

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Estudo de Biodegradação de Compostos Fenólicos em Águas
Residuárias**

Maurício Rigo

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Campinas – SP
2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R449e Rigo, Maurício
Estudo de biodegradação de compostos fenólicos em águas
residuárias / Maurício Rigo. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Biodegradação. 2.Águas residuais. 3.Fenóis. 4.Leveduras
(Fungos). I.Monte Alegre, Ranulfo. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

Dra. Lúcia Regina Durrant

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Dr. Mauro de Paula Moreira

Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Dr. Alexandre Nunes Ponezi

Dr. Denis Miguel Pastor

DEDICATÓRIA

À minha família.

À minha esposa Cristina.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Ranulfo Monte Alegre, pela paciência, serenidade, conselhos e dedicação durante a excussão deste trabalho.

A UNICAMP pela sua infra-estrutura que possibilitou a complementação de minha formação acadêmica.

A Capes, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões que melhoraram este trabalho.

A todos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo e momentos agradáveis.

Aos funcionários da biblioteca, centro de informática e secretaria do departamento.

ÍNDICE GERAL

1. Introdução e Objetivos.	1
2. Revisão Bibliográfica.	5
2.1 Aspectos relacionados à presença de compostos aromáticos no meio ambiente.	6
2.2 Rotas metabólicas para degradação microbiológica dos compostos aromáticos.	8
2.3 Suporte empregado para imobilização de microorganismos.	9
2.4 Aspectos relacionados ao processo de biodegradação de compostos fenólicos.	13
2.5 Cinéticas de crescimento microbiano e de inibição por substrato na degradação de fenol.	49
3. Isolamento e seleção de linhagens degradadoras de fenol.	56
3.1 Introdução.	57
3.2 Material e Métodos.	57
3.2.1 Obtenção de linhagens de microrganismos degradadoras de fenol.	57
3.2.2 Teste de biodegradação de fenol em placas de Petri.	57
3.2.3 Obtenção de linhagens de microrganismos degradadoras de fenol pelo método de enriquecimento seletivo.	58
3.2.4 Teste de biodegradação de fenol em meio líquido.	59
3.3 Resultados e Discussão.	60
3.3.1 Identificação do microrganismo.	62
3.3.2 Cultivo sob condições microaeróbica e anaeróbica.	62
4. Obtenção de parâmetros cinéticos da levedura degradadora de fenol.	63
4.1 Introdução.	64
4.2 Material e Métodos.	65
4.2.1 Determinação da massa seca de células.	66

4.2.2 Procedimento para análise de fenol.	66
4.2.3 Determinação do pH.	67
4.3. Resultados e Discussão.	67
5. Ensaio de degradação de fenol em reatores contínuos.	81
5.1 Introdução.	82
5.2 Material e Métodos.	83
5.2.1 Caracterização da água residuária sintética.	83
5.2.2 Preparo do inóculo empregado nos ensaios contínuos de degradação de fenol.	84
5.2.3 Equações para o cálculo da produtividade volumétrica específica de remoção de fenol e de eficiência de remoção de fenol.	85
5.2.4 Análise de fenol.	86
5.2.5 Análise de demanda química de oxigênio (DQO).	86
5.2.6 Determinação da massa seca celular por filtração.	86
5.3 Discussão dos Resultados.	87
5.3.1 Reator de mistura.	87
5.3.1.1 Montagem do reator de mistura.	87
5.3.1.2 Operação do reator de mistura.	88
5.3.2 Reator de leito fluidizado.	91
5.3.2.1 Montagem do reator de leito fluidizado.	91
5.3.2.2 Operação do reator de leito fluidizado.	91
5.3.3 Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm ² .	94
5.3.3.1 Montagem do reator de mistura pressurizado.	94
5.3.3.2 Operação do reator de mistura pressurizado.	95
5.3.4 Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm ² .	98

5.3.4.1 Montagem do reator de mistura pressurizado.	98
5.3.4.2 Operação do reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm ² .	98
5.3.5 Reator “air-lift” pressurizado.	101
5.3.5.1 Montagem do reator “air-lift” pressurizado entre 1 e 1,5 kgf / cm ² .	101
5.3.5.2 Operação do reator “air-lift” pressurizado.	102
5.3.6 Reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado.	105
5.3.6.1 Montagem do reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado.	105
5.3.6.2 Operação do reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado.	106
6. Quantificação de atividade enzimática.	109
6.1 Introdução.	110
6.2 Materiais e Métodos.	111
6.2.1. Quantificação da atividade enzimática.	111
6.2.2. Determinação das atividades enzimáticas.	112
6.2.2.1 Lacase.	112
6.2.2.2 Peroxidase.	112
6.2.2.3 Tirosinase.	112
6.2.2.4 Lignina peroxidase.	112
6.2.2.5 Álcool veratrílico oxidase.	113
6.2.2.6 Manganês peroxidase.	113
6.3. Resultados e Discussão.	113
7. Conclusões.	122
8. Referências Bibliográficas.	125
9. Anexos do capítulo 4.	134
10. Anexos do capítulo 5.	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Mecanismos de oxidação de HPAs por microrganismos procarióticos e eucarióticos.	9
Figura 2.2 Comparação entre as velocidades específicas de crescimento (M_i), e a concentração de substrato (S) para as relações de Monod e de Haldane. Os valores usados para efetuar os cálculos foram: $M_{i_{\max}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 20 \text{ mg / L}$ e $K_i = 300 \text{ mg / L}$.	51
Figura 3.1. Levedura filamentosa, ampliação de 400 vezes.	61
Figura 3.2 Levedura filamentosa, ampliação de 1000 vezes.	61
Figura 4.1. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 20 mg / L. Tempo de fermentação versus absorvância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,30278 \text{ h}^{-1}$.	68
Figura 4.2. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 20 mg / L. —□— Absorvância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.	68
Figura 4.3. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 46 mg / L. Tempo de fermentação versus absorvância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,33433 \text{ h}^{-1}$.	69
Figura 4.4. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 46 mg / L. —□— Absorvância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.	69
Figura 4.5. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 88,5 mg / L. Tempo de fermentação versus absorvância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,32546 \text{ h}^{-1}$.	70
Figura 4.6. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 88,5 mg / L. —□— Absorvância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.	70
Figura 4.7. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 170 mg / L. Tempo de fermentação versus absorvância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,29376 \text{ h}^{-1}$.	71

- Figura 4.8.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 170 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação. 71
- Figura 4.9.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 267 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,27669 h⁻¹. 72
- Figura 4.10.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 267 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação. 72
- Figura 4.11.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 393 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,1933 h⁻¹. 73
- Figura 4.12.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 393 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação. 73
- Figura 4.13.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 448 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,16158 h⁻¹. 74
- Figura 4.14.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 448 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação. 74
- Figura 4.15.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 502 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,16091 h⁻¹. 75
- Figura 4.16.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 502 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação. 75
- Figura 4.17.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 612 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,15059 h⁻¹. 76
- Figura 4.18.** Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 612 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L)

em função do tempo de fermentação.	76
Figura 4.19. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 723 mg / L. Tempo de fermentação versus absorvância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,13907 h ⁻¹ .	77
Figura 4.20. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 723 mg / L. —□— Absorvância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.	77
Figura 4.21. Taxa de específica crescimento <i>versus</i> concentração de substrato inicial. Os pontos são os dados experimentais e a linha representa o ajuste dos dados experimentais pelo modelo de Haldane.	80
Figura 5.1. Reator de mistura.	88
Figura 5.2. Reator de mistura. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).	90
Figura 5.3. Reator de mistura. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).	90
Figura 5.4. Reator de leito fluidizado com carvão ativado. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —x— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).	93
Figura 5.5. Reator de leito fluidizado com carvão ativado. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —x— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).	93
Figura 5.6. Reator de mistura pressurizado.	95
Figura 5.7. Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 0,7 kgf / cm ² . —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).	97
Figura 5.8. Reator de mistura pressurizado entre 0,5 e 1,0 kgf / cm ² . —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).	97

- Figura 5.9.** Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L). 100
- Figura 5.10.** Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L). 100
- Figura 5.11.** Reator “air-lift” pressurizado. 102
- Figura 5.12.** Reator “air-lift” pressurizado entre 1 e 1,5 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L). 104
- Figura 5.13.** Reator “air-lift” pressurizado entre 1 e 1,5 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L). 105
- Figura 5.14.** Reator “air-lift” pressurizado a 1,0 – 1,5 kgf / cm², com carvão ativado. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —x— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L). 107
- Figura 5.15.** Reator “air-lift” pressurizado a 1,0 – 1,5 kgf / cm², com carvão ativado. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —x— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L). 107
- Figura 6.1.** Reator de mistura, atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase. 114
- Figura 6.2.** Reator de mistura, atividade enzimática da manganês peroxidase. 115
- Figura 6.3.** Reator de leito fluidizado com carvão ativado, atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase. 115
- Figura 6.4.** Reator de leito fluidizado com carvão ativado, atividade enzimática da manganês peroxidase. 116
- Figura 6.5.** Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm², atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase. 116
- Figura 6.6.** Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm². Atividade

enzimática da manganês peroxidase.	117
Figura 6.7. Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm ² , atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.	117
Figura 6.8. Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm ² , atividade enzimática da manganês peroxidase.	118
Figura 6.9. Reator “air-lift” pressurizado entre 1,0 e 1,5 kgf / cm ² , atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.	118
Figura 6.10. Reator “air-lift” pressurizado entre 1,0 e 1,5 kgf / cm ² , atividade enzimática da manganês peroxidase.	119
Figura 6.11. Reator “air-lift” pressurizado a 1,0 – 1,5 kgf / cm ² , com carvão ativado, atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.	119
Figura 6.12. Reator “air-lift” pressurizado a 1,0 – 1,5 kgf / cm ² , com carvão ativado, atividade enzimática da manganês peroxidase.	120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Valores de parâmetros cinéticos para vários microrganismos na degradação de fenol e pH e temperatura em que os parâmetros foram obtidos.	52
Tabela 3.1. Composição da solução A.	59
Tabela 3.2. Composição da solução B.	59
Tabela 3.3. Composição da solução de elementos traços adicionada na solução A.	60
Tabela 3.4. Composição da solução de vitaminas adicionada na solução A.	60
Tabela 4.1. Valores de μ e de S_0 .	78
Tabela 4.2. Valores de parâmetros cinéticos de crescimentos de vários microrganismos na degradação de fenol, pH e temperatura em que os parâmetros foram obtidos.	79
Tabela 5.1. Composição da água residuária sintética empregada nos ensaios contínuos com reatores de mistura e leito fluidizado.	83
Tabela 5.2. Composição da água residuária sintética empregada nos ensaios contínuos com reatores de mistura pressurizado e “air-lift” com e sem carvão ativado.	84

RESUMO

O emprego de hidrocarbonetos aromáticos produzidos pela indústria química tem ocasionado inevitavelmente sua liberação para o ambiente. Tal problema tem se intensificado ultimamente mesmo que considerado a intervenção governamental. Neste escopo, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos objetivando apresentar possíveis soluções para a redução da presença de poluentes no ambiente.

Neste trabalho, selecionaram-se microrganismos degradadores de fenol de estação de tratamento de resíduos de indústria química, visando-se a investigação da capacidade destes degradarem fenol de água residuária sintética em reatores contínuos.

Em ensaios para biodegradação de fenol em meio nutriente líquido contendo 200 mg/L de fenol foram selecionados 13 linhagens de microrganismos que consumiram todo fenol presente no meio em 24 horas. Destas linhagens testadas, uma em especial apresentou um desenvolvimento diferenciado com crescimento no meio líquido de 1000 mg/L de fenol. Essa levedura foi identificada como sendo a *Candida parapsilopsis*. Através de ensaios em frascos de Erlenmeyer determinou-se os valores dos parâmetros cinéticos de crescimento desta levedura como sendo μ_{\max} , K_s e K_i de $0,476 \text{ h}^{-1}$; 10,6 mg/L e 286,3 mg/L respectivamente.

Os ensaios contínuos de biodegradação de fenol foram realizados com o propósito de se estudar a biodegradação de fenol presente na água residuária sintética e a estabilidade operacional do reator. Os reatores investigados foram: reator de mistura, reator de mistura pressurizado, reator de leito fluidizado com carvão ativado e reator “air-lift” pressurizado com e sem carvão ativado, os quais operaram por períodos que variaram de 17 à 97 dias, e a concentração de fenol na água residuária variou entre 250 e 2100 mg/L. Os reatores que apresentaram melhor estabilidade operacional foram os reatores de leito fluidizado com carvão ativado e “air-lift” pressurizado sem carvão ativado, os quais também apresentaram os melhores valores de produtividade volumétrica de remoção de fenol, de 77 mg/L.h e 67 mg/L.h respectivamente.

ABSTRACT

The aromatic hydrocarbons produced by chemical industry have been causing its liberation not deliberated to the environment. Such a problem has being intensified lately even taking into account government effort to prevent that. Regarding that, many researches have being developed in order to introduce possible solutions for reduction of the pollutant presence in the environment.

In this report, it was selected microorganisms capable of biodegrading phenol for wastewater treatment plant in chemical industry in order to evaluate a set of yeasts considering phenol degradation in synthetic wastewater in continuous bioreactors.

Tests were performed to verify strains resistance and growth capability in presence of phenol. In liquid medium biodegradation essays with concentration of phenol of 200 mg/L a set of 13 microorganisms have been selected because they have consumed the all the phenol within 24 hours. From these microorganisms one in special have presented a differentiate growth in liquid medium with phenol concentration of 1000 mg/L, which was identified as being the yeast *Candida parapsilopsis*. Through essays in Erlenmeyer flasks it was obtained the kinetic parameter values for growth of this specific yeast as μ_{\max} , K_s and K_i of 0.476 h^{-1} ; 10.6 mg/L and 286.3 mg/L respectively.

The continuous essays of phenol degradation were accomplished with the purpose of studying the phenol biodegradation in the synthetic wastewater and the operational stability of the reactor. The investigated reactors were: continuous-flow stirred-tank reactor, continuous-flow stirred-tank reactor pressurized, fluidized-bed reactor with activated coal and "air-lift" reactor pressurized with and without activated coal. The reactors were operated for periods between 17 and 97 days, and the phenol concentration in the wastewater varied between 250 and 2100 mg/L. The tested reactors that presented better operational stability were the fluidized-bed reactor with activated coal and also "air-lift" reactor without activated coal. Additionally those reactors have presented the best values of volumetric rate for phenol removal of 77 mg/L.h and 67 mg/L.h respectively.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O problema da poluição ambiental iniciou-se na revolução industrial e intensificou-se com a expansão populacional humana. O acúmulo no ambiente de produtos xenobióticos que são produtos químicos artificiais não encontrados na natureza, como os compostos aromáticos clorados e fenóis, tornou-se tema de numerosas pesquisas sobre tratamento de resíduos e efluentes com microrganismos que acelerem o processo de degradação e aumentem seu rendimento. O uso de sistemas biológicos para despoluir um ambiente contaminado é chamado de biorremediação, onde o poluente funciona como fonte de carbono, sendo geralmente necessário o fornecimento de fósforo e nitrogênio (DUENSER, 1992).

Hidrocarbonetos aromáticos são onipresentes na natureza. Embora haja algum debate de como eles se originaram no ambiente, é geralmente aceito que a maioria deles não é de origem biossintética, mas derivado de pirólise natural de compostos orgânicos. De fato, depois de resíduos glicosil, o anel de benzeno é a principal unidade de estrutura química na natureza é, por esta razão, que microrganismos têm a capacidade de envolver-se com a ocorrência de hidrocarbonetos aromáticos produzidos pelo homem. Benzeno, tolueno, etilbenzeno e fenol, entre outros (mais de 50 produtos químicos) são sintetizados na ordem de milhões de toneladas por ano e são usados principalmente como solventes, combustível, polímeros, produtos farmacêuticos, fertilizantes na agroindústria, na indústria de explosivo, entre outras aplicações (SMITH, 1990; BOUWER, 1992).

O uso de hidrocarbonetos aromáticos produzidos pelo homem tem ocasionado inevitavelmente sua liberação para o ambiente; problema que ainda está se intensificando, mesmo com a intervenção governamental (SMITH, 1990).

O fenol e seus homólogos são moléculas aromáticas constituídas por um anel benzênico contendo grupos hidroxilas, metila, amidas ou sulfônicos, que possuem comportamento de ácidos fracos e dissolvem-se em meios polares, mas são pouco solúveis em hidrocarbonetos alifáticos. Não existem tecnologias que permitam a reciclagem e a eliminação total dos resíduos fenólicos em curto prazo. Então, é preciso destinar-lhes um processo de tratamento apropriado antes de sua disposição final, que pode ser incineração, compostagem, separação ou recuperação e sua biodegradação.

Os compostos fenólicos estão distribuídos na natureza, provenientes do metabolismo de plantas, decomposição microbiana e de proteínas; também são produzidos

artificialmente pelo homem, sendo encontrados comumente em efluentes de refinarias de petróleo, em termoelétricas que utilizam carvão, em indústria de resinas e polímeros, têxteis, entre muitas outras indústrias (LEE *et al.*, 1996; KUMARAN & PARACHURI, 1997).

Um dos principais problemas estudados na ecologia contemporânea é a degradação, biotransformação e assimilação de xenobióticos. Típicos representantes desses grupos é o fenol e todos seus derivados. Muitos estudos com vários microrganismos já foram feitos: *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp*, *Streptomyces sp*, *Bacillus steorothermophilus*, *Rhodopseudomonas polistris*, *Candida tropicalis*, *Phanerochaete chrysosporuim*, os quais revelaram seus potenciais de degradação de fenol nas concentrações de 0,3 a 0,5 g / L (GODJEVARGOVA *et al.*, 2000). Entretanto, nesses estudos a degradação de hidrocarbonetos aromáticos ocorre através da ação de culturas puras ou mistas em ambiente asséptico, com temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido controlados, além de meio nutriente suplementado com sais e vitaminas, o que é inviável economicamente quanto à ampliação de escala. Daí a necessidade de se estudar como biodegradar fenóis em águas residuárias usando um sistema de tratamento que opere sob condições não assépticas, com presença de microrganismos adaptados ao ambiente de tratamento capazes de degradar fenóis.

No sistema de lodo ativado é necessária à aclimatação dos microrganismos aos resíduos resistentes biologicamente e/ou perigosos a serem degradados. O caminho convencional para aclimatação é aumentar paulatinamente a concentração dos compostos químicos contaminantes no reator. Entretanto, poucos estudos compreensíveis têm sido reportados sobre o caminho para a aclimatação e comportamento do ecossistema microbiano, especialmente sobre a dinâmica população de microrganismos responsáveis pela degradação dos contaminantes durante e depois da aclimatação (OKADA *et al.*, 1991).

O fenol e seus compostos são considerados produtos de difícil tratamento, no que tange sua remoção ou degradação do meio ambiente ou de efluentes industriais, e as alternativas para recuperação de ambientes contaminados por esses compostos necessitam do desenvolvimento de tecnologias inovadoras, buscando a eficiência e baixo custo do processo (TORNISIELO, 1996).

Os objetivos deste trabalho foram:

- Isolar e selecionar microrganismos de estação de tratamento de resíduos de indústrias químicas que produzissem ou trabalhassem com compostos fenólicos;
- Estudar a capacidade dos microrganismos isolados a degradarem compostos fenólicos em meio sintético, em culturas mistas ou puras, em reatores que operassem continuamente por longo período de tempo.
- Buscar uma técnica de imobilização dos microrganismos que promovesse a degradação de fenol, usando suportes de baixo custo, que possibilitasse o aumento da densidade celular dentro do reator, e proporcionasse aumento da tolerância dos microrganismos ao fenol, visando melhorar a sua eficiência de degradação, tanto em água residuária bruta bem como em água residuária tratada por processo de lodo ativado.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos relacionados à presença de compostos aromáticos no meio ambiente.

A biorremediação consiste no uso de microrganismos na degradação de poluentes ambientais, e essa técnica tem-se mostrada como alternativa tecnológica crescente com o desenvolvimento industrial, pois a quantidade de efluentes, muitas vezes tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos descartados no ambiente é muito grande. Portanto, há esforço de muitos pesquisadores em várias partes do mundo, para elucidar a rota de biodegradação e eliminação de hidrocarbonetos aromáticos de meios contaminados, através da atividade exercida por microrganismos sobre esses compostos, visando explorar a possibilidade de empregar estes para o controle de poluição ambiental.

Uma das conseqüências do avanço tecnológico é a produção de material residual (efluente) que de alguma forma é descartado no ambiente físico, seja na atmosfera (emissão de material particulado e gases), no solo ou em águas naturais (efluentes industriais e esgoto doméstico). Os compostos químicos contaminantes descarregados no ambiente poderiam ser introduzidos em correntes que passariam por uma planta de tratamento de águas residuárias, e parte deles, embora não sua totalidade, poderiam ser degradados biologicamente por processo de lodo ativado ou biofilme (OKADA *et al.*, 1991).

A origem dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) está na combustão incompleta de qualquer substância orgânica, envolvendo dois processos principais, que são:

1. Pirólise, quando ocorre a decomposição dos compostos de alto peso molecular em estruturas menores, na maioria radicais livres;
2. Pirossíntese, quando os compostos formados durante a pirólise se recombina para formar estruturas relativamente estáveis, entre elas os HPAs. A formação destes contaminantes sempre ocorre em altas temperaturas (BAGER *et al.*, 1960; RUSZ & MULLER, 1977).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são poluentes ubíquos, formados tanto por fontes naturais como de fontes antropogênicas. Entre as fontes naturais incluem-se as queimadas nas florestas (AVER & MALISSA, 1990) e os processos geoquímicos, isto é, a conversão natural em longo prazo da biomassa em petróleo e carvão.

As fontes antropogênicas, o tráfego automotivo, os sistemas de aquecimento, tanto a nível industrial como residencial, a incineração, os mais variados processos

industriais e os vazamentos acidentais de óleo são os maiores contribuintes para a poluição ambiental, contaminando o solo, o ar e a água (AVER & MALISSA, 1990).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), levando em consideração a frequência de ocorrência, através de dados de persistência e toxicidade, elaborou uma lista contendo 129 poluentes prioritários em águas naturais, dos quais 113 são orgânicos (RUOCCO *et al.*, 1987). Os compostos fenólicos constituem importante classe de poluentes do sistema aquático e onze fenóis substituídos constam da lista da EPA. Esses compostos são de grande interesse devido a sua toxicidade à vida aquática e à saúde humana.

Muitos estudos foram realizados com a finalidade de estabelecer a toxicidade de compostos fenólicos. Neste propósito, diferentes organismos tais como bactérias, algas, peixes e roedores foram utilizados (JAWORSKA & SCHULTZ, 1991). O fenol é considerado altamente tóxico e apresenta $L_D 50$ (dose calculada, administrada via oral em ratos, responsável pela morte de 50% de uma população animal experimental em determinado tempo) de 384 mg / kg de peso do animal.

A ingestão contínua de fenol, por um período de tempo prolongado, provoca diarreia, urina escura e danos na visão, em níveis de concentração na faixa de 10 a 240 mg / L de sangue. A concentração letal de fenol no sangue é por volta de 0,047 a 1,3 g / L. Na concentração de 5 μg / L o fenol já ocasiona mau cheiro em águas de rios (KUMARAN & PARUCHURI, 1997).

A EPA estabelece em 1,0 μg / L a concentração máxima permitida para fenol em águas potáveis. No Brasil a Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Básico e Defesa do Meio Ambiente (CETESB), também estabelece como sendo 1,0 μg / L o valor máximo para fenol. Já a Comunidade Econômica Européia (CEE) recomenda o valor máximo de 0,5 μg / L.

Em 1860 o fenol era empregado para desinfecção de materiais cirúrgicos. Atualmente alguns compostos fenólicos obtidos por síntese química, tais como: cresóis, hexaclorofenol, hexilresorcinol e irgasan possuem atividade antimicrobiana mais eficiente que a do fenol, e podem ser empregados como saneantes químicos na indústria de alimentos. Soluções de 2 a 5 % podem ser usadas para desinfecção de equipamentos contaminados, deve-se mencionar que existem alternativas de saneantes mais adequados ao

uso na indústria de alimentos. Estes compostos sanificantes alteram a permeabilidade da membrana celular, permitindo a saída de constituintes celulares essenciais, como os aminoácidos. Alguns compostos fenólicos são excelentes fungicidas, mas apresentam baixa eficiência sobre esporos bacterianos e vírus (ANDRADE & MACÊDO, 1996).

O fenol em baixa concentração age como um agente da membrana ativa das células, pois aumenta a permeabilidade da membrana citoplasmática e ocasiona o vazamento de material citoplasmático, tal como íons de potássio, purinas, pirimidinas e aminoácidos (HUGO & RUSSEL, 1977).

Os fenóis e seus derivados são tóxicos protoplasmáticos e possuem a propriedade de se combinar com as proteínas teciduais e prejudica todo tipo de célula, ainda são relatados efeitos cancerígenos pela exposição ao fenol (OGA, 1996).

2.2 Rotas metabólicas para degradação microbiológica dos compostos aromáticos

O metabolismo oxidativo de bactéria sobre compostos HPAs mostra que primeiramente ocorre uma reação de oxidação, produzindo cis-di-hidrodióis independentemente da estrutura do substrato inicial, que pode ser um fenol, benzeno tolueno, etc. Os cis-di-hidrodióis são formados pela incorporação de dois átomos de oxigênio molecular no núcleo aromático. A dioxigenase que catalisa essas reações iniciais faz parte de um sistema multienzimático do microrganismo. Em seguida os cis-di-hidrodióis sofrem reação de rearomatização pela ação da enzima cis-di-hidrodiol desidrogenase, levando à formação de um derivado di-hidroxilado, que através de oxidação subsequente gera o catecol que é substrato de outras desidrogenases, que vão tornar possível a clivagem do anel aromático, Figura 1.1.

O catecol pode ser oxidado via orto, através da clivagem da ligação entre os átomos de carbono que contém os dois grupos hidroxilas, formando o ácido cis-cis-mucônico, ou pode ser oxidado via meta, onde ocorre a clivagem das ligações entre um átomo de carbono e um grupo hidroxila e de um átomo de carbono adjacente, que contenha grupo hidroxila, formando aldeído (MARIUZZO, 2000).

Um caminho metabólico típico para a degradação de compostos fenólicos consiste em hidroxilar o anel benzênico formando um derivado de catecol, para em seguida romper o anel através da oxidação via orto ou meta. A bactéria *Pseudomonas putida* (ATCC

17515) degrada fenol através do caminho meta, enquanto o fungo *Trichosporon cutaneum* degrada fenol pelo caminho orto. Nos caminhos meta e orto são empregadas as enzimas 2,3 oxigenase e 1,2 oxigenase, respectivamente (YANG & HUMPHREY, 1975).

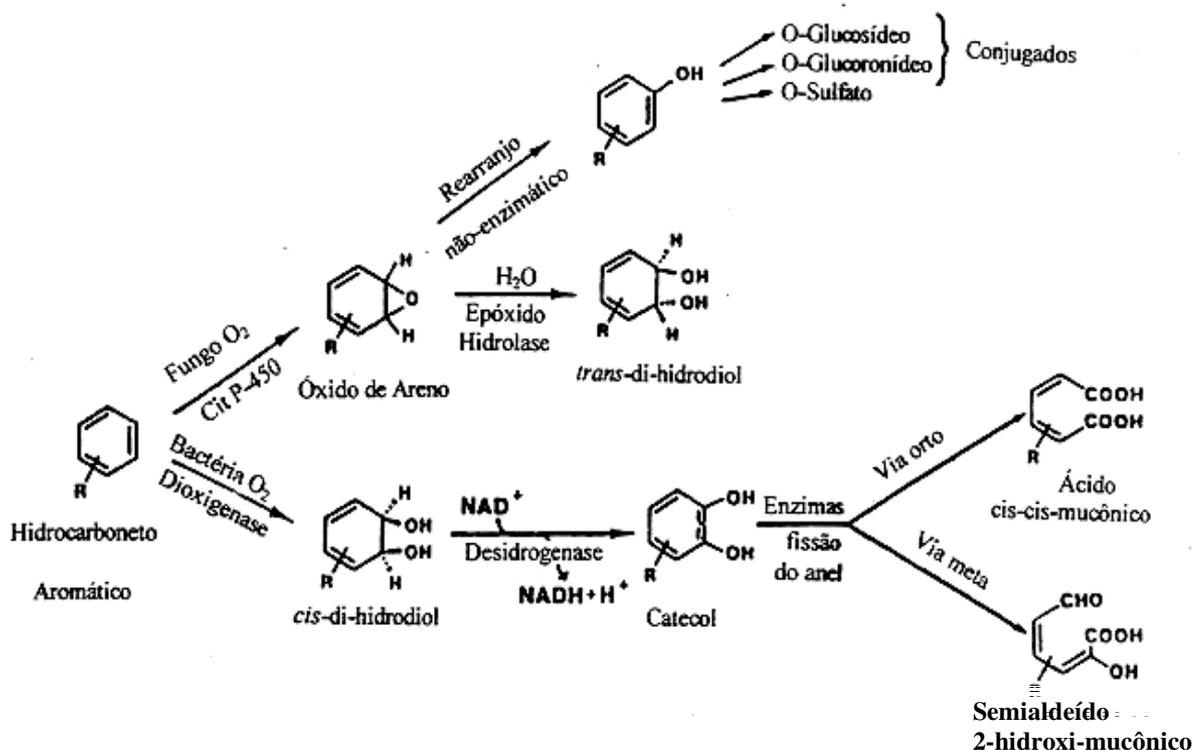


Figura 2.1. Mecanismos de oxidação de HPA's por microrganismos procarióticos e eucarióticos (CERNIGLIA, 1984 citado por MARIUZZO em 2000).

2.3 Suporte empregado para imobilização de microrganismos.

Não existe um material suporte ideal para imobilização de enzimas ou células que seja padrão para cada técnica empregada. Para seleção do material suporte e do método de imobilização é necessário ponderar sobre as conveniências das várias características da aplicação da enzima ou célula contra as propriedades, limitações e características da imobilização do suporte. A influência da natureza química do material suporte usado na imobilização bacteriana é difícil de ser avaliada, pois durante a execução dos experimentos o meio no qual o suporte se encontra pode ter suas propriedades alteradas e interferir na sua interação com o microrganismo. Entretanto, vários autores são unânimes em afirmar a importância das propriedades da superfície do suporte para a fixação de microrganismos e sua colonização. Como principal exemplo, tem-se a carga superficial do suporte, que afeta

diretamente a adesão microbiana. Os microrganismos em condições usuais de pH apresentam superfícies carregadas negativamente e a maioria dos materiais usados como suporte, tais como os polímeros orgânicos, também apresentam carga superficial negativa. Portanto, uma modificação na superfície do suporte é necessária para diminuir sua repulsão eletrostática do microrganismo, e assim, criar condições para a promoção da atração entre o microrganismo e o suporte. A modificação na superfície do suporte pode ser obtida adicionando-se cargas positivas através de sua lavagem com soluções de ácidos ou outras técnicas que empreguem íons metálicos, tais como Fe^{+3} e Al^{+3} (BICKERSTAFF, 1997).

Uma célula intacta qualquer possui centenas de macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, lipoproteínas), dispostas dentro de um volume extremamente pequeno, o que provoca forte inter-relacionamento entre elas. Dentre as quase 2000 enzimas conhecidas atualmente, a maioria delas encontram-se associadas às membranas, por conseguinte essas enzimas em seu meio natural agem como catalisadores típicos heterogêneos, ou seja, elas se encontram insolubilizadas ou imobilizadas. Em meados da década de 60 começaram a surgir trabalhos que ligavam as enzimas, quer por meios químicos quer físicos, a suportes insolúveis (VITOLLO, 1989). Atualmente a busca de tecnologia para imobilização de enzimas e células ganhou impulso devido à expansão da biotecnologia, sobretudo dos avanços na tecnologia genética (BICKERSTAFF, 1997).

Os métodos de insolubilização de enzimas ou células podem ser classificados em quatro tipos básicos:

1- Separação por membranas.

Neste método a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação através de uma película semipermeável. Isso pode ser obtido por microencapsulação, que consiste basicamente na preparação de um sistema emulsionado, onde a enzima ou célula fica aprisionada no interior das micelas, ou ainda através de uma membrana fibrosa semipermeável (hollow-fibers); neste caso a enzima ou célula é confinada numa dada região da solução, retida pela membrana.

2- Entrelaçamento em polímeros.

Consiste no aprisionamento da enzima ou células entre malhas de um polímero geliforme com porosidade que previna o lixiviamento das células ou enzimas e, ao mesmo tempo, permita o livre movimento de substrato e produto.

3- Adsorção.

Consiste da união entre moléculas da enzima ou células e um suporte inerte através de ligações eletrostáticas, estabelecidas entre grupos de cargas opostas. É um processo simples, não deletério para a maioria das enzimas, sendo desprezíveis os efeitos difusionais.

4- Formação de ligação covalente.

A enzima é ligada a um suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, as quais são normalmente estabelecidas entre os amino grupos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos relativos do suporte (-CHO, -NCS ...), (VITOLLO, 1989; BICKERSTAFF, 1997).

A interação entre a célula e o suporte que promove sua imobilização pode ser devido à **adesão**, ligação direta entre a célula e o suporte, através de forças de Van der Waal, pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas; ou **aprisionamento**, ligação cruzada entre a célula e o suporte, onde ocorre ligação intermolecular. Processos de fermentação contínua com células imobilizadas por adesão apresentam problema de desorção, ou seja, lavagem das células do reator durante a fermentação, enquanto em processos com células imobilizadas por aprisionamento, esse problema é menor ou não existe (KOLOT, 1980).

A adesão microbiana a um material suporte é um assunto que vem merecendo atenção especial por parte de vários pesquisadores, porém os resultados obtidos até agora não permitem concluir de forma genérica qual a natureza das forças interativas que ocasionam a adesão do microrganismo à superfície do suporte. A grande dificuldade está no fato de existir uma imensa variedade de suporte e sobretudo de espécies de microrganismos, além de que as condições físico-químicas do ambiente de adesão encontram-se em constante alteração no curso dos experimentos. As características mínimas para um material suporte, a ser empregado neste trabalho, para imobilização de microrganismos em reatores de leito fixo ou fluidizado deverão ser: apresentar a maior

superfície específica possível; permitir a adsorção de microrganismos com capacidade de biodegradar compostos fenólicos; apresentar boa resistência mecânica e ter baixo custo e ser recuperável.

Crisotila é uma fibra de silicato de magnésio muito abundante no Brasil e tem sido utilizada com sucesso em biorredução enantioselectiva em processos em batelada (MORAN *et al.*, 1994), contínuo (WENDHAUSEN *et al.*, 1998) e como suporte de *Saccharomyces cerevisiae* em experimentos de fermentação alcoólica (RIGO, 2001; FILLOY, 2000).

Carvões ativados.

As matérias primas usadas para manufatura de carvões ativados em escala industrial podem ser de origem mineral ou vegetal, como por exemplo: madeira, casca de coco, carvões minerais, turfa e outros materiais vegetais.

O processo de produção de carvões ativados consiste, primeiramente, em seu aquecimento em forno, sob condições controladas, a fim de evitar a combustão. Este tratamento remove materiais voláteis dos microporos, porém, a estrutura porosa ainda não é adequada para uma adsorção eficiente. Posteriormente, a maiores temperaturas, essa estrutura pode ser desbloqueada para criar microporos que se conectam com os meso e/ou macroporos (DAVIES & LEGROS, 1986).

Existem dois processos para ativação do carvão, o físico e o químico. O melhor produto normalmente é produzido pela ativação química com ácido fosfórico, o qual produz um carvão com grande área superficial, consistindo de poros de dimensões moleculares. Outro método químico consiste em adicionar ao leito com carvão solução aquosa de cloreto de zinco seguida por aquecimento à alta temperatura, lavagem com ácido clorídrico, água e secagem (HOUGHTON & WILDMAN, 1971).

O processo usual de ativação é o processo físico, que envolve o uso de vapor de água a temperaturas elevadas, promovendo oxidação seletiva dos materiais e resultando na produção de poros também de dimensões moleculares. No método físico, o carvão é ativado com ausência de ar pela passagem do gás nitrogênio, carbônico, vapor de água ou por outro gás inerte pré-aquecido à alta temperatura (HOUGHTON & WILDMAN, 1971).

Muitas teorias têm sido propostas para explicar o aumento do poder de adsorção desenvolvidas nos carvões após ativação. BARKER (1930) considera que a ativação produz

uma superfície interna ativa e maior, com menor quantidade de oxigênio e hidrogênio residuais, do que as encontradas em carvões não ativados ou primários. O autor sugere que esses componentes atuam como um agente aglomerador para a estruturação da partícula do carvão.

2.4 Aspectos relacionados ao processo de biodegradação de compostos fenólicos

Dois processos tradicionais em tratamentos de efluentes industriais são adsorção em carvão ativado e “air stripping”. A adsorção em carvão ativado é um processo de separação líquido-sólido, cujas aplicações envolvem controle de esgoto e odor, além da remoção de compostos orgânicos específicos tais como organoclorados e aromáticos (URANO *et al.*, 1991). Embora o carvão ativado apresente boa capacidade de adsorção de aromáticos halogenados, a freqüente necessidade de reativação do carvão torna esse processo economicamente inconveniente. “Air stripping” é um processo de separação líquido-gás, eficiente para remoção de compostos orgânicos halogenados voláteis. Entretanto, o maior problema com o uso destes dois processos é que ambos envolvem somente a transferência de poluente de uma fase para outra (CLARK *et al.*, 1988). Dentre as alternativas técnicas mais eficientes propostas para degradação de compostos orgânicos de efluentes, a biodegradação é a técnica mais usada. Estudos recentes mostram que fenol e fenóis clorados são degradados por luz solar e microrganismos em estuários (HWANG & HODSON, 1986).

GODJEVARGOVA e colaboradores (2000) usando a levedura filamentosa *Trichosporum cutoneum* imobilizada em grãos porosos de poliacrilonitrila, em fermentação em frascos de Erlenmeyer com 50 mL de meio nutriente sintético, contendo como única fonte de carbono fenol na concentração de 1000 mg / L, a 30 °C durante 30 horas obtiveram, aproximadamente, a biodegradação de 95 % de fenol presente inicialmente nos frascos. Após o final da fermentação as células imobilizadas foram filtradas, lavadas e usadas em fermentação para degradação de fenol, nas mesmas condições anteriores por seis fermentações consecutivas com biodegradação de 95 % do fenol inicialmente presente. Já na sétima fermentação a porcentagem de fenol biodegradado foi de 80 %.

