

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR EL DESEMPEÑO DE UN REACTOR ANAEROBIO DE BIOMASA INMOVILIZADA

TOXICITY EVALUATION AS A TOOL TO ASSES THE PERFORMANCE OF AN ANAEROBIC IMMOBILIZED BIOMASS REACTOR

TATIANA RODRIGUEZ CHAPARRO

Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá-Colombia

Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paul, Brasil, adela.rodriguez@unimilitar.edu.co

EDUARDO CLETO PIRES

Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paul, Brasil, ecpires@sc.usp.br

Recibido para revisar Julio 9 de 2009, aceptado Agosto 11 de 2010, versión final Agosto 24 de 2010

RESUMEN: Los efluentes de la Industria de Papel y Celulosa son usualmente tóxicos y mutagénicos. Esa característica se deriva principalmente por la presencia de compuestos xenobióticos formados durante el proceso. Los parámetros globales para el análisis de la calidad del agua como: demanda química de oxígeno, carbón orgánico total, entre otros, no permiten identificar si el potencial toxicológico es remediado después de los tratamientos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño de un reactor anaerobio horizontal de biomasa inmovilizada (RAHBI) tratando un efluente real de blanqueamiento de celulosa Kraft, por medio de ensayos de toxicidad (*Daphnia similis* - *Ceriodaphnia silvestrii*), mutagenicidad y citotoxicidad (*Allium cepa* L.). Los resultados mostraron alta sensibilidad de todos los organismos estudiados y buena capacidad del reactor anaerobio para remover compuestos que ejercen efectos tóxicos y mutagénicos. Los bioensayos estudiados representan una alternativa interesante para el análisis de la calidad del agua y para la evaluación del desempeño de tratamientos.

PALABRAS CLAVE: AOX, Celulosa, Kraft, toxicidad, mutagenicidad.

ABSTRACT: Effluents from pulp mill are usually toxic and mutagenic. This characteristic is mainly a consequence of xenobiotic compounds that are formed during the process. Global parameters such as chemical oxidation demand, total organic carbon and others, do not permit identify whether the toxic potential was remedied by the treatments or not. The objective of this research was to evaluate the performance of an horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor (HAIB) treating the bleaching effluent from a Kraft pulp mill using toxicological (*Daphnia similis* – *Ceriodaphnia silvestrii*) mutagenicity and citotoxicological assays (*Allium cepa* L.). The results showed high sensibility of the test-organisms and capability of the anaerobic reactor to remove compounds that are exerting toxic and mutagenic effects. The bioassays represented an attractive alternative to water quality analyzes and the performance evaluation of treatments.

KEY WORDS: AOX, Celulose, Kraft, toxicity, mutagenicity.

1. INTRODUCCIÓN

El papel es hecho principalmente a partir de fibras de celulosa y la madera es la principal fuente de materia prima. La madera contiene aproximadamente 50% de agua y la fracción sólida esta compuesta principalmente por 45% de celulosa, 25% de hemicelulosa, 25% de lignina y 5% de otros materiales orgánicos e inorgánicos. La fabricación de papel y celulosa se base en una serie de procesos que tienen como finalidad remover lignina y otros compuestos responsables por la coloración del producto. El proceso Kraft, que actualmente domina la producción mundial de papel y celulosa, utiliza productos como el bisulfito de sodio y el hidróxido de sodio para separar esos compuestos. Como resultado de las reacciones entre esos reactivos y los constituyentes de la madera, son formados varios subproductos, que pueden, eventualmente, estar presentes en las aguas residuales de las industrias.

La planta de blanqueamiento es considerada como la principal fuente de contaminación de la fabricación de papel y celulosa. En los efluentes generados en este proceso se encuentran compuestos clorados derivados de la lignina cuantificados como AOX (Organohalogenos absorbibles en carbono) y compuestos aromáticos. Los AOX se han relacionado con la presencia de efectos tóxicos agudos, crónicos y mutagénicos en organismos vivos [1,2,3]. Algunos autores resaltan que los compuestos de baja masa molecular, menores que 1000Da, son los que presentan los mayores riesgos toxicológicos y mutagénicos, debido principalmente a la facilidad de penetrar en la membrana celular. Sin embargo, varios de los compuestos organoclorados presentes en este tipo de efluentes son de alta masa molecular (mayores que 1000kDa) [1,4]. Esto es, aunque contribuyan con la toxicidad, pero en menor proporción, son compuestos de naturaleza recalcitrante [5].

