhecer os mecanismos de degradação específicos destes microrganismos e por outro, ter uma melhor compreensão do potencial metabólico de outras espécies de fungos e suas interações com este tipo de substratos.

Para a passagem à escala industrial seria necessário um estudo económico e de viabilidade da aplicação deste processo em contínuo com *Fusarium flocciferum*, a empresas preparadoras da cortiça de pequena e média dimensão.

Representando a descarga destas águas residuais um problema ambiental e dada a inexistência de tecnologias de tratamento adequadas às unidades tradicionais do sector preparador, estes resultados podem contribuir para a solução do problema num contexto de desenvolvimento sustentável.

## BIBLIOGRAFIA

- ANSELMO, A. M. (1992): *Estudo da degradação de fenol por células livres e imobilizadas de Fusarium flocciferum*, Lisboa, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, (Tese de Doutoramento).
- ANSELMO, A. M.; NOVAIS, J. M. (1984): "Isolation and selection of phenol degrading microorganisms from an industrial effluent", *Biotechnology Letters*, 6 (9), pp. 601-606.
- ANSELMO, A. M.; PEREIRA, P. T.; MENDONÇA, E.; VILHENA, M. T.; PRAZERES, M. G.; MINHALMA, L. M.; DE PINHO, M. N. (1998): "Valorização e tratamento das águas residuais da indústria da cortiça – estudo preliminar", em PEREIRA, H. (ed.), *Cork oak and Cork. Sobreiro e Cortiça*, Lisboa, Centro de Estudos Florestais, pp. 459-465.
- APHA (1998): *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, (Edição de CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D.) (20th ed.).
- ECKENFELDER, W. W. (1990): "Granular Carbon Adsorption of Toxics", em LANKFORD, P. W.; ECKENFELDER, W. W. (eds.), *Toxicity Reduction in Industrial Effluents*, New York, Van Nostrand Reinhold, pp. 203-228.
- FIELD, J. A.; LETTINGA, G. (1991): "Treatment and detoxification of aqueous spruce bark extracts by *Aspergillus niger*", *Water Science and Technology*, 24 (3/4), pp. 127-137.
- FORD, D. L. (1998): "Organic toxicant control", em FORD, D. L. (ed.), *Toxicity Reduction: Evaluation and Control*, Basel, Water Quality Management Library, Technomic Publishing Company Inc., Vol. III, pp. 31-66.
- ISO (1996): *Water Quality - Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test*, Paris, International Standard Organization 6341.

ISO (2003): *Water Quality - Determination of the toxic effect of water constituents and wastewater to duckweed (Lemna minor) - Duckweed growth inhibition test*, Paris, International Standard Organization /DIS 20079.

KISSI, M.; MOUNTADAR, M.; ASSOBHEI, O.; GAREGIULO, E.; PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. (2001): "Role of two white-rot basidiomycete fungi in the decolorisation and detoxification of olive mill waste water", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp. 221-226.

MENDONÇA, E. (2003): *Estudo ecotoxicológico de um efluente agro-industrial - Caracterização e biodestoxificação de águas de cozedura da cortiça*, Lisboa, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, (Tese de Doutoramento).

MENDONÇA, E.; PEREIRA, P.; MARTINS, A.; ANSELMO, A. M. (2004a): "Fungal Biodegradation and Detoxification of Cork Boiling Wastewaters", *Engineering in Life Sciences*, 4 (2), pp. 144-149.

MENDONÇA, E., MARTINS, A.; ANSELMO, A. M. (2004b): "Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*", *Electronic Journal of Biotechnology*, 7 (1).  
(Available online from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue1/full/3/index.html>).

MICROBICS (1992): *Microtox Manual. A Toxicity Handbook*, Carlsbad, Microbics Corporation, Inc., vols. I-IV.

ROBLES, A.; LUCAS, R.; DE CIENFUEGOS, G. A.; GÁLVEZ, A. (2000): "Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds", *Bioresource Technology*, 74, pp. 217-221.

TONKES, M.; DE GRAAF, P. J. F.; GRAANSMA, J. (1999): "Assessment of complex industrial effluents in the Netherlands using a whole effluent toxicity (or WET) approach", *Water Science and Technology*, 39 (10/11), pp. 55-61.