BORJA e colaboradores (1992) empregaram a levedura *Geotricum candidum* para remover compostos fenólicos de efluentes de indústria de óleo de oliva, e conseguiram

reduzir sua concentração, que são grandes inibidores da atividade bacteriana, de forma que o efluente tratado pela levedura tornou-se susceptível ao tratamento anaeróbico por bactérias, para depois ser disposto no meio ambiente.

ANSELMO & NOVAIS (1984) isolaram microrganismos de amostras de efluente industrial que continha 10 – 20 mg de fenol / L utilizando as técnicas de enriquecimento de culturas e filtração. Os autores selecionaram doze linhagens resistentes a até concentrações iniciais de 1000 mg de fenol / L. Entretanto, quando os microrganismos foram cultivados isoladamente em meio nutriente contendo fenol como única fonte de carbono, somente duas linhagens apresentaram crescimento; uma delas foi identificada como *Acinetobacter sp* e a outra como o fungo *Fusarium flocciferum*. Ambas as espécies também foram capazes de utilizar catecol, que é um composto intermediário da degradação de fenol. O fungo ainda foi capaz de oxidar resorcinol na concentração de até 1000 mg / L. Tanto o fungo quanto a bactéria não foram capazes de degradar clorofenol ou nitrofenol.

ANSELMO & NOVAIS (1992) investigaram o uso de *Fusarium flocciferum* em fermentações contínuas, com células livres ou imobilizadas em poliuretano, na biodegradação de fenol. Os experimentos contínuos foram feitos assepticamente em reatores de 1 L de volume útil, a 25 °C, pH controlado na faixa de 4,0 a 4,5, agitação de 300 rotações por minuto e saturação de oxigênio maior que 60 %. O meio de alimentação do reator continha concentração inicial de fenol de 500 mg / L. No início da fermentação com células livres usaram inóculo proveniente de fermentação em batelada e na fermentação com células imobilizadas seu início ocorreu com a introdução no reator de cubos de espuma de poliuretano com células imobilizadas de *Fusarium flocciferum*. O reator com células imobilizadas operou por quatro meses estavelmente, até a taxa de diluição de 0,2 h⁻¹ e concentração de fenol na alimentação de 1000 mg / L, cuja degradação foi total, porém aumentando a concentração de fenol na alimentação do reator para 1500 mg / L, verificou-se que o efluente de saída do reator continha 284 mg de fenol / L. Nos experimentos com células livres a taxa de diluição variou de 0,02 até 0,13 h⁻¹, porém obtiveram remoção total de fenol até a taxa de diluição de 0,08 h⁻¹. O lixiviamento das células do reator ocorreu na taxa de diluição de 0,11 h⁻¹. Assim, os autores verificaram a capacidade do fungo em degradar fenol na forma livre e imobilizado em resina de poliuretano, e inferiram que para o emprego em escala industrial, o sistema de imobilização de células em poliuretano é

estável, possibilitando a determinação de parâmetros relevantes do reator, apesar dos fungos filamentosos não serem facilmente adaptados em culturas submersas contínuas, devido sua característica morfológica de crescimento, cuja retenção de biomassa no reator ocasiona instabilidade no estado estacionário e o meio ter comportamento não Newtoniano, entre outros problemas. Mas por outro lado, esse fungo tem grande importância na área da biotecnologia devida sua capacidade de degradar compostos tóxicos.

ROZICH & COLVIN (1986) estudaram o consumo de substrato misto fenol / glicose por populações heterogêneas de microrganismos em fermentações em batelada. As fermentações foram feitas com dois tipos de inóculos: o primeiro era adaptado a fenol como única fonte de carbono, o segundo inóculo era adaptado a fenol / glicose como fonte de carbono. A resposta da fermentação com inóculo adaptado com apenas fenol mostrou que as células apresentaram preferência inicial por degradar fenol, mas a presença de glicose diminuiu a velocidade de remoção de fenol. Na fermentação com inóculo adaptado a substrato misto houve uma rápida degradação inicial de glicose e concomitantemente uma lenta remoção de fenol. Portanto os autores concluíram que a adaptação dos microrganismos ao substrato misto influenciou significativamente na remoção de substrato misto fenol e glicose das fermentações em batelada e propuseram que sejam estudados parâmetros cinéticos com sistemas de substrato misto.

AIKTEN e colaboradores em 1989 estudaram a capacidade de degradação de poluentes fenólicos por *Phanerochaete chrysosporium*, e constataram que a enzima ligninase catalisou a oxidação de vários fenóis na presença de peróxido de hidrogênio. Usando o-cresol como substrato padrão comprovou-se que sua remoção foi acentuada com o aumento da concentração da enzima ligninase.

A bactéria *Pseudomonas putida* Q5 apresenta boa taxa de crescimento na faixa de temperatura de 0 a 30 °C, em razão de que é usada para processo de tratamento de efluentes contendo fenóis em regiões de clima frio, pois é capaz de degradar compostos orgânicos solúveis em água mais rapidamente que microrganismos mesófilos, sendo sua temperatura ótima de atuação de 10 °C e a degradação da molécula de fenol ocorre pela orto-clivagem do anel benzênico (KOTTURI *et al.*, 1991).

KOTTURI e colaboradores em 1991 estudaram a cinética de degradação de fenol e o crescimento celular da bactéria psicrófila *Pseudomonas putida* Q5, a 10 °C em

ensaios em batelada com concentração inicial de fenol variando na faixa de 14 a 1000 mg / L. Os experimentos foram feitos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio nutriente, cuja composição em g / L era: 0,17 de K_2HPO_4 ; 0,17 de KH_2PO_4 ; 0,71 de $(NH_4)_2SO_4$; 0,34 de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Por litro de meio nutriente ainda foi adicionado 1 mL da solução de elementos traços de uma solução estoque, com composição em g / 100 mL de: 0,1 de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 2,6 de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,06 de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. Antes da esterilização do meio nutriente seu pH foi ajustado a 7,0 através da adição de NaOH. Após a esterilização do meio nutriente contido nos frascos, foi adicionada solução de fenol 50 g / L, assepticamente, até atingir a concentração inicial de fenol desejada no meio nutriente. Os autores concluíram que o microrganismo psicrotrófilo apresentou capacidade de degradar fenol somente de um quinto a um terço da taxa de degradação de fenol por bactérias pseudomonas mesófilas a 30 °C. No entanto, ressaltaram que a redução no requerimento de energia para aquecer efluentes contaminados com fenol até 30 °C, para atuação das bactérias mesófila, pode propiciar vantagem econômica para o sistema de tratamento de águas residuárias com a bactéria psicrotrófila em lugares de clima frio. Eles também sugeriram novos estudos para verificar o potencial de redução de custos desse processo de tratamento. Trabalhando com concentração de substrato inicial (fenol) na faixa de 14 a 200 mg / L, obtiveram fator de rendimento de 0,55 mg células secas / mg de fenol consumido, e os parâmetros cinéticos: velocidade específica máxima de crescimento de $0,119 \text{ h}^{-1}$, constante de saturação de substrato de 5,27 mg / L e constante de inibição por substrato de 377 mg / L.

MONTEIRO *et al.* (2000) investigaram o uso de *Pseudomonas putida* DSM 548 na degradação de fenol em fermentações em batelada, executadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL a 26 °C e com agitação de 144 rotações por minuto. Foram feitos experimentos com fenol como única fonte de carbono em concentrações variando de 1 a 100 mg / L, e a resposta densidade óptica *versus* tempo de fermentação mostrou uma curva característica de crescimento bacteriano, com a máxima concentração celular no final da fase de crescimento exponencial da bactéria. O aumento da concentração celular da bactéria no meio nutriente foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do substrato fenol adicionado no início da fermentação ao meio nutriente, porém a fase lag, aumentou linearmente com o aumento da concentração de fenol. A taxa específica de crescimento,

determinada para cada valor inicial de concentração de fenol (S_0), foi de $0,246 \text{ h}^{-1}$ para S_0 de 10 mg / L , $0,176 \text{ h}^{-1}$ para S_0 de 50 mg / L e de $0,246 \text{ h}^{-1}$ para S_0 de 100 mg / L . Neste trabalho os autores também obtiveram as seguintes constantes cinéticas: taxa máxima de crescimento específico (μ_m) de $0,436 \text{ h}^{-1}$ e coeficiente de inibição pelo substrato de $54,1 \text{ mg / L}$. Eles ressaltaram que o μ_m obtido foi menor do que o observado para culturas mistas, o que significa que a cultura pura tem maior eficiência na degradação de fenol.

YANG & HUMPHREY em 1975 estudaram a biodegradação de fenol em culturas puras e mistas de *Pseudomonas putida* e *Trichosporon cutaneum* através de ensaios contínuos e em batelada. Os experimentos foram conduzidos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH controlado em 4,5, taxa de aeração de 0,5 vvm e agitação de 750 rotações por minuto, o que permitiu obter rendimento de $0,85 \text{ mg células secas / mg de fenol}$ e requerimento de fenol para manutenção das células de $0,055 \text{ mg de fenol / mg de células secas} \cdot \text{hora}$. A taxa máxima de diluição foi de $0,33 \text{ h}^{-1}$. Os autores concluíram, através dos dados cinéticos das culturas, que é possível reduzir a concentração de fenol até 1 a 2 ppm, de meio que contenha até 100 ppm de fenol, pois acima desse patamar ocorre inibição do crescimento celular pelo substrato. Acrescentaram que somente quando pH, temperatura, taxa de alimentação e concentração de entrada de substrato são mantidas constantes é possível ter uma mistura de culturas operando de forma satisfatória. Na prática, é possível que variações de pH e temperatura possam contribuir para superar a instabilidade ocasionada pelo regime transiente inerente ao processo antes de atingir o regime permanente. Citando como exemplo o processo de tratamento de efluentes de lodo ativado, que opera melhor a concentrações de fenol de 8 a 10 ppm do que a de 1 ppm. Os autores ressaltaram a necessidade de novos estudos sobre o comportamento de culturas mistas para degradação de fenol, bem como estudos sobre os efeitos da temperatura e pH no modelo cinético dos microrganismos. Os experimentos com culturas contínuas foram feitos com o objetivo de analisar a estabilidade e o comportamento dinâmico das culturas puras e mistas, para tanto, foi estudado o comportamento cinético dos microrganismos nos estados estacionários e transientes. Os autores verificaram que o efeito de inibição pelo substrato promoveu estados transientes muito duradouros, quando os microrganismos foram submetidos a um aumento da carga de fenol. Os autores ainda estudaram vários modelos de inibição para ajustar os dados de cinética dos microrganismos, o modelo de Haldane foi o que melhor

representou o comportamento cinético dos microrganismos. Os valores dos parâmetros cinéticos reportados para *Trichosporon cutaneum* foram: μ_{\max} de $0,446 \text{ h}^{-1}$; K_s de $1,66 \text{ mg / L}$; K_i de 380 mg / L e para *Pseudomonas putida* foram de: μ_{\max} de $0,567 \text{ h}^{-1}$; K_s de $2,38 \text{ mg / L}$ e K_i de 106 mg / L .

HILL & ROBINSON (1975) investigaram a cinética de crescimento da cultura pura de *Pseudomonas putida* usando fenol como única fonte de carbono e energia em ensaios em batelada e contínuos, a 30° C e pH de 6,5. Os parâmetros cinéticos foram obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais usando o modelo de Haldane, os valores obtidos de μ_{\max} , K_s e K_i foram: $0,567 \text{ h}^{-1}$; $<1 \text{ mg / L}$ e 470 mg / L , respectivamente. O coeficiente de rendimento celular (Y) foi de $0,52 \text{ g de células secas / g de fenol}$. Nos ensaios em batelada a bactéria apresentou alta taxa de degradação de fenol, concentrações iniciais de fenol de 700 mg / L foram totalmente consumidas.

PAWLOWSKY & HOWELL em 1973 isolaram culturas de microrganismos de solo e de lodo ativado e as empregaram em ensaios para degradação de fenol em batelada, objetivando a determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos. Duas culturas de microrganismos foram estudadas, uma com espécies predominantemente filamentosas e outra com microrganismos não filamentosos. Os autores utilizaram vários modelos cinéticos para ajustar os dados experimentais através da técnica de regressão não linear dos mínimos quadrados. A resposta do ajuste dos dados por todos os modelos foi satisfatória, mas o modelo de Haldane foi escolhido devido a sua simplicidade. Os valores de μ_{\max} , K_s e K_i obtidos para a cultura não filamentosa foram: $0,26 \text{ h}^{-1}$; $25,4 \text{ mg / L}$ e 173 mg / L , respectivamente. Quando foi empregada cultura predominantemente filamentosa os valores dos parâmetros cinéticos obtidos foram: $0,223 \text{ h}^{-1}$; $5,86 \text{ mg / L}$ e $934,5 \text{ mg / L}$, respectivamente.

OKADA e colaboradores em 1991 estudaram o processo de tratamento de águas residuárias por lodo ativado em reatores em batelada seqüencial e contínuo, os quais tinham passado por um processo de aclimação a fenol, e concluíram que a atividade de degradação de fenol no reator de lodo ativado aumentava principalmente quando os microrganismos envolvidos na biodegradação de fenol tornavam-se tolerante ao contaminante e não pelo aumento de sua população.

SHIEH e colaboradores (1990) estudaram a biodegradação de clorofenol usando reator de leito fluidizado, contendo células de bactérias filamentosas imobilizadas sobre celite. A água residuária sintética alimentada ao reator continha 35,7 ppm de 4-clorofenol ou 45,3 ppm de 2,4-clorofenol, a fase líquida atingiu condição de mistura completa devido à recirculação de efluente, as melhores taxas de remoção de 4-clorofenol e 2,4-clorofenol foram de 88 % e 83 %, respectivamente. Ambas obtidas com tempo de detenção hidráulica de uma hora. Os autores ressaltaram que o suporte empregado foi colonizado lentamente por bactérias filamentosas, porém não houve formação de filmes microbianos com espessura mensurável. O crescimento de células livres no reator também foi desprezível.

MÖRSEN & REHM, 1990, estudaram a biodegradação de fenol por uma cultura constituída pela levedura *Cryptococcus elinovii* e a bactéria *Pseudomonas putida* imobilizadas por adsorção sobre carvão ativado e vidro sinterizado, respectivamente. Em ensaios em batelada usando meio sintético enriquecido com levedura imobilizada em carvão ativado ou bactéria imobilizada em vidro sinterizado foi possível degradar 1 g / L de fenol por quatro bateladas consecutivas depois de 8 horas de fermentação quando foi usado o sistema de carvão ativado e 10 horas para o sistema de vidro sinterizado. A degradação de fenol em fermentação contínua em sistema de carvão ativado atingiu a máxima taxa de degradação de fenol de 380 mg / L h comparado com a taxa de 266 mg L / h do sistema de vidro sinterizado. Nas fermentações em batelada o pH inicial foi de 6,9 e durante o curso da fermentação diminuiu até 5,1 no sistema com carvão ativado, e até 4,3 no sistema com vidro sinterizado. Os autores também estudaram a capacidade de adsorção de fenol pelo carvão ativado que apresentou alta capacidade de adsorção (1 g de carvão adsorveu 0,7 g de fenol) e por este motivo o fenol presente em solução com concentração de fenol abaixo 4 g / L era todo adsorvido pelo carvão em curto tempo. O sistema com células de levedura imobilizadas em carvão ativado foi capaz de degradar fenol muito mais rapidamente que o sistema com células de levedura imobilizadas em vidro sinterizado. A máxima concentração de fenol que foi degradada, em fermentação em batelada, pelo sistema de carvão ativado e sistema com vidro sinterizado foi de 17 g / L e 4 g / L, respectivamente.

KRYST & KARAMANEV (2001) estudaram a degradação de fenol em reator de leito fluidizado inverso de volume útil de 0,9 L, neste reator o fluxo de alimentação era descendente, enquanto o fluxo de aeração era ascendente e mantinha fluidificadas as

partículas do suporte de poliestireno expandido (800 kg / m^3) com diâmetros de 0,9 a 1,6 mm. Para que ocorresse a adesão ou aprisionamento microbiano no suporte sua superfície era coberta com pó de carvão. Um consórcio de microrganismos obtido de amostra de solo de um sítio contaminado foi usado neste trabalho. A água residuária sintética empregada continha concentração de fenol na faixa de 30 a 350 mg / L, e composição de sais nutrientes, em mg / L, de: 840 de KH_2PO_4 ; 750 de K_2HPO_4 e 1200 de $(\text{NH})_4\text{SO}_4$. A vazão de alimentação do reator foi de 0,83 até 108 mL / min. A taxa volumétrica de aeração foi de 4,3 L / min. A máxima produtividade volumétrica de degradação de fenol e eficiência de remoção de fenol foram de 180 mg / L h e 84 %, respectivamente, e ocorreram a taxa de diluição de $3,6 \text{ h}^{-1}$ e concentração de fenol na alimentação de 59 mg / L. A menores taxas de diluição a produção de biofilme sobre a superfície do suporte foi gradualmente aumentada. Os parâmetros cinéticos representados pelo melhor ajuste dos dados experimentais foram $\mu_{\text{max}} = 2,18 \text{ h}^{-1}$ e $K_s = 0,1 \text{ mg / L}$. Os autores concluíram que o reator de leito fluidificado foi estável por três meses devido ao eficiente controle da espessura do biofilme. Na faixa de concentração inicial de fenol estudada não foi determinada nenhuma limitação de oxigênio.

COLLINS & DAUGULIS, 1997, estudaram a biodegradação de fenol por *Pseudomonas putida* usando um bioreator com meio particionado e duas fases. Esta configuração permite alta carga do composto inibitório dentro da fase orgânica, o qual é imiscível na fase aquosa que possui baixa concentração do composto inibitório. Os autores empregaram 2–undecanone como fase orgânica. A fermentação foi feita em reator com volume nominal de 2 L, com 1 L da fase aquosa que recebeu a cultura de bactéria, mais 0,5 L do solvente orgânico que recebeu 10 g de fenol. A fermentação foi feita assepticamente, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação de 250 rpm, pH controlado a 6,8 com adição de KOH, aeração de 0,5 vvm. Sob essas condições, com o reator operando em batelada, todo o fenol foi degradado em 84 h, portanto a produtividade volumétrica do sistema (baseada sobre o consumo de fenol) foi de 60 mg fenol / L h. Entretanto os autores verificaram que o sistema tinha limitação de oxigênio disponível durante a rápida fase de crescimento da bactéria, então propuseram uma nova fermentação, similar a anterior, mas com 0,5 vvm de aeração enriquecida, sendo 0,25 vvm de ar mais 0,25 vvm de oxigênio puro, com isso foi possível manter a concentração de oxigênio dissolvido na fase aquosa acima de 80 % durante todo

curso da fermentação. A resposta deste experimento foi a degradação completa do fenol em 72 h.

Em outro experimento o fermentador foi preparado como descrito anteriormente, com 0,5 vvm de ar, mas a carga de fenol foi dividida em duas alíquotas de 5 g. A primeira adicionada no início da fermentação. Depois que a bactéria consumiu quase todo o fenol inicial, após 35 h de fermentação, foi removido 250 ml da fase orgânica, a qual recebeu a segunda alíquota de 5 g de fenol e então retornou ao reator. Essa estratégia permitiu reduzir a fase lag do microorganismo pela sua exposição a menores concentrações de substrato inibitório. Assim, neste experimento foi possível degradar 10 g de fenol em 60 h, o que resultou numa produtividade volumétrica de 83 mg de fenol / L h.

COLLINS & DAUGULIS (1997) ainda fizeram um último ensaio, uma batelada alimentada, onde a fermentação ocorreu sob as mesmas condições anteriores, com aeração de 0,5 vvm. Quando a concentração de fenol era próxima de zero era adicionado, na fase orgânica, 10 g de fenol novamente. O reator recebeu quatro vezes a adição de fenol, de tal maneira que a fermentação consumiu 46,5 g de fenol (incluindo a carga inicial de fenol) em 12 dias, neste tempo não foi verificado significativo acúmulo de metabólitos celulares inibitórios ou tóxicos à bactéria.

Os autores verificaram que a produtividade volumétrica é significativamente melhorada com a aeração enriquecida, pois quando foi desconsiderada a fase lag para os cálculos da produtividade volumétrica obtiveram para o sistema com oxigênio limitado a produtividade de 248 mg fenol / L h, enquanto no sistema com aeração enriquecida obtiveram 373 mg fenol / L h. Ou seja, a aeração enriquecida aumentou em 50 % o valor da produtividade volumétrica.

Os autores concluíram que o reator bifásico contínuo pode ser uma excelente alternativa para biodegradação convencional de fenol. O sistema requer pH, temperatura, agitação e oxigênio dissolvido controlado. A taxa de fenol que migra da fase orgânica para fase aquosa é determinada pela taxa metabólica do microorganismo.

O uso de filtros de carvão ativado para remover compostos fenólicos tem sido estudado por muitos pesquisadores. Este processo de tratamento combina as vantagens da eficiência energética dos filtros anaeróbicos e a capacidade de adsorção do carvão ativado que retêm os compostos tóxicos. A atividade do carvão ativado protege os

microorganismos contra o choque ocasionado pela carga de compostos tóxicos, através da rápida adsorção inicial desses compostos em seus poros e subsequente a vagarosa liberação desses compostos, ou seja, sua desorção. Este fenômeno de desorção, acompanhado pela biodegradação dos compostos desorvidos tem sido frequentemente referido como bioregeneração (KIM *et al.*, 1986).

KIM *et al.* (1986) investigaram a remoção de fenol de água residuária sintética e o processo de bioregeneração em reator anaeróbico de leito fluidificado com carvão ativado granular, usando como inóculo lodo de uma planta de tratamento de resíduo municipal, que sofreu um período de aclimação. Os autores empregaram neste estudo unidades de reatores com dois estágios. Cada estágio possuía um reator cilíndrico de volume útil de 14,3 L, ligado em série com o estágio seguinte. Portanto cada unidade continha dois bioreatores anaeróbicos, um de leito fixo contendo anéis de Raschig e o outro reator contendo carvão ativado granular com as partículas fluidificadas. A vazão de entrada de afluente foi de 10,4 ml / min, o que proporciona um tempo de detenção hidráulica de 24 h para cada reator ou 48 h para a unidade. A água residuária sintética era constituída por fenol, glicose, traços de sais, vitaminas e tampão fosfato. A glicose (1000 ppm) era adicionada no início da aclimação para eliminar o risco de deixar fenol como única fonte de carbono e paulatinamente era reduzida até ser eliminada. A concentração de fenol na alimentação foi aumentada gradualmente até atingir 2000 ppm. O reator operou durante aproximadamente 200 dias, sendo os primeiros 50 dias usados para aclimação da flora microbiana. Os autores concluíram que a produção de biomassa, biogás, adsorção foram todas contribuições importantes para a remoção de fenol. A produção de biogás foi a maior responsável pela remoção de fenol, depois as contribuições do acúmulo de biomassa e da adsorção de fenol no carvão ativado foram similares. A bioregeneração ocorreu quando o fenol adsorvido pelo carvão foi desorvido quando a concentração de fenol no afluente era baixa, esse processo foi verificado pelo aumento da produção de biogás durante o período de desorção. Esse reator tinha volume útil, com os dois estágios somados, de 28,6 L e operou anaerobicamente com taxa de diluição de $0,02 \text{ h}^{-1}$. A máxima produtividade volumétrica de degradação de fenol obtida foi de 40 mg / L h, acompanhada da eficiência de, aproximadamente, 100 % de degradação do fenol presente inicialmente na alimentação.

Efluentes de plantas convencionais de tratamento biológico de águas residuárias, tal como plantas de lodo ativado, sempre contêm uma quantidade moderada de compostos orgânicos. Esses compostos se originam de:

- 1- Degradação inadequada dos compostos orgânicos contidos no afluente que são passíveis de sofrer biodegradação;
- 2- Presença de compostos orgânicos no afluente que não são degradados sob as condições do tratamento;
- 3- Substâncias orgânicas não degradáveis geradas durante o processo de tratamento.

A maioria das plantas de tratamento de águas residuárias são desenhadas e operada tal que os compostos orgânicos do efluente se insiram dentro das categorias 2 e 3. Então, uma típica planta de tratamento de águas residuárias domésticas norte-americana contém aproximadamente 15 mg / L de carbono orgânico total filtrado. Sobre prolongada padronização, esse plano altera-se muito pouco, indicando que os compostos orgânicos degradáveis contidos no afluente sofrem a biodegradação. Recentemente, vastas pesquisas têm como alvo produzir efluente com conteúdo orgânico abaixo do que o produzido pelo tratamento biológico convencional. Como resultado destas pesquisas a propriedade de adsorção do carvão ativado tem sido identificada como responsável pelo processo capaz de produzir um efluente de alta qualidade. Inicialmente acreditava-se que o carvão ativado tinha apenas a função primária de adsorção, ou seja, era um adsorvente. Agora já é amplamente conhecido que o carvão ativado atua favorecendo a atividade biológica, quando ele é empregado no tratamento de águas residuárias. Num sistema de tratamento de águas residuárias que contenha carvão ativado granular os compostos orgânicos pertencentes às categorias 2 e 3 poderiam ser adsorvidos pelo carvão ativado, e posteriormente desorvidos e biodegradados, portanto ocorreriam o processo de bioregeneração dos compostos tóxicos residuais. Já os compostos classificados na categoria 1 seriam prontamente degradados pelos microorganismos do lodo ativado (TSEZOS & BENEDEK, 1980).

TSEZOS & BENEDEK (1980) estudaram os mecanismos de remoção de compostos orgânicos, de água residuária sintética contendo fenol, em reator aeróbico de leiteo fluidificado com carvão ativado e microorganismos provenientes de lodo ativado. Os

autores constataram que se formou um filme biológico sobre as partículas de carvão ativado, e que na presença da atividade biológica o carvão exercia a função de adsorver compostos refratários ou gerados durante a biodegradação. Neste estudo foi investigado 9 materiais adsorventes orgânicos e inorgânicos, quanto a sua capacidade de adsorver os compostos gerados da biodegradação de fenol, e os autores concluíram que o carvão ativado foi o melhor adsorvente testado. O tempo de operação do reator de leito fluidificado foi de 160 h e foram feitos 7 experimentos neste reator, variando-se a concentração inicial de fenol do afluente na faixa de 18 a 56 ppm. Os autores usaram água residuária sintética contendo a proporção de carbono, nitrogênio e fósforo de 100:5:1. A eficiência de remoção de fenol variou entre 100 a 20 % nas primeiras 130 h de operação do reator, depois ficou em 100 % até o término do experimento em 160 h. Os autores concluíram que inicialmente o fenol era adsorvido pelo carvão ativado e depois era biodegradado. Os autores também estudaram a formação de biofilme no reator e concluíram que o rendimento volumétrico de formação de biofilme variou entre 0,8 e 2,9 cm³ / g de carbono orgânico total oxidado, quanto maior a concentração de oxigênio dissolvido no meio maior foi o rendimento volumétrico de biofilme.

A aparente necessidade de longo tempo de aeração no tratamento aeróbico de resíduos fenólicos junto com a instabilidade do processo de tratamento aeróbico propicia a esse processo intensa demanda de energia, tornando o tratamento de águas residuárias de compostos fenólicos ineficiente. Bioreator empacotado com carvão ativado granular anaeróbico tem sido empregado no tratamento de água residuária sintética contendo fenol, catecol, o-cresol e misturas o-cresol e glicose. Esse processo funciona convertendo os componentes fenólicos primários, bem com reduzindo a demanda química de oxigênio (DQO) e o conteúdo orgânico do substrato alimentado ao reator. O carvão ativado contido no reator promove proteção contra o choque de carga de material orgânico tóxico sobre a flora microbiana do reator, pois o material orgânico é adsorvido pelo carvão durante o período de aumento de sua concentração na alimentação. Posteriormente, quando a concentração deste material na alimentação diminui ocorre a desorção dos compostos tóxicos para o meio (SUIDAN *et al.*, 1981).

SUIDAN *et al.* (1991) estudaram o tratamento de água residuária sintética contendo catecol em bioreator anaeróbico de leito empacotado com carvão ativado granular

usado como suporte. Os autores montaram um sistema constituído de quatro reatores em série, sendo que após os três primeiros reatores, havia um clarificador, com a função de remover o excesso de biomassa e separar a fase gasosa da fase líquida que alimentava o reator seguinte. A vazão de alimentação da água residuária sintética ao sistema era de 2 ml / min, cada reator tinha volume útil de 1,2 L e o clarificador tinha volume útil de 0,6 L, portanto o volume total dos sistemas era de 5,4 L, o tempo de detenção hidráulica do sistema era de 55 h, a vazão de recirculação de cada reator era de 50 ml / min. A temperatura de operação dos reatores foi mantida constante a 35 °C.

Durante 617 dias de operação contínua, o reator foi alimentado com razão constante de 2 ml / min e três diferentes concentrações de catecol na água residuária sintética foram avaliados. Na primeira fase que durou 333 dias, a concentração de catecol foi de 200 ppm. Enquanto durante a segunda fase do experimento que durou 178 dias a concentração de catecol no meio sintético foi de 410 ppm. Na fase final do experimento que se estendeu por 106 dias à concentração de catecol na alimentação foi de 1000 ppm.

Nos primeiros 150 dias iniciais de operação, foi observada pouca atividade biológica anaeróbica, que era mensurada pela produção de metano, portanto os autores concluíram que nesta fase o catecol foi removido devido a sua adsorção no carvão ativado. O reator atingiu o estágio estacionário após 250 dias de operação ininterrupta, a partir daí o primeiro reator foi responsável por 99 % da remoção de catecol e por remoção de 88 e 81 %, de DQO e carbono orgânico total (COT), respectivamente. Após o aumento da concentração de catecol na alimentação do efluente para 400 e 1000 ppm, foi verificado imediata elevação na produção de metano, portanto os autores concluíram que não foi preciso um período de adaptação quando foi aumentada a carga de catecol. No experimento com afluente, contendo 400 ppm de catecol, o primeiro reator anaeróbico apresentou eficiência de remoção de DQO, COT, e catecol de 93, 94, 99 %, respectivamente. Na fase final do experimento quando a concentração de catecol na água residuária sintética era de 1000 ppm, o primeiro reator atingiu remoção superior a 99 % de catecol, e remoção de 93 e 97 % de DQO e COT, respectivamente.

A produtividade volumétrica de remoção de catecol foi de 66,1 mg / L h, considerando-se apenas o primeiro reator para efetuar os cálculos. A eficiência do reator na remoção de catecol ficou acima de 99 %.

O processo de carbono ativado biológico, o qual integra o processo biológico com adsorção em carvão ativado, tem sido principalmente aplicado para remover os riscos de resíduos orgânicos de resíduos aquosos e água-subterrânea. O melhoramento da capacidade de adsorção de carbono em sistemas de carvão ativado biológico tem sido atribuído a bioregeneração, que é a recuperação da capacidade de adsorção do carvão ativado pela biodegradação das moléculas orgânicas adsorvidas sobre o carvão. A remoção biológica do adsorvido sobre a superfície do carvão pode reabrir sítios de adsorção, os quais podem ser ocupados por outras moléculas orgânicas do seio da solução. Tem sido geralmente aceito que a biodegradação envolve desorção de compostos adsorvidos do carvão ativado para o seio da solução, seguindo-se a biodegradação (HA *et al.*, 2000).

HA *et al.* (2000) estudaram o processo de bioregeneração de uma mistura de microrganismos sobre carvão ativado granular com carga mista de fenol e 2,4 diclorofenol. Os microrganismos usados foram provenientes de uma planta de tratamento biológico aeróbio de água residuária de uma indústria petroquímica. Os microrganismos sofreram um processo de aclimação aos substratos fenol e 2,4 diclorofenol durante 80 dias. Nas fermentações em batelada foram usados meios nutrientes de solução tampão a pH 7 constituído por, em mg / L, 72 (NH₄)₂SO₄; 2,5 KH₂PO₄; 8,5 K₂HPO₄ · 3 H₂O e 9,2 Na₂HPO₄ 7 H₂O, em 100 ml deste meio nutriente foram adicionados fenol e 2,4 diclorofenol até a concentração de 100 e 116 mg / L, respectivamente. Em seguida foi adicionado 0,1 g de carvão ativado granular (CAG) ao frasco que foi incubado a 30 °C e 120 g por 24 h. Estudos anteriores mostraram que a adsorção atingiu o equilíbrio após 15 h. Após o tempo de incubação de 24 h a fase líquida foi separada do carvão ativado granular por centrifugação, a fase líquida foi analisada para se determinar a quantidade de fenol e 2,4 diclorofenol adsorvido no CAG. A massa de CAG foi dividida em dois frascos, um para ocorrer a bioregeneração em batelada onde foi inoculado a cultura mista de microrganismos adaptados ao fenol, e outro frasco que era o controle sem microrganismos que foi usado para identificar a contribuição ao processo de desorção na ausência dos microrganismos. Os dois frascos com CAG foram incubados durante duas semanas a 30 °C e 120 g.

Inicialmente foi determinado que a quantidade de fenol, 2,4 diclorofenol adsorvidos no CAG foram de 41 e 84 mg / g de CAG, respectivamente, indicando que o composto 2,4 diclorofenol tem maior tendência para ocupar os sítios de adsorção do que o

fenol. No frasco onde ocorreu a bioregeneração em batelada, após duas semanas de incubação, as concentrações de fenol e 2,4 diclorofenol sobre o CAG foram de 11 e 34 mg / g CAG, respectivamente. Então as eficiências de bioregenerações foram de 73 e 60%, respectivamente. Para o frasco controle as eficiências de bioregenerações de fenol e 2,4 diclorofenol foram de 13 e 4%, respectivamente. Esse resultado mostrou que no frasco sem microrganismos somente uma pequena fração dos compostos adsorvidos sofreu desorção. Os autores reportaram que em estudos anteriores foi determinado que o fenol adsorvido sobre CAG tinha alta energia de ativação devido a ligação oxidativa dos compostos fenólicos. Então os autores colocaram a hipótese de que os microrganismos dentro do processo de bioregeneração aumentam a desorção dos compostos adsorvidos pelo CAG pela bio-assimilação desses compostos no seio do líquido.

Em ensaio de fermentação em batelada consecutivas com ciclos de 8 h e com CAG biológico (contém microrganismos provenientes de lodo ativado), os autores obtiveram que quanto maior o tempo de retenção de lodo, maior a eficiência de remoção dos compostos fenol e 2,4 diclorofenol, bem como maior a capacidade de bioregeneração destes compostos de CAG. O tempo de retenção do lodo era controlado ajustando-se o volume do meio nutriente incluindo o lodo suspenso.

Os autores fizeram micrografias de varredura eletrônica das superfícies externa e interna no CAG de amostra coletada da fermentação em batelada e constataram que os microrganismos ficaram imobilizados principalmente na superfície externa da superfície do CAG, embora existisse microrganismos na superfície interna do suporte. A face externa do CAG continha microrganismos filamentosos e na forma de bastonetes curtos, e a superfície interna continha microrganismos na forma de bastonetes curtos (HA *et al.*, 2000).

Vários métodos têm sido propostos para superar a inibição pelo substrato no tratamento de água residuária com alta concentração de fenol. Vários deles incluem adaptação das células de alta concentração de fenol; imobilização de células; emprego de microrganismos modificados geneticamente. Os métodos que usam adaptação de células levam mais de 20 dias de adaptação para degradar 1000 mg / L de fenol. A imobilização de microrganismos em vários meios, tais como, hidrogéis, carbono ativado e membranas de fibras ocas têm sido técnicas promissoras para superar a inibição pelo substrato (LOH & TAR, 2000).

LOH & TAR (2000) investigaram o processo de otimização da taxa de biodegradação de fenol por *Pseudomonas putida* pela suplementação do meio de crescimento com extrato de levedura ou glicose, e também estudaram o efeito da adição destes suplementos sobre a tolerância da inibição pelo substrato da bactéria. As fermentações foram feitas em frascos de Erlenmeyer de 500 ml com 250 ml de meio, o pH inicial era de 7,2 a 7,4, após a inoculação da bactéria os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm. A concentração inicial de fenol no meio nutriente era de 750 ppm ou de 1000 ppm e ambas as concentrações de extrato de levedura e glicose variaram na faixa de 0,2 a 4 g / L.

Nas fermentações feitas com extrato de levedura nas concentrações de 0,2; 0,6; 1; 2 e 4 g / L com 750 ppm de fenol foram obtidas fases lag na faixa de 10 e 30 h. E a resposta de taxa específica de crescimento da bactéria obtida para cada concentração de extrato de levedura investigada foi 0,23 h⁻¹. A taxa específica de crescimento de células sob presença somente de fenol, sem extrato de levedura, foi de 0,22 ± 0,01 h⁻¹. Portanto a adição de extrato de levedura não tem efeito positivo ou adverso sobre a taxa específica de crescimento. Os autores notaram que existe uma concentração de extrato de levedura ótima para ser usada na degradação de fenol, essa concentração encontra-se na faixa de 0,2 até 2 g / L de extrato de levedura. O motivo para o aumento da taxa de degradação de fenol à concentração de extrato de levedura menor que 2 g / L pode ser atribuída a atenuação da toxicidade do fenol pelo extrato de levedura e conseqüentemente formação de mais massa celular formada como resultado da fonte de carbono adicional de extrato de levedura. Baseado nesses resultados, a quantidade ótima de extrato de levedura a ser suplementada foi determinada como sendo 1,5 g / L para 750 mg de fenol / L. Essa taxa foi usada em experimentos de degradação de fenol a altas concentrações.

Nas fermentações onde glicose foi empregada como suplemento verificou-se que abaixo de 1 g / L de glicose a taxa de remoção de fenol aumenta com a suplementação de glicose. Isso devido ao aumento de massa celular que ocasionaria o aumento de remoção de fenol. Entretanto o melhoramento na remoção de fenol foi apenas de 13%.

Para se determinar à quantidade ótima de suplementação de extrato de levedura ou glicose, foram feitos estudos para testar a tolerância da bactéria à alta concentração de fenol na presença dos suplementos. Foi obtido crescimento celular em fermentação com 1000

ppm de fenol suplementada com 2 g / L de extrato de levedura. Nas fermentações onde glicose foi usada como suplemento foi constatado crescimento celular nas concentrações de fenol de 1000 e 1200 ppm quando o meio estava suplementado com 1,1 e 1,3 g / L de glicose, respectivamente.