Debido a la reconocida capacidad de degradar ciertos compuestos tóxicos, la biotecnología anaerobia, es actualmente una de las alternativas más utilizadas en el tratamiento de efluentes líquidos industriales [6]. Varios estudios han

sido reportados en la literatura en relación con la aplicación de procesos anaerobios tratando efluentes de la industria de papel y celulosa [3, 7, 8,9].

Los ensayos de toxicidad y mutagenicidad son herramientas complementarias para evaluar la calidad del agua [10]. Los análisis fisico-químicos tradicionalmente realizados, tales como demanda química de oxígeno (DQO), carbón orgánico total (COT), sólidos, metales y otras sustancias orgánicas e inorgánicas, cuyos límites se encuentran establecidos en la normatividad ambiental, no tienen la capacidad de diferenciar las sustancias que afectan tanto a los sistemas de tratamiento biológicos como a los cuerpos receptores. Consecuentemente son insuficientes para evaluar el potencial riesgo ambiental.

No obstante, los ensayos de toxicidad y mutagenicidad no sustituyen los análisis fisico-químicos tradicionales. Mientras que los análisis fisico-químicos identifican y cuantifican las sustancias tóxicas, los ensayos de toxicidad evalúan el efecto de esas sustancias en los sistemas de tratamiento biológicos y los cuerpos receptores. De esa forma, análisis químicos y ensayos de toxicidad se complementan. En ese sentido, el desempeño de un reactor anaerobio de biomasa inmovilizada tratando un efluente real de una industria de papel y celulosa, se evaluó con base en ensayos de toxicidad, mutagenicidad y citotoxicidad.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 Agua residual

El agua residual se obtuvo de una fábrica de celulosa Kraft que utiliza la secuencia de blanqueamiento libre de cloro elemental (ECF), localizada en el estado de São Paulo- Brasil. Esta industria procesa aproximadamente 630.000 toneladas anuales de madera, principalmente *Eucalipto*. Los efluentes generados en la planta de blanqueamiento son de dos tipos, el efluente ácido, que se genera después de la oxidación con dióxido de cloro y el efluente básico, generado después de la extracción alcalina. Los dos son

descartados en las industrias en proporciones de 60% y 40%, respectivamente. Esas proporciones se mantuvieron en la preparación del agua residual utilizada en este trabajo.

2.2 Reactor anaerobio horizontal de biomasa inmobilizada

Se utilizó el reactor anaerobio horizontal de biomasa inmobilizada (RAHBI) desarrollado por [11]. El principio de esta tecnología se basa en la inmobilización de células en matrices de materiales que permitan la retención de biomasa, aumentado de esta forma, el volumen útil del reactor debido a la reducción del volumen destinado a la separación del gas generado y el flujo del agua próximo a flujo pistón.

El reactor RAHBI se construyó en acrílico con una longitud de 100 cm, diámetro de 5 cm, lo que resultó en un volumen total aproximado de 1964 mL. Se instaló en una cámara revestida de icopor, termo controlada por un termostato electrónico para mantener la temperatura media en 30 ± 2 °C. Antes de la alimentación del reactor, el agua residual (mezcla del efluente ácido con el efluente alcalino) era ajustada para mantener un valor de pH en torno de $7,0 \pm 0,5$. Así mismo, y conforme encontrado en la literatura [6] para mantener la relación DQO:N:P igual a 500:5:1, fue adicionada urea y fosfato monobásico de sodio.

Una masa de 25 g de lodo granulado, proveniente de un reactor de manto de lodos de flujo ascendente (UASB) que trata el efluente de una industria Avícola, se inmobilizó en cubos de espuma de poliuretano de 0,5 cm de arista, con densidad aparente de 23 kg/m^3 siguiendo la metodología de inmobilización propuesta por [11]. La porosidad de la espuma (ϵ) fue aproximadamente 0,4, lo que resultó en un volumen del líquido de 800 mL. El reactor operó con un tiempo de retención hidráulica de 25 h y carga orgánica de $2,33 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{día}$ continuamente durante 306 días. Un esquema del reactor se observa en la Figura 1.