Em fermentações com meio contendo suplemento de 2 g / L de extrato de levedura e com concentração inicial de fenol de 1000 e 750 ppm foram obtidas produtividade volumétricas de degradação de fenol de 56,1 e 73,7 mg / L h, respectivamente. E os autores atribuíram esta diferença ao efeito de inibição pelo substrato da bactéria. Em fermentações com meio suplementado com glicose 1000 e 1200 mg / L e com concentração inicial de fenol de 1000 ppm foram obtidas produtividade volumétrica de degradação de fenol de 61 e 52,4 mg / L h, respectivamente. Como no ensaio controle onde havia somente fenol (1000 ppm) como fonte de carbono as células não foram capazes de crescer os autores concluíram que a presença de glicose ou extrato de levedura no meio de cultura aumentou a tolerância de microrganismo à alta concentração de fenol.

EHRHARDT & REHM, 1985, investigaram a degradação de fenol por *Cândida sp* e *Pseudomonas sp* imobilizadas sobre carvão ativado. Neste estudo foi empregada água residuária sintética constituída por (g / L): $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ (0,5); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5); NaCl (0,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,5); K_2HPO_4 (1,5); KH_2PO_4 (0,5); CaCl_2 (0,01); $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,01) e 1 ml de solução de elementos traços, o pH final foi ajustado a 6,9 e o fenol foi adicionado após a esterilização. Foram feitos ensaios em batelada, em frascos com 200 mL de meio com 10 g de carvão, para estudar a degradação de fenol em diferentes concentrações, a degradação de fenol com o carvão ativado saturado com fenol e cinética de adsorção de fenol pelo carvão ativado, e também para estudar a cinética de adsorção dos microrganismos na superfície do carvão ativado. Os autores concluíram que após 10 h de ensaio um grama de carvão ativado continha 4×10^7 células de *Pseudomonas sp* e 3×10^8 células de *Cândida sp*. Nos ensaios de cinética de adsorção de fenol foi obtido completa adsorção de 1 g / L de fenol em menos de 15 minutos, 5, 10 e 15 g / L de fenol foram adsorvidos em 40, 100 e 200 h, respectivamente. Não foram observados, para essas concentrações, diferentes cinéticas de adsorções entre o carvão ativado com e sem microrganismos adsorvidos. Nos ensaios de degradação de fenol os autores constataram que as células livres não toleraram mais que 1,5 g / L de fenol, enquanto os microrganismos

adsorvidos sobreviviam temporariamente a altas concentrações de fenol, até 15 g / L, e degradaram cerca de 90 % do fenol adsorvido pelo carvão ativado.

Os autores relataram que os poros externos do carvão ativado tem diâmetro maior que 5×10^{-8} m, o qual é menor do que o diâmetro das células da bactéria, cerca de 5×10^{-7} m. Entretanto algumas células conseguem aprisionar-se na superfície externa do carvão ativado quando encontram algum microporo, o que ocasiona diminuição da velocidade de adsorção de fenol pelo carvão ativado, pois as células adsorvidas sobre a superfície externa do carvão ativado obstruem alguns poros e impedem a difusão do fenol. Os autores concluíram que a máxima concentração de fenol no meio, após a adsorção de fenol pelo carvão, deve ser menor que 2 g / L para manter a atividade de degradação de fenol dos microrganismos imobilizados, e ainda que os microrganismos imobilizados utilizaram o fenol adsorvido pelo carvão, que tornou-se disponível para as células após sofrer difusão para fora do carvão ativado. Portanto o carvão ativado agiu como um tampão para os microrganismos, protegendo-os através da adsorção do fenol, e liberando-o em pequenas quantidades para sofrer a biodegradação gradualmente. Assim essa combinação de adsorção física e degradação biológica de fenol poderia ser aplicada em tratamento de águas residuárias contendo temporariamente alta concentração de fenol.

EHRHARDT & REHM (1989) estudaram a degradação contínua e semicontínua do fenol por *Pseudomonas putida* adsorvida sobre carvão ativado, em água residuária sintética descrita pelos próprios autores em 1985. O reator contínuo tinha volume de trabalho de 200 a 230 mL, operou a temperatura de 25 °C e como um reator de coluna “air-fift”, onde o meio era constantemente bombeado do topo para a base da coluna. No início do experimento 25 ml de carvão ativado esterilizado, com células imobilizadas, foi colocado como um leito fixo na coluna. Esse leito fixo de carvão foi aerado a partir de sua base. As células adsorvidas sobre o carvão ativado aumentaram com o desenvolvimento da fermentação, formando um filme ao redor do carvão, o que entupia o reator. Então, quando o reator começava a entupir, ao redor de 8 dias de operação, era feita uma fluidificação do leito através do aumento da aeração, para varrer o excesso de células do reator, em seguida a aeração era diminuída e o reator voltava a ser de leito fixo. O tempo de detenção hidráulica do reator foi constante de 4 h e a maior produtividade volumétrica de degradação de fenol obtida foi de 625 mg / L h. A concentração de fenol da alimentação foi aumentada

até 2500 mg / L, onde a eficiência de remoção de fenol atingiu seu menor valor, de 88 %. O tempo de operação total do ensaio contínuo foi de um mês e a produtividade média de degradação de fenol foi de 360 mg / L h. Durante o processo de fermentação as partículas do carvão foram cobertas com um biofilme. A bactéria crescia nas entradas dos microporos do carvão, ocasionando a diminuição de adsorção de fenol pelo carvão ativado. Nos ensaios contínuos foram acompanhadas a atividade da enzima catecol-2-3-dioxigenase da bactéria, e os autores verificaram que a atividade desta enzima em ensaio sem carvão ativado foi menor do que em ensaio com carvão ativado, portanto concluíram que a presença de carvão ativado estimula a atividade de degradação da bactéria.

PRIETO *et al.* (2002) estudaram a biodegradação de fenol e formaldeído por células de *Rhodococcus erythropolis* imobilizadas em partículas esféricas irregulares de cerâmica com 2,5 – 3,0 cm de diâmetro e tamanho médio dos poros de 0,0664 µm. Experimentos controle feitos com o suporte na ausência de biomassa mostraram sua incapacidade de adsorver fenol e formaldeído na concentração e tempo de exposição testados. O microrganismo foi isolado de água residuária poluída com fenol. Os autores observaram em ensaios feitos em batelada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio sintético, com concentrações de fenol de 600, 800 e 1000 mg / L, com 5 g de suporte ou sem suporte (frascos controle) incubados a 30 °C e 160 rpm, que a biodegradação de fenol foi mais rápida nos frascos com suporte com concentração de fenol acima de 600 mg / L. Este fato pôde ser explicado assumindo que as células adsorvidas no suporte possuem alta taxa de degradação de fenol ou que o suporte favorece o crescimento celular. Nos frascos com suporte e 1000 mg / L de fenol o tempo requerido para degradar todo o fenol foi de 50 h, enquanto que nos frascos sem suporte e com a mesma concentração de fenol foi de 70 h. A fase lag para as células imobilizadas foi menor em relação às células suspensas. Portanto, os autores concluíram que a interação entre as células e o material cerâmico do suporte resultou num aumento da taxa metabólica da bactéria, refletido no aumento observado da taxa respiratória das células e na diminuição da sua fase lag, o que elevou sua capacidade de degradação de fenol. Os autores também estudaram a biodegradação contínua de fenol com células imobilizadas em 60 g do suporte mantido dentro de um reator de leito fixo, montado dentro de duas colunas de vidro de 30 cm de comprimento e diâmetro de 2,5 cm, com vidro sinterizado em sua base. A corrente

de ar e de alimentação de meio sintético eram ascendentes, o volume total do reator era de 300 mL e a vazão de ar introduzida em sua base era de 0,5 vvm. Com o procedimento de inoculação otimizado os autores investigaram o efeito da taxa de diluição 0,5 – 4,5 h⁻¹ sobre o funcionamento do reator, para isso se variou a vazão de alimentação. A máxima taxa de degradação de fenol obtida foi de 0,75; 0,60; 0,67 e 0,39 g / L h, para água residuária sintética contendo 200; 400; 600 e 800 mg / L, respectivamente. O tempo de operação do reator foi de 10 dias e o seu estado estacionário foi atingido após o primeiro dia. Os autores testaram o reator com efluente industrial, contendo fenol e formaldeído, diluído em meio sintético e obtiveram completa degradação do formaldeído, mas o fenol não foi degradado completamente. Os autores concluíram que mesmo sendo difícil de comparar seus resultados com dados obtidos de ensaios com diferentes procedimentos experimentais e com cepas distintas, que as taxas de biodegradação de fenol reportadas aqui estavam acima das taxas obtidas por outros autores que utilizaram o mesmo microrganismo imobilizado em alginato de cálcio.

KUO e colaboradores em 2002 investigaram a biodegradação de fenol por células de *Candida tropicalis* imobilizadas em pequenas esferas de 3 mm de diâmetro de poliacrilamida. Em reator “air-lift”, de volume útil de 10 L, foi conduzido estudos de biodegradação contínua de fenol de água residuária sintética. O suporte ocupava 10 % do volume de trabalho do reator e durante o ensaio o pH foi mantido na faixa de 6,5 a 7,2 com adição de carbonato de cálcio 0,1 N, a corrente de alimentação continha 1000 a 5000 mg / L de fenol, o tempo de retenção hidráulica do reator foi de 15 h e a vazão de ar de 4 L / minuto. A eficiência de remoção de fenol foi maior do que 99 % após 30, 45 e 75 h de operação do reator para concentrações iniciais de fenol de 1000, 2000 e 3000 mg / L, respectivamente. A máxima produtividade volumétrica de remoção de fenol obtida no reator foi de 320 mg / L h, após 250 h de operação com concentração inicial de fenol de 5000 mg / L, o que representou 95 % de remoção de fenol.

KIM *et al.* (2002) estudaram a biodegradação simultânea de fenol e 4-clorofenol em reator de leito fixo por *Pseudomonas testoteroni* imobilizada em Celite R635. O volume útil do reator era de 1 L e o suporte ocupava 70 % deste volume. Os autores usaram meio nutriente sintético com pH ajustado a 7,2 e a única fonte de carbono era os compostos fenólicos, ambos na concentração inicial de 20 mg / L. Em ensaios feitos em batelada após

10 h houve completa degradação dos compostos fenólicos. Esses ensaios foram repetidos por mais quatro vezes de modo a simular um sistema semicontínuo e o tempo de degradação completa dos compostos fenólicos continuou sendo 10 h. Portanto os autores concluíram que o reator era estável e suficientemente efetivo para ser aplicado em biodegradação. Depois da quinta batelada consecutiva começou-se a adicionar o substrato continuamente com taxa de diluição de $0,06 \text{ h}^{-1}$, a qual foi aumentada gradualmente até atingir $0,36 \text{ h}^{-1}$ após 80 h de operação, nesta faixa de taxa de diluição investigada os compostos fenólicos foram completamente degradados. A taxa de diluição de $0,36 \text{ h}^{-1}$ obtida em reator de leito fixo foi superior a taxa máxima específica de crescimento obtida em reator de mistura (CSTR) sem células imobilizadas sobre o suporte, então os autores concluíram que o reator de leito fixo superava a limitação ocasionada pela lixiviação das células do reator de mistura sem imobilização.

RAJA *et al.* (1997) estudaram o efeito do campo magnético sobre a biodegradação de fenol em reatores de coluna de bolhas e “air-lift”. Inicialmente duas colunas de 700 mm de altura e 90 mm de diâmetro foram montados, em uma delas foi aplicado campo magnético lateralmente. Posteriormente essas colunas foram transformadas em reatores “air-lift” pela imersão de um tubo interno concêntrico de 44 mm de diâmetro e 400 mm de altura. Os resultados dos reatores “air-lift” e de coluna de bolhas, nas mesmas condições de processo e intensidade de campo magnético mostraram que o tempo para degradação de fenol no reator de coluna de bolhas foi de 480 minutos, enquanto que no reator “air-lift” foi de 425 minutos. Portanto a biodegradação de fenol foi mais rápida no reator “air-lift”.

Exemplos do potencial de biodegradação de fenol foi estudado por SANTOS & LINARDI (2003), bem como isolamento, seleção e identificação de microrganismos obtidos a partir de efluentes de indústria siderúrgicas contendo concentração de fenol na faixa de 5 a 326 mg / L. Os autores isolaram 97 culturas de fungos capazes de crescer em meio Sabourand (peptona 1 % , glicose 2 % , extrato de levedura 0,5 % e ágar 0,5 %) suplementado de com 194 mg de fenol / L. Dessas culturas 15 foram selecionadas por serem capazes de tolerar concentrações de fenol superiores a 980 mg / L em ensaios feitos usando meio sólido YNB. Três dessas culturas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Aspergillus*, duas ao gênero *Fusarium*, três ao gênero *Penicillium* e sete ao gênero *Graphium*. Todas as formas identificadas foram testadas quanto sua habilidade de crescer

em meio líquido YNB contendo concentração de fenol na faixa de 194 a 980 mg / L. A extensão da biodegradação de fenol e o tempo requerido para a degradação variaram em função da cepa e da concentração inicial de fenol no meio de cultura. A degradação de mais de 80 % do fenol presente no meio de cultura ocorreu para todas as cepas testadas em menos de 72 horas para concentração inicial de fenol no meio de cultura de 392 mg / L. Para concentrações iniciais de fenol superiores a 586 mg / L a porcentagem de degradação de fenol ficou em torno de 4 %, o que caracterizou metabolismo de um substrato tóxico. As sete linhagens do gênero *Graphium* foram as que apresentaram maior porcentagem de degradação de fenol, por volta de 20 %, quando cresceram em meio de cultura com concentração inicial de fenol de 980 mg / L.

HAMED e colaboradores (2003) investigaram a biodegradação dos compostos individuais (benzeno, tolueno e fenol) e também de suas misturas, por *Pseudomonas putida*. Os autores empregaram meio nutriente sintético contendo fonte de carbono proveniente apenas de fenol, benzeno ou tolueno. Em experimentos feitos em frascos de Erlenmeyer para os compostos individualmente com concentrações iniciais de 30, 60, 125, 185, 250 e 420 mg / L de benzeno, 28, 55, 110, 165, 220 e 380 mg / L de tolueno e 50, 100, 200 e 400 mg / L de fenol os resultados mostraram que os substratos foram completamente biodegradado, exceto para concentrações de 380 mg / L de tolueno, 420 mg / L de tolueno e 400 mg / L de fenol, que tiveram apenas 44 %, 65 % e 54 % de seus substratos degradados, respectivamente. Excluindo-se o período de fase lag do crescimento do microrganismo as curvas de concentração celular versus tempo de fermentação para os três substratos foram muito semelhantes. A taxa de biodegradação calculada pela razão: concentração de substrato pelo tempo de degradação mais a concentração celular obtida foi similar para benzeno e tolueno, mas a de fenol foi menor, portanto o microrganismo usa benzeno e tolueno como única fonte de carbono melhor do que fenol.

A completa biodegradação da mistura de benzeno (125 mg / L) e tolueno (110 mg / L) ocorreu em 16 h, enquanto que para biodegradar completamente 250 mg / L de benzeno foi necessário 14 h. A fase lag da bactéria para a mistura dos substratos benzeno e tolueno foi menor do que a fase lag para os substratos puros. Os autores verificaram que o tolueno inibiu a utilização de benzeno mais do que o benzeno inibiu a utilização do tolueno.

Para a mistura de benzeno e fenol os autores verificaram que a biodegradação de fenol começou apenas quando o benzeno já tinha sido consumido completamente, assim quando o fenol começou a ser utilizado como fonte de carbono a concentração celular era muito maior do que a concentração celular inicial, portanto o fenol era degradado mais rapidamente do que se estivesse sozinho no meio. 200 mg / L de fenol levou 35 h para ser degradado completamente pela bactéria, enquanto que a mistura de benzeno (60 mg / L) e fenol (200 mg / L) teve a completa degradação de benzeno em 10 h e de fenol em 20 h.

Para mistura tolueno e fenol também foi observado o mesmo comportamento apresentado para mistura de benzeno e fenol, portanto o consumo de fenol iniciava-se apenas quando o tolueno fosse consumido completamente, e ainda os autores verificaram que após o consumo do tolueno não houve nenhum crescimento celular significativo durante a biodegradação do fenol. A presença de tolueno diminuiu o tempo de biodegradação de fenol muito mais significativamente que a presença de benzeno.

A mistura ternária de benzeno (30 mg / L), tolueno (28 mg / L) e fenol (100 mg / L) também teve comportamento semelhante ao das misturas binárias, onde o fenol só foi biodegradado após o completo consumo do benzeno e do tolueno, e novamente nenhum crescimento celular significativo foi observado durante o consumo do fenol.

Os autores concluíram que na biodegradação em batelada dos substratos conduzidos neste trabalho, a bactéria *Pseudomonas putida* foi capaz de consumir benzeno, tolueno e fenol completamente. Benzeno e tolueno foram melhor substrato para crescimento da bactéria do que fenol e também foram degradados antes do que o fenol.

ABUHAMED e colaboradores (2003) desenvolveram um trabalho cujo objetivo foi estudar o efeito da adaptação de *Pseudomonas putida* para a biodegradação de benzeno, tolueno e fenol, e investigar a interação desses substratos durante a biodegradação aeróbica em ensaios em batelada. Células adaptadas a benzeno, tolueno e fenol cresceram mais rapidamente do que as células não adaptadas. Para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento celular para um único substrato os autores mediram a concentração celular em função do tempo para concentrações iniciais de substrato que variaram na faixa de 3 a 187,7 mg / L para benzeno, de 2,7 a 160,3 mg / L para tolueno e de 10 a 200 mg / L para fenol. A taxa específica de crescimento (μ) foi calculada na fase exponencial de crescimento usando a equação $\mu = [\ln (X_2 / X_1)] / (t_2 - t_1)$.

O modelo de Haldane $\mu = \mu_{\text{máx}} / ((K_s / S) + 1 + (S / K_i))$ foi usado para determinar para um único substrato a taxa máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), a constante de meia saturação de Monod (K_s) e a constante de inibição de substrato (K_i). Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos para benzeno, tolueno e fenol foram de 0,62, 0,61 e 0,051 h⁻¹, respectivamente, e indicaram que a bactéria cresce mais rapidamente usando os substratos benzeno e tolueno do que fenol. Os valores de K_s obtidos para benzeno, tolueno e fenol foram de 1,65, 6,47 e 18 mg / L, respectivamente. Portanto o microrganismo teve habilidade de crescer em baixa concentração dos substratos. Os valores de K_i obtidos para benzeno, tolueno e fenol foram de 180, 88 e 430 mg / L, respectivamente, indicando que o efeito de inibição do crescimento da bactéria foi observado em alta faixa de concentração de substrato.

Os autores empregando o modelo cinético de Andrews investigaram a interação entre os parâmetros cinéticos de benzeno, tolueno e fenol em ensaios em batelada usando os três substratos simultaneamente bem como combinações de apenas dois deles, e concluíram que o modelo empregado promoveu uma excelente predição da cinética de crescimento do microrganismo e da interação entre esses substratos. Benzeno e tolueno foram melhor substrato do que fenol para a *Pseudomonas putida*, pois seu crescimento foi mais rápido. O benzeno e tolueno aumentaram a biodegradação de fenol, entretanto o fenol inibiu a biodegradação do benzeno e do tolueno.

REARDON *et al.* (2000) estudaram a cinética de biodegradação dos substratos benzeno, tolueno e fenol e de suas misturas binárias em ensaios em batelada usando *Pseudomonas putida* F1, os ensaios foram feitos com baixas concentrações de substratos (< 50 mg / L) e foi empregado o modelo cinético de Monod para determinação dos parâmetros cinéticos $\mu_{\text{máx}}$ e K_s da bactéria, embora para o fenol tenha sido notado um pequeno grau de inibição pelo substrato. Tolueno e benzeno foram melhor substrato para crescimento da *Pseudomonas* do que fenol, pois resultaram num crescimento mais rápido e tiveram maior coeficiente de rendimento celular. Em ensaios usando misturas binárias os autores concluíram que o tolueno inibiu significativamente a taxa de biodegradação dos outros substratos, o benzeno retardou o consumo de fenol, mas não o de tolueno e o fenol apresentou pouco efeito sobre a biodegradação dos outros substratos. Os parâmetros cinéticos de crescimento obtidos para fenol foram $\mu_{\text{máx}}$ de 0,11 h⁻¹ e K_s de 32 mg / L, para

benzeno foram $\mu_{\text{máx}}$ de $0,73 \text{ h}^{-1}$ e K_s de $0,12 \text{ mg / L}$ e para o tolueno foram $\mu_{\text{máx}}$ de $0,86 \text{ h}^{-1}$ e K_s de $13,8 \text{ mg / L}$. Os autores concluíram que o modelo cinético empregado para obtenção dos parâmetros cinéticos promoveu uma excelente predição da biodegradação para a mistura dos três substratos.

SEKER *et al.* (1997) estudaram a biodegradação de fenol pela cultura pura *Pseudomonas putida* em reator de tanque agitado continuamente, sob condições aeróbicas. O meio nutriente sintético foi constituído de, em mg / L : 375 de K_2HPO_4 ; 420 de KH_2PO_4 ; 244 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 15 de NaCl ; 19,8 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 61,4 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 3,2 de FeCl_2 ; 500 de fenol; 10000 de glicose e 1000 de extrato de levedura. Nos ensaios contínuos o meio nutriente não continha glicose e extrato de levedura, os quais foram empregados apenas no meio nutriente do preparo do inóculo para estimular o crescimento da bactéria. Os autores não empregaram nos ensaios contínuos nenhuma vitamina ou micronutrientes no meio nutriente para estimular o crescimento, pois desejaram obter condições mais próximas de um tratamento de resíduo real. Os autores variaram a taxa de diluição do reator contínuo na faixa de $0,0174$ a $0,278 \text{ h}^{-1}$ e investigaram a região de inibição de crescimento da bactéria ocasionada pela presença de fenol e pela concentração de oxigênio dissolvido no meio. Através da análise dos dados por regressão não linear, empregado para o substrato fenol o modelo cinético de Haldane e para o oxigênio dissolvido o modelo cinético de Monod, os parâmetros cinéticos de crescimento celular para o substrato fenol obtido foram $\mu_{\text{máx}}$ de $0,569 \text{ h}^{-1}$, K_s de $18,5 \text{ mg / L}$, K_i de $99,3 \text{ mg / L}$ e o rendimento ($Y_{M/S}$) de $0,521 \text{ g de microrganismo / g de fenol}$. Para o substrato oxigênio dissolvido foram obtidos a constante de saturação para oxigênio dissolvido (K_o) de $0,048 \text{ mg / L}$ e o rendimento ($Y_{M/O}$) de $0,338 \text{ g microrganismo / g de oxigênio dissolvido}$. Os autores concluíram que os valores encontrados neste estudo se encontram em concordância com os de outros estudos, mas ressaltaram que é difícil comparar os valores de K_o com o de outros trabalhos, pois a composição do meio nutriente sintético, bem como o microrganismo empregado, são diferentes da empregada neste estudo. Ainda concluíram que os parâmetros cinéticos obtidos por ensaio contínuo são mais apropriados para prever aplicações em sistemas contínuos de tratamento de resíduos e reator de biofilme de leito fluidizado, do que aqueles obtidos por ensaio em batelada.

D'ADAMO *et al.* (1984) analisaram os dados de crescimento microbiano em fontes de carbono inibitórias como o fenol. Os autores testaram cinco modelos cinéticos para crescimento microbiano que relacionaram a taxa de crescimento específica (μ) com a concentração de substrato (S) e assim obtiveram os parâmetros cinéticos μ_{\max} , K_i e K_s . Os métodos gráficos, tais como, Lineweaver – Burk frequentemente usados para ajuste de dados de crescimento microbiano que seguem o modelo de Monod não puderam ser empregados para substratos inibitórios, pois somente uma parte da curva pode ser linearizada, então não foi possível a obtenção das constantes cinéticas μ e K_s . Para o caso específico do substrato tóxico fenol a equação de Haldane promoveu um ajuste adequado do gráfico μ versus S para o crescimento microbiano sobre fenol em culturas puras (YANG & HUMPHREY, 1975) e culturas mistas (PAWLOWSKY & HOWELL, 1973).

Técnicas de regressão não linear dos mínimos quadrados foram empregadas por vários pesquisadores para o ajuste dos dados de crescimento celular sobre substrato tóxico para obter a estimativa dos parâmetros cinéticos, mas esse método mostrou-se sensível ao chute inicial dos valores das constantes cinéticas, então neste trabalho os autores criaram um programa para executar a regressão não linear dos mínimos quadrados, mas que possuiu uma rotina para permitir o chute inicial dos valores das constantes cinéticas somente se ele estivesse dentro de uma faixa de valores pré-fixados. Para testar o programa os autores fizeram ensaios em batelada de biodegradação de fenol por uma cultura mista, isolada de estação de tratamento de resíduos municipal. A média dos valores dos parâmetros cinéticos obtidos do ajuste dos dados usando os cinco modelos testados foram comparados com os valores encontrados na literatura em ensaios similares, que empregaram o modelo de Haldane para ajustar os dados experimentais. PAWLOWSKY & HOWELL em 1973 reportaram valores médios de μ_{\max} , K_i e K_s de $0,26 \text{ h}^{-1}$; $25,4 \text{ mg / L}$ e 173 mg / L , respectivamente. Enquanto, neste trabalho, os autores obtiveram valores de $0,224 \text{ h}^{-1}$; 131 mg / L e 547 mg / L , respectivamente. Os autores atribuíram a diferença entre os valores das constantes cinéticas dos trabalhos a alteração predominantemente da espécie microbiana empregada (D'ADAMO *et al.*, 1984).

BASTOS *et al.* em 2000 isolaram dois microorganismos de solo amazônico e os identificaram como sendo *Candida tropicalis* e *Acaligenes faecalis*, os quais foram capazes de degradar fenol nas concentrações de 1600 e 1200 mg / L , respectivamente, em meio

nutriente sintético contendo alta concentração salina, 15 % e 5,6 %, respectivamente. Os microrganismos clivaram a molécula de fenol na posição orto e secretaram ao meio as enzimas extracelulares hidroxilase e catecol 1,2 – dioxigenase. O nível de degradação de fenol por esses microrganismos foram comparáveis àqueles descritos na literatura para microrganismos isolados de locais contaminados com fenol. Portanto, os autores concluíram que em ambientes naturais, não contaminados, possuem uma diversidade microbiana suficientemente grande e propícia para o isolamento de microrganismos com potencial para degradação de fenol.

PACÁ *et al.* (2002) estudaram o efeito da taxa de fornecimento de oxigênio e a presença de nutrientes essenciais na biodegradação de fenol por *Candida tropicalis*. O meio nutriente empregado foi constituído por (em g / L): YNB 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5; NaCl 0,1; L-metionina 0,004; L-triptofano 0,004 e L-histidina 0,002. Fenol foi usado como única fonte de carbono e energia. A partir de ensaios em batelada alimentada de biodegradação de fenol feitos a 28 °C e pH 5,2 com oxigênio dissolvido em excesso foi calculado pelo método dinâmico o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (Kla) de 340 h⁻¹, e estimados através de ajuste polinomial de ordem n, dos dados experimentais, a taxa máxima específica de degradação de fenol ($q_{s\text{máx}}$) de 2,6 mmol / g h, a constante de saturação (Ks) de 4,6 mg / L e a constante de inibição (Ki) maior de 500 mg / L. Em ensaios feitos em batelada em frascos de Erlenmeyer sob a mesma temperatura e pH dos anteriores, mas com limitação de oxigênio os parâmetros cinéticos obtidos foram: Kla de 12 h⁻¹, $q_{s\text{máx}}$ de 1,2 mmol / g h, Ks de 14,9 mg / L e Ki de 376 mg / L. O excesso de oxigênio dissolvido aumentou a afinidade das células de levedura com o fenol e diminuiu a sensibilidade das células em relação à inibição ocasionada pelo fenol, fatos observados pela comparação dos valores de Ks e Ki obtidos com excesso e limitação de oxigênio, respectivamente. Em ensaios feitos em reator com excesso de oxigênio Kla de 340 h⁻¹ os autores verificaram que adicionando íons de amônia não foi afetado o valor da taxa específica de degradação de fenol (qs), enquanto que suplementando o meio com íons de fosfato, potássio, sódio e outros nutrientes resultou num aumento do valor de qs. Entretanto a presença de nutrientes não alterou o valor de Ks. Os autores concluíram que a taxa específica de degradação de fenol foi significativamente afetada pela taxa de fornecimento

de oxigênio, e o excesso de oxigênio dissolvido resultou não apenas em alto valor de q_s , mas aumentou a resistência das células ao fenol.

GODJEVARGOVA *et al.* (2003) estudaram a habilidade da levedura *Trichosporon cutaneum* crescer utilizando os compostos tóxicos fenol, acetofenol, acetona, metilestireno, ácido benzóico, dimetil-fenil-carbinol, metanol e isopropilbenzeno como única fonte de carbono e energia. Os autores prepararam água residuária sintética contendo todos os contaminantes listados acima, pois em esses compostos foram encontrados em águas residuárias de indústrias produtoras de fenol e refinarias de petróleo, e também água residuária proveniente de indústria produtora de fenol. Todos os ensaios foram feitos em frascos de Erlenmeyer a 220 rpm e 28 °C, ou 30 °C para o caso de células imobilizadas em grânulos de poliamida. Nos ensaios feitos empregando cada um dos compostos tóxicos separadamente com concentração de 500 mg / L, excetuando-se o composto isopropilbenzeno (200 mg / L), os autores observaram a maior fase lag para os compostos altamente tóxicos isopropilbenzeno, acetofenol e dimetil-fenil-carbinol, e esses compostos apresentaram menor quantidade acumulada de biomassa em 24 h e não foi atingida sua completa biodegradação, enquanto os outros compostos tiveram completa biodegradação em 24 h. Nos ensaios feitos empregando um meio multicomponente sintético com todos os compostos tóxicos listados anteriormente, cada um na concentração de 100 mg / L, excetuando-se o isopropilbenzeno que não foi adicionado, os autores verificaram que o grau de biodegradação dos diferentes compostos da solução multicomponente permaneceu similar ao obtido com um único componente, os compostos acetofenol e dimetil-fenil-carbinol, metilestireno e ácido benzóico requereram maior tempo para biodegradação, enquanto os demais componentes da mistura foram degradados em 24 h. Os autores fizeram experimentos utilizando água residuária proveniente de uma estação de tratamento de resíduos de uma indústria produtora de fenol, que após passar por uma coluna de troca aniônica apresentou em sua composição fenol, acetona, dimetil-fenil-carbinol e ácido benzóico em concentrações inferiores as empregadas nos ensaios anteriores. Os resultados mostraram que a levedura cresceu lentamente em relação aos resultados obtidos para meios de cultivo contendo apenas cada um dos compostos tóxicos, o sistema com células imobilizadas apresentou maior taxa de degradação de fenol e ácido benzóico (40 %) do que o sistema com células livres (20 %). Para o componente acetona a taxa de biodegradação foi

de, aproximadamente, 50 % tanto para o sistema com células imobilizadas quanto livres. Os autores concluíram que *Trichosporon cutaneum* foi capaz de crescer e degradar uma ampla faixa de contaminantes tóxicos presentes em águas residuárias sintética e de indústria produtora de fenol, e a degradação de cada componente ocorreu em diferente extensão e período de tempo.

DUARTE-VAZQUEZ e colaboradores em 2002 estudaram modelos para remoção de compostos fenólicos (fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol, o-cresol, m-cresol, 2,4-diclorofenol, bisfenol) de solução aquosa por polimerização, através de reações enzimáticas usando peroxidase extraída de nabo. O mecanismo de ação das peroxidases envolvem enzimas intermediárias, inicialmente a enzima contendo ferro nativo sofre oxidação pela ação de peróxido de hidrogênio, permitindo a formação do composto porfirina contendo o radical Fe^{+4} . Um substrato doador de elétrons (compostos fenólicos) reduz o composto porfirina deixando-o com a mesma estrutura, mas protonado, liberando um radical livre. Após outra redução e formação de um outro radical livre a enzima volta a seu estado nativo. Os autores trabalharam com concentração de peróxido de hidrogênio na faixa de 17 a 122 mg / L, de fenol de 52 a 127 mg / L e de polietileno glicol (PEG) de 50 a 200 mg / L. Pelo menos 85 % dos compostos fenólicos estudados foram removidos na faixa de pH de 4 a 8, os melhores resultados foram obtidos entre pH 5 e 7 para todos os compostos fenólicos. Mais que 90 % dos compostos fenólicos foram removidos usando 30 mg / L de peróxido de hidrogênio. Estes resultados encontram-se de acordo como os obtidos usando-se peroxidase de rábano silvestre (raiz forte) e peroxidase de semente de soja. A máxima remoção de fenol foi obtida usando a taxa molar de peróxido de hidrogênio / fenol de 1,6. Abaixo desta taxa molar a eficiência de remoção de fenol foi limitada pela concentração de peróxido de hidrogênio. Para todos os compostos fenólicos testados, excetuando-se o 2,4-diclorofenol, baixa eficiência de remoção foi observada quando sua concentração foi aumentada. Na máxima concentração testada de 127 mg / L a eficiência de remoção de compostos fenólicos foi de 63 %. Isto indica inibição enzimática pelo substrato. A adição de PEG melhorou a eficiência de remoção de bisfenol, 3-clorofenol e m-cresol, sendo que a adição de 50 mg de PEG / L produziu 99 % de remoção destes compostos. O PEG exerceu um significativo efeito protetor para a peroxidase de nabo, observado pelo aumento de sua atividade residual, e também reduziu para 10 minutos o tempo de reação requerido para

atingir 95 % de remoção destes compostos fenólicos. Os autores concluíram que a peroxidase de nabo foi capaz de catalisar a polimerização e precipitação dos compostos fenólicos investigados em água residuária sintética, mas ressaltaram que serão necessários novos estudos para propor uma metodologia para determinar a toxicidade dos produtos de reação solúveis depois que a peroxidase de nabo catalisar a polimerização dos contaminantes fenólicos.

Peroxidase de raiz forte (HRP) utiliza peróxido de hidrogênio para oxidar muitos compostos fenólicos e aminas aromáticas em seus correspondentes radicais. Em reações subseqüentes estes compostos combinam-se para formar polímeros, os quais podem ser removidos do meio aquoso por precipitação e coagulação, seguido por filtração ou sedimentação. Este processo ainda pode arrastar compostos que não são substratos para a enzima, fenômeno esse conhecido por co-precipitação. A enzima normalmente é inativada pelos produtos da reação, no entanto o tempo de ação catalítica da enzima pode ser estendido substancialmente na presença de polímeros hidrofílicos com alto peso molecular como polietileno glicol ou quitosana. Muitas investigações para degradação enzimática de compostos fenólicos foram conduzidas usando água residuária sintética composta com uma única fonte de fenol, o que não reflete as condições reais de um efluente industrial, que possui uma variedade de compostos tóxicos que interferirão com o processo de tratamento enzimático e assim limitarão sua aplicação prática (WAGNER & NICELL, 2001).

WAGNER & NICELL em 2001 investigaram o tratamento de água residuária sintética de refinaria de petróleo usando peroxidase de raiz forte (HRP) e peróxido de hidrogênio. Os experimentos em batelada foram conduzidos para minimizar a quantidade de HRP e peróxido de hidrogênio requerido para atingir concentração de fenol, após o tratamento, de 1,27 mg / L, pois este é o valor limite imposto pelas autoridades neste caso particular de refinaria de petróleo. A concentração de HRP sempre esteve em excesso (7 UI / mL) para assegurar que a quantidade de fenol removida seria apenas limitada pelo peróxido de hidrogênio disponível. Inicialmente frascos com 15 mL de água residuária com concentração de compostos fenólicos de 44,6 mg / L ou 33,2 mg / L receberam alíquotas de peróxido de hidrogênio e foram incubados a 20 °C sob agitação nos primeiros 15 minutos. Após 12 horas de reação foi removido os produtos coloidais coloridos da solução por coagulação com 55 mg / L de $AL_2(SO_4)_3$ e centrifugação. O sobrenadante obtido foi

utilizado para análise de fenol. Os resultados dos ensaios em batelada mostraram a razão estequiométrica de 1,14 e 1,24 mol de peróxido de hidrogênio por mol de compostos fenólicos quando as concentrações iniciais de fenol nas amostras foram de 44,6 e 33,2 mg / L, respectivamente. Estes valores encontram-se próximos da relação estequiométrica 1:1 encontrada para tratamento de diversos compostos fenólicos de água residuária sintética. Em ambas as amostras a quantidade de peróxido de hidrogênio requerida para atingir a concentração de fenol no efluente inferior a 1,27 mg / L foi de 20,4 mg / L, e a mínima dose de enzima requerida foi de 2,2 UI / mL e 1,6 UI / mL, respectivamente. As amostras foram filtradas antes dos ensaios, pois os sólidos suspensos catalisavam a decomposição de peróxido de hidrogênio em água mais oxigênio. Os autores concluíram que o tratamento enzimático reduziu a concentração total de fenol a valores abaixo do limite de descarga permitido, houve 98 % e 78 % de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica de oxigênio (DBO), respectivamente. A adição de polietileno glicol e chitosana protegeram a enzima da inativação resultando numa diminuição do requerimento de enzima de 4 a 25 vezes, respectivamente. Os substratos fenólicos foram polimerizados em substâncias menos biodegradáveis e removidos da água residuária por coagulação. A presença de diferentes hidrocarbonetos na água residuária, que são tipicamente encontrados em águas residuárias de refinaria de petróleo, não prejudicaram a remoção de fenol pelo método enzimático.

Os métodos para remoção de fenol de águas residuárias são extração por solventes, degradação microbiológica, adsorção sobre carvão ativo e oxidação química. O método de extração por solvente é caro. Adsorção e tratamento por oxidação tornam-se muito caros quando muita baixa concentração de fenol no efluente precisa ser atingida. O tratamento biológico é muito promissor, mas para pequenas quantidades de resíduos gerados de forma descontínua o tratamento biológico tem sido ineficiente devido à instabilidade causada pela toxicidade destes compostos na população microbiana. Portanto uma alternativa tecnológica que tem sido explorada é o tratamento por enzimas, que possui a vantagem da especificidade das enzimas para com seus substratos. Entretanto as enzimas podem ser facilmente inativadas, aumentando o dramaticamente o custo do processo enzimático de remoção de fenol. A estabilidade da enzima pode ser aumentada pela sua imobilização ou pela sua incorporação em solventes orgânicos (SEETHARAM & SAVILLE, 2003).