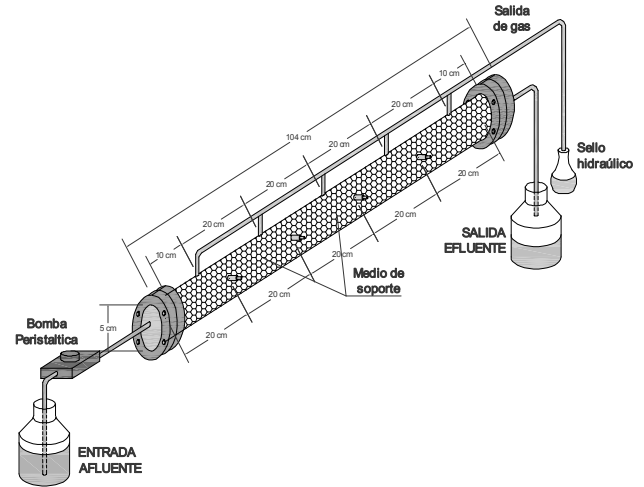


Figura 1. Esquema del Reactor anaerobio horizontal de biomasa inmobilizada

Figure 1. Scheme of Horizontal Anaerobic Immobilized Biomass Reactor

2.3 Procedimientos experimentales

La medida de AOX es ampliamente reconocida para cuantificar la concentración de compuestos organoclorados presentes en los efluentes de las industrias de papel y celulosa. La determinación se realizó con base en el método W9 propuesto por la Scandinavian Pulp, Paper and Board [12] en el equipo Dexter Vertical 1600 fabricado por la Thermo Electron Corporation.

Bioensayos

Para el ensayo de toxicidad aguda fue escogido como organismo indicador la *Daphnia similis* (Crustácea, Cladóceros) conocida como Pulga del agua. Los resultados se evaluaron en unidades toxicológicas agudas (UTa) de acuerdo con la expresión $UTa = 100 / CE_{50}$, en la cual CE_{50} indica el valor de la concentración efectiva del agua residual que causa mortalidad y/o inmovilidad en el 50% de los organismos. Este valor fue calculado estadísticamente por el método Trimmed Spearman –Karber conforme sugerido por [13] utilizando el Software Toxstat 3.3. El montaje de este ensayo y el mantenimiento de las culturas siguieron las recomendaciones establecidas en [14].

La realización del ensayo de la toxicidad crónica, en el cual, se escogió como organismo indicador la *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustácea, Cladóceros) siguió las recomendaciones establecidas por [15]. En este caso los resultados se evaluaron en unidades toxicológicas crónicas (UTc) de acuerdo con la expresión $UTc = 100 / ICp_{(25)}$, en la cual, ICp (25) corresponde al valor de la concentración del agua residual que causa el 25% de reducción en la reproducción de los organismos. Para el cálculo de este índice, se utilizó el método estadístico de la interpolación lineal propuesto por [16].

Los agentes genotóxicos son aquellos que actúan en el DNA, alterando su estructura o función. Cuando estas alteraciones se fijan con posibilidades de ser transmitidas se denominan mutaciones [17]. Se escogió como organismo indicador para evaluar los efectos mutagénicos y citotóxicos la raíz de la cebolla común (*Allium cepa* L). Aproximadamente 50 semillas de cebolla común se colocaron sobre un papel filtro humedecido en agua Milli-Q en una caja Petri a temperatura de $20 \pm 5^\circ\text{C}$ para germinar. Cuando las semillas presentaron un tamaño de raíz más o menos entre 1,5 y 2,0 cm (i.e 4 o 5 días) se transfirieron a nuevas cajas Petri humedecidas tanto con el afluente y efluente del reactor RAHBI como con el control positivo (Metil Metano Sulfonato $4 \cdot 10^{-4}$ M - Acros-Organics, CAS- 66-27-3) y el control negativo (Agua Milli-Q) por 48 h. Luego de este periodo las raíces fueron fijadas en una solución de Carnoy (3:1 - v/v) durante 48 h. El material fijado fue después sometido a hidrólisis ácida con HCl 1N a 60°C por 8 min. En seguida las raíces se sometieron al reactivo de Schiff en local oscuro por 2 h. Para la preparación de las laminas, la región meristemática de la raíz fue seccionada y enseguida se aplicó una gota de Carmin Acético (2%), posteriormente fue cubierta con una laminula para posterior análisis. Se evaluó la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico (IM) presentes en 5000 células siguiendo la metodología descrita por [18,19] siendo observadas 500 células en cada lámina, para un total de 10 láminas por tratamiento. Los resultados se analizaron estadísticamente