SEETHARAM & SAVILLE em 2003 estudaram a degradação de fenol de água residuária sintética por tironase imobilizada em aluminossilicato de sódio modificado quimicamente (NaA), em aluminossilicato de cálcio (CaA) e em sílica gel. A tironase é uma enzima disponível para o tratamento de resíduos fenólicos que catalisa duas reações consecutivas, a primeira é a oxidação dos monofenóis com oxigênio molecular em presença de um agente redutor (AH_2) para formar orto-fenóis. A segunda reação catalisada pela enzima é a desidrogenação dos orto-fenóis com oxigênio molecular formando orto-quinonas, os quais sofrem reações não enzimáticas transformando-se em compostos intermediários que lentamente sofrem reação de polimerização formando compostos insolúveis de polifenóis de alto peso molecular. Os autores conduziram experimentos em batelada repetida para investigar a estabilidade da enzima imobilizada e a cinética de remoção de fenol. A solução residuária foi preparada dissolvendo-se fenol em solução tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH entre 6,8 e 8,0. Nos experimentos feitos com 400 UI de tirosinase imobilizada sobre CaA, com concentração inicial de fenol de 400 mg / L e pH 8 foi observado que após o primeiro ensaio em batelada de 50 minutos 12,5 % do fenol presente foi removido, após a 4ª batelada consecutiva atingiu-se 19 % de remoção de fenol. Em ensaios com 800 UI de tirosinase imobilizada em CaA em pH 8 e concentração inicial de fenol de 100 mg / L obteve-se, após as 4 bateladas consecutivas, a remoção de 25 % do fenol presente inicialmente. Resultados semelhantes foram obtidos para o suporte NaA. Os autores notaram que a reação enzimática ocorreu nos primeiros 20 minutos e a enzima sofreu inibição pelos compostos quinonas que são intermediários do produto formado. Para reduzir o efeito da inibição enzimática foi aumentada a concentração da enzima ativa e reduzida à concentração do inibidor, o que ocorreu com o ajuste de pH, em pH 8 a quinona é rapidamente removida sendo polimerizada, mas o pH ótimo da enzima ocorreu em 6,5. Os autores determinaram que a enzima imobilizada em NaA e CaA teve melhor performance em pH 6,8, mas esses suportes em pH fracamente ácido sofreram hidrólise, então os autores empregaram sílica gel para imobilizar a enzima e obtiveram seus melhores resultados em ensaios em batelada repetida, com duração de 24 h cada batelada, concentração de enzima de 2000 UI e concentração inicial de fenol de 100 mg / L. Após o tempo de reação de 6 horas foi obtido 15 % de remoção de fenol, após 24 horas foi obtido 37 % de remoção de fenol e após a terceira batelada consecutiva foi obtido 58 % de

remoção de fenol. Os autores concluíram que a enzima tirosinase imobilizada sobre os suportes de sílica foi capaz de remover entre 15 e 60 % de fenol, dependendo da concentração inicial de fenol, atividade inicial da enzima imobilizada, pH da solução de fenol, e tempo de duração da reação.

GIANFREDA e colaboradores em 2003 investigaram a remoção dos compostos fenólicos catecol, hidroxitirosol, m-tirosol e metilcatecol de água residuária sintética através da enzima lacase (polifenol oxidase) obtida da árvore *Rhus vernificera*. Esta enzima é uma glicoproteína que contém geralmente quatro íons de cobre com importante função no mecanismo catalítico e possui ampla especificidade para compostos aromáticos contendo grupos hidroxilas e aminas. Atua oxidando compostos fenólicos pela abstração de um elétron com formação de um radical que pode repolimerizar, assim ocorre a formação de compostos poucos solúveis de alto peso molecular, que podem ser facilmente removidos da solução aquosa por sedimentação ou filtração. Os compostos fenólicos estudados são geralmente os principais constituintes da água residuária de processo produtor de óleo de oliva. A atividade da lacase foi medida utilizando o corante ABTS como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para transformar um micromol de ABTS por minuto a 25 °C e pH 3,65. Foram feitos ensaios em batelada em frascos de 25 mL com concentração final dos compostos fenólicos de 29,4 mg / L em solução tampão citrato/fosfato 100 mM e pH 5,0 na presença de 3 U de lacase, a 25 °C. Amostras foram retiradas em função do tempo de incubação para análise da concentração dos compostos fenólicos e da atividade enzimática residual. Nos ensaios para remoção dos compostos fenólicos individuais foi obtido que catecol, hidroxitirosol tiveram comportamento semelhante, após 1 h de incubação 58 e 56 % do catecol e do hidroxitirosol foram removidos, respectivamente. Após 2 h de incubação 72 e 65 % destes compostos haviam sido removidos, respectivamente. Já o composto m-tirosol foi removido progressivamente até atingir 30 % de remoção após 24 h de incubação. O composto metilcatecol teve um comportamento diferente, 32 % foi oxidado após 1h de incubação, depois de 18 h de incubação 54 % do composto havia sido oxidado e a remoção completa foi observada após 24 de incubação. Quando se aumentou a quantidade de enzima utilizada houve um aumento na transformação dos compostos fenólicos investigados. Os autores também verificaram que a procedência da enzima influenciou na taxa de remoção dos

compostos fenólicos, quando se empregou lacase proveniente do fungo *Cerrena unicolor* todo o catecol foi oxidado em 8 h de incubação. A atividade da lacase diminuiu enquanto os compostos eram transformados, mas não foi evidenciada nenhuma correspondência quantitativa entre a remoção do composto fenólico e a quantidade da enzima inativada, o que sugere a existência de diferentes mecanismos envolvidos na transformação catalisada pela enzima para os quatro compostos investigados. Uma explicação para esses resultados é que moléculas de enzima ativa são imobilizadas, ligadas ou adsorvidas com os produtos formados na transformação dos compostos fenólicos, o que ocasionaria sua perda de atividade total ou parcial. Durante a remoção de cerca de 50 % dos compostos catecol e hidroxitiroso, aproximadamente 38 % da enzima perdeu atividade. Mas apenas 20 % da enzima permaneceu ativa após a remoção de 32 % da concentração inicial de metilcatecol. Para a mistura quaternária dos compostos fenólicos foi obtido, após 24 h de incubação, 63, 9, 8 e 17 % de transformação dos compostos catecol, metilcatecol, m-tiroso e hidroxitiroso, respectivamente e a atividade enzimática remanescente foi de 11 %. Os autores concluíram que os quatro compostos fenólicos podem ser transformados pela enzima quando incubados sozinhos ou em misturas, e uma grande diminuição da atividade enzimática ocorreu quando uma quantidade significativa de remoção ocorreu. Estes resultados foram considerados encorajadores para a possibilidade de empregar lacase como um agente de remediação para tratamento de misturas complexas de compostos fenólicos. Entretanto, a perda de atividade da enzima ainda constitui um entrave para o uso efetivo do catalisador em grande escala.

FALCONI em 1998 estudou a degradação de lignina e poluentes tóxicos altamente recalcitrantes como fenol, ácido tânico e ácido lignossulfônico por fungos basidiomicetos de degradação branca que apresentaram mecanismos enzimáticos não específico a um único substrato. Neste trabalho foram empregados duas linhagens fúngicas (898 e 897) não identificadas e o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, os quais foram crescidos em frascos de Erlenmeyer com meio nutriente sintético sob diferentes condições de cultivo (com e sem agitação, com e sem oxigenação e com e sem adição de glicose). A autora mediu a atividade das enzimas lignolíticas lacase, peroxidase, lignina peroxidase, manganês peroxidase e álcool veratrílico peroxidase, e a porcentagem de remoção dos compostos tóxicos, e ainda, a remoção de DQO, após 3, 7 e 10 dias de cultivo. Os resultados revelaram

que o melhor meio para produção enzimática foi aquele contendo 5000 mg / L de composto tóxico em condição estacionária, sem oxigenação e suplementado com 0,5 % de glicose. Dentre as linhagens estudadas a 898 apresentou as mais altas taxas de degradação dos compostos e redução de DQO. A linhagem 897 produziu alta atividade enzimática, entretanto apresentou redução de DQO inferior que a linhagem 898, nas mesmas condições de cultivo. O fungo, *Phanerochaete chrysosporium*, quando crescido nas mesmas condições que as outras duas linhagens produziu menor quantidade de enzimas e apresentou uma menor degradação dos compostos tóxicos que as outras duas linhagens.

GALLEGO *et al.* (2003) investigaram a degradação de compostos fenólicos de uma solução residuária sintética contendo fenol, m-cresol e 2-clorofenol, por culturas puras e mistas de *Alcaligenes sp.* e *Acinetobacter sp.* Primeiramente os autores fizeram ensaios em batelada em um microfermentador de 1,3 L de volume útil, a 28 °C, com controle de oxigênio dissolvido, pH e agitação. Empregando a cultura pura *Alcaligenes sp.* e o composto 2-clorofenol (100 mg / L) após 27 h de fermentação foi obtido 99,5 % de remoção do composto e a taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,19 h⁻¹. Quando se utilizou fenol (50 mg / L) como única fonte de carbono a cultura *Alcaligenes sp.* metabolizou 99,5 % do composto em 20 h. Em ensaios com m-cresol como única fonte de carbono esta cultura degradou em 8 h todo o composto e a taxa específica de crescimento foi de 0,48 h⁻¹. Quando foi empregada a cultura pura *Acinetobacter sp.* e como única fonte de carbono fenol (50 mg / L) obteve-se 99,5 % de remoção de fenol após 11 h e a taxa específica de crescimento foi de 0,36 h⁻¹. Em ensaios em batelada com a cultura mista e os três compostos fenólicos juntos as taxas de degradação dos compostos fenol (50 mg / L), m-cresol (50 mg / L) e 2-clorofenol (100 mg / L) foram similares àquelas observadas para a bactéria pura, o que demonstrou que a presença de outros microrganismos não afetou o processo individual de degradação. Todos os compostos fenólicos foram degradados em 38 h de fermentação, com eficiência de remoção de 99,8 %. A cultura mista obtida de ensaios em batelada foi imobilizada em carvão ativado e empregada no reator de leito fluidizado de 6 L de volume útil, que operou continuamente por 6 meses com tempo de detenção hidráulica de 24 h, vazão de afluente de 0,23 L / h e vazão de reciclo de 240 L / h. O afluente possuía a mistura dos compostos fenol, m-cresol e 2-clorofenol na concentração de 50, 50 e 100 mg / L, respectivamente e nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio na

proporção de 20:2:6. Durante a operação do reator os fenóis totais e a demanda química de oxigênio sofreram redução de 99,8 % e 94,9 %, respectivamente. Os autores observaram que outras bactérias cresceram no interior do reator, mas que elas não se mostraram capazes de degradar compostos fenólicos em testes feitos em batelada. Também foram encontradas durante o funcionamento do reator algas como *Chlorophita sp*, *Naviculla sp* e *Pinularia sp* e diversos protozoários. A biomassa de microrganismos degradadores dos compostos fenólicos permaneceu praticamente constante na fase aquosa do reator e seu desenvolvimento foi a partir do inóculo inicial introduzido no reator junto com o suporte, não foi necessária a introdução de uma nova carga de microrganismo durante os seis meses de operação do reator.

QUAN *et al.* (2003) estudaram a biodegradação de fenol e 2,4-diclorofenol em reator “air lift” com células de *Achromobacter sp* imobilizadas sobre cerâmica. O reator possuía volume útil de 15 L e foi operado de forma descontínua (batelada alimentada) durante 8 dias e também de forma contínua por 30 dias. A taxa de aeração empregada foi de 8,3 L / min e inicialmente foi imobilizada 1,3 kg de células no suporte. Primeiramente o reator foi operado de forma contínua por 8 dias com apenas 2,4-diclorofenol 25 mg / L como fonte de carbono na água residuária sintética e a eficiência de remoção manteve-se por volta de 98 %. Em seguida o reator foi operado como batelada alimentada por quatro corridas consecutivas de 48 h de duração cada, com fenol e 2,4-diclorofenol no afluente, a concentração de fenol no afluente variou entre 100 e 400 mg / L e a de 2,4-diclorofenol permaneceu constante em 25 mg / L. Na primeira corrida a produtividade volumétrica de remoção de 2,4-diclorofenol foi de 2,6 mg / L h, já nas três corridas seguintes foi de 1,9; 1,1 e 1,4 mg / L h. O 2,4-diclorofenol foi consumido primeiro do que o fenol que teve fase lag de, aproximadamente, 9 h. A eficiência de remoção de ambos os compostos foi de 100 %, exceto para o fenol na 1ª batelada alimentada que foi de 40 %. No ensaio contínuo a concentração de fenol variou entre 100 e 200 mg / L e a de 2,4-diclorofenol entre 8 e 12 mg / L. A produtividade volumétrica de remoção de 2,4-diclorofenol e fenol nos dois primeiros dias de operação do reator foi de 1,2 e 13,6 mg / L h, respectivamente. Para os últimos cinco dias de operação do reator foram obtidos valores de produtividade volumétrica de remoção de 2,4-diclorofenol e fenol de 1,2 e 25,1 mg / L h, respectivamente. A eficiência de remoção de 2,4-diclorofenol declinou para 88 % quando a concentração de fenol no

afluente foi aumentada para 200 mg / L. Os autores concluíram que *Achromobacter sp* pode ser facilmente imobilizada em cerâmica, a qual pode ser empregada em reator “air lift” para degradar 2,4-diclorofenol e fenol, sendo necessário manter um certo plano de concentração de fenol no afluente para não diminuir a eficiência de remoção de 2,4-diclorofenol.

2.5 Cinéticas de crescimento microbiano e de inibição por substrato na degradação de fenol.

No caso de crescimento unicelular, a velocidade de crescimento pode ser expressa por uma concentração limitante de substrato, como segue:

$$\frac{dX}{dt} = f(X, S) \quad (1)$$

onde: X = massa de células por unidade de volume;

S = concentração de substrato limitante.

Agora, a velocidade específica de crescimento das células (μ) pode ser definida por:

$$\mu = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dX}{dt} \right) = \frac{d(\ln X)}{dt} \quad (2)$$

A equação 1 é denominada equação exponencial de crescimento.

Monod, em seu estudo de crescimento de bactéria num “chemostat” (cultura contínua), onde a velocidade de crescimento era limitada por um substrato simples, propôs que seus dados se ajustavam à curva tipificada pela Figura 2.2.

Monod observou que os dados se comportavam de maneira tipificada pela equação de Michaelis – Menten, e sugeriu, portanto, a seguinte fórmula para descrever seus dados:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \quad (3)$$

onde: μ_{\max} = velocidade específica máxima de crescimento quando o substrato é limitante;

K_s = a concentração de substrato em que a velocidade específica de crescimento observada é metade do valor máximo; constante de saturação (AIBA, *et al.* 1971).

A relação entre a velocidade específica de crescimento (μ) e a concentração de substrato limitante (S) para um processo de crescimento com substrato tóxico às células, pode ser descrito pelo modelo de Haldane, representado na figura 2.2, onde o termo K_i é a constante de inibição pelo substrato (YANG & HUMPHREY, 1975).

A fórmula do modelo de Haldane é:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (4)$$

Para fermentações com substrato não tóxico, concentrações elevadas de substrato promovem velocidades específicas de crescimento mais altas, aproximando-se assintoticamente da velocidade específica máxima de crescimento μ_{\max} . Já em fermentações com substratos tóxicos, um aumento da concentração de substrato resulta em um aumento na velocidade de crescimento num intervalo mais limitado, acima de uma concentração crítica de substrato, \underline{S} , a toxicidade do substrato às células provoca um decréscimo na velocidade específica de crescimento, \underline{M}_i , esta abaixo da velocidade específica máxima de crescimento para o sistema (Figura 2.2.). Ainda deve-se ressaltar que quando K_i aproxima-se de infinito, a relação de Haldane aproxima-se da relação de Monod.

Em estudos sobre biodegradação de fenol, a equação de Haldane forneceu ajuste adequado para a relação entre μ e S para várias culturas puras (YANG & HUMPHREY, 1975, HILL & HOBINSON, 1975) e também para populações heterogêneas (PAWLOWSKY & HOWELL, 1973).

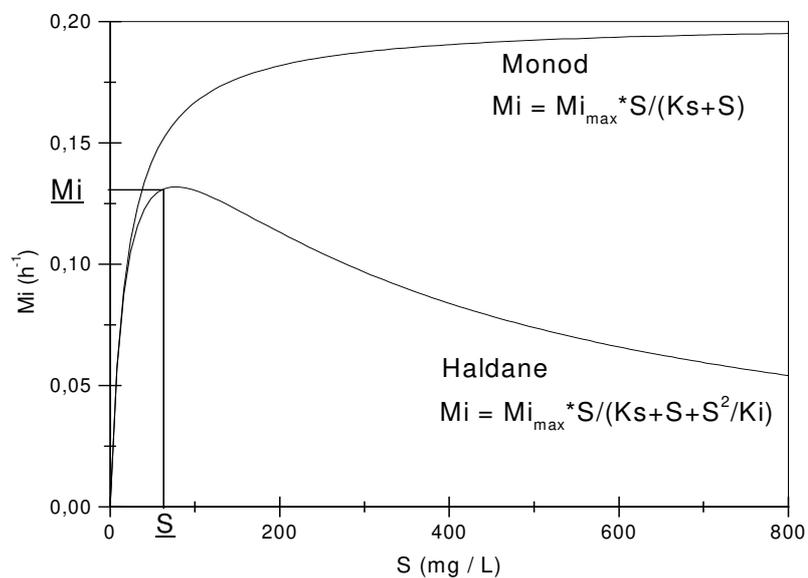


Figura 2.2. Comparação entre as velocidades específicas de crescimento (M_i), e a concentração de substrato (S) para as relações de Monod e de Haldane. Os valores usados para efetuar os cálculos foram: $M_{i_{\max}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 20 \text{ mg / L}$ e $K_i = 300 \text{ mg / L}$.

A Tabela 2.1 apresenta um resumo sobre os parâmetros cinéticos de crescimento de vários microrganismos na degradação de fenol obtidos por diversos pesquisadores.

Tabela 2.1: Valores de parâmetros cinéticos para vários microrganismos na degradação de fenol e pH e temperatura em que os parâmetros foram obtidos.

Microrganismo	Sistema	μ_{\max} (h ⁻¹)	K _s (mg / L)	K _i (mg / L)	pH	T (°C)	Autor
Cultura mista filamentosa	Batelada	0,233	5,9	934,5	6,6	28	Pawlowsky & Howell (1973)
Cultura mista não filamentosa	Batelada		25,4	173	6,6	28	Pawlowsky & Howell (1973)
Cultura mista	Batelada	0,224	131	547	6,9	25	D'ADAMO <i>et al.</i> (1984)
<i>P. putida</i> ATCC 17484	Batelada/ contínuo	0,534	< 1	470	6,5	30	Hill & Hobinson (1975)
<i>Fusarium flocciferum</i>	Batelada		95	345	4,6	30	Anselmo <i>et al.</i> (1989)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Batelada	0,051	18	430	7	30	Abuhamed <i>et al.</i> (2003)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Batelada	0,11	32		6,8	30	Reardon <i>et al.</i> (2000)
<i>Pseudomonas putida</i> NRRL	Contínuo	0,569	18,5	99,3	6,8	25	Seker <i>et al.</i> (1997)
<i>Pseudomonas putida</i> Q5	Batelada	0,119	5,3	377	7	10	Kotturi <i>et al.</i> (1991)
<i>Pseudomonas Putida</i>	Batelada	0,436	54,1		7,0	26	Monteiro <i>et al.</i> (2000)
<i>Trychosporon cutaneum</i>	Contínuo	0,464	1,7	380	4,5	30	Yang & Humphrey (1975)
<i>Pseudomonas putida</i>	Contínuo	0,567	2,4	106	6	30	Yang & Humphrey (1975)
Cultura mista	Contínuo	2,18	0,10				Kryst & Karamanev (2001)

<i>Pseudomonas putida</i>	Contínuo	0,5 a 1,4	0,6 a 1	8,2 a 19,2	6,8	30	Sokol (1987)
<i>Candida tropicalis</i>	Batelada	0,375	0,004	848	5	28	Ordaz <i>et al.</i> (1998).
<i>Candida tropicalis</i>	Batelada alimentada		4,6	> 500	5,2	28	Pacá <i>et al.</i> (2002).
<i>Pseudomonas putida</i> Q5	Batelada	0,119	5,27	377	7,0	10	Kotturi <i>et al.</i> (1991).
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Batelada	0,441	1,22	36,8	7,0	25	Saéz & Rittmann (1993).
<i>Pseudomonas putida</i>	Batelada	0,897	12,2	203,7		28,5	Dikshitulu <i>et al.</i> (1993).
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	Batelada	1	13	117,7		28,5	Dikshitulu <i>et al.</i> (1993).
<i>Candida tropicalis</i>	Batelada	0,22	110	1200	7,0	32,5	Shimizu <i>et al.</i> (1973)
<i>Nocardia sp</i>	Contínuo	0,29	<1	730	6,8	30	Mizobuchi <i>et al.</i> (1980).

ORDAZ *et al.* (1998) elaboraram um modelo cinético de crescimento de *Cândida Tropicalis* que leva em consideração o efeito de inibição do fenol sobre a levedura, e também o efeito de lisi do fenol sobre as células do microorganismo. O meio de cultura empregado nas fermentações em batelada para determinação da taxa máxima específica de crescimento limiar era constituído em grama por litro por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g; KH_2PO_4 , 0,25 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,075 g. O meio foi esterilizado e o fenol foi adicionado após a esterilização na faixa de concentração de 84 a 1800 mg / L. O pH inicial do meio de cultura era 5,0 e as fermentações foram feitas a 28 °C e 54 rpm durante 6 a 10 h.

Para se determinar a atividade lítica do fenol, os autores adicionaram uma amostra da suspensão celular da levedura em diferentes frascos de Erlenmeyer com 100 ml de

solução aquosa com concentrações de fenol variando entre 0 a 4000 mg / L. Os frascos foram incubados a 28 °C, 54 rpm durante 4 h, e amostras foram retiradas periodicamente para medição da biomassa. A respostas deste experimento expresso num gráfico de massa celular na ordenada versus tempo na abscissa, mostrou que a taxa de diminuição da biomassa é exponencial na presença de fenol e diretamente relacionada com a concentração de fenol. As inclinações das retas obtidas são numericamente taxa específica de lisi (K_d), e seu aumento é diretamente proporcional ao aumento da concentração de fenol. Com isso os autores expressaram o efeito lítico do fenol pela equação.

$$\frac{X}{X_0} = \exp\left(\frac{-K_d}{t}\right) \quad (5)$$

onde: X é a concentração de biomassa no tempo (g / L);

X_0 é a concentração inicial de biomassa t = 0 (g / L);

K_d é a taxa específica de lisi (h^{-1}) e

t é o tempo (h).

Os autores testaram três modelos para verificar se eles descreviam a taxa específica de crescimento (μ) e a concentração de fenol quando a cultura de levedura crescia em diferentes concentrações de fenol, mas os modelos testados de Haldane, Andrews e um modelo de inibição não competitiva não produziram ajustes satisfatórios. Segundo os autores não foi possível obter ajustes satisfatórios por causa do efeito lítico do fenol sobre a levedura, então foi proposto um modelo matemático que combinava o efeito lítico do fenol com o efeito de inibição do fenol sobre o crescimento celular. O modelo proposto foi o modelo de Andrews com um segundo termo que é a taxa específica de lisi.

$$\mu = \left(\frac{\mu_{\max}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}} \right) - K_d \quad (6)$$

onde: K_s = constante de saturação de Monod;

K_i = constante de inibição de substrato.

O coeficiente de correlação ao quadrado obtido para este modelo foi de $r^2 = 0,9686$.

Os parâmetros cinéticos obtidos por este modelo, através do ajuste não linear dos mínimos quadrados foram: $\mu_{\max} = 0,375 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 0,0037 \text{ g / L}$; $K_i = 0,848 \text{ g / L}$.

Os autores concluíram que fenol inibiu o crescimento de *Cândida Tropicalis*, mas também causa sua lisi e propuseram um modelo cinético para descrever o crescimento de levedura.

CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LINHAGENS DEGRADADORAS DE FENOL

3.1 Introdução

Esta primeira etapa do trabalho teve como objetivo isolar microrganismos provenientes de amostra de água residuária de indústria química. Em seguida foram selecionadas aquelas linhagens que apresentaram capacidade de degradar fenol em água residuária sintética.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Obtenção de linhagens de microrganismos degradadoras de fenol.

Amostras de água residuária da lagoa de tratamento da Rhodia e de óleo de refrigeração de torno mecânico do Centro de Tecnologia da UNICAMP foram coletadas e levadas ao laboratório, para serem diluídas em água destilada estéril na proporção 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000. Com auxílio de uma alça de Drigausky, foram plaqueadas em ágar nutriente e as colônias isoladas de microrganismos obtidas nas placas foram repicadas em tubo de ensaio com ágar nutriente inclinado e mantidas sob refrigeração, sendo repicadas mensalmente.

3.2.2 Teste de biodegradação de fenol em placas de Petri.

Para verificar a capacidade de crescimento e/ou resistência na presença de fenol, as linhagens de microrganismos isoladas anteriormente foram submetidas ao teste de degradação de fenol em placa de Petri, com meio mineral mínimo (MM) sólido com composição em g / L: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0); $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,001); K_2HPO_4 (0,8); KH_2PO_4 (0,2); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,005), ágar (15,0) e fenol (0,5). A concentração de fenol de 0,05 % foi atingida com adição de solução de fenol, depois da esterilização do meio, quando o mesmo ainda estava líquido. Após receberem as culturas de microrganismos, as placas foram fechadas com filme protetor “Parafilm”, para evitar contaminação durante os cinco dias de incubação em estufa a 30 °C. Para este ensaio, houve dois tipos de controle: placas contendo o meio MM sólido modificado, sem fenol, inoculado com as linhagens de microrganismo e placas contendo o meio MM sólido, sem receberem linhagem de microrganismos (MARIUZZO, 2000). Após o período de incubação das placas, as colônias de microrganismos obtidas foram repicadas

em tubos de ensaio contendo meio MM sólido inclinado. Os tubos foram incubados a 30 °C por 48 a 72 horas e em seguida levados à geladeira. Mensalmente, essas colônias eram repicadas em novos tubos de ensaio com meio MM sólido inclinado.

3.2.3 Obtenção de linhagens de microrganismos degradadoras de fenol pelo método de enriquecimento seletivo.

Através do método de enriquecimento seletivo, foram isoladas linhagens de microrganismos com capacidade de biodegradar fenol das amostras de água residuária da lagoa de tratamento de resíduos da Rhodía e de óleo de refrigeração de torno mecânico do Centro de Tecnologia da UNICAMP.

O meio mineral líquido JE (g / L de água destilada): K_2HPO_4 (2,0); NH_4NO_3 (0,5); NaCl (0,1); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1) e $FeCl_3$ (0,01) (JONES & EDINGTON, 1968) e o meio caldo nutriente líquido CN foram utilizados para o cultivo dos microrganismos, ambos contendo as concentrações iniciais de fenol de 0,01 e 0,1 % como única fonte de carbono. O fenol diluído em água destilada estéril foi adicionado após a esterilização dos meios líquidos JE e CN.

Amostra de água residuária de 2 mL foi adicionada em 20 mL dos meios mineral JE e CN em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo as concentrações de fenol de 0,01 e 0,1 %. Os frascos foram levados para incubadora a 30 °C sob agitação constante de 150 rpm por 5 dias. Após esse período de incubação, foram transferidas alíquotas de 1 mL da cultura do meio mineral JE e CN para novo meio mineral líquido JE (20 mL) e meio CN (20 mL), respectivamente, com a mesma concentração de fenol utilizada anteriormente. Os frascos foram incubados novamente sob as mesmas condições anteriores. Esse processo foi repetido por mais cinco vezes, quando então se aumentou a concentração de fenol dos frascos de 0,01 % para 0,05 % e de 0,1 % para 0,5 %. Os frascos foram incubados sob as mesmas condições anteriores e novamente esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes. Ao final do último ciclo de fermentação, foram adicionados 0,1 mL do meio de cultura dos frascos em placas de Petri contendo meio mineral mínimo (MM) sólido, para execução do teste de degradação de fenol em placas de Petri.

3.2.4 Teste de biodegradação de fenol em meio líquido.

As colônias de microrganismos obtidas pelo teste de degradação de fenol em placas de Petri foram submetidas ao teste de biodegradação de fenol em meio líquido.

O meio de cultura sintético utilizado no teste de biodegradação de fenol em meio líquido foi preparado misturando-se, assepticamente, partes iguais das soluções A e B (Tabelas 3.1 e 3.2.), sendo que ambas as soluções foram esterilizadas a 121 °C por 15 minutos, separadamente, para evitar precipitação de íons de magnésio e cálcio. A fonte de carbono deste meio de cultura foi fenol, o qual foi acrescentando ao meio antes de seu uso, até atingir a concentração desejada. A fermentação foi executada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com aproximadamente 120 mL de meio de cultura sintético, a 30 °C, com ou sem agitação de 150 rotações por minuto, após os frascos receberem uma alçada de microrganismos provenientes das culturas em tubos de ensaio com meio MM inclinado (YANG & HUMPHREY, 1975, modificado).

Tabela 3.1. Composição da solução A.

Componente	Quantidade em 500 mL
KH ₂ PO ₄	1,6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
KI	0,01 g
Vitaminas	16 mL
Elementos traços	1 mL

Tabela 3.2. Composição da solução B.

Componente	Quantidade em 500 mL
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ . H ₂ O	0,3

Tabela 3.3. Composição da solução de elementos traços adicionada na solução A.

Componente	Concentração (g/L)
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,1
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,04
MnSO ₄ . 7H ₂ O	0,04
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,045
FeSO ₄ . H ₂ O	0,025

Tabela 3.4. Composição da solução de vitaminas adicionada na solução A.

Componente	Concentração (mg/L)
Pantotenato de cálcio	200
Tiamina	40
Piridoxina	40
Ácido nicotínico	40
Biotina	0,2

3.3. Resultados e Discussão.

Dos testes de biodegradação de fenol em placas de Petri foram obtidas 30 linhagens de microrganismos que apresentaram crescimento em meio mineral sólido (MM) com fenol como única fonte de carbono. Dessas linhagens, foram feitas micrografias em microscópio óptico com ampliação de 1000 vezes e constatou-se que algumas linhagens eram bactérias Gram negativas, leveduras e fungos.

Todas as linhagens de microrganismos que tiveram resultado positivo no teste de biodegradação de fenol em placa de Petri, foram empregadas no teste de biodegradação de fenol em meio líquido, com concentração de 200 ppm de fenol e agitação de 150 rpm. A resposta foi positiva para 13 linhagens de microrganismos, que degradaram totalmente o fenol presente no meio após um dia de fermentação. Essas linhagens foram submetidas a um novo teste de biodegradação de fenol em meio líquido, mas com concentração inicial de

fenol de 1000 ppm, e para uma linhagem foi obtida resposta positiva, ou seja, degradou totalmente o fenol presente em dois dias de fermentação. Essa linhagem era uma levedura filamentosa (Figuras 3.1 e 3.2) e foi empregada no ensaio contínuo de degradação de fenol.



Figura 3.1. Levedura filamentosa, ampliação de 400 vezes.



Figura 3.2 Levedura filamentosa, ampliação de 1000 vezes.

3.3.1 Identificação do microrganismo.

A levedura filamentosa isolada anteriormente foi enviada para a Fundação André Tosello, onde foi identificada pelo método de taxonomia clássica convencional como sendo *Candida parapsilopsis*.

3.3.2 Cultivo sob condições microaeróbia e anaeróbia.

A levedura *Candida parapsilopsis* foi repicada em meio ágar nutriente em placas de Petri e incubada a 30 °C em recipiente hermeticamente fechado contendo uma placa de Microaerobacter (PROBAC) para manter o ambiente de microaerobiose (5-15 % de oxigênio e 10 % de gás carbônico). Após um dia de incubação, foi observado crescimento da levedura nas placas, concluindo-se que a levedura cresceu em ambiente de microaerobiose.

Em seguida, a levedura foi novamente repicada em meio ágar nutriente em placas de Petri e incubada a 30 °C em recipiente hermeticamente fechado contendo uma placa de Anaerobacter (PROBAC), na qual foram adicionado 20 mL de água destilada para iniciar a reação de oxido-redução e proporcionar um ambiente de 9 a 13 % de gás carbônico e ausência de oxigênio. Com dois dias de incubação, foi verificado crescimento da levedura nas placas, portanto a levedura *Candida parapsilopsis* cresceu em ambiente anaeróbio.

CAPÍTULO 4

OBTENÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DA LEVEDURA DEGRADADORA DE FENOL

4.1 Introdução

O crescimento microbiano é normalmente caracterizado por dois parâmetros: a velocidade específica de crescimento (μ) e o tempo de duplicação celular (t_d).

O tempo de duplicação celular expressa o intervalo de tempo decorrido até que ocorra a duplicação do número de células (ou da massa celular, conforme o método de medida). O t_d depende de uma série de fatores dentre os quais se destacam: temperatura, pH e concentração de nutrientes inibidores. Para um mesmo microrganismo, esse parâmetro pode variar entre limites bastante amplos. WANG *et al.* (1979) apresentaram valores típicos para o tempo de duplicação celular para bactérias entre 45 e 60 minutos, para leveduras entre 90 e 120 minutos e para fungos miceliais entre 4 a 8 horas.

A velocidade específica de crescimento μ é numericamente igual à massa de células produzidas na unidade de tempo, por unidade de massa de microrganismo e é representada pela equação:

$$\mu = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (1)$$

Quando a velocidade específica de crescimento é constante, a equação (1) pode ser integrada entre os limites t_1 , X_1 e t_2 , X_2 resultando em:

$$X_2 = X_1 \exp [\mu (t_2 - t_1)] \quad (2)$$

A equação (2) é a base do crescimento exponencial (também conhecida como crescimento logarítmico). No crescimento exponencial, há uma relação simples entre μ e t_d , representado por:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,69}{\mu} \quad (3)$$

A equação (3) tem sido intensamente empregada para o cálculo da velocidade específica de crescimento celular, através de sua aplicação aos resultados de cultivos microbianos em regime descontínuo.

A velocidade específica de crescimento na fase exponencial é calculada lançando-se os valores da concentração celular (X) num gráfico mono-logarítmico e determinando-se o ângulo da tangente a reta obtida para fase exponencial.

A identificação do valor assim calculado, como a máxima velocidade específica de crescimento celular do microrganismo, nas condições de determinação é decorrente de se considerar que o meio de cultura era favorável ao desenvolvimento do microrganismo e que o mesmo ocorreu com velocidade específica constante. Pois esta seria a máxima velocidade específica com que o microrganismo poderia se desenvolver para as condições de cultivos propostas.

Durante o desenvolvimento exponencial do microrganismo, as concentrações usuais de substratos utilizados nos cultivos microbianos são muito superiores ao valor de K_s , assim quando não há restrições na disponibilidade de nutrientes para o microrganismo tem-se $\mu = \mu_{\max}$. WANG *et al.* (1979) apontaram o intervalo de $S < 10 K_s$ para que concentração de substrato passe a ter influência no valor de μ .

Neste capítulo, estão apresentados os valores de velocidade específica de crescimento celular da levedura (μ) para 10 concentrações de fenol diferentes e a curva μ *versus* S_0 . O modelo de Haldane foi ajustado aos dados desta curva, pelo método de regressão não linear dos mínimos quadrados, para desta forma ser obtido os parâmetros cinéticos μ_{\max} , K_s e K_i (SEKER, *et al.*, 1997; YANG & HUMPHREY, 1975; PAWLOWSKY & HOWELL, 1973).

4.2 Material e Métodos

Os ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos da levedura foram feitos em frascos de Erlenmeyer usando meio nutriente sintético contendo fenol como única fonte de carbono e energia. As respostas obtidas deste ensaio de concentração celular e concentração de fenol em função do tempo de fermentação foram suficientes para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento da levedura como μ , μ_{\max} , K_s e K_i . Para cada concentração inicial de substrato investigada, foi feito o gráfico em escala semi-logarítmica de absorbância *versus* tempo, onde se obteve o valor da taxa específica de crescimento (μ)

através da inclinação da reta que melhor se ajustou os dados experimentais da fase exponencial de crescimento (DORAN, 2000; D'ADAMO, 1984).

O meio de cultura sintético utilizado nos ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos da levedura foi preparado conforme descrito no item 3.2.4 do Capítulo 3.

Nos ensaios em batelada, a concentração celular foi medida indiretamente através da absorbância a 600 nm empregando o meio nutriente sintético como branco. Amostras eram retiradas dos frascos de Erlenmeyer periodicamente e imediatamente a absorbância era lida em espectrofotômetro, o pH em potenciômetro digital e feita análise de fenol. Através de uma curva padrão para a levedura que correlacionava a massa seca de células (mg / L) com a densidade óptica a 600 nm, foi possível obter a massa celular seca da levedura durante esses ensaios em batelada.

4.2.1 Determinação da massa seca de células

A partir de um ensaio com a levedura *Candida parapsilopsis* feito em batelada com meio nutriente sintético, conforme descrito no item 3.2.4 do Capítulo 3, foi feita uma curva padrão que correlacionava a massa seca de células (mg / L) com a densidade óptica a 600 nm. As células de levedura contidas no meio nutriente sintético foram precipitadas através de centrifugação, e uma parte delas foi suspensa em água destilada e separada novamente por centrifugação; esse procedimento foi repetido mais uma vez e, então, com a massa celular obtida, foi feita uma suspensão celular com água destilada. Uma amostra de 10 mL desta suspensão foi seca em estufa até peso constante. Ainda da suspensão celular, obteve-se mais 12 amostras através de sucessivas diluições e em seguida foi lida a densidade óptica dessas amostras em espectrofotômetro a 600 nm, usando-se água destilada como branco. Deste modo, foi obtida uma curva correlacionando a densidade óptica com a massa seca, e a equação da reta que melhor ajustou seus pontos.

4.2.2 Procedimento para análise de fenol

O meio de cultura líquido foi centrifugado para separar as células e, então, foi feita a análise de fenol segundo procedimento de YANG & HUMPHREY, 1975, descrito a seguir:

- 1 - Adicionar 0,05 mL de amostra em tubo de ensaio;
- 2 - Adicionar 0,5 mL de solução 1 % de $K_3Fe(CN)_6$ em solução tampão glicina 0,1 M com pH ajustado a 9,7 com NaOH;
- 3 - Adicionar 2,5 mL de solução 1 % de 4-aminoantipireno em solução tampão glicina 0,1 M com pH ajustado a 9,7 com NaOH;
- 4 - Misturar as soluções por agitação, esperar 10 minutos e fazer a leitura em espectrofotômetro a 505 nm (o controle foi feito com água destilada no lugar da amostra).