utilizando el método de *Kruskal-Wallis* en el Software Bioestat 5. Se consideró efecto mutagénico y citotóxico positivo, para niveles de confianza de $p < 0,05$ comparando con el control negativo. Las láminas fueron analizadas en el microscopio OLYMPUS BX51 con aumento de 400 veces y cámara acoplada CoolSNAP para registro fotográfico de los mejores resultados.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los efluentes de la fabricación de papel y celulosa provocan alteraciones metabólicas y hormonales en organismos acuáticos. Estudios realizados por [2] utilizando bioensayos confirman estos resultados. Los mismos autores, resaltaron que la toxicidad y mutagenicidad de los residuos en este tipo de industrias deben ser considerados problemas ambientales de interés global que exigen estudios y soluciones inmediatas. Como se observa en la Figura 3, los valores de UTa y UTc en el afluente del reactor RAHBI indican el elevado potencial toxicológico en este tipo de residuos líquidos. La misma respuesta, aunque organismos diferentes se observa en el valor de la frecuencia de micronúcleos (MN) y citotoxicidad (IM), que como muestra la Tabla 1, resultó significativa estadísticamente al compararse con el control negativo. Indicando, portanto, que este efluente, efectivamente provoca efectos mutagénicos y citotóxicos en células de plantas superiores como el caso del *Allium cepa*. Resultados similares ya fueron reportados por [1].

El reactor anaerobio horizontal de biomasa inmovilizada (RAHBI) mostró remociones significativas en todos los efectos estudiados (Ver figura 3 y Tabla 1). Se obtuvo una disminución de 90% en la toxicidad aguda y 81% en la toxicidad crónica. Indicando como sugerido por [6] que la biodegradación de sustancias con características tóxicas, presentan cinéticas relativamente lentas de crecimiento microbiano, y por tanto, la inmovilización de la biomasa puede ser la clave para tener un buen desempeño en este tipo de efluentes.

El análisis de la frecuencia del micronúcleo es considerada por varios autores, como una de las técnicas prometedoras en la evaluación de los efectos mutagénicos inducidos por sustancias tóxicas [21,22,23]. El micronúcleo es una estructura morfológicamente parecida al núcleo de la célula, pero de tamaño reducido (el diámetro debe estar entre 1/16 y 1/3 del núcleo principal) y generalmente presenta la misma intensidad de coloración del núcleo. Se observó en este caso, que al igual que en la toxicidad, el reactor RAHBI, mostró una buena capacidad en la reducción del efecto mutagénico, se obtuvo 73% de disminución en la frecuencia de aparición de micronúcleos. En la figura 2 se observan células de la raíz del *Allium cepa* L expuestas al efluente de blanqueamiento de celulosa con presencia de micronúcleos.



Figura 2. Micronúcleo en células de la región meristemática de la raíz del *Allium cepa*
Figure 2. Micronucleic in meristematic cells of *Allium cepa* roots

Autores como [20] sugieren que los niveles de citotoxicidad pueden ser determinados con base en el aumento o disminución del valor del índice mitótico, el cual además, puede ser usado como parámetro de biomonitoreo ambiental. Así, valores del IM más bajos que los del control negativo indican que el crecimiento y desarrollo de los organismos expuestos ha sido afectado por los compuestos evaluados. Por otro lado, valores del IM mayores que los del control positivo serían el resultado de aumento en la división celular, permitiendo una proliferación

incontrolada del crecimiento de las células y posiblemente formación de tumores. En particular, fue observado remoción total del efecto citotóxico en el reactor RAHBI.