A curva padrão foi feita com solução de fenol em água destilada com concentrações variando de 0 a 600 mg / L. Para amostras que continham mais de 600 mg / L de fenol foram feitas diluições para atingir a faixa de concentração de fenol varrida pela curva padrão.

4.2.3 Determinação do pH

O pH foi medido em pHmetro.

4.3. Resultados e Discussão

Foram feitos 10 ensaios em batelada com concentração inicial de fenol na faixa de 20 a 723 mg / L. Os gráficos em escalas semi-logarítmica de absorvância *versus* tempo para fase exponencial de crescimento da levedura, mais os gráficos de absorvância e concentração de fenol em função do tempo estão mostrados nas Figuras 4.1 a 4.20. No Anexo 9, se encontram as tabelas relativas aos ensaios em batelada contendo os dados de absorvância, concentração de fenol, pH e massa celular seca da levedura em função do tempo de fermentação. Nos ensaios em batelada com concentração de fenol acima de 88,5 mg / L, constatou-se que houve diminuição do pH enquanto o fenol era degradado, fato que pode ser atribuído à produção de compostos intermediários que são formados durante a degradação de fenol, tais como ácidos orgânicos, que a partir de determinadas concentrações podem superar a capacidade tamponante do meio levando a depressão do pH (LALLAI & MURA, 1989; LALLAI *et al.*, 1988).

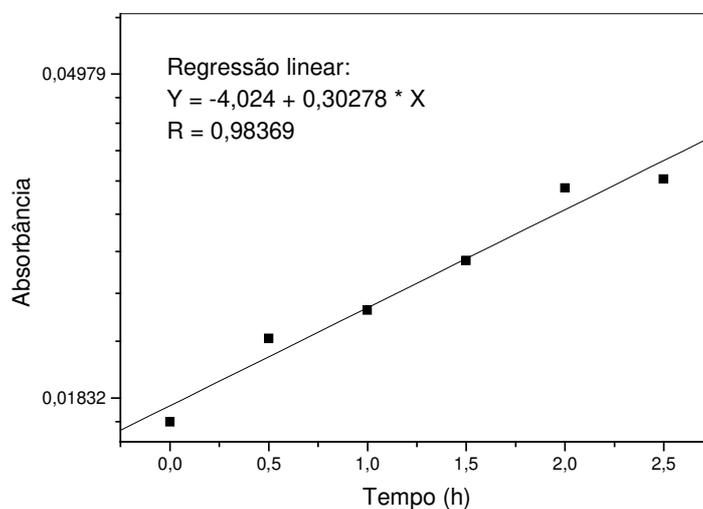


Figura 4.1. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 20 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,30278 \text{ h}^{-1}$.

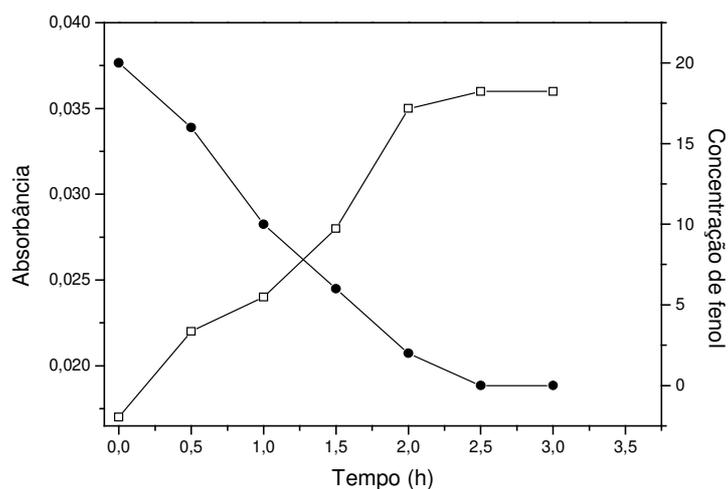


Figura 4.2. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 20 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

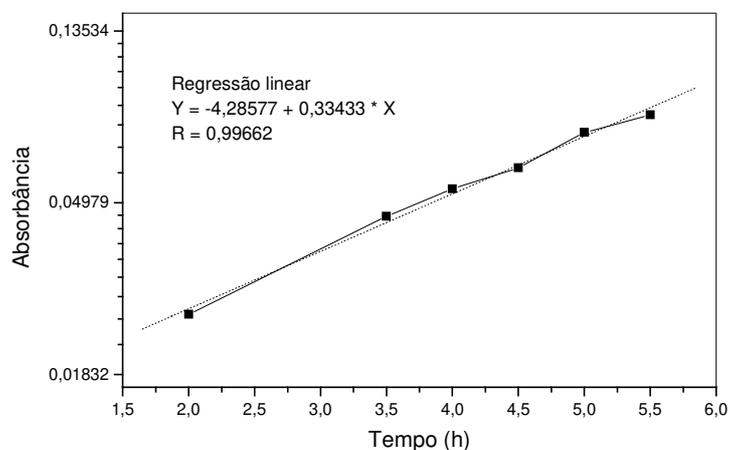


Figura 4.3. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 46 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,33433 h⁻¹.

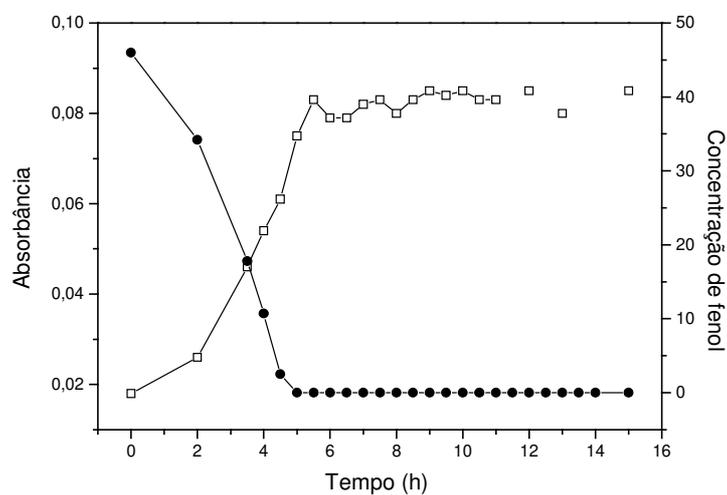


Figura 4.4. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 46 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

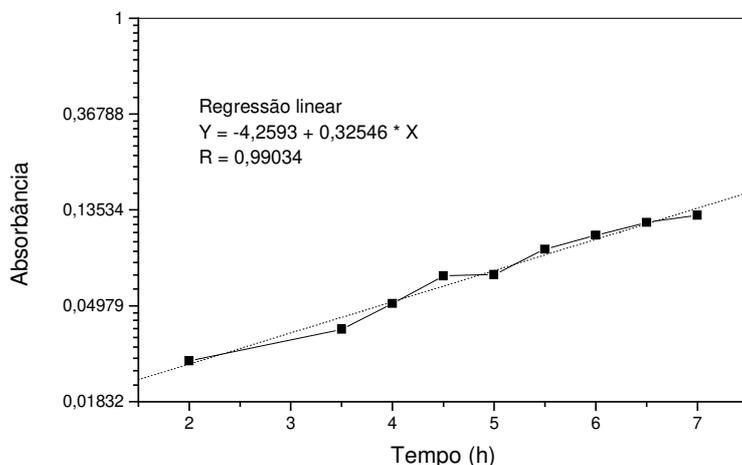


Figura 4.5. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 88,5 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,32546 \text{ h}^{-1}$.

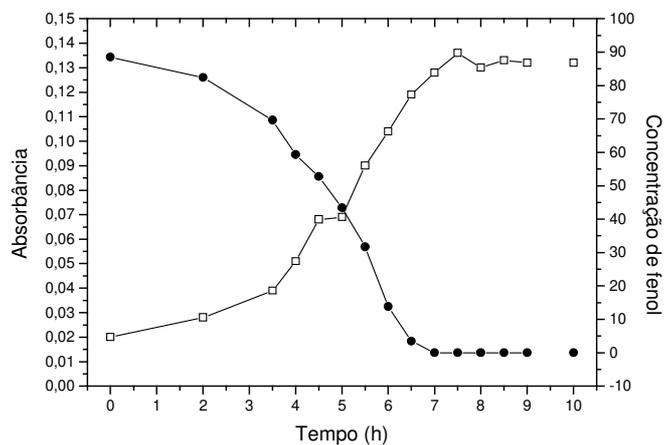


Figura 4.6. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 88,5 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

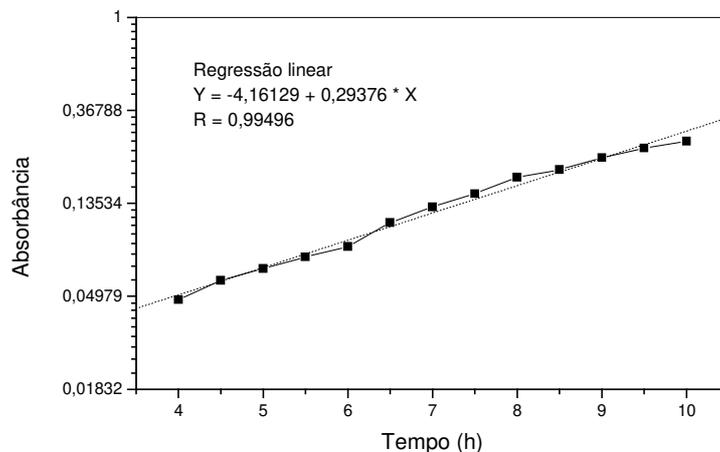


Figura 4.7. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 170 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,29376 \text{ h}^{-1}$.

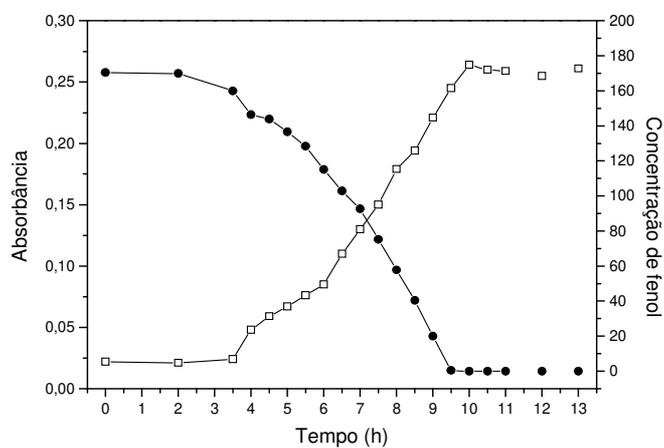


Figura 4.8. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 170 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

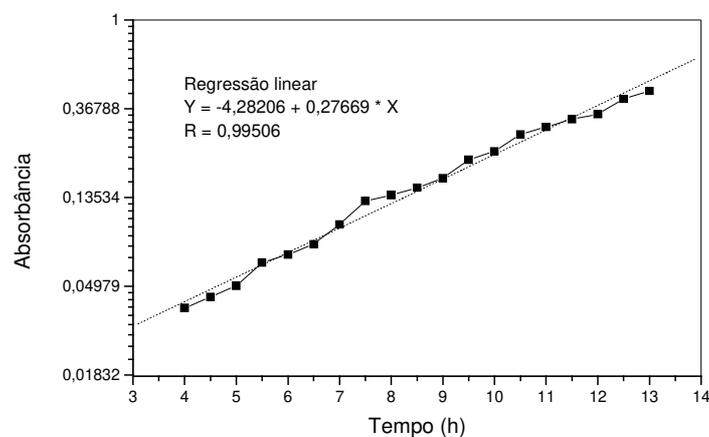


Figura 4.9. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 267 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,27669 \text{ h}^{-1}$.

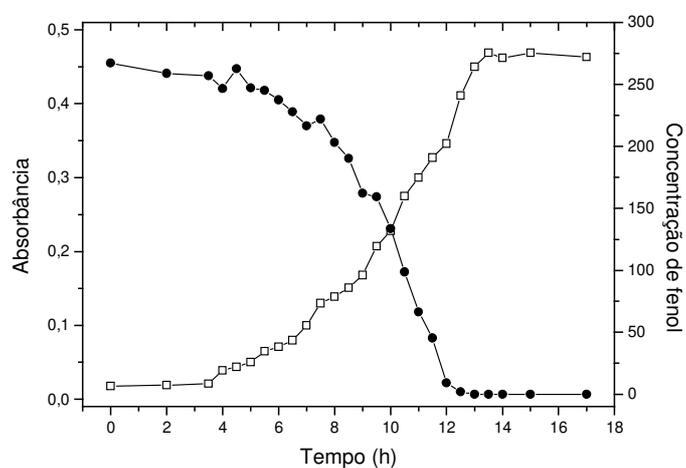


Figura 4.10. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 267 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

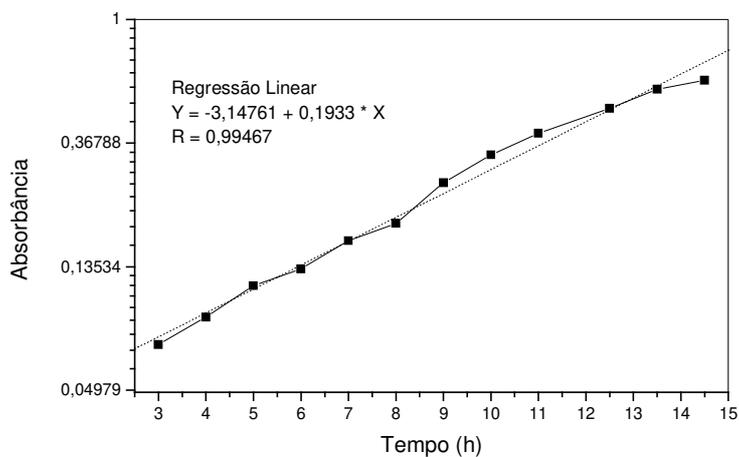


Figura 4.11. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 393 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de 0,1933 h⁻¹.

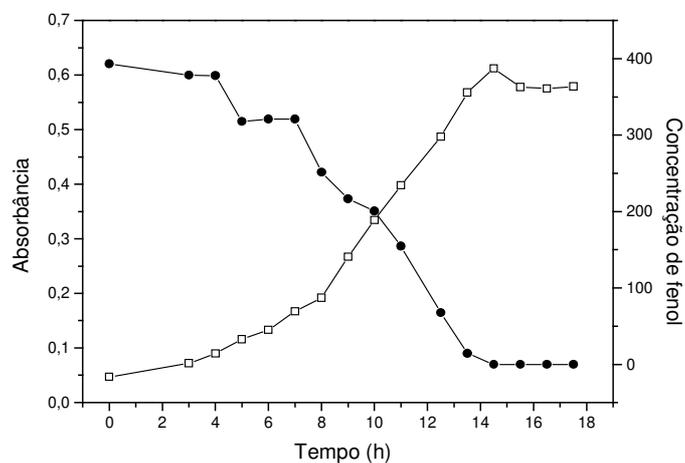


Figura 4.12. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 393 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

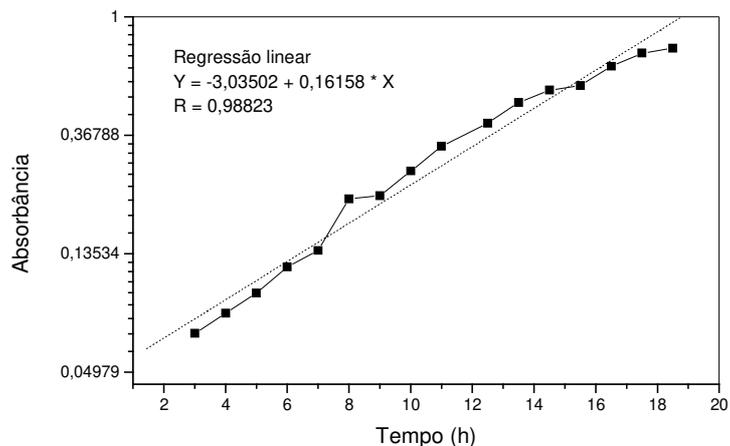


Figura 4.13. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 448 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,16158 \text{ h}^{-1}$.

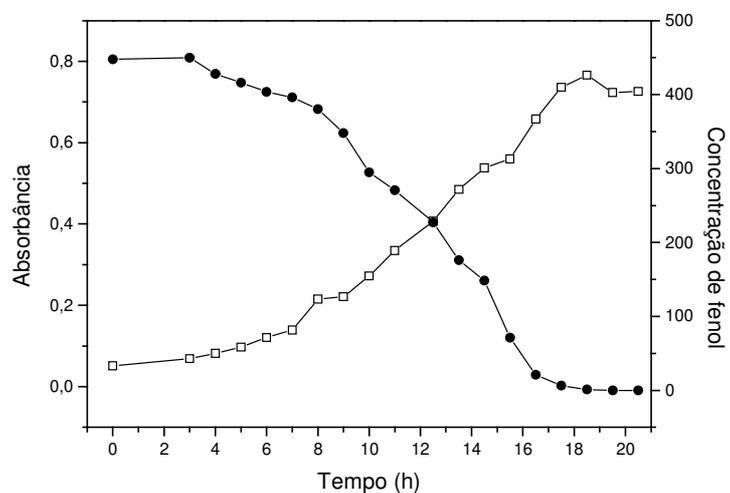


Figura 4.14. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 448 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

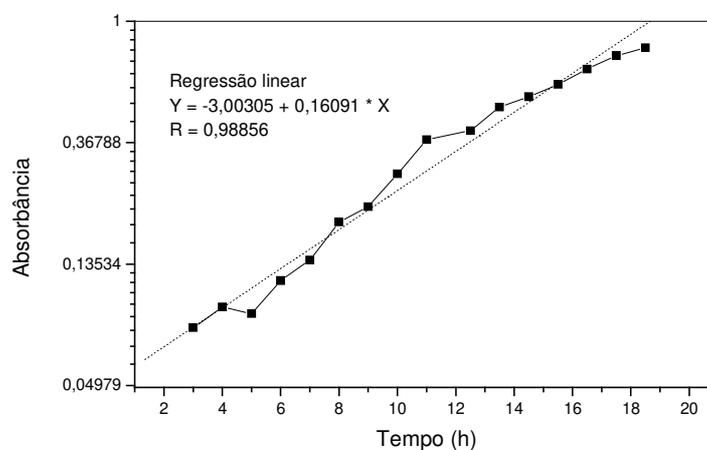


Figura 4.15. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 502 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,16091 \text{ h}^{-1}$.

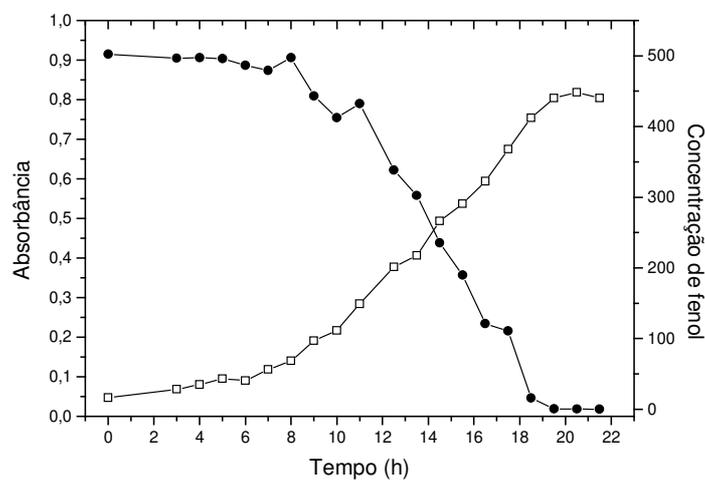


Figura 4.16. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 502 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

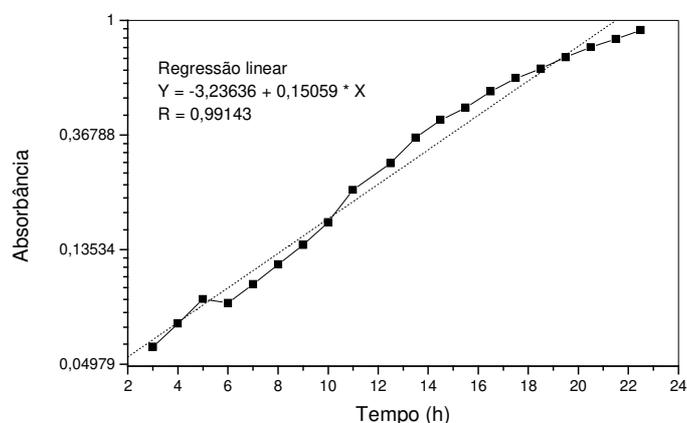


Figura 4.17. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 612 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,15059 \text{ h}^{-1}$.

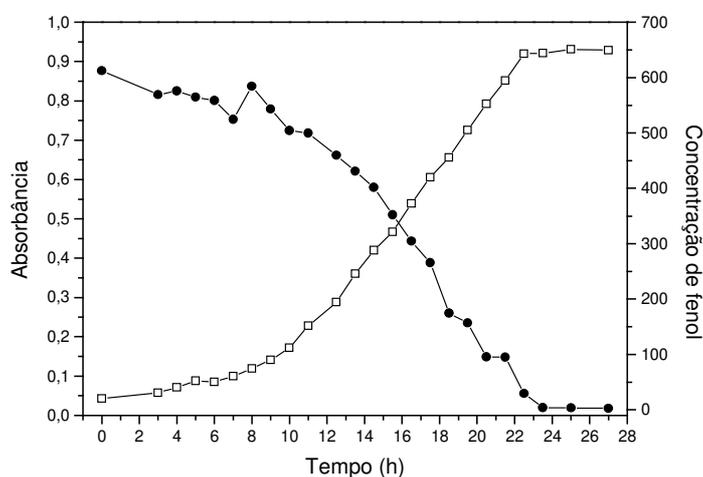


Figura 4.18. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 612 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

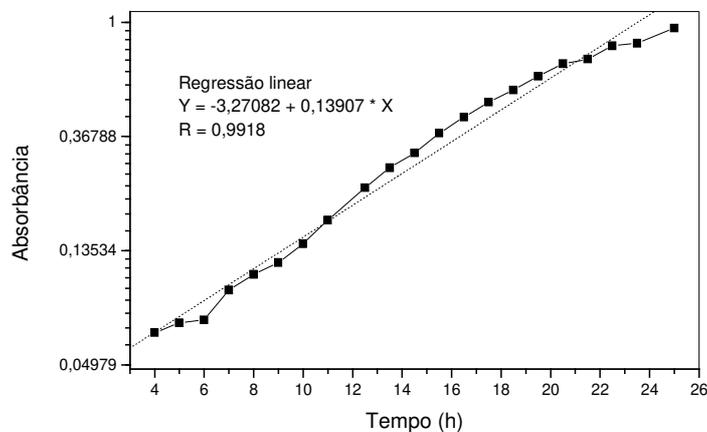


Figura 4.19. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 723 mg / L. Tempo de fermentação versus absorbância a 600 nm em escala logarítmica natural, apenas para a fase exponencial de crescimento da levedura. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,13907 \text{ h}^{-1}$.

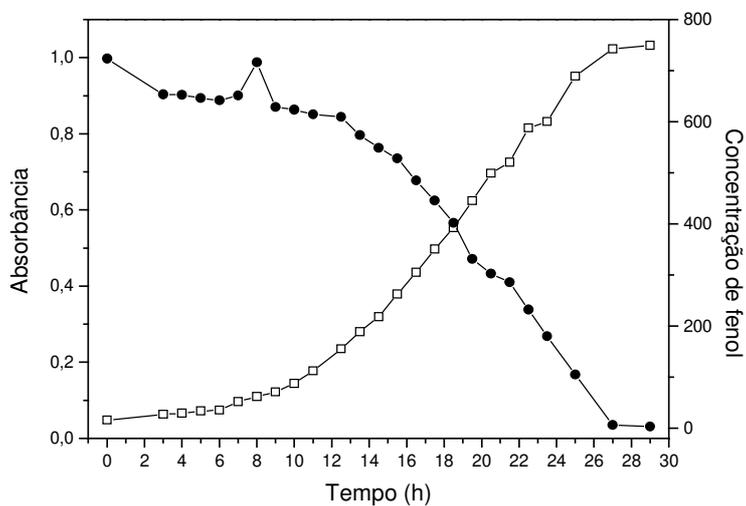


Figura 4.20. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 723 mg / L. —□— Absorbância a 600 nm, —●— concentração de fenol em (mg / L) em função do tempo de fermentação.

A Tabela 4.1 mostra os valores da taxa específica de crescimento (μ) e da concentração inicial de fenol no substrato (S_0), obtidos dos gráficos em escalas semi-logarítmica de absorbância *versus* tempo para fase exponencial de crescimento da levedura. O valor de μ foi retirado do gráfico através da inclinação da reta que melhor ajustou seus pontos.

Tabela 4.1. Valores de μ e de S_0 .

S_0 (mg / L)	μ (h^{-1})
20	0,303
46	0,334
88,5	0,325
170,4	0,294
267,2	0,277
393	0,193
448	0,162
502	0,161
612	0,151
723	0,139

Os valores de μ versus S_0 da Tabela 4.1 foram plotados num gráfico (Figura 4.21) e através da técnica de ajuste não linear dos mínimos quadrados foi traçado a curva, descrita pelo modelo de Haldane, que melhor representa esses pontos experimentais, assim foram obtidos os parâmetros cinéticos de crescimento celular μ_{max} , K_s e K_i de: $0,476 h^{-1}$; $10,6 mg / L$ e $286,3 mg / L$, respectivamente (SEKER, *et al.*, 1997; YANG & HUMPHREY, 1975; PAWLOWSKY & HOWELL, 1973).

Os parâmetros cinéticos de crescimento celular obtidos neste trabalho foram comparados com resultados obtidos por outros autores em ensaios com diferentes cepas e procedimentos experimentais, e mesmo sendo difícil de comparar esses dados verificou-se que os valores reportados neste trabalho dos parâmetros cinéticos μ_{max} , K_s e K_i foram da

mesma ordem de grandeza que os parâmetros cinéticos obtidos por outros autores, como mostra a Tabela 4.2 a seguir.

Tabela 4.2. Valores de parâmetros cinéticos de crescimentos de vários microrganismos na degradação de fenol, pH e temperatura em que os parâmetros foram obtidos.

Microrganismo	Sistema	μ_{\max} (h⁻¹)	K_s (mg / L)	K_i (mg / L)	pH	T (°C)	Autor
Cultura mista filamentosa	Batelada	0,233	5,9	934,5	6,6	28	Pawlowsky & Howell (1973)
<i>Trychosporon cutaneum</i>	Contínuo	0,464	1,7	380	4,5	30	Yang & Humphrey (1975)
<i>Pseudomonas putida</i>	Contínuo	0,567	2,4	106	6	30	Yang & Humphrey (1975)
<i>Candida tropicalis</i>	Batelada	0,22	110	1200	7,0	32,5	Shimizu <i>et al.</i> (1973)
<i>Pseudomonas putida</i>	Batelada	0,897	12,2	203,7		28,5	Dikshitulu <i>et al.</i> (1993).
<i>Pseudomonas putida</i> Q5	Batelada	0,119	5,3	377	7	10	Kotturi <i>et al.</i> (1991)

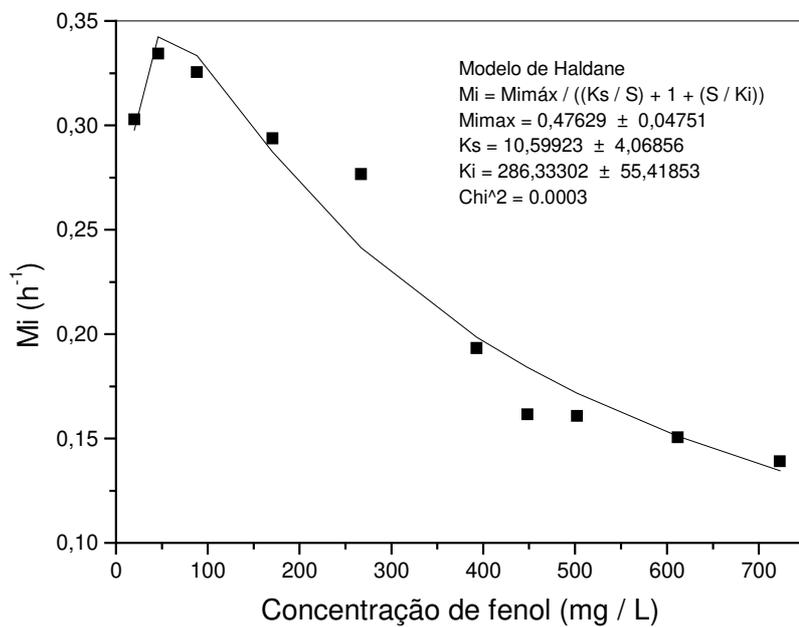


Figura 4.21. Taxa específica de crescimento *versus* concentração de substrato inicial. Os pontos são os dados experimentais e a linha representa o ajuste dos dados experimentais pelo modelo de Haldane.

CAPÍTULO 5

ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE FENOL EM REATORES CONTÍNUOS

5.1 Introdução

Os ensaios contínuos de biodegradação de fenol foram executados com o propósito de se estudar o efeito da degradação de fenol presente na água residuária sintética pelas células de *Candida parapsilopsis* e a estabilidade operacional do reator. Os reatores investigados foram nesta ordem: reator de mistura, reator de leito fluidizado com carvão ativado, reator de mistura pressurizado, e reator “air-lift” pressurizado com e sem carvão ativado.

Os ensaios contínuos foram executados por períodos que variaram de 17 até 97 dias e as amostras de efluente para análises de fenol, demanda química de oxigênio (DQO) e atividades enzimáticas foram coletadas diariamente, através da saída do reator. Após a coleta da amostra, era efetuada sua filtração em membrana Millipore (0,22 µm) e feita à análise de fenol como descrito no item 5.4.2 deste Capítulo, o restante da amostra filtrada era congelada para análises posteriores.

Durante a execução dos ensaios contínuos, foi almejado operar os reatores pelo máximo de tempo possível, sempre objetivando mantê-los estáveis operacionalmente, ou seja, operando com oscilações dentro de faixas aceitáveis, e obter valores máximos do binômio produtividade volumétrica específica de remoção de fenol e eficiência de remoção de fenol. Para isso, trabalhou-se com as variáveis vazão de afluente e concentração de fenol do afluente da seguinte forma: quando o reator estava em regime estacionário por alguns dias (2 a 7) se efetuava uma perturbação no reator, quer seja pelo aumento da vazão de afluente, quer pelo aumento da concentração de fenol no afluente, ou por ambas ao mesmo tempo. Em seguida, esperava-se o reator atingir o estado estacionário novamente, o qual levava por volta de uns três dias normalmente, sempre tomando-se a precaução de deixar uma margem de segurança de tempo maior do que três vezes o tempo de detenção hidráulico do reator, para assegurar que o estado estacionário hidráulico fosse atingido. Em seguida, o reator era mantido em estado estacionário por mais alguns dias e se efetuava uma nova perturbação. Quando o reator deixava de operar satisfatoriamente, constatado através da diminuição da eficiência de remoção de fenol a valores inferiores a 70 %, ou dava-se um passo para trás diminuindo a vazão ou a concentração de fenol no afluente e esperava-se mais algum tempo para tentar atingir valores maiores de vazão ou de concentração de fenol

no afluente que resultassem em valores satisfatórios de eficiência de remoção de fenol do reator ou então se finalizava o ensaio.

O funcionamento dos reatores contínuos iniciou-se com valores baixos de vazão e concentração de fenol no afluente, com o passar do tempo, esses valores foram sendo aumentados, até atingir um limite máximo, que correspondia aos melhores valores do binômio produtividade volumétrica específica de remoção de fenol e eficiência de remoção de fenol.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Caracterização da água residuária sintética.

A composição da água residuária sintética empregada nos ensaios contínuos é mostrada nas Tabelas 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1. Composição da água residuária sintética empregada nos ensaios contínuos com reatores de mistura e leito fluidizado com carvão ativado.

Componente	Concentração (mg / L)
Glicose	28
Uréia	13
Caseína hidrolisada	2,8
Na ₂ HPO ₄	6,4
K ₂ HPO ₄	5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,6
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1,1
MnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,14
FeSO ₄ . 6 H ₂ O	0,14
Fenol	Variável

Tabela 5.2. Composição da água residuária sintética empregada nos ensaios contínuos com reatores de mistura pressurizado e “air-lift” com e sem carvão ativado.

Componente	Concentração (mg / L)
Glicose	84
Uréia	80
Caseína hidrolisada	2,8
Na ₂ HPO ₄	6,4
K ₂ HPO ₄	5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	2,5
MnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,14
FeSO ₄ . 6 H ₂ O	0,60
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	3,8
Fenol	Variável

5.2.2 Preparo do inóculo empregado nos ensaios contínuos de degradação de fenol.

O meio de cultura sintético utilizado para a pré-fermentação dos ensaios contínuos de biodegradação de fenol foi preparado segundo procedimento descrito no item 3.2.4 do Capítulo 3. A fonte de carbono deste meio de cultura foi fenol, que foi acrescentado ao meio antes de seu uso, até atingir a concentração de 50 mg / L para a pré-fermentação número 1 e de 250 mg / L na pré-fermentação número 2. Ambas as pré-fermentações foram executadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com aproximadamente 100 mL de meio de cultura, a 30 °C com agitação de 150 rotações por minuto. A pré-fermentação número 1 iniciou-se após os frascos receberem uma alçada do microrganismo *Candida parapsilopsis* proveniente de tubos de ensaio com meio MM inclinado e, após 24 horas, tempo suficiente para a levedura consumir todo o fenol presente no meio, uma alíquota de 10 mL foi transferida para os frascos da pré-fermentação número 2, que teve duração de aproximadamente 24 horas. O meio de cultura proveniente da pré-fermentação número 2

era então adicionado nos reatores contínuos no volume que representasse, aproximadamente 30 % de seu volume útil.

5.2.3 Equações para o cálculo da produtividade volumétrica específica de remoção de fenol e de eficiência de remoção de fenol.

Hipótese assumida:

O reator operou com vazão constante.

As fórmulas empregadas para cálculo de produtividade volumétrica específica de remoção de fenol (P), e de eficiência de remoção de fenol (R) foram:

$$P = \frac{(S_a - S_e) * F * 60}{V}$$

$$R = \left(\frac{S_a - S_e}{S_a} \right) * 100$$

Onde:

P = produtividade volumétrica específica de remoção de fenol (mg / L h);

R = eficiência de remoção de fenol (%);

F = vazão (mL / min);

V = volume de líquido do reator (mL);

S_a = concentração de fenol no afluente (mg / L);

S_e = concentração de fenol no efluente (mg / L).

As fórmulas empregadas para cálculo de produtividade volumétrica específica de remoção de DQO e de eficiência de remoção de DQO foram análogas às apresentadas acima, trocando-se as concentrações de fenol no afluente e efluente pelas suas respectivas concentrações de DQO.

5.2.4 Análise de fenol.

A análise de fenol foi feita segundo procedimento descrito no item 4.2.2 do Capítulo 4, excetuando-se que as amostras foram filtradas em membrana Millipore (0,22 µm) para separação da massa celular ao invés de serem centrifugadas.

5.2.5 Análise de demanda química de oxigênio (DQO).

Para determinação de DQO na água residuária sintética e nos efluente dos reatores, foi empregado o método colorimétrico, o qual se baseia na reação da amostra com uma quantidade conhecida de dicromato de potássio em presença de ácido sulfúrico, por duas horas a 150 °C em bloco digestor. A matéria orgânica da amostra é oxidada e o dicromato que inicialmente tem cor amarela e reage gerando íons Cr^{+3} de cor verde. O sulfato de prata em meio ácido é o catalisador (APHA, 1976).

A reação envolvida no processo segue abaixo:



A DQO foi determinada pela absorbância, a 620 nm, da amostra digerida sendo expressa em mg DQO / L.

5.2.6 Determinação da massa seca celular por filtração.

As amostras de efluentes coletadas dos ensaios contínuos foram filtradas em membrana Millipore (0,22 µm) previamente pesadas, as quais foram levadas à estufa a vácuo por 24 h, a 70 °C, pesadas e por diferença de peso foi calculada a massa celular seca de cada amostra.

O filtrado obtido desta operação foi congelado para posteriormente ser empregado para determinação de fenol, DQO e das atividades enzimáticas.

5.3 Discussão dos Resultados.

5.3.1 Reator de mistura.

5.3.1.1 Montagem do reator de mistura.

O reator de mistura contínuo foi montado num béquer de 1 L com diâmetro de 8 cm e altura de 20 cm, onde foi adicionado um tubo de vidro para saída do efluente na altura de 15 cm. O volume útil do reator foi de 530 mL. Na borda do béquer, foi colocada uma tampa de borracha com furos para entrada de um termômetro, dos tubos de alimentação, aeração e de circulação de água.

O reator de mistura contínuo possuía fluxo de alimentação ascendente promovido por uma bomba peristáltica, a agitação era proporcionada por agitador magnético e a temperatura era mantida a 30 °C através da circulação de água em tubo de vidro em forma de serpentina contido no reator (Figura 5.1).

A água residuária sintética utilizada no reator tinha composição conforme mostra a Tabela 5.1 do item 5.2.1, e era acondicionada em galões de PIREX de 20 L ou 10 L para ser esterilizada em autoclave a 121 °C por 25 minutos. A alimentação do reator era feita através de uma bomba peristáltica que funcionava intermitentemente, pois estava ligada a um temporizador para promover a vazão de afluente desejada.

A oxigenação da fase líquida do reator foi promovida pela vazão de ar (0,5 vvm) fornecida por um compressor e aplicada através de uma pedra porosa na base do reator.



Figura 5.1. Reator de mistura.

5.3.1.2 Operação do reator de mistura.

O reator foi alimentado com água residuária sintética contendo fenol na faixa de concentração de 250 a 300 mg / L e operou por 44 dias consecutivos, sendo coletadas amostras de efluente de 100 mL diariamente para determinação da concentração de fenol, DQO e atividades enzimáticas.

Nas Tabelas 10.1 e 10.2 do Capítulo 10 estão apresentados os dados concernentes a operação do reator. As Figuras 5.2 e 5.3 mostram as variações das concentrações de fenol e DQO no reator, respectivamente, através dos dados de eficiência de remoção de fenol ou DQO e produtividade volumétrica de remoção de fenol ou DQO.

Durante a fase experimental, o reator de mistura foi submetido a diferentes valores de tempo de detenção hidráulica (entre 6 a 25 h). A carga orgânica removida do reator

medida em termos da produtividade volumétrica de remoção de fenol variou entre 8 e 26 mg / L h e a eficiência de remoção de fenol variou entre 50 e 100 %.