Tabla 1. Resultados de MN y IM en la región meristemática de la raíz de *Allium cepa* en los tratamientos aplicados

Table 1. Results of MN and IM in *Allium cepa* meristematic cells after applied treatments

Tratamiento	Número de células analizadas	Índice Mitótico * (citotoxicidad)	Micronúcleos* (mutagenicidad)
Control negativo	5000	25,44±2,76	Efecto no observado
Control positivo	5000	28,47±4,61	1,61±1,18 ^a
Afluente RAHBI	5000	6,04±1,61 ^a	0,73±0,97 ^a
Efluente RAHBI	5000	23,69±1,98	0,16±0,21

*Media ± desviación standard.

^a Diferencia significativa en relación al control negativo para $p < 0,05$, de acuerdo con el método de Kruskal Wallis.

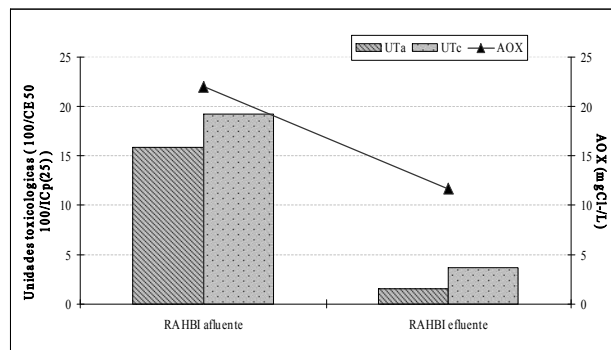


Figura 3. Toxicidad aguda, crónica y compuestos organoclorados en el reactor anaerobio horizontal de biomasa inmovilizada

Figure 3. Acute, chronic toxicity and organochlorides compounds in the horizontal anaerobic immobilized biomass reactor

No obstante, es importante resaltar que, tanto las características físicas como químicas de los compuestos y grupos de compuestos que causan la toxicidad o la mutagenicidad en este tipo de efluentes aún no son totalmente conocidas y varios estudios necesitan ser realizados. Por ejemplo, los compuestos organoclorados, que son potencialmente bioacumulables y persistentes, representan apenas el 0,1% del total

de los AOX que están presentes en estos efluentes.

Como se observa en la Figura 3, el RAHBI removió compuestos organoclorados medidos como AOX con un valor medio durante el periodo de operación de $46\pm 6\%$, resultado próximo de los valores encontrados en la literatura (entre 45% y 60% - [1]). Sin embargo, vale la pena destacar que la mayoría de estos estudios fueron realizados con culturas metanogénicas puras y otras configuraciones de reactores. Se considero que la remoción de AOX que se presento en el RAHBI puede haber sido consecuencia del fenómeno de la descloración reductiva, una vez que fue verificado aumento en la concentración de los cloruros (datos no presentados) durante el periodo de operación. Ese fenómeno ya fue citado en la literatura por varios autores [7,24].

Otras explicaciones se pueden considerar, por ejemplo, que una fracción de los AOX, principalmente la fracción de alta masa molecular, no hidrolisable, sea retenida en el medio de soporte, y como consecuencia se tendría menor concentración en la fase líquida. Ese mecanismo ya fue reportado por [25]. No obstante, es importante resaltar que los fenómenos que influyen en la degradación anaerobia de los AOX y su relación con la presencia de efectos tóxicos y mutagénicos, aún es poco entendida.

4. CONCLUSIONES

Diferentes organismos indicadores de toxicidad, mutagenicidad y citotoxicidad fueron estudiados para evaluar el desempeño de un proceso anaerobio de biomasa inmovilizada. Los resultados mostraron que hubo remociones significativas en todos los efectos estudiados, indicando por tanto, buena capacidad del reactor anaerobio horizontal de biomasa inmovilizada para degradar sustancias con potencial toxicológico. Sin embargo, y con la finalidad de continuar removiendo la materia orgánica residual, principalmente de naturaleza recalcitrante, es necesario integrar el tratamiento anaerobio con procesos químicos y/o biológicos aerobios, de esa forma cumplir los valores de los límites permisibles de vertimiento de efluentes

exigidos por la normatividad ambiental vigente. Adicionalmente, los ensayos de toxicidad y mutagenicidad ofrecen respuestas relevantes que permiten entender el comportamiento de los tratamientos aplicados desde otro punto de vista, aunque, deben ser considerados como análisis complementarios a los análisis físico-químicos tradicionales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a la Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, por el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación y al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ por la beca de Productividad Científica para el Dr. Eduardo Cleto Pires. Especial agradecimiento a la Universidad Militar Nueva Granada (Bogotá-Colombia).