Nos primeiros 15 dias de operação do reator de mistura, a eficiência de remoção de fenol variou entre 55 e 100 % e a produtividade volumétrica de remoção de fenol variou entre 10 e 20 mg / L h. O declínio da eficiência de remoção de fenol para patamares de 60 %, observado a partir do 4º dia de operação do reator, foi devido a redução do tempo de detenção hidráulica que ocasionou lixiviação das células do reator, devido a isso no 5º dia de operação foram adicionados mais 50 mL de inóculo no reator, preparado como descrito no item 5.2.2, o problema de lavagem de células do reator voltou a se repetir, então no 16º dia de operação do reator foi adicionado mais 50 mL de inóculo no reator e o tempo de detenção hidráulica foi aumentado de 10 para 15 h. Com isso, o reator apresentou melhora na eficiência de remoção de fenol, com valores superiores a 90 % entre os dias 17 e 21, para então iniciar uma tendência de queda nos valores de remoção de fenol, entre os dias de operação 21 e 31, devido à diminuição do tempo de detenção hidráulica e aumento da concentração de fenol no afluente. Entre os dias 27 e 28, foram obtidos os melhores valores de produtividade volumétrica de remoção de fenol do reator, por volta de 28 mg / L h. Nos últimos 20 dias de operação do reator, o tempo de detenção hidráulica foi mantido em torno de 10 h, como no 33º dia a eficiência de remoção de fenol do reator foi de 60 %, então foi diminuída a concentração de fenol no afluente de 270 para 250 mg / L, visando melhorar a eficiência de degradação de fenol, o que de fato ocorreu, mas por poucos dias, sendo finalizado o ensaio com 44 dias de operação.

Durante todo período de operação do reator, a eficiência de remoção de DQO ficou entre 30 e 90 % e apresentou comportamento análogo ao da curva de eficiência de remoção de fenol *versus* tempo de operação do reator, mas com valores diminuídos de, aproximadamente, 10 unidades. A curva de produtividade volumétrica de remoção de DQO em função do tempo de operação teve comportamento análogo à curva de produtividade volumétrica de remoção de fenol, mas com valores adicionados de, aproximadamente, 20 unidades. Como a DQO no afluente era principalmente devida a concentração de fenol, por este motivo as curvas de remoção de DQO e fenol tiveram comportamento semelhantes.

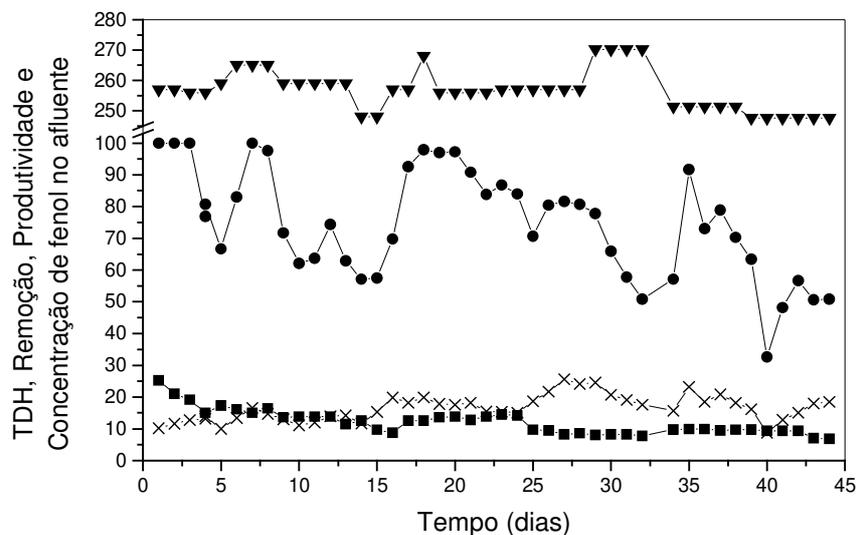


Figura 5.2. Reator de mistura. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).

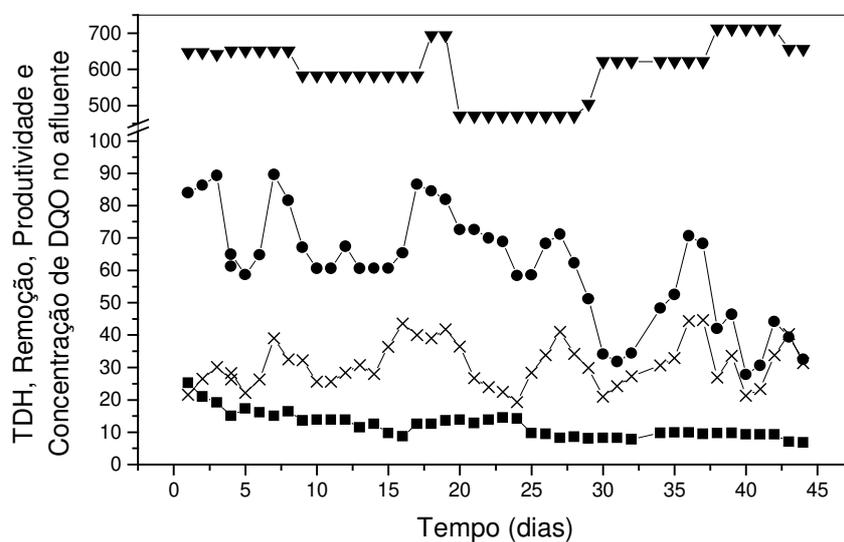


Figura 5.3. Reator de mistura. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).

5.3.2 Reator de leito fluidizado.

5.3.2.1 Montagem do reator de leito fluidizado.

O reator de leito fluidizado contínuo foi montado numa garrafa de PET de 2 L, com parte cônica sendo o fundo do reator por onde foram adicionados três tubos de vidro para entrada das correntes de alimentação, aeração e recirculação de meio. Na parte cilíndrica da garrafa, foi adicionado um tubo de vidro com 1 cm de diâmetro com uma tela de aço inox de 250 mesh de abertura em sua extremidade, por onde saía o efluente do reator que era coletado numa proveta de 250 mL, sendo uma parte do efluente removida continuamente da proveta por gravidade e outra recirculava para dentro do reator através de uma bomba centrífuga, com vazão de 35 mL / min.

No interior da garrafa PET foram adicionados 100 g de carvão ativado com células de levedura imobilizada e o volume útil do reator foi de 1400 mL.

O reator de leito fluidizado possuía alimentação ascendente promovida por uma bomba peristáltica, a aeração era promovida por um compressor e aplicada numa pedra porosa na base do reator a uma vazão de 40 mL / min.

A água residuária sintética utilizada no reator tinha composição como descrita na Tabela 5.1 do item 5.2.1, e era acondicionada em galão de PIREX de 20 L e esterilizada a 121 °C por 15 min.

5.3.2.2 Operação do reator de leito fluidizado.

O reator foi alimentado com água residuária sintética contendo fenol na faixa de concentração de 250 a 1100 mg / L e operou por 97 dias consecutivos, sendo coletadas amostras de efluente diariamente de 100 mL para determinação da concentração de fenol, DQO e atividades enzimáticas.

Nas Tabelas 10.3 e 10.4 do Capítulo 10 foram apresentados os dados concernentes a operação do reator. As Figuras 5.4 e 5.5 mostram as variações das concentrações de fenol e DQO no reator, respectivamente, através dos dados de eficiência de remoção de fenol ou DQO e produtividade volumétrica de remoção de fenol ou DQO.

Durante a fase experimental, o reator de leito fluidizado foi submetido a diferentes valores de tempo de detenção hidráulica (entre 3 a 24 h). A carga orgânica removida do reator foi medida em termos da produtividade volumétrica de remoção de fenol, a qual variou entre 19 e 77 mg / L h.

Considerando-se os primeiros 33 dias de operação do reator, a concentração de fenol no afluente foi de aproximadamente 300 mg / L. Nos primeiros 12 dias de operação do reator, a eficiência de remoção de fenol variou na faixa de 90 a 100 % e a produtividade volumétrica de remoção de fenol manteve-se na faixa de 20 a 25 mg / L h. Entre o 12º dia de operação do reator e o 33º, o tempo de detenção hidráulica foi diminuído gradativamente de 8 para 3 h e os valores de produtividade volumétrica de remoção de fenol e eficiência de remoção de fenol atingiram os valores de 70 mg / L h e 85 %, respectivamente no 28º dia de operação do reator. Entre os dias 33 e 77, a concentração de fenol no afluente foi de aproximadamente 550 mg / L, o tempo de detenção hidráulico permaneceu entre 10 e 15 h, a eficiência de remoção de fenol variou entre 70 e 100 % e a produtividade volumétrica de remoção de fenol permaneceu em torno de 50 mg / L h. A máxima produtividade volumétrica de remoção de fenol, de 77 mg / L h, foi obtida no 90º dia de operação do reator quando a eficiência de remoção de fenol foi de 90 %, a concentração de fenol no afluente era de 1100 mg / L e o tempo de detenção hidráulica de 15 h.

Durante os 12 primeiros dias de operação do reator, a produtividade volumétrica de remoção de DQO permaneceu por volta de 40 mg / L h, e do 12º dia até o 97º dia de operação do reator a produtividade volumétrica de remoção de DQO e a eficiência de remoção de DQO tiveram valores médios de 100 mg / L h e 85 %, respectivamente.

Os resultados de produtividade volumétrica de remoção de fenol e de eficiência de remoção de fenol apresentados foram superiores aos resultados obtidos por KIM *et al.* (1986), que estudaram a remoção de fenol em água residuária sintética, em reator de leito fluidizado contendo como inóculo lodo de uma planta de tratamento de resíduo municipal, cuja máxima produtividade volumétrica de degradação de fenol foi de 40 mg / L h, acompanhada de eficiência de remoção de fenol de 100 %.

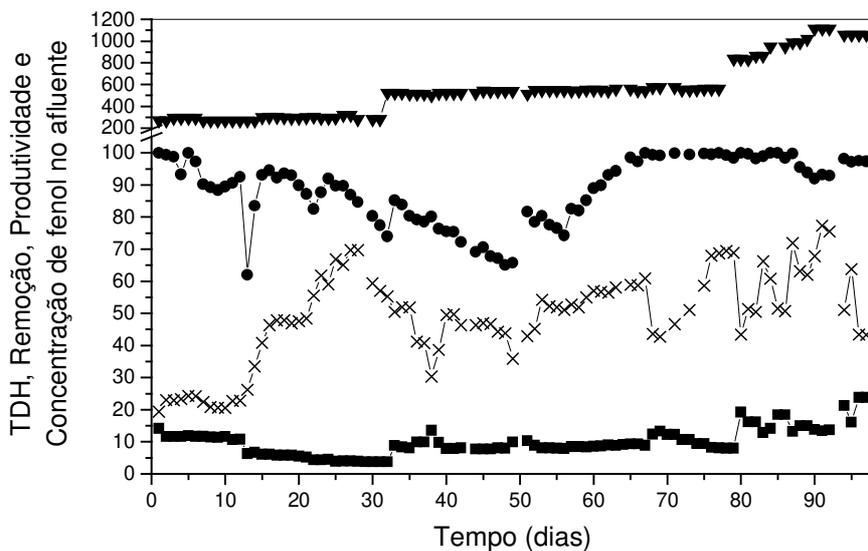


Figura 5.4. Reator de leito fluidizado com carvão ativado. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —x— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).

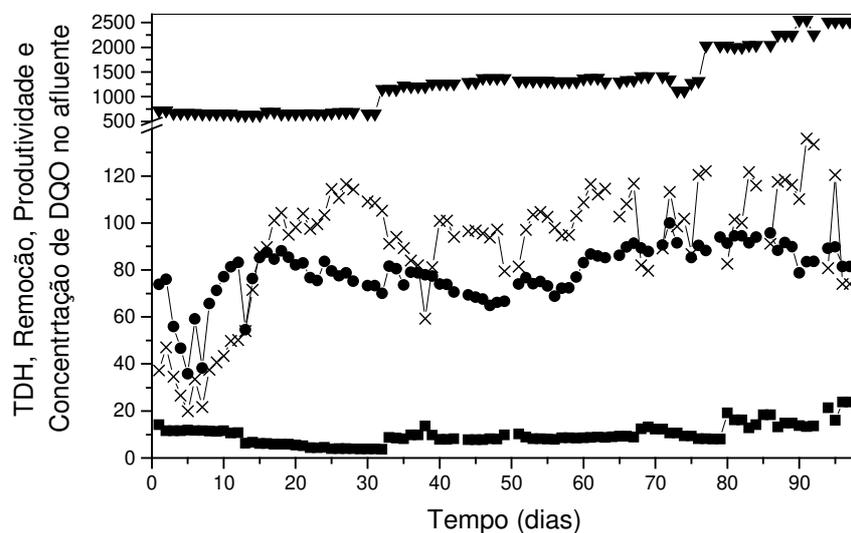


Figura 5.5. Reator de leito fluidizado com carvão ativado. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —x— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).

5.3.3 Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm².

5.3.3.1 Montagem do reator de mistura pressurizado.

A Figura 5.6 mostra o esquema geral de instalação do reator de mistura pressurizado a uma faixa de 0,6 a 1,0 kgf / cm². O reator foi formado por uma coluna de acrílico com diâmetro de 12 cm, altura de 16 cm e volume total de 1,6 L e foi colocado sob um agitador magnético, o qual conferia agitação ao meio. A base do reator dispunha de entradas individuais para a água residuária sintética e ar. A oxigenação da fase líquida do reator foi promovida pela vazão de ar fornecida por um compressor e aplicada através de uma pedra porosa na base do reator. Antes de entrar no reator, a vazão de ar era medida num rotâmetro e permaneceu durante o ensaio na faixa de 0,3 a 0,6 L / min.

No topo do reator foram postas uma tampa de acrílico com um manômetro, uma válvula de alívio de pressão regulada para manter a pressão no interior do reator em 0,6 kgf / cm² e dois fios de prata de 3 mm de diâmetro ajustada a uma altura de líquido de 12 cm e responsável pelo acionamento da válvula solenóide que permitia a saída do efluente do reator e mantinha o volume útil do reator constante em 1500 mL.

A água residuária sintética utilizada no ensaio foi acondicionada em béquer de 5 L e mantida em banho refrigerado a 5 °C, enquanto era bombeada para o interior do reator pela sua base por uma bomba positiva que funcionava intermitentemente, pois estava ligada a um temporizador, para promover a vazão de afluente desejada. A cada dois dias, a água residuária sintética era renovada.



Figura 5.6. Reator de mistura pressurizado.

5.3.3.2 Operação do reator de mistura pressurizado.

O reator foi alimentado com água residuária sintética contendo fenol na faixa de concentração de 300 a 900 mg / L e operou por 25 dias consecutivos, sendo coletadas amostras diárias de 100 mL para determinação da concentração de fenol, DQO, massa celular seca e atividades enzimáticas.

Nas Tabelas 10.5 e 10.6 do Capítulo 10 estão apresentados os dados concernentes a operação do reator. As Figuras 5.7 e 5.8 mostram as variações das concentrações de fenol e DQO no reator, respectivamente, através dos dados de eficiência de remoção de fenol ou DQO e produtividade volumétrica de remoção de fenol ou DQO.

O reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm² foi submetido a tempo de detenção hidráulica variando entre 10 a 90 h. A carga orgânica removida do reator foi medida em termos da produtividade volumétrica de remoção de fenol, a qual variou entre 5 e 70 mg / L h.

Considerando-se os primeiros 18 dias de operação do reator, a concentração de fenol no afluente foi de, aproximadamente, 350 mg / L e a eficiência de remoção de fenol foi de 100 % até o 20° dia de operação. Entre o 1° dia de operação do reator e o 12° dia, o tempo de detenção hidráulica permaneceu na faixa de 25 a 30 h e a produtividade volumétrica de remoção de fenol manteve-se na faixa de 8 a 10 mg / L h. A partir do 12° dia, o tempo de detenção hidráulica do meio no reator começou a declinar até atingir a faixa de 9 a 10 h entre o 17° dia de operação e o 22° dia. Entre os dias de operação 17 e 19, a produtividade volumétrica de remoção de fenol foi de 30 mg / L h.

A partir do 19° dia de operação do reator, a concentração de fenol no afluente foi aumentada até estabilizar em, aproximadamente, 800 mg / L no 21° dia de operação. Com isso a eficiência de remoção de fenol declinou até atingir o valor de 50 % no 23° dia. A produtividade volumétrica de remoção de fenol no 21° dia atingiu seu valor máximo de 70 mg / L h, mas não se manteve nos dias seguintes neste patamar, portanto o sistema biológico não entrou em estado estacionário depois da elevação na concentração de fenol do afluente e também não foi capaz de degradar com alta eficiência a carga orgânica de fenol que entrou no reator. O que ocorreu neste caso foi um choque no sistema biológico ocasionado pela abrupta elevação da concentração de fenol do afluente, contribuindo para a diminuição da atividade das células de levedura responsáveis pela degradação de fenol. A massa celular seca dos últimos cinco dias de operação do reator permaneceu dentro da faixa de 250 a 406 mg / L, mas através da análise microscópica verificou-se que a concentração de bactérias aumentou, e em contrapartida a concentração de levedura filamentosa diminuiu.

Durante todo período de operação do reator, a eficiência de remoção de DQO ficou entre 70 e 90 % e a curva de produtividade volumétrica de remoção de DQO em função do tempo de operação teve comportamento análogo à curva de produtividade volumétrica de remoção de fenol, mas com valores, aproximadamente, adicionados de 10 unidades.

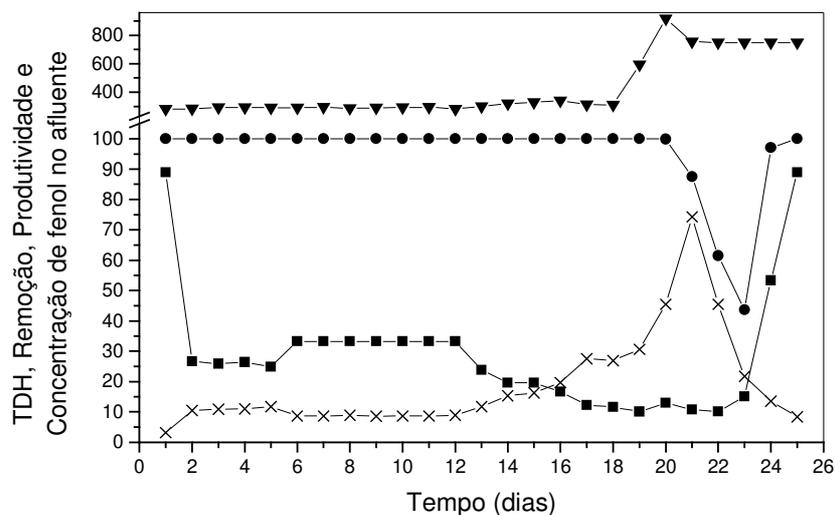


Figura 5.7. Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 0,7 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).

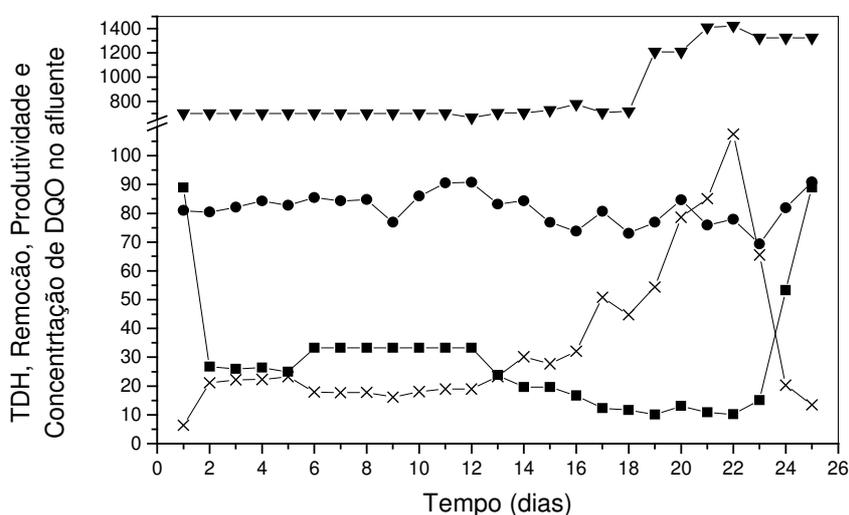


Figura 5.8. Reator de mistura pressurizado entre 0,5 e 1,0 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).

5.3.4 Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm².

5.3.4.1 Montagem do reator de mistura pressurizado.

A montagem do reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm² foi idêntica a do reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm², apresentado anteriormente, exceto em relação à faixa de pressão empregada.

5.3.4.2 Operação do reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm².

O reator foi alimentado com água residuária sintética contendo fenol na faixa de concentração de 595 a 710 mg / L e operou por 17 dias consecutivos. Amostras de 100 mL foram coletadas diariamente para determinação da concentração de fenol, DQO, massa celular seca e atividades enzimáticas.

Nas Tabelas 10.7 e 10.8 do Capítulo 10 estão apresentados os dados concernentes a operação do reator. As Figuras 5.9 e 5.10 mostram as variações das concentrações de fenol e DQO no reator, respectivamente, através dos dados de eficiência de remoção de fenol ou DQO e produtividade volumétrica de remoção de fenol ou DQO.

O reator de mistura pressurizado foi submetido a diferentes valores de tempo de detenção hidráulica, entre 10 a 65 h. A carga orgânica removida do reator medida em termos da produtividade volumétrica de remoção de fenol variou entre 10 e 55 mg / L h.

Considerando-se os primeiros 6 dias de operação do reator, a concentração de fenol no afluente foi mantida na faixa de 600 a 650 mg / L e a eficiência de remoção de fenol foi de aproximadamente 100 %. Entre o 5º e o 8º dia de operação do reator, o tempo de detenção hidráulica foi de 10 h e foi obtido o valor máximo da produtividade volumétrica de remoção de fenol de 55 mg / L h no 6º dia de operação. Nos dois dias seguintes, a eficiência de remoção de fenol e a produtividade volumétrica de remoção de fenol foram reduzidas drasticamente, de 95 para 50 % e de 55 para 30 mg / L h, respectivamente. A massa celular seca obtida no efluente nestes dois dias foram de 180 e 122 mg / L, respectivamente. Estes valores foram da mesma ordem de grandeza dos valores de massa celular seca obtida nos dias anteriores, portanto a queda de eficiência de remoção de fenol não foi atribuída à lavagem das células e sim a inibição ocasionada pelo fenol às células.

Nos dias 9 e 10 de operação do reator, a bomba positiva que alimentava o reator apresentou problema de entupimento, sendo que a vazão foi reduzida drasticamente, o que provocou aumento do tempo de detenção hidráulica para, aproximadamente, 60 h nestes dois dias. A partir do 11º dia de operação do reator, o tempo de detenção hidráulica foi mantido por volta de 15 h e a concentração de fenol no afluente em, aproximadamente, 650 mg / L. A produtividade volumétrica de remoção de fenol no 14º dia atingiu o valor de 50 mg / L h e a eficiência de remoção de fenol foi de 90 %, mas estes valores começaram a declinar nos dias seguintes, portanto o sistema biológico saiu do estado estacionário após o 15º dia de operação, o que pode ser constatado pela queda na eficiência de remoção de fenol do reator, para o valor de 20 % no último dia de operação e pela massa celular seca que decresceu de 280 mg / L no 14º dia para 33 e 20 mg / L nos últimos dois dias de operação do reator, respectivamente. Portanto nos últimos dias de operação do reator ocorreu a lavagem de células do reator.

Durante todo período de operação do reator a eficiência de remoção de DQO ficou entre 50 e 90 % e a produtividade volumétrica de remoção de DQO variou dentro da faixa de 10 a 100 mg / L h. As curvas de produtividade volumétrica de remoção de DQO e de eficiência de remoção de DQO em função do tempo de operação tiveram comportamentos análogos às curvas de produtividade volumétrica de remoção de fenol e de eficiência de remoção de fenol, respectivamente.

O reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm² apresentou valores de produtividade volumétrica de remoção de fenol por volta de 35 mg / L h, enquanto o reator de mistura a pressão ambiente apresentou um valor médio de produtividade volumétrica de remoção de fenol de, aproximadamente, 20 mg / L h. Comparando-se as respostas dos reatores de mistura pressurizados entre 0,6 e 1,0 kgf / cm² e entre 1,3 e 1,5 kgf / cm² verificou-se que o reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm² apresentou melhores valores do binômio produtividade volumétrica de remoção de fenol e eficiência de remoção de fenol.

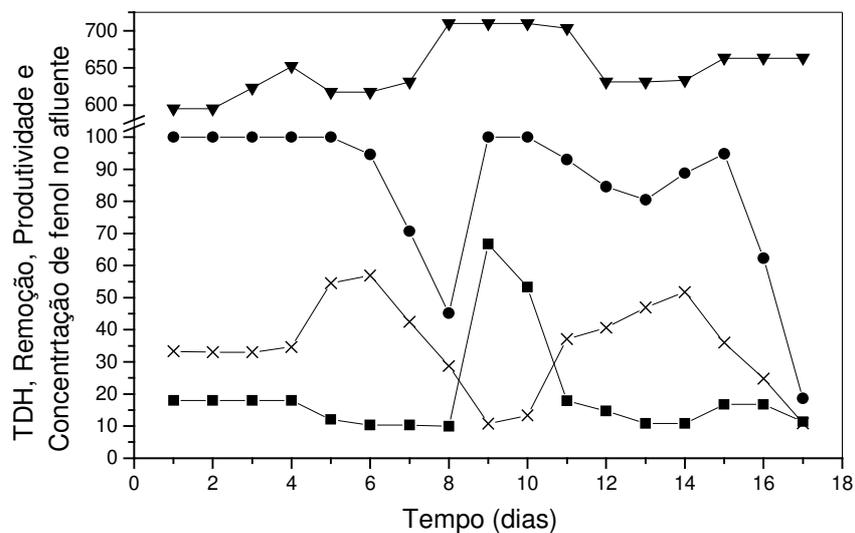


Figura 5.9. Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).

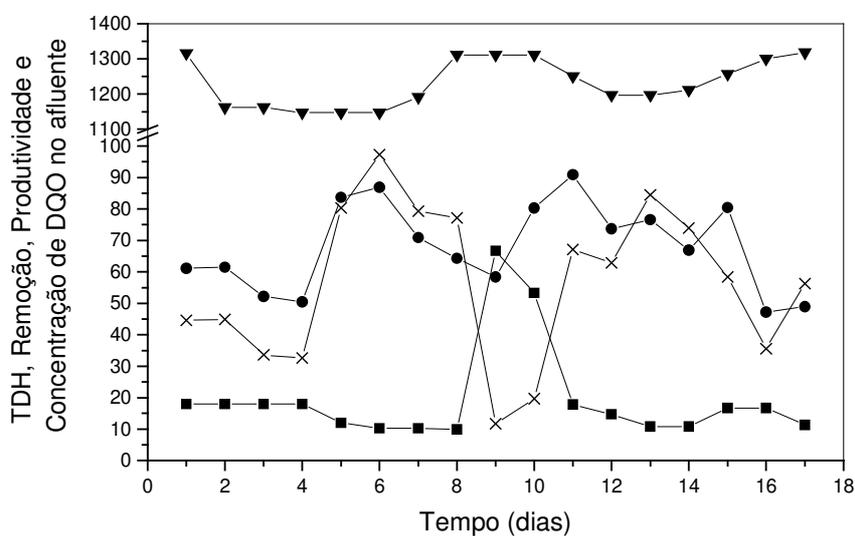


Figura 5.10. Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).

5.3.5 Reator “air-lift” pressurizado.

5.3.5.1 Montagem do reator “air-lift” pressurizado entre 1,0 e 1,5 kgf / cm².

O reator “air-lift” pressurizado foi constituído por uma coluna de aço inox, com diâmetro interno de 5 cm, altura de 100 cm e volume líquido de 1,6 L. Dentro desta coluna foi colocado outro tubo de aço inox de diâmetro interno de 2,5 cm e altura de 90 cm, que ficava apoiado na base do reator numa peça de náilon cônica, com uma pedra porosa em seu centro responsável pela distribuição homogênea do ar no interior desta coluna. O tubo de maior diâmetro ainda foi encamisado por outro tubo de aço inox de diâmetro interno de 9 cm, sendo que no espaço anular entre os tubos escoava água que permitiu o controle de temperatura do reator.

O topo do reator tinha a configuração cônica e uma parte cilíndrica de diâmetro de 25 cm com altura de 20 cm, com uma tampa que possibilitou a instalação de um manômetro, de uma válvula de alívio para manter a pressão no interior do reator por volta de 1,0 kgf / cm², e de dois fios de latão de 3 mm de diâmetro com 35 cm de altura que eram posicionados no interior do tubo de 5 cm de diâmetro e responsáveis pelo acionamento da válvula solenóide situada no corpo do reator na altura de 70 cm. Portanto através destes dois fios de latão foi ajustado o nível de líquido no interior do reator.

A Figura 5.11 mostra o esquema geral da instalação do reator “air-lift” pressurizado.

A água residuária sintética foi acondicionada em béquer de 5 L e mantida em banho refrigerado a 5 °C, enquanto era bombeada para o interior do reator pela sua base por uma bomba positiva que funcionava intermitentemente, pois estava ligada a um temporizador, para promover a vazão de afluente desejada.

A aeração do reator foi promovida pela vazão de ar, fornecida por um compressor, e aplicada na base do reator através da pedra porosa posicionada no interior do tubo cilíndrico interno de diâmetro de 2,5 cm. A medição da vazão de ar que ingressava no reator era feita através de um rotâmetro e variou entre 0,1 e 0,3 L / min.

Na camisa do reator era escoada água a 30 °C proveniente de um banho termostático por uma bomba centrífuga.



Figura 5.11. Reator “air-lift” pressurizado.

5.3.5.2 Operação do reator “air-lift” pressurizado.

Durante a fase experimental o reator “air-lift” pressurizado foi submetido a diferentes valores de tempo de detenção hidráulica entre 12 a 50 h e de concentração de fenol no afluente, na faixa de 600 a 2300 mg / L. A carga orgânica removida do reator, medida em termos de produtividade volumétrica de remoção de fenol do reator variou entre 5 a 60 mg de fenol / L.

O reator “air-lift” pressurizado entre 1,0 e 1,5 kgf / cm² teve a máxima remoção de fenol de 100 % durante as faixas de tempo de operação de 3 a 11 dias e 45 a 53 dias. Valores de produtividade volumétrica de remoção de fenol maiores de 50 mg / L h foram

obtidos nos tempos de operação do reator de 17, 18, 29, 30, 54, 55, 57 e 58 dias. O tempo total de operação deste reator foi de 64 dias.

Nas Tabelas 10.9 e 10.10 do Capítulo 10 estão apresentados os dados concernentes à operação deste reator. As Figuras 5.12 e 5.13 mostram as variações das concentrações de fenol e DQO, respectivamente, através dos dados de eficiência de remoção de fenol ou DQO e produtividade volumétrica de remoção de fenol ou DQO, respectivamente.

Nos primeiros 10 dias de operação o reator “air-lift” teve concentração de fenol no afluente praticamente constante entre 650 a 700 mg / L, o tempo de detenção hidráulica permaneceu em 48 h nos primeiros quatro dias de operação e passou para faixa de 15 a 22 h entre os dias 5 e 18 de operação do reator. Desconsiderando-se os dois primeiros dias de operação do reator, a eficiência de remoção de fenol do reator foi de 100 % nos 8 primeiros dias de operação. Na faixa de tempo de 10 a 13 dias de operação do reator, a eficiência de remoção de fenol declinou até 70 % devido ao aumento na concentração de fenol do afluente, que passou para faixa de 1250 a 1300 mg / L. Com isso a produtividade volumétrica de remoção de fenol do reator aumentou para faixa de 40 a 50 mg de fenol / L h. Quando a eficiência de remoção de fenol do reator voltou a ser praticamente 100 % entre os dias 13 e 17, a produtividade volumétrica de remoção de fenol atingiu seu valor máximo de 55 mg de fenol / L h.

Entre o tempo de operação de 20 a 40 dias, o tempo de detenção hidráulica permaneceu entre a faixa de 32 a 36 h, a concentração de fenol no afluente variou dentro da faixa de 1600 a 1800 mg / L, excetuando-se o dia 22 de operação, quando a concentração de fenol no afluente foi de 2000 mg / L. Nos dias de operação 30 a 31, a eficiência do reator na remoção de fenol foi de 99 %, enquanto a produtividade volumétrica de remoção de fenol permaneceu por volta de 50 mg de fenol / L h. A partir do dia 32 de operação, a eficiência de remoção de fenol começou a declinar e permaneceu na faixa de 80 a 95 % até o dia 40 de operação. Então, foi diminuída a concentração de fenol no afluente para faixa de 1000 a 1200 mg / L entre os dias 40 e 49 de operação do reator, visando aumentar a eficiência de remoção de fenol no reator para valores próximos a 100 %. O que, de fato, ocorreu, pois do dia 44 até o dia 56 de operação do reator a eficiência de remoção de fenol no reator foi superior a 95 %, mesmo quando, a partir do dia 48, a concentração de fenol no afluente foi aumentada para 1500 mg / L.

Na faixa de tempo de operação do reator de 53 a 56 dias, o mesmo sofreu uma variação do tempo de detenção hidráulica muito grande, de 30 a 50 h devido à ocorrência de seguidos problemas de falta de energia elétrica, que promoveram várias interrupções da operação contínua do reator, durante as quais o sistema biológico permanecia várias horas seguidas sem a oxigenação adequada e sem alimentação do afluente no reator. A partir do tempo de operação de 62 dias o tempo de detenção hidráulica foi mantido em 30 h e o valor da concentração de fenol no afluente em 2000 mg / L, com isso ocorreu uma diminuição na eficiência de remoção de fenol no reator para valores em torno de 70 % e a produtividade volumétrica de remoção de fenol ficou na faixa de 30 a 35 mg de fenol / L h. Portanto o reator “air-lift” foi capaz de operar com alta carga orgânica (2000 mg / L) no afluente, sem que sua eficiência de remoção de fenol fosse drasticamente afetada. Em parte isso pode ser atribuído ao efeito de adaptação do sistema biológico ao fenol que é altamente tóxico às células.

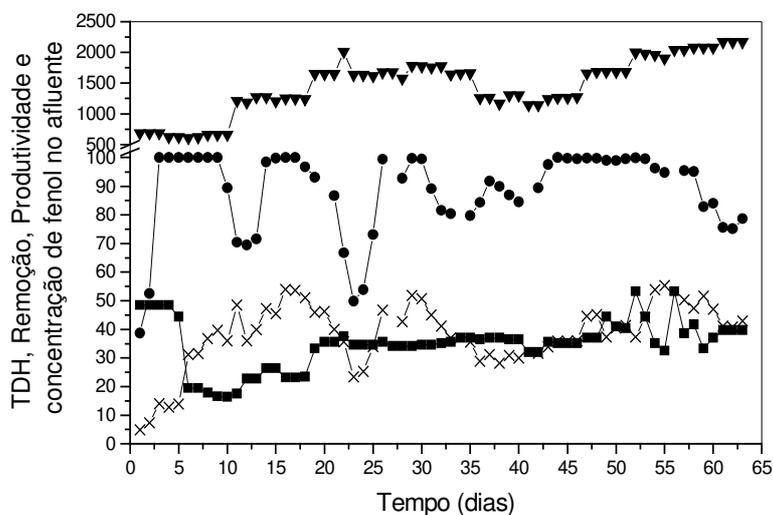


Figura 5.12. Reator “air-lift” pressurizado entre 1 e 1,5 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg / L h) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).

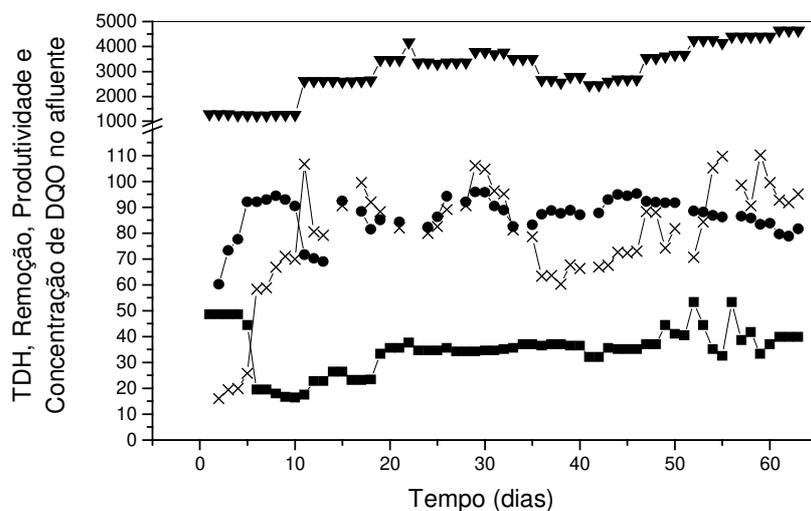


Figura 5.13. Reator “air-lift” pressurizado entre 1 e 1,5 kgf / cm². —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg / L h) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).

5.3.6 Reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado.

5.3.6.1 Montagem do reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado.

O reator “air-lift” pressurizado do ensaio anterior em seu 65º dia de operação foi desmontado e recebeu 60 g de carvão ativado com células de levedura imobilizadas, o volume de meio contido no reator de aproximadamente 1600 mL foi aproveitado para o ensaio contínuo com reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado, portanto a montagem do reator foi análoga a do ensaio anterior, sendo mantidas as mesmas condições de operação, de 0,3 L / min de aeração, temperatura do reator mantida em 30° C e a vazão de alimentação sendo intermitente, proporcionando um tempo de detenção hidráulico de aproximadamente 35 h a partir do 10º dia de operação do reator.

5.3.6.2 Operação do reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado.

Durante a fase experimental o reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado foi submetido a valores de tempo de detenção hidráulica entre 30 a 50 h e de concentração de fenol no afluente, na faixa de 600 a 1400 mg / L. A carga orgânica removida do reator, medida em termos de produtividade volumétrica de remoção de fenol do reator variou entre 15 a 43 mg de fenol / L.

O reator “air-lift” com carvão ativado permaneceu pressurizado dentro da faixa de 1,0 a 1,5 kgf / cm² durante 50 dias e teve a máxima eficiência de remoção de fenol de aproximadamente 100 % nos cinco primeiros dias de operação, durante o 24° e 31° dias e 39° e 46° dias de operação do reator. A máxima produtividade volumétrica de remoção de fenol obtida foi de 43 mg / L h após 31 dias de operação do reator. O tempo total de operação deste reator foi de 50 dias, sendo que na maior parte deste tempo o reator operou com tempo de detenção hidráulico de 35 h.