REFERENCIAS

- [1] SAVANT, D., ABDUL-RAHMAN, R., RANADE, D. Anaerobic degradation of sorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology*, 97, 1092-1104, 2006.
- [2] RANA, T., GUPTA, S., KUMAR, D., SHARMA, S., RANA, M., RATHORE, V., PEREIRA, M. Toxic effects of pulp and paper-mill effluents on male reproductive organs and some systemic parameters in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 18, 1-7, 2004.
- [3] ALI, M., SREEKRISHNAN, T. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in Environmental Research*, 5, 175-196, 2001.
- [4] YAN, G., & ALLEN, D. Biosorption of high molecular weight organochlorines in pulp mill effluent, *Water Resources*, 28(9), 1933-1941, 1994.
- [5] SPRINGER, A. *Industrial Environmental Control: Pulp and Paper Industry*. Atlanta: Tappi Press, 2000.

- [6] SPEECE, R. Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater. Nashville Tennessee: Archae Press, 1996.
- [7] RINTALA, J., PUHAKKA, J. Anaerobic treatment in pulp and paper mill waste management. *Bioresource Technology*, 47, 1-18, 1994.
- [8] BUZZINI, A., PIRES, E. Cellulose pulp mill effluent treatment in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Process Biochemistry*, 38,707-713, 2002.
- [9] VIDAL, G., BECERRA, J., HERNANDES, V., DECAP, J., XAVIER, C. Anaerobic biodegradation of sterols contained in Kraft Mills effluents, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(6), 476-480, 2007.
- [10] COSTA, C., OLIVI, P., BOTTA, C., ESPINDOLA, E. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods, *Química Nova*, 31 (7), 1820-1830, 2008.
- [11] ZAIAT, M., PASSIG, H., FORESTI, E. Treatment of domestic sewage in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor, *Environmental Technology*, 21, 1139-1145, 2000.
- [12] SCAN. W9-Test Method. Estocolmo: Scandinavian Pulp, Paper and Board Testing Committee, 1989.
- [13] HAMILTON, M., RUSSO, R., THURSTON, R. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, 11, 714-719, 1977.
- [14] NBR 12713. Ecotoxicologia Aquática-Toxicidade Aguda - Método do Ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea). Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2004.
- [15] NBR 13373. Ecotoxicologia Aquática-Toxicidade Crônica - Método de Ensaio com *Ceriodaphnia sp.* (Cladocera, Crustácea). Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005.
- [16] NORBER-KING, T. A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) approach. Version 2.0: USEPA-Environmental Protection Agency, 1993.
- [17] ZAGATTO, A., BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações. São Paulo: RIMA, 2006.
- [18] GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*, a report of the U.S environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation research*, 99, 273-291, 1982.
- [19] FISKESJO, G. *Allium* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 9, 235-241, 1994.
- [20] FERNANDES, T. Investigação dos Efeitos Tóxicos, Mutagênicos e Genotóxicos do Herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas testes. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho": 200p. Dissertação (Mestrado), 2005.
- [21] MIGID, H., AZAB, Y., IBRAHIM, W. Use of plant genotoxicity bioassays for the evolution of efficiency of algal biofilters in biorremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 57-64, 2007.
- [22] CARITA, R., MARIN-MORALES, M. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, 72,722-725, 2008.

[23] LEMES, D., MARIN-MORALES, M. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water- a case of study. *Mutation research*, 650, 80-86, 2008.

[24] DAMIANOVIC, M.H.R.Z., MORAES, E.M., ZAIAT, M., FORESTI, E. Pentachlorophenol (PCP) dechlorination in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor, *Bioresource Technology*, 100, 4361-4367, 2009.

[25] RAIZER-NETO., E., PICHO, M., ROUGER, J. Decreasing chlorinated organics in bleaching effluents in an anaerobic fixed bed bioreactor, In: *Proceedings. of 4th International Biotechnology Conference in Pulp and Paper Industry*, Raleigh, North Carolina, 279-287, 1989.