Nas Tabelas 10.11 e 10.12 do Capítulo 10 estão apresentados os dados concernentes à operação deste reator. As Figuras 5.14 e 5.15 mostram as variações das concentrações de fenol e DQO, respectivamente, através dos dados de eficiência de remoção de fenol ou DQO e produtividade volumétrica de remoção de fenol ou DQO, respectivamente.

Entre os dias 20 e 22 de operação do reator a concentração de fenol no afluente foi de 1179 mg / L e a eficiência de remoção de fenol começou a declinar até atingir 60 % no 22° dia de operação, então foi diminuída a concentração de fenol no afluente para 714 mg / L para obter maiores valores de eficiência de degradação de fenol, o que de fato foi alcançado, pois entre o 25° dia de operação do reator de o 30° dia a eficiência de remoção de fenol foi de 100 %.

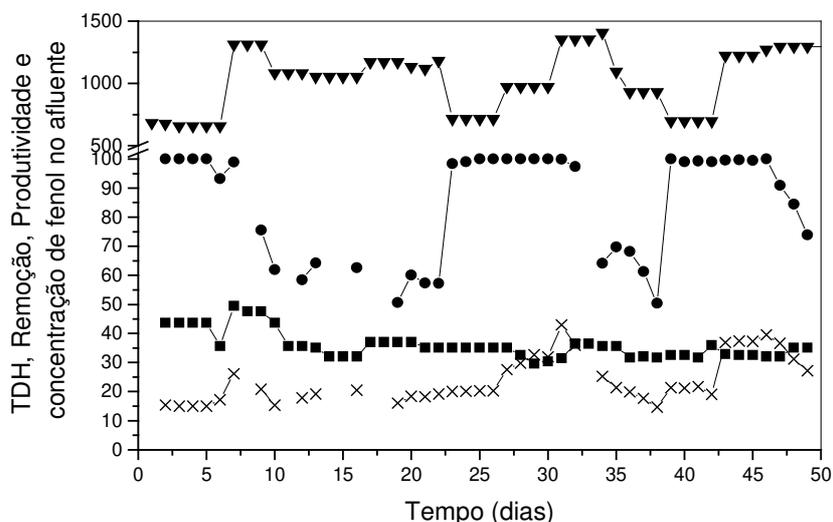


Figura 5.14. Reator “air-lift” pressurizado a $1,0 - 1,5 \text{ kgf} / \text{cm}^2$, com carvão ativado. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%), —x— produtividade volumétrica de remoção de fenol ($\text{mg} / \text{L h}$) e —▼— concentração de fenol no afluente (mg / L).

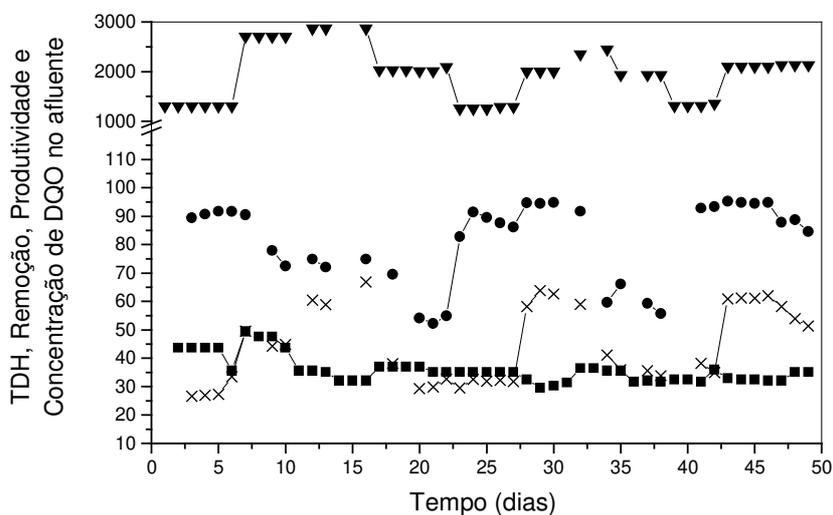


Figura 5.15. Reator “air-lift” pressurizado a $1,0 - 1,5 \text{ kgf} / \text{cm}^2$, com carvão ativado. —■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%), —x— produtividade volumétrica de remoção de DQO ($\text{mg} / \text{L h}$) e —▼— concentração de DQO no afluente (mg / L).

O reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado foi mais instável operacionalmente do que o reator “air-lift” pressurizado do ensaio anterior, o que pode ser constatado observando-se as curvas de eficiência de remoção de fenol para os dois reatores, uma vez que sempre fora intencionado manter o reator em estado estacionário com valores de eficiência de remoção de fenol em aproximadamente 100 %. No reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado a curva de eficiência de remoção de fenol permaneceu menos tempo em seu valor máximo de 100 %, em relação à mesma curva do ensaio com reator “air-lift” pressurizado.

As partículas de carvão nos dias de operação 22 a 24 entupiram a válvula solenóide, de modo que a mesma permaneceu aberta a passagem de meio e ar, portanto nestes dias o reator operou despressurizado, para evitar que partículas de carvão atingissem a válvula solenóide foi colocado um retentor de vidro e uma mangueira de silicone em forma de (U) entre o reator e a válvula, assim evitou-se que a mesma apresentasse problemas novamente.

De um modo geral a presença de carvão ativado no reator não produziu o efeito desejado de aumento da produtividade volumétrica de degradação de fenol em relação ao ensaio anterior, que foi feito no mesmo reator e sob as mesmas condições de operação. Para o ensaio em reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado os valores de produtividade volumétrica de degradação de fenol ficaram por volta de 20 mg / L h na maior parte do tempo de operação do reator, a máxima concentração de fenol no afluente atingida com o reator operando em estado estacionário foi de 1500 mg / L, enquanto que no ensaio anterior em reator “air-lift” pressurizado esses valores permaneceram por volta de 30 mg / L h e conseguiu-se atingir valores de fenol no afluente de até 2000 mg / L com o reator operando em estado estacionário. O que pode ter contribuído para ocasionar um menor rendimento do reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado em relação ao reator “air-lift” pressurizado foi à sedimentação das partículas de carvão ativado dentro do reator, pois no decorrer do experimento provavelmente as partículas de carvão foram decantando na base do reator e propiciaram uma zona morta dentro do reator, diminuindo a capacidade para reter massa celular viável dentro do reator, fato esse observado quando o reator foi desmontado, pois se verificou a presença de carvão ativado compactado na base do reator.

CAPÍTULO 6

QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

6.1 Introdução.

O sistema enzimático extracelular dos fungos de degradação branca tem sido bastante estudado devido ao fato destas enzimas não ter especificidade a um único substrato, agindo sobre diversos compostos aromáticos (COLLINS & DOBSON, 1999).

A degradação de compostos policíclicos aromáticos por fungos lignolíticos ocorre pela ação de um conjunto de enzimas tais como peroxidase, lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase, tirosinase e enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio (AITKEN *et al.*, 1989).

A lacase é uma enzima glicoprotéica muito difundida na natureza que contém cobre em seu sítio ativo e não requer peróxido de hidrogênio como ativador da reação. Quando produzidas por fungos, agem polimerizando ou oxidando compostos fenólicos e quando produzidas por plantas, atuam na lignificação. A lacase fúngica oxida estruturas fenólicas pela abstração de um elétron com formação de radicais fenoxila, os quais podem ser convertidos a quinonas, formando complexos amorfos e insolúveis através da polimerização dos compostos fenólicos (THURSTON, 1994).

A tirosinase é uma enzima que contém cobre em seu sítio ativo e não requer peróxido de hidrogênio para atuar em substratos fenólicos e catecólicos, oxidando-os até quinona. Em geral, as tirosinases são enzimas intracelulares (THURSTON, 1994; KROL & BOLTON, 1997).

As peroxidases fúngicas envolvidas na degradação de compostos aromáticos possuem atividades semelhantes às da peroxidase de raiz forte (HRP) e são responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos e hidroxilação de compostos aromáticos (MAJCHERCZYK *et al.*, 1998).

A lignina peroxidase (LiP) é uma glicoproteína contendo ferro no seu grupo prostético, dependente de peróxido de hidrogênio, que catalisa a oxidação de compostos fenólicos em meio fortemente ácido através da remoção de um elétron do núcleo aromático, produzindo radicais catiônicos arila, os quais posteriormente, através de uma série de reações não enzimáticas, darão origem aos produtos finais (HATTAKA, 1994).

A manganês peroxidase (MnP) é uma glicoproteína com ferro no grupo prostético, sendo ativa em pH próximo de 5 e dependente de peróxido de hidrogênio e íons de Mn^{++} ,

os quais são oxidados a Mn^{+++} , que por sua vez oxidam substratos como fenol, aminas e corantes aromáticos (BANCI *et al.*, 1999).

Neste trabalho, foram quantificadas as atividades das enzimas peroxidase, lacase, tirosinase, lignina peroxidase e manganês peroxidase nas amostras de efluente coletadas dos ensaios contínuos de degradação de fenol, após sofrerem filtração em membrana Millipore de 0,22 μm para separação das células, uma vez que essas enzimas estão relacionadas com a degradação de compostos fenólicos.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1. Quantificação da atividade enzimática.

O cálculo para quantificação da atividade enzimática foi realizado através da equação apresentada abaixo, onde uma unidade de atividade enzimática (U) representa a oxidação de 1 μmol de substrato por minuto de reação.

$$\frac{\Delta Abs * 10^6}{E * R * t} = \text{Atividade enzimática} \left(\frac{U}{L * \text{min}} \right)$$

Onde: ΔAbs = Absorbância final - Absorbância inicial;

E = coeficiente de absorção molar;

R = Volume da amostra (mL);

t = tempo de reação (min);

10^6 = fator de conversão de unidade para litro (L);

A unidade da atividade enzimática é: U / L min.

6.2.2. Determinação das atividades enzimáticas.

6.2.2.1 Lacase

A atividade da lacase foi determinada adicionando-se 0,6 mL da amostra filtrada numa cubeta de espectrofotômetro. Em seguida, foram adicionados mais 0,1 mL de siringaldazina 1 mM em álcool; 0,2 mL de tampão citrato fosfato (0,05 M e pH 5,0) e 0,1 mL de água destilada.

A oxidação da siringaldazina ($E_{525\text{nm}} = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) até sua forma de quinona foi acompanhada por 10 minutos de reação a temperatura ambiente sendo a absorbância lida em espectrofotômetro UV – VIS a 525 nm. A atividade enzimática foi expressa em U / L min (SZKLARZ *et al.*, 1989 - modificado).

6.2.2.2 Peroxidase.

A atividade da peroxidase foi determinada como a atividade da lacase, excetuando-se que no lugar de 0,1 mL de água destilada foi colocado 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. A atividade enzimática foi expressa em U / L min.

6.2.2.3 Tirosinase.

A atividade de tirosinase foi determinada utilizando-se 0,1 mL de L-tirosina (1,0 mM) como substrato. A oxidação deste substrato em 0,6 mL de amostra filtrada e 0,2 mL de solução tampão fosfato em pH 7,0 até dihidroxifenilalanina foi acompanhada pelo aumento de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro UV – VIS por 10 minutos a temperatura ambiente. A atividade enzimática foi expressa em U / L min (SUGUMARAN & BOLTON, 1998 - modificado).

6.2.2.4 Lignina peroxidase.

A atividade da lignina peroxidase foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico ($E_{310\text{nm}} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura da reação continha 0,6 mL de amostra filtrada, 0,2 mL de solução de álcool veratrílico 0,2 mM em tampão tartarato de sódio (0,4 M e pH 3,0). A reação iniciou-se com a adição de 0,2 mL peróxido de hidrogênio 2 mM e acompanhou-se a oxidação do álcool veratrílico pela medida de

absorbância a 310 nm em espectrofotômetro UV – VIS por 10 minutos a temperatura ambiente. A atividade enzimática foi expressa em U / L min (TIEN & KIRK, 1984).

6.2.2.5 Álcool veratrílico oxidase.

A atividade da enzima álcool veratrílico oxidase foi determinada da mesma forma que para a atividade da lignina peroxidase, excetuando-se pelo fato de ter sido substituído o peróxido de hidrogênio 2 mM por 0,2 mL de água destilada.

6.2.2.6 Manganês peroxidase.

A atividade da enzima manganês peroxidase foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol ($E_{610nm} = 4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na presença de íons Mn^{++} e peróxido de hidrogênio. A mistura reacional continha 0,5 mL da amostra filtrada, 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5 %, 0,05 mL de MnSO_4 2 mM, 0,05 mL de peróxido de hidrogênio 2,0 mM em tampão succinato de sódio (0,2 M e pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 1 %. Determinou-se a absorbância no tempo zero e, após 5 minutos, interrompeu-se a reação pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N e determinou-se novamente a absorbância a 610 nm. A atividade enzimática foi expressa em U / L min.

Para controle, utilizou-se amostra tratada durante 30 minutos a 100 °C (KUWAHARA *et al.*, 1984 - modificado).

6.3. Resultados e Discussão.

Em todos os ensaios contínuos, foram selecionadas algumas amostras para determinação de atividade das enzimas lacase, peroxidase, tirosinase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase. As enzimas lignina peroxidase e álcool veratrílico oxidase não apresentaram atividade em nenhuma das amostras investigadas; as enzimas lacase e peroxidase apresentaram valores de atividades enzimáticas inferiores a 0,4 U / L min e a enzima manganês peroxidase apresentou valores de atividade entre 0,1 e 4,0 U / L min. Não foi possível determinar a atividade da enzima tirosinase, uma vez que as

amostras se apresentaram instáveis e ocasionaram uma grande variação na leitura de absorbância do espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm.

Os gráficos a seguir mostram os valores de atividades enzimáticas para as enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase, nas amostras coletadas dos ensaios contínuos de degradação de fenol.

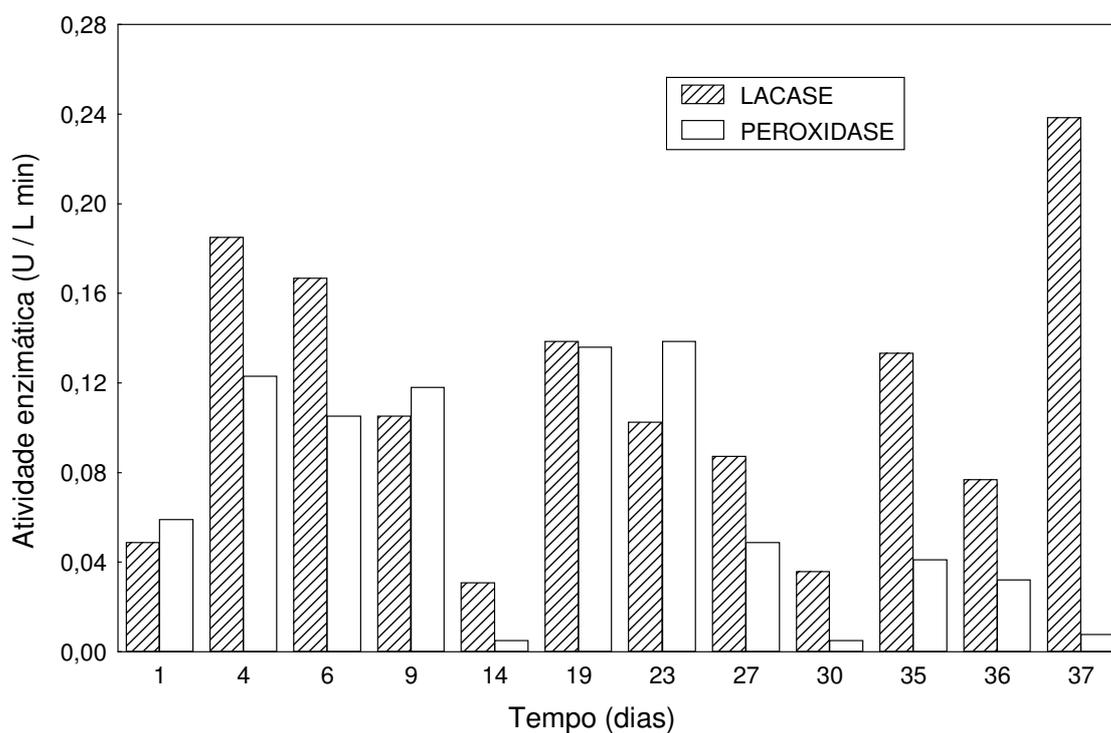


Figura 6.1. Reator de mistura, atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.

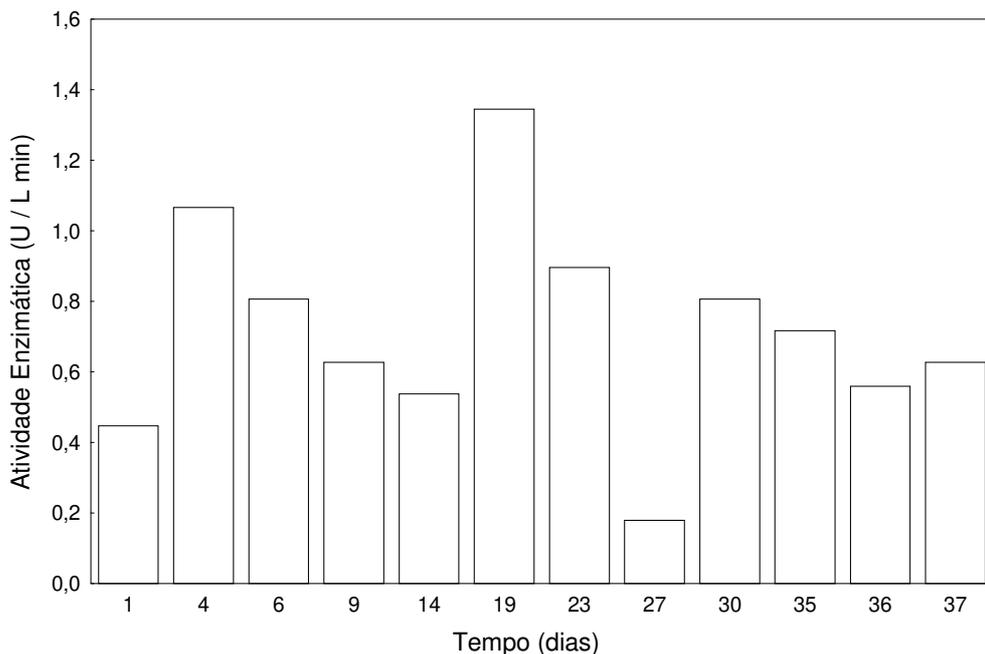


Figura 6.2. Reator de mistura, atividade enzimática da manganês peroxidase.

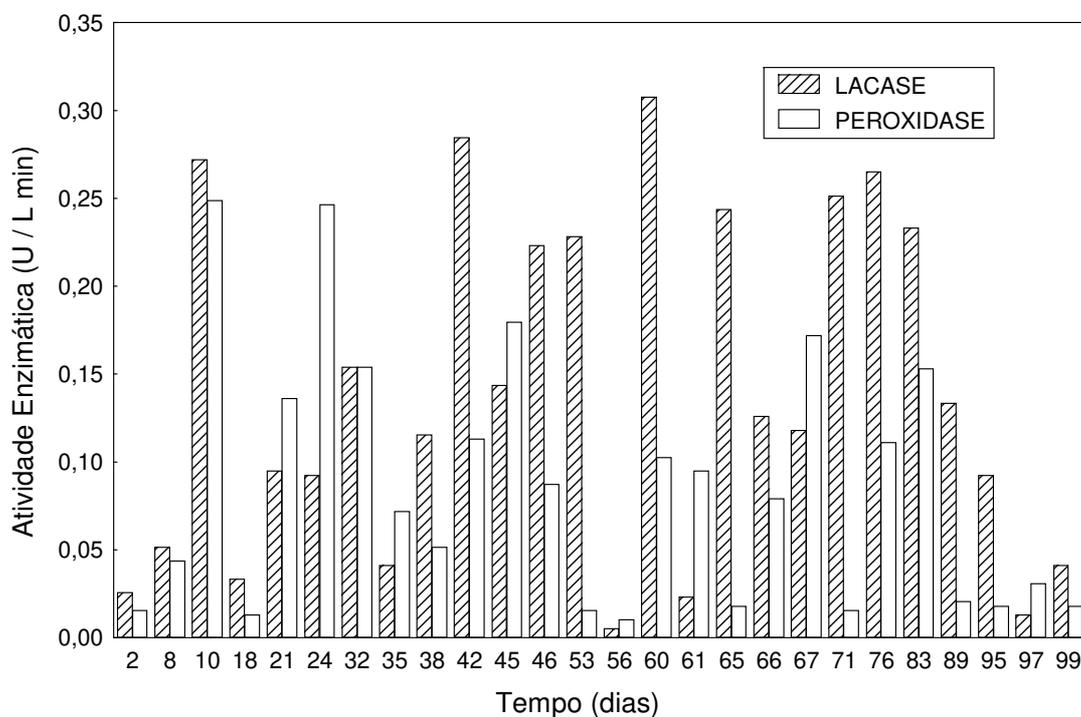


Figura 6.3. Reator de leito fluidizado com carvão ativado, atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.

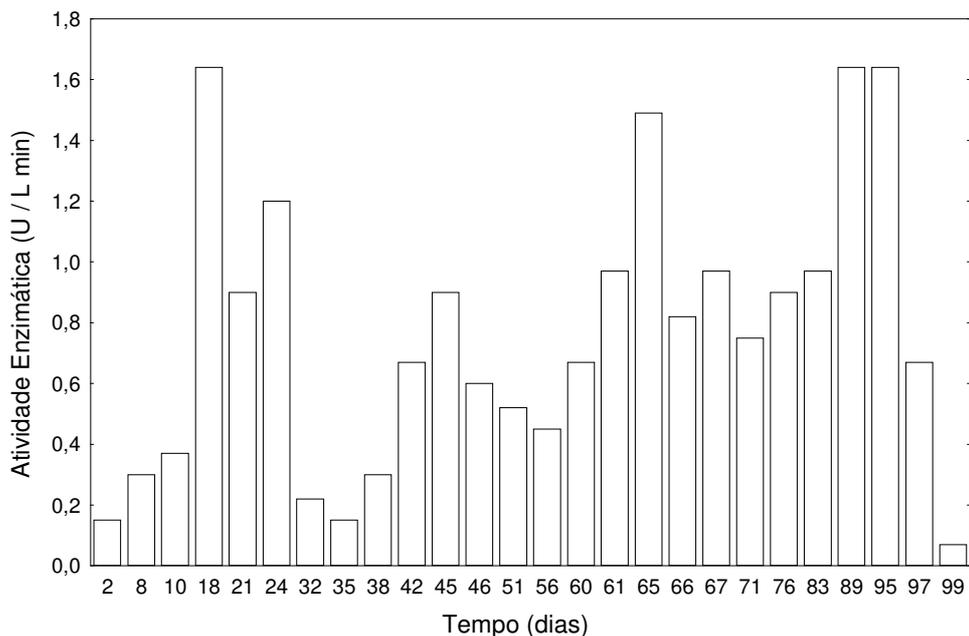


Figura 6.4. Reator de leito fluidizado com carvão ativado, atividade enzimática da manganês peroxidase.

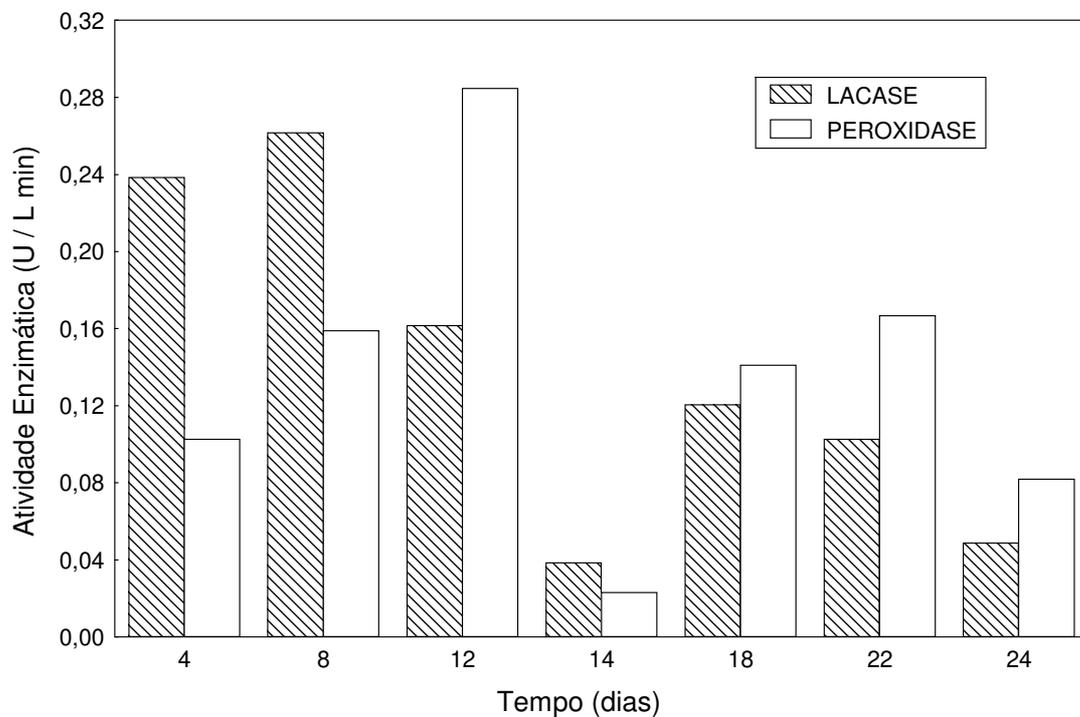


Figura 6.5. Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm², atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.

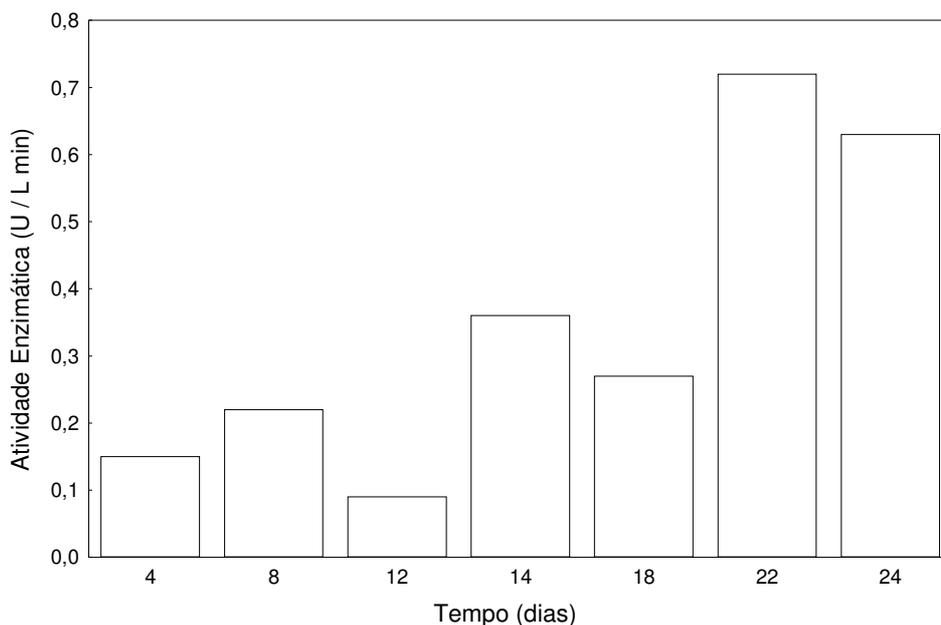


Figura 6.6. Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm². Atividade enzimática da manganês peroxidase.

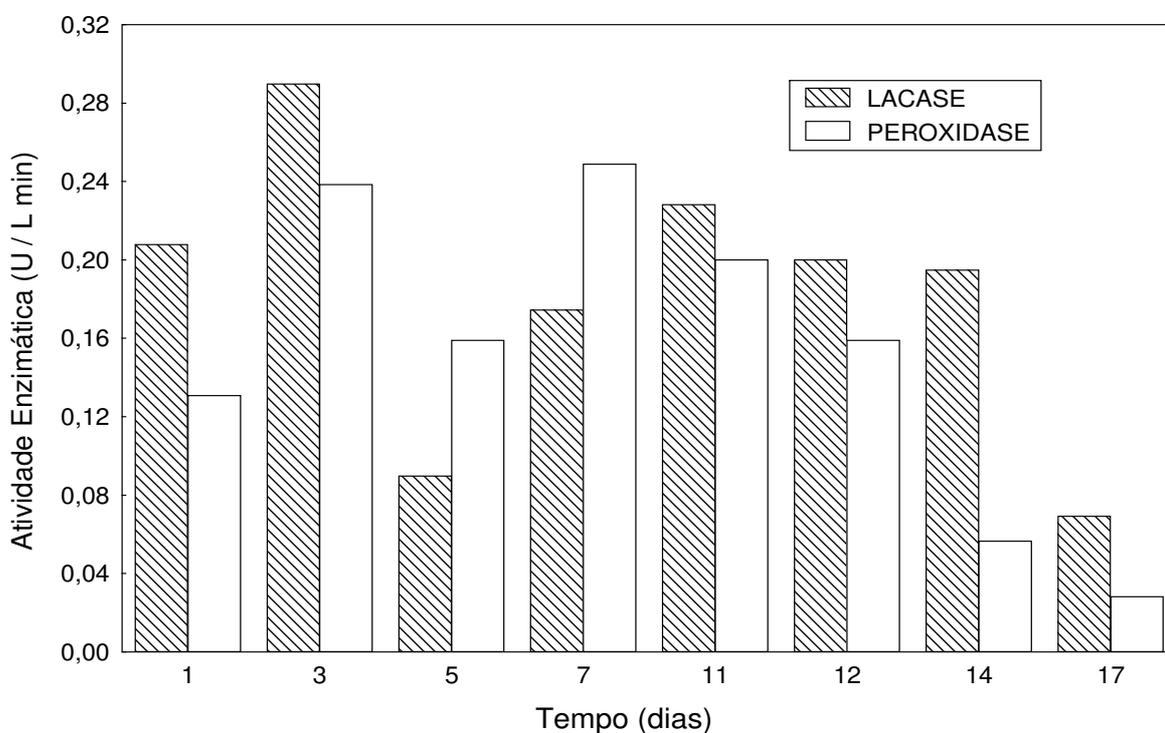


Figura 6.7. Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm², atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.

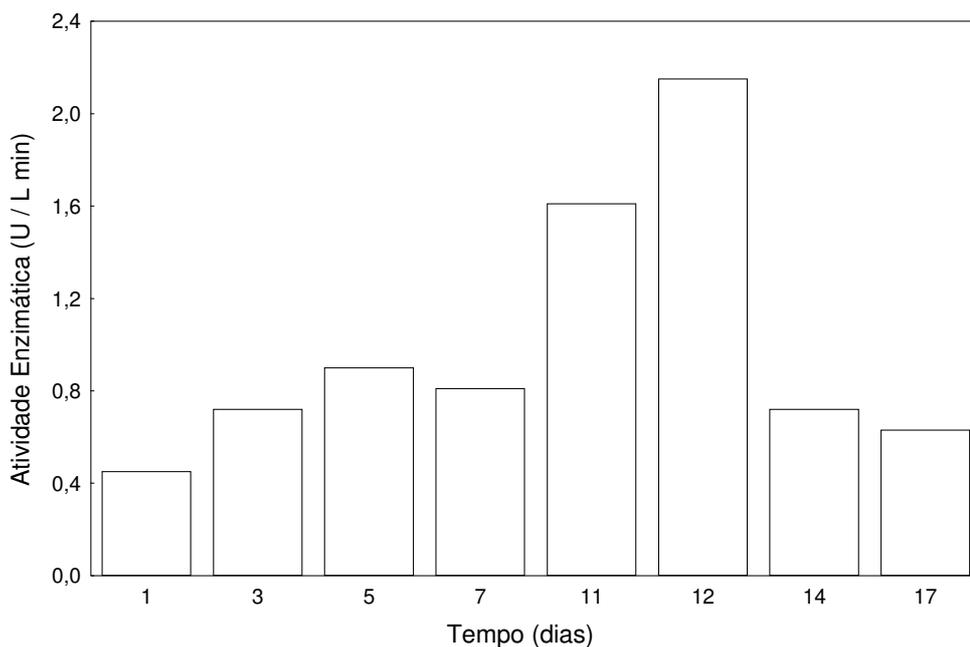


Figura 6.8. Reator de mistura pressurizado entre 1,3 e 1,5 kgf / cm², atividade enzimática da manganês peroxidase.

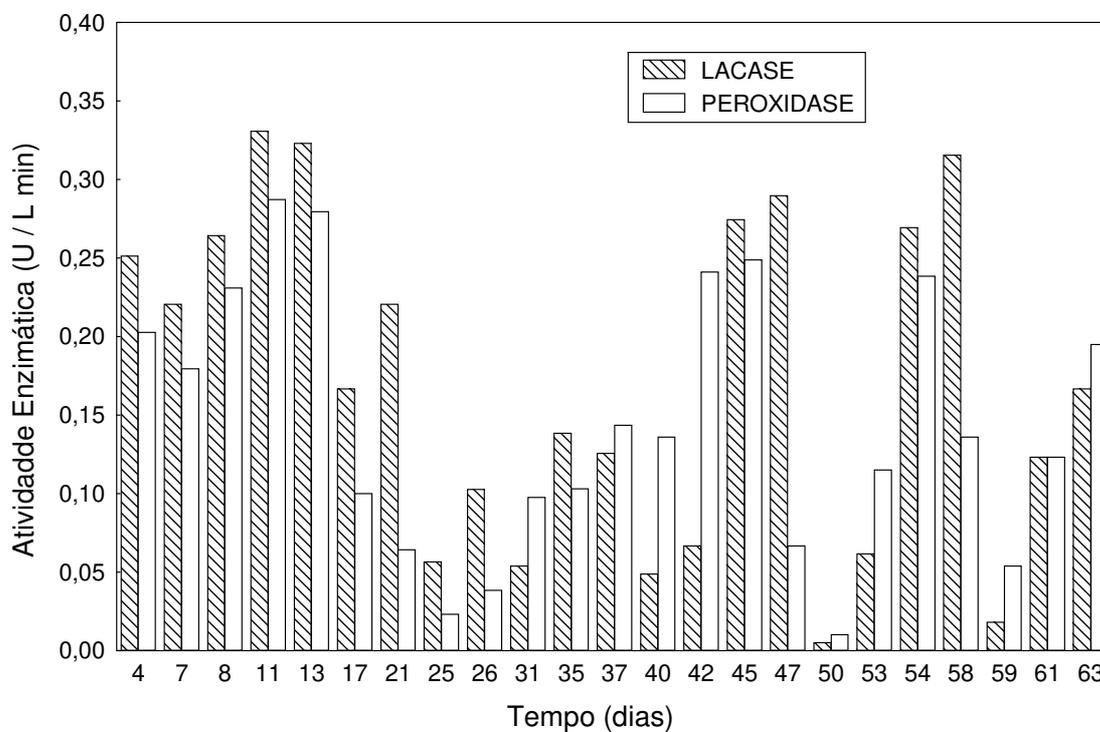


Figura 6.9. Reator “air-lift” pressurizado entre 1,0 e 1,5 kgf / cm², atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.

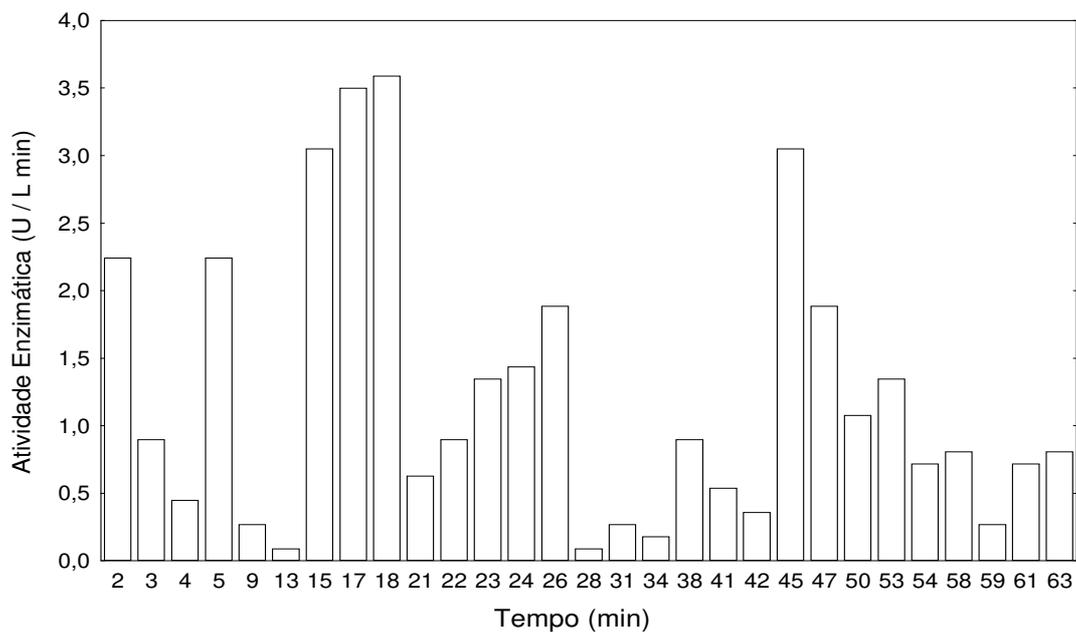


Figura 6.10. Reator “air-lift” pressurizado entre 1,0 e 1,5 kgf / cm², atividade enzimática da manganês peroxidase.

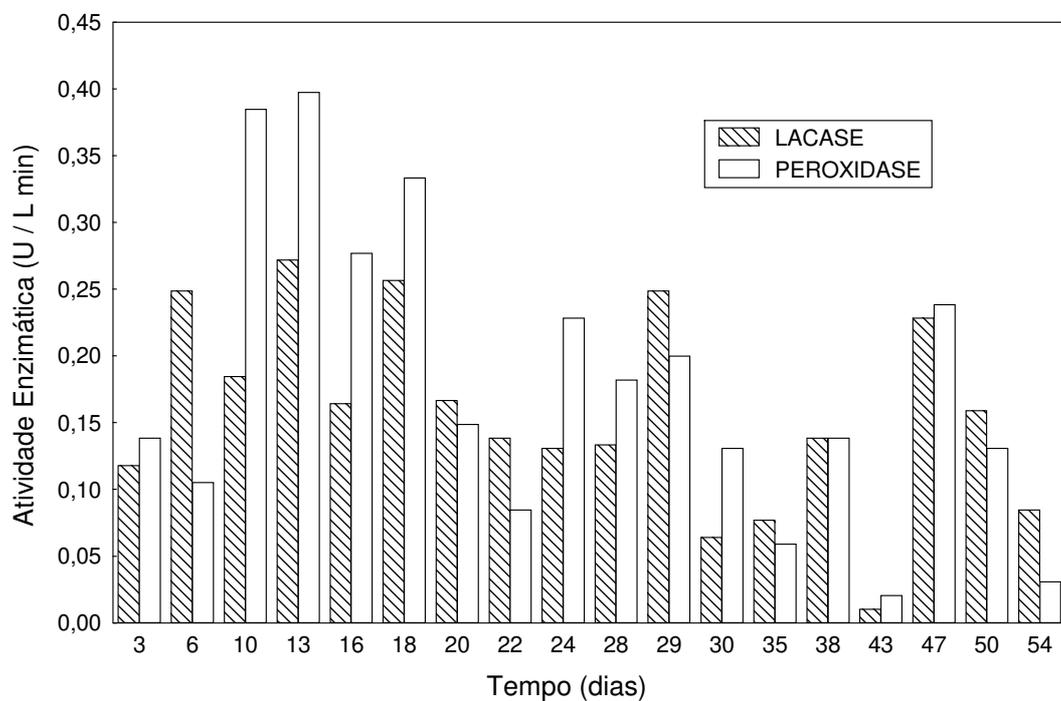


Figura 6.11. Reator “air-lift” pressurizado a 1,0 – 1,5 kgf / cm², com carvão ativado, atividade enzimática das enzimas lacase e peroxidase.

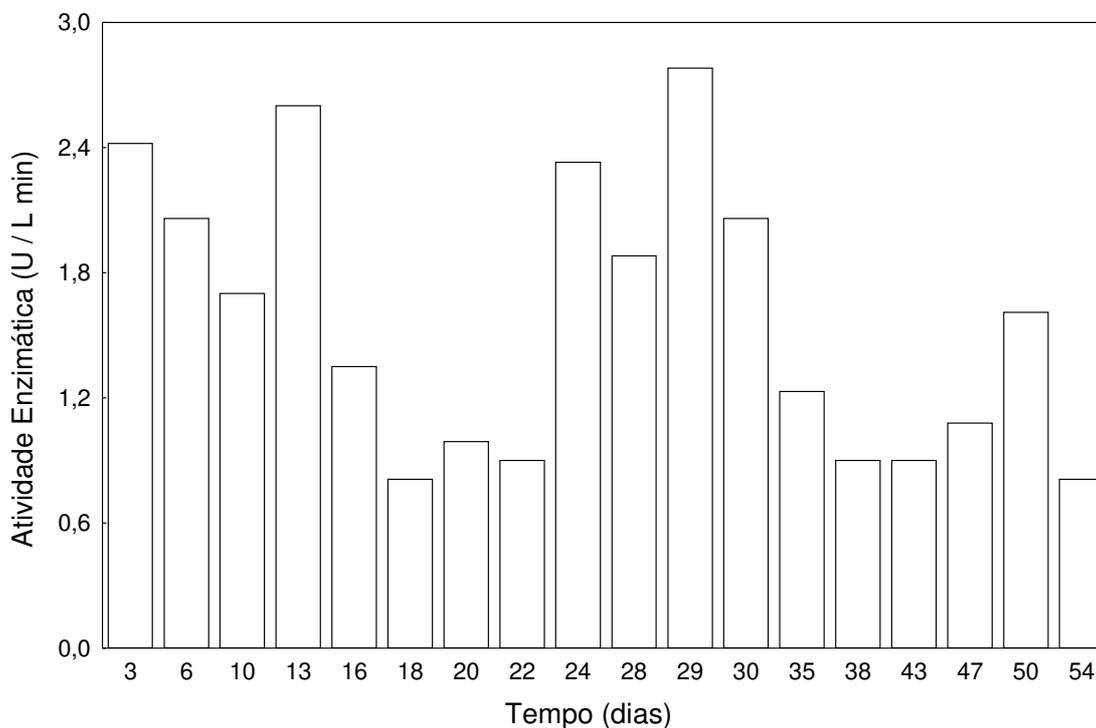


Figura 6.12. Reator “air-lift” pressurizado a 1,0 – 1,5 kgf / cm², com carvão ativado, atividade enzimática da manganês peroxidase.

FALCONI (1998) estudou a biodegradação de fenol por duas linhagens fúngicas (897 e 898), não identificadas, e o fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Em ensaios executados em frascos de Erlenmeyer com as culturas puras em meio nutriente líquido sintético contendo 500, 1000 e 5000 mg / L de fenol como única fonte de carbono, foram medidas as atividades das enzimas peroxidase, lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase e álcool veratrílico oxidase, para os tempos de 3, 7 e 10 dias de crescimento dos fungos. Durante o crescimento dos três fungos, verificou-se que para as três concentrações de fenol investigadas nenhum apresentou atividade das enzimas lignina peroxidase e álcool veratrílico oxidase, exceto a linhagem número 898 que para enzima álcool veratrílico oxidase apresentou atividade de 0,12 e 0,19 U / L min após 10 dias de crescimento em meio nutriente com oxigenação contendo 1000 e 5000 mg / L de fenol, respectivamente. Comparando-se os resultados de atividade das enzimas lacase e peroxidase, quando as três linhagens cresceram sob diferentes condições de cultivo, constatou-se que a presença ou

não de agitação e oxigenação não afetou de maneira significativa a produção enzimática, portanto os fungos produziram enzimas com atividades semelhantes sob diferentes condições de cultivo. Nos ensaios onde se utilizou 5000 mg / L de fenol como fonte de carbono foram verificadas as maiores atividade para a enzima manganês peroxidase de 5 U / L min, enquanto que para as enzimas lacase e peroxidase, nas três concentrações de fenol investigadas e sob as diferentes condições de cultivo, as atividades enzimáticas permaneceram dentro da faixa de 0,5 a 2,5 U / L min.

Os resultados de atividades enzimáticas apresentados neste capítulo tiveram comportamento semelhante ao obtido por FALCONI (1998), pois não foi obtido atividade da enzima lignina peroxidase e os maiores valores de atividade enzimática obtidos foram para a enzima manganês peroxidase, de 3,5 U / L min, enquanto as enzimas lacase e peroxidase apresentaram valores de atividade menores que 0,4 U / L min, portanto valores menores que os reportados pelo mesmo autor.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

A partir de amostra de água residuária de indústria química, foram isolados microrganismos que apresentaram crescimento em meio nutriente sólido contendo fenol como única fonte de carbono. Dentre os microrganismos isolados, foi selecionado um que apresentou crescimento em meio sintético líquido contendo 1000 mg / L de fenol como única fonte de carbono, o qual foi identificado como sendo a levedura *Candida parapsilopsis* e empregado nos ensaios contínuos de degradação de fenol.

Em ensaios executados em frascos de Erlenmeyer, foi estudada a cinética de crescimento da levedura *Candida parapsilopsis*, e os parâmetros $\mu_{\text{máx}}$, K_s e K_i obtidos foram de $0,476 \text{ h}^{-1}$, $10,6 \text{ mg / L}$ e $286,3 \text{ mg / L}$, respectivamente.

Nos ensaios contínuos de degradação de fenol, o reator de mistura pressurizado entre $1,3$ e $1,5 \text{ kgf / cm}^2$ apresentou melhores valores do binômio produtividade volumétrica de remoção de fenol e eficiência de remoção de fenol, do que os reatores de mistura operando a pressão ambiente e a pressão manométrica de $0,6$ a $1,0 \text{ kgf / cm}^2$.

Nos ensaios contínuos de degradação de fenol, as melhores respostas de produtividade volumétrica de remoção de fenol e eficiência de remoção de fenol foram obtidas para os reatores de leito fluidizado com carvão ativado e “air-lift” pressurizado. Em ambos, a produtividade volumétrica de remoção de fenol permaneceu por volta de 45 mg / L h . O reator “air-lift” pressurizado foi operado com valores médios de concentração de fenol no afluente de 1500 mg / L e tempo de detenção hidráulica de 35 h , para o reator de leito fluidizado com carvão ativado, estes valores médios foram de 550 mg / L e 10 h , respectivamente.

Os valores de atividade das enzimas relacionadas com a degradação de fenol nos ensaios contínuos foram baixos, inferiores a $0,4 \text{ U / L.min}$ para as enzimas lacase e peroxidase, e menores que $3,5 \text{ U / L.min}$ para a enzima manganês peroxidase. As enzimas lignina peroxidase e álcool veratrílico oxidase não apresentaram atividade. Entretanto, esses

resultados se encontram na mesma magnitude de respostas de atividade enzimática obtidas por outros autores.

O desenvolvimento dos reatores contínuos, com a levedura selecionada para degradação de fenol, mostrou-se satisfatório, uma vez que foi possível operar os reatores continuamente por períodos de 17 a 97 dias, com alta eficiência de remoção de fenol.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUHAMED, T. BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, T.; MEHMETOGLU, U. Kinectis model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. Process biochemistry. v. ____ , p. 1 – 6, 2003.
- AIBA, S; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. Engenharia Bioquímica. Ed. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, S.P., p 100 –105, 1971.
- AIKTEN, M. D.; VENKATADRI, R.; IRVANE, R. L. Oxidation of phenolic pollutants by lignin degrading enzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Water Research, v. 23, n. 4, p. 443-450, 1989.
- ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. Higienização na indústria de Alimentos. Ed. Livraria Varela Ltda, São Paulo, p. 136-137, 1996.
- ANSELMO, A. M.; NOVAIS, J. M. Isolation and selection of phenol degrading microorganisms from on industrial effluent. Biotechnology Letters, v. 6, n. 9, p. 601-606, 1984.
- ANSELMO, A. M.; CABRAL, J. M. S., NOVAIS, J. M. The adsorption of *Fusarium flocciferum* spores on celite particles and their use in the degradation of phenol. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 31, p. 200 – 203, 1989.
- ANSELMO, A. M.; NOVAIS, J. M. Biological treatment of phenolics wastes: comparison between free and immobilized cells systems. Biotechnology Letters, v. 14, n. 3, p. 239-244, 1992.
- APHA. Oxigen demand (chemical). In: APHA Standard methods for the examination of water and wastewater. 4. ed. Washington, D.C., 1976. p. 550 – 554.
- AVER, W.; MALISSA, H. Jr. Determiration of traces amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Anal. Chem. Acta, v. 237, p. 451-457, 1990.
- BADGER, G. M.; KIMBER, W.L.; SPOTWOOD, T. M. Mode of formation of 3,4-benzopireno in human environment. Nature, v. 187, p. 663-665, 1960.
- BANCI, L.; CIOFI-BAFFONI, S.; TIEN, M. Lignin and Mn preoxidase-catalized oxidation of phenolic lignin oligomers. Biochemistry, v. 38, p. 3205 – 3209, 1999.
- BASTOS, A. E. R.; TORNISIELO, V. L.; NOZAWA, S. R.; TREVOS, J. T.; ROSSI, A. Phenol metabolism by two microorganisms isolated from Amazonian forest soil samples. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. v. 24, p. 403 – 409, 2000.
- BARKER, M. E. The mechanism of charcoal activation. Industrial and Engineering Chemistry. v. 9, p.926-931, 1930.

- BICKERSTAFF, G. F. In: "Immobilization of enzymes and cells" (BICKERSTAFF G. F., ed), p. 1-7. Humana Press, Totowa, New Jersey – USA, 1997.
- BOUWER, E. J.; CHEN, C. T.; LI, Y. H.; Transformation of a petroleum mixture of biofilms. Water Science Technology v. 26, n. 3-4, p. 637-646, 1992.
- BORJA, R.; MARTÍN, A; MAESTRO, R.; ALBA, J.; FIESTAS, J. A. Enhancement of the anaerobic digestion of live Mill wastewater by the removal phenolic inhibitors. Process Biochemistry, London, v. 27, p. 231-237, 1992.
- CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. Adv. Applied. Microbiology. v. 30, p. 30 – 37, 1984.
- CLARK, R. M. ; FRONK, C. A. ; LYKINS, B. W. Jr. Remaining organic contaminants from groundwater – A cost and performance evaluation. Environment. Science Technology. v. 22, n. 10, p. 1126-1130, 1988.
- COLLINS, L. D.; DAUGULIS, A. J. Characterization and optimization of a two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol. Applied microbiology and biotechnology. v. 48, p. 18-22, 1997.
- COLLINS, P. J.; DOBSON, A. D. W. Extracellular lignin and manganese peroxidase production by the whit-rot fungus *Criolus versicolor* 290. Biotechnology Letters, v. 17, n. 9, p. 989 – 992, 1995.
- D'ADAMO, P. D.; ROZICH, A. F.; GAUDY, A. F. Analysis of growth data with inhibitory carbon sources. Biotechnology and Bioengineering, v. 26, p. 397 – 402, (1984).
- DAVIES, R. A. & LEGROS, E. F. Odour removal by adsorption on activated carbon. Filtration & Separation. v. may/june, p. 169-171, 1986.
- DIKSHITULO, S.; BALZIS, B. C.; LEWANDOWSKI, G. A.; PAVLOU, S. Competition between two microbial populations in a sequencing fed-batch reactor: theory, experimental verification, and implications for waste treatment applications. Biotechnology and Bioengineering, v. 42, p. 643 - 656, 1993.
- DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Principles. London: Academic Press. p. 35 – 38, 2000.
- DUARTE-VAZQUEZ, M. A.; ORTEGA-TOVAR, M. A.; GARCIA-ALMENDAREZ, B. E.; REGALADO, C. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. Journal of Chemistry Technology and Biotechnology. v. 78, p. 42 – 47, 2002.

- DUENSER, H. Textile wastewater treatment. Indian Textile Journal v. 102, p. 80-90, 1992.
- EHRHARDT, H. M.; REHM, H. J. Phenol degradation by microorganisms adsorbed on activated carbon. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 21, p. 32-36, 1985.
- EHRHARDT, H. M.; REHM, H. J. Semicontinuous and continuous degradation of phenol by *Pseudomonas putida* P8 adsorbed on activated carbon. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 30, p. 312-317, 1989.
- FALCONI, F. A. Bioconversão de compostos fenólicos por fungos lignolíticos. Tese de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1998.
- FILLOY, H. P. Ativação da superfície da crisotila brasileira em reatores com fluxo de ar, CO₂ e argônio. Utilização como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de mestrado – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.
- GALLEGO, A.; FORTUNATO, M. S.; FOGLIA, J.; ROSSI, S.; GEMINI, V.; GOMEZ, L.; GOMES, C. E.; HIGA, L. E.; KOROL, S. E. Biodegradation and detoxification of phenolic compounds by pure and mixed indigenous cultures in aerobic reactors. International Biodeterioration & Biodegradation. v. 52, p. 261 – 267, 2003.
- GIANFREDA, L.; SANNINO, RAO, M. A.; BOLLAG, J.M.; Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. Water Research. v. 37, p. 3205 – 3215, 2003.
- GODJEVARGOVA, T.; ALEXIEVA, Z.; IVANOVA, D. Cell immobilization of *Trichosporon cutaneum* strain with phenol degradation ability on new modified polymer carriers. Process Biochemistry. v. 35, p. 699-704, 2000.
- GODJEVARGOVA, T.; IVANOVA, D.; ALEXIEVA, Z.; DIMOVA, N. Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production waste water by free and immobilized *Trichosporon cutaneum*. Process Biochemistry. v. 38, p. 915 - 920, 2003.
- HA, S.R.; VINITNANTHARAT, S.; OZAKI, H. Bioregeneration by mixed microorganisms of granular activated carbon loaded with a mixture of phenols. Biotechnology Letters. v. 22, p. 1093-1096, 2000.
- HATTAKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews, v. 13, p. 125 – 135, 1994.
- HILL, G. A.; ROBINSON, C. W. Substrate inhibition kinetics phenol degradation by *Pseudomonas putida*. Biotechnology and Bioengineering, v. 17, p. 1599 – 1615, 1975.

- HOUGHTON, F. R. & WILDMAN, J. Manufacture and uses of active carbon. Chemical and Process Engineering, v. 52, p. 61-64, 1971.
- HUGO, W. B.; RUSSEL, A. D. The mode of action of non-antibiotic antibacterial agents. Pharmaceutical microbiology, cap. 11, p. 202-208, 1977.
- LALLAI, A.; MURA, G. pH variation during phenol biodegradation in mixed cultures of microorganisms. Water Research, v. 23, n. 11, p. 1335 – 1338, 1989.
- LALLAI, A.; MURA, G; MILIDDI, R; MASTINU, C. Effect of pH on growth of mixed cultures in batch reactor. Biotechnology and Bioengineering, v. 31, p. 130 – 134, 1988.
- LEE, S.; HONG, S.; SUNG, M. Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable tyrosinase. Enzyme and Microbial Technology, Surrey, v. 19, p. 374-377, 1996.
- JAWORSKA, J.S. & SCHULTZ, T. W. Comparative toxicity and structure activity in *chlorella* and *Tetrahumena*: monosubstitued phenols. Bull Envirem. Contam. Toxicol, v. 47, p. 55-62, 1991.
- JONES, J. G.; EDINGTON, M. A. A ecological survey of hydrocarbon-oxidizing microorganism. J Gen. Microbiol. v. 52, p. 381-390, 1968.
- KIM, B. R.; CHIAN, E. S. K.; CROSS, W. H.; CHENG, S. S. Adsorption, desorption, and bioregeneration in an anaerobic, granular activated carbon reactor for the removal of phenol. Journal of Water Pollution Control Federation. v. 58, n. 1, p. 35-40, 1986.
- KIM, J. H.; OH, K. K.; LEE, S. T.; KIM, S. W.; HONG, S. I. Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. Process Biochemistry. v. 37, p. 1367 – 1373, 2002.
- KOLOT, F. B. New tends in yeast techonoly-immobilized cell. Process Biochemistry, London. v. 15, n. 7, p. 2-8, out/nov, 1980.
- KOTTURI, G.; ROBINSON, C. W.; INNIS, W. E. Phenol degradation by psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 34, p. 539-543, 1991.
- KROL, E. S.; BOLTON, J. L. Oxidation of 4-alkylphenols and catechols by tirosinase: ortho-substituents alter the mechanism of quinoid formation. Chemico-Biological Interaction, v. 104, p. 11 – 27, 1997.
- KRYST, K.; KARAMANEV, D. G. Aerobic phenol biodegradation in an inverse fluidized-bed biofilm reactor. Journal of Industry Engineering Chemistry Res. v. 40, n. 23, p. 5436 – 5439, 2001.

- KUMARAN, P.; PARUCHURI, Y. L. Kinetics of phenol biotransformation. Water Research, New York, v. 31, n. 1, p. 11-22, 1997.
- KUO, C. C.; YUN, H. L.; WEN, H. C.; YI, C. L. Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. Enzyme and Microbial Technology. v. 31, p. 490-497 2002.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A., GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxydases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters, v. 169, p. 247 – 250, 1984.
- HAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, T.; MEHMETOGLU, U. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene and phenol mixtures. Process biochemistry. v. 39, p. 27 – 35, 2003.
- HWANG, H. M.; HODSON, R. E. Degradation of phenol and chlorophenols by sunlight and microbes in estuarine water. Environ. Sci. Technol., v. 20, n. 10, p. 1002-1007, 1986.
- LOH, K. C.; TAR, P. P. Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol. Bolletim of Environmental Contamination and toxicology. v. 64, p. 756-763, 2000.
- MAJCHERCZYK, A; JOHANNES, C; HUTTERMAN, A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase of *Trametes versicolor*. Enzyme Microbiology Technology, v. 22, p. 335 – 341, 1998.
- MARIUZZO, D. M. Estudo da biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por linhagens de microrganismos nativos isolados de sítios ambientais aquáticos contaminados de Estado de São Paulo. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 39, 2000.
- MIZOBUCHI, T.; MORITA, S.; YANO, T. Stability and phase plane analysis of continuous phenol degradation: a simple case. Journal Fermentation Technology, v. 58, p. 33 – 38, 1980.
- MONTEIRO, A. A. M. G.; BOAVENTURA, R. A R.; RODRIGUES, A E. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DMS 548 in a batch reactor. Biochemical Engineering Journal, v. 6, p. 45-49, 2000.
- MORAN. P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; JOEKES, I.; BRENELLI, E. C. S.; LEITE, R. A. Reduction of α -azidopropiophenone by immobilized baker's yeast. Biocatalysis, v. 9, n. 1-4, p. 321-328, 1994.
- MÖRSEN, A.; REHM, H-J. Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. Applied Microbiology and Biotechnology, v 33, p. 206-212, 1990.

- OGA, S. Fundamentos de Toxicologia – São Paulo: Atheneu Editora de São Paulo, p. 194 – 196, 1996.
- OKADA, M.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; MURAKAMI, A Population dynamics of phenol degrading microorganisms in activated sludge process under the stress of phenolic wastewater. Water Science Technology, Kyoto, v. 23, p. 1001-1010, 1991.
- ORDAZ, N. R.; MANZANO, W. H.; LAGÚNEZ, J. C. R.; URBINA, E. C.; MAYER, J. G. Growth kinetic model that describes the inhibitory and lytic effects of phenol on *Candida tropicalis* Yeast. Biotechnology progress. v. 14, n. 6, p. 966-969, 1998.
- PACÁ, J.; KOMÁRKOVÁ, E.; PRELL, A.; STIBOROVÁ, M; SOBOTKA, M. Kinetics of phenol oxidation by *Candida tropicalis* effects of oxygen supply rate and nutrients on phenol inhibition. Folia microbiologica. v. 47, n. 6, p. 701 – 707, 2002.
- PAWLOWSKY, U.; HOWELL, J. A. Mixed culture biooxidation of phenol I. Determination of kinetics parameters. Biotechnology and Bioengineering, v. 15, p. 889 – 896, 1973.
- PRIETO, M. B.; HIDALGO, H.; SERRA, J. L.; LLAMA, M. J. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite in a packed-bed reactor. Journal of Biotechnology, v. 97, p. 1-11, 2002.
- QUAN, X.; SHI, H.; ZHANG, Y.; WANG, J.; QIAN, Y. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter sp.* Separation Purification Technology. v. p. 1 – 8, 2003.
- RAJA, R.; SONOLIKAR, R. L.; SAHEB, P. S. Influence of magnetic field on the performance of bubble columns and airlift bioreactor with submersed microorganisms. Chemical Engineering Science, v. 52, n. 21/22, p. 4155-4160, 1997.
- REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. D. B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. Biotechnology and Bioengineering, v. 69, p. 385 - 400, 2000.
- RIGO, M. Estudo de Fermentação Alcoólica por Células de *Saccharomyces cerevisiae* Imobilizadas em Crisotila. Tese de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.
- ROZICH, A. F.; COLVIN, R. J. Effects of glucose on phenol biodegradation by heterogeneous population. Biotechnology and Bioengineering, v. 28, p. 965 – 971, 1986.
- RUOCCO, J. Jr; AIBA, C. J.; HOKAMA, P. C.; PIRES, J. M. e MENDES, C. A., Identificação de Poluentes Orgânicos, Ambiente, v. 1, n. 3, p. 147-149, 1987.

- RUSZ, J.; MULLER, K. B. M. Physical and chemical process involved in the production and application of smoke. Pure and Applied Chemistry, v. 49, p. 1631-1654, 1977.
- SAÉZ, P. B.; RITTMANN, B. E. Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and an inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol). Biodegradation. v. 4, p. 3 – 21, 1993.
- SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potential. Process Biochemistry, p 1-7, 2003.
- SEETHARAM, G. B.; SAVILLE, B. A. Degradation of phenol using tirosinase immobilized on siliceous supports. Water Research. v. 37, p. 436 – 440, 2003.
- SEKER, S.; BEYENAL, H.; TANYOLAC, A. Multi substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 47, p. 610 - 614, 1997.
- SHIEH W. K.; PUHAKKA, J. A.; MELIN, E.; TUHKANEN, T. Immobilized-cells degradation of chlorophenols. Journal of Environmental Engineering v. 116; n. 4; p. 683-687; 1990.
- SHIMIZU, T. UNO, T. DAN, Y.; NEI, N.; ICHIKAWA, K. Continuous treatment of wastewater containing phenol by *Candida tropicalis*. Journal of Fermentation Technology. v. 51, p. 809 – 812, 1973.
- SMITH, M. R. Biodegradation of aromatic compounds by bacterial. Biodegradation. v. 1, p. 191- 206, 1990.
- SOKOL, W. Oxidation of inhibitory substrate by washed cells (oxidation of phenol by *Pseudomonas putida*). Biotechnology and Bioengineering, v. 30, p. 921 – 927, 1987.
- SUGUMARAN, M. & BOLTON, J. L. Laccase, and not tyrosinase, in the enzyme responsible for quinone methide production from 2,6-dimethoxy-4-allyl phenol. Archives of Biochemistry and Biophysic, v. 353, n. 2, p. 207 – 212, 1998.
- SUIDAN, M. T.; CROSS, W. H.; FONG, M.; CALVERT, J. W. Anaerobic carbon filter for degradation of phenols. Journal of Environment Engineering Division. v. 107, n. EE3, p. 563-579, 1981.
- SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and preoxidases by wood-rotting fungi. Mycology, v. 81, p. 234 – 240, 1989.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring

- oxigenase. Proceeding of National Academy of Science USA, v. 81, p. 2280 – 2284, 1984.
- THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. v. 140, p. 19 – 26, 1994.
- TORNISIELO, V. L. Degradação de fenol por microrganismos do solo. In: I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, 1996, Campinas. Anais. p. 05.
- TSEZOS, M.; BENEDEK, A. Removal of organic substances by biologically activated carbon in a fluidized-bed reactor. Journal of Water Pollution Control Federation. v. 52, n.3, p. 578-586, 1980.
- URANO, K.; YAMAMOTO, E.; TONEGAWA, M.; FUJIE, K. Adsorption of chlorinated organic compounds on activated carbon from water. Water Research, v. 25, p. 1459-1464, 1991.
- VITOLLO M.; MINAMI P. S. Leveduras em Biotecnologia. Ed. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 67-69, 1989.
- YANG, R. D.; HUMPHREY, A. E. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. Biotechnology and Bioengineering, v. 17, p. 1211-1235, 1975.
- WAGNER, M.; NICELL, J. A. Peroxidase-catalyzed removal of phenol from a petroleum refinery wastewater. Water Science Technology. v. 43, n. 2, p. 253 – 260, 2001.
- WANG, D. I. C.; COONEY, C. L.; DEMAIN, A. L.; DUNNIL, P.; HUMPREY, A. E.; LILLY, M.D. Fermentation and Enzyme Technology, New York, John Willey & Sons, 1979. p. 57 – 97.
- WENDHAUSEN, Jr. R.; MORAN. P. J. S.; JOEKES, I.; RODRIGUES, J. A. R.; Continuous process for large-scale preparation of chiral alcohols with baker's yeast immobilized on chrysotile fibers. Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic, Amsterdam, v. 5, p. 57-61, 1998.

CAPÍTULO 9

ANEXOS DO CAPÍTULO 4

Neste capítulo estão apresentados as Tabelas com os dados dos ensaios em batelada para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento da levedura.

Tabela 9.1. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 20 mg / L. Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorbância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,017	20	5,6
0,5	0,022	16	5,6
1	0,024	11	5,6
1,5	0,028	9	5,6
2	0,035	4	5,6
2,5	0,036	0	5,6

Tabela 9.2. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 46 mg / L.
Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorvância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,018	46,0	5,7
2	0,026	34,2	5,7
3,5	0,046	17,8	5,6
4	0,054	10,7	5,6
4,5	0,061	2,5	5,6
5	0,075	0,0	5,6
5,5	0,083	0,0	5,6
6	0,079	0,0	5,6
6,5	0,079	0,0	5,6
7	0,082	0,0	5,6
7,5	0,083	0,0	5,6
8	0,080	0,0	5,6

Tabela 9.3. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 88,5mg / L.
Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorbância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,02	88,5	5,6
2	0,028	82,4	5,6
3,5	0,039	69,6	5,6
4	0,041	59,3	5,6
4,5	0,068	52,7	5,5
5	0,069	43,4	5,5
5,5	0,09	31,7	5,5
6	0,104	13,8	5,4
6,5	0,119	3,5	5,4
7	0,128	0,0	5,4
7,5	0,136	0,0	5,4
8	0,13	0,0	5,4
8,5	0,133	0,0	5,4
9	0,132	0,0	5,3

Tabela 9.4. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 170,4 mg / L. Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorvância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,022	170,4	5,6
2	0,021	169,9	5,6
4	0,048	146,4	5,6
4,5	0,059	143,8	5,5
5	0,067	136,6	5,5
5,5	0,076	128,4	5,5
6	0,085	115,1	5,4
6,5	0,11	102,8	5,4
7	0,13	92,6	5,4
7,5	0,15	75,2	5,4
8	0,179	57,8	5,3
8,5	0,194	40,4	5,2
9	0,221	19,9	5,0
9,5	0,245	0,4	4,9
10	0,264	0	4,8
10,5	0,26	0	4,8
11	0,259	0	4,8
12	0,255	0	4,9

Tabela 9.5. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 267,2 mg / L. Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorvância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,018	267,2	5,6
2	0,019	259,0	5,6
4	0,039	246,7	5,6
4,5	0,044	262,6	5,6
5	0,05	247,2	5,5
5,5	0,065	245,2	5,5
6	0,071	237,5	5,5
6,5	0,08	227,8	5,4
7	0,1	216,5	5,4
7,5	0,13	222,1	5,4
8	0,139	203,2	5,3
8,5	0,151	190,4	5,2
9	0,168	162,2	5,0
9,5	0,207	159,2	4,9
10	0,228	133,6	4,8
10,5	0,275	98,7	4,5
11	0,3	66,5	4,3
11,5	0,327	45,5	4,3
12	0,346	19,1	4,0
12,5	0,411	9	3,9
13	0,45	0	3,9
13,5	0,463	0	3,8
14	0,462	0	3,9
15	0,463	0	3,9

Tabela 9.6. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 393 mg / L.
Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorvância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,047	393,1	5,5
3	0,072	378,3	5,6
4	0,09	377,8	
5	0,116	317,9	5,5
6	0,133	320,9	
7	0,167	320,9	
8	0,192	251,3	5,2
9	0,267	216,5	
10	0,334	200,6	4,7
11	0,398	154,5	
12,5	0,487	67,5	3,8
13,5	0,568	14,3	
14,5	0,612	0,0	3,5
15,5	0,578	0,0	
16,5	0,575	0,0	3,6
17,5	0,579	0,0	

Tabela 9.7. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 448 mg / L.
Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorvância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,051	447,9	5,4
3	0,069	450,0	5,6
4	0,082	428,0	
5	0,097	416,1	5,5
6	0,121	403,9	
7	0,139	396,2	
8	0,215	380,3	5,2
9	0,221	348,1	
10	0,272	294,8	4,8
11	0,335	270,8	
12,5	0,407	227,2	4,0
13,5	0,485	176,0	
14,5	0,538	148,4	3,6
15,5	0,56	71,1	
16,5	0,658	20,9	3,3
17,5	0,736	6,58	
18,5	0,766	0,952	3,3
19,5	0,723	1,464	
20,5	0,726	0	3,3

Tabela 9.8. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 502mg / L.
Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorbância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,047	502,2	5,4
3	0,068	496,5	5,4
4	0,08	497,6	
5	0,095	496,0	5,3
6	0,09	486,3	
7	0,118	479,1	
8	0,14	497,6	5,1
9	0,191	443,3	
10	0,217	412,6	4,8
11	0,284	432,0	
12,5	0,377	338,3	3,9
13,5	0,406	302,5	
14,5	0,493	235,4	3,5
15,5	0,537	189,9	
16,5	0,594	121,3	3,2
17,5	0,675	110,5	
18,5	0,754	15,8	3,1
19,5	0,804	0,4	
20,5	0,818	0,2	2,9
21,5	0,804	0,0	

Tabela 9.9. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 612 mg / L.
Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorvância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,043	612,2	5,4
3	0,058	569,2	5,4
4	0,071	575,9	
5	0,088	564,6	5,4
6	0,085	558,5	
7	0,1	524,7	
8	0,119	584,1	5,2
9	0,141	543,1	
10	0,172	504,2	5,0
11	0,228	499,6	
12,5	0,288	459,7	4,3
13,5	0,36	431,0	
14,5	0,42	401,8	3,7
15,5	0,467	352,2	
16,5	0,539	304,6	3,3
17,5	0,605	265,6	
18,5	0,656	174,5	3,1
19,5	0,726	157,1	
20,5	0,792	95,7	2,9
21,5	0,852	95,2	
22,5	0,92	29,6	2,9
23,5	0,921	4,0	
25	0,931	3,5	2,7
27	0,929	2,5	

Tabela 9.10. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de fenol de 723 mg / L. Tempo de fermentação, absorvância, concentração de fenol e pH.

Tempo (h)	Absorvância a 600 nm	Concentração de fenol (mg / L)	pH
0	0,048	723,3	5,4
3	0,063	653,2	5,4
4	0,066	652,7	
5	0,072	646,0	5,4
6	0,074	641,4	
7	0,096	651,2	
8	0,11	716,2	5,3
9	0,122	628,6	
10	0,144	623,5	5,1
11	0,177	614,3	
12,5	0,235	609,2	4,8
13,5	0,28	573,3	
14,5	0,319	548,8	4,2
15,5	0,379	528,3	
16,5	0,436	484,8	3,7
17,5	0,497	445,3	
18,5	0,553	401,8	3,3
19,5	0,624	331,2	
20,5	0,696	302,5	3,0
21,5	0,725	285,6	
22,5	0,815	231,9	2,9
23,5	0,832	179,6	
25	0,951	104,9	2,7
27	1,023	6,1	
29	1,032	3,0	2,7

CAPÍTULO 10

ANEXOS DO CAPÍTULO 5

Neste capítulo estão apresentados as Tabelas com os dados dos ensaios contínuos de degradação de fenol.

TABELA 10.1. Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator de mistura. Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de fenol no afluente e efluente, eficiência de remoção de fenol e produtividade volumétrica de remoção de fenol.

Tempo (Dias)	TDH (h)	Fenol Afluente (mg / L)	Fenol Efluente (mg / L)	Remoção de fenol (%)	Produtividade (mg / L h)
1	25,2	257	0	100	10,2
2	21	257	0	100	11,6
3	19,2	256	0	100	12,7
4	15	256	59,7	76,9	13,2
5	15	256	50	80,7	14
6	17,3	259	86,5	66,7	10
7	16,1	265	44	83	13,4
8	15	265	0	100	16,6
9	16,4	265	6	97,6	14,7
10	13,6	259	70	71,7	13
11	13,8	259	93,7	62,1	11,1
12	13,8	259	93,9	63,7	12
13	13,8	259	66,4	74,4	14
14	11,5	259	96	62,9	14,2
15	12,6	248	111	57,1	11,7
16	9,7	248	110	57,5	15,3
17	8,7	257	75	69,8	19,8
18	12,6	257	18,3	92,6	18,2
19	12,6	268	5,5	97,9	19,9
20	13,6	256	7,6	97	17,8
21	13,8	256	7,1	97,2	17,6
22	12,8	256	23,5	90,8	18,2
23	13,8	256	41,4	83,8	15,5
24	14,5	257	33,7	86,8	15,4
25	14,2	257	40,9	84	15,1
26	9,7	257	75,2	70,7	18,7
27	9,5	257	50,2	80,4	21,7
28	8,2	257	47,1	81,6	25,6

29	8,6	257	49,6	80,7	24,1
30	8,1	270,2	56,8	77,8	24,6
31	8,2	270,2	87,5	65,9	20,7
32	8,2	270,2	114,1	57,8	19,1
33	7,8	270,2	133	50,8	17,6
34	9,8	251,3	116	57,1	15,7
35	9,9	251,3	20,9	91,7	23,2
36	9,9	251,3	67,9	73	18,5
37	9,5	251,3	53	78,9	20,9
38	9,7	251,3	74,6	70,3	18,2
39	9,8	247,6	92,1	63,4	16,2
40	9,3	247,6	166,8	32,6	8,7
41	9,3	247,6	128,2	48,2	12,8
42	9,3	247,6	107,1	56,7	15,1
43	7	247,6	122,2	50,6	18
44	6,8	247,6	121,9	50,8	18,5

TABELA 10.2. Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator de mistura. Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de DQO no afluente e efluente, eficiência de remoção de DQO e produtividade volumétrica de remoção de DQO.

Tempo (Dias)	TDH (h)	DQO Afluente (mg / L)	DQO Efluente (mg / L)	Remoção de DQO (%)	Produtividade (mg / L h)
1	25,2	646,4	103,6	84	21,5
2	21	646,4	88,5	86,3	26,5
3	19,2	641,4	69,3	89,3	30,1
4	15	651,6	248,1	61,3	26,3
5	15	651,6	228,3	65	28,3
6	17,3	651,6	269	58,7	22,1
7	16,1	651,6	229,5	64,8	26,3
8	15	651,6	67,9	89,6	39
9	16,4	651,6	119,8	81,6	32,5
10	13,6	582,6	214,3	67,1	32,2
11	13,8	582,6	229,7	60,6	25,6
12	13,8	582,6	229,5	60,6	25,6
13	13,8	582,6	190,1	67,4	28,4
14	11,5	582,6	229,3	60,6	30,8
15	12,6	582,6	229,1	60,7	28
16	9,7	582,6	229,1	60,7	36,4
17	8,7	582,6	201,5	65,4	43,6
18	12,6	582,6	78,1	86,6	40
19	12,6	693,6	90,3	84,5	39
20	13,6	693,6	125,5	81,9	41,8
21	13,8	470,8	190,1	72,6	36,5
22	12,8	470,8	128,9	72,6	26,7
23	13,8	470,8	141,3	70	23,9
24	14,5	470,8	146,5	68,9	22,4
25	14,2	470,8	195,8	58,4	19,3
26	9,7	470,8	194,8	58,6	28,4
27	9,5	470,8	149,4	68,3	33,8
28	8,2	470,8	135,4	71,2	41
29	8,6	470,8	177,3	62,3	34,2
30	8,1	503,6	229,7	51,2	29,8
31	8,2	621,5	331,9	34,1	21
32	8,2	621,5	423,6	31,8	24,2
33	7,8	621,5	407,9	34,4	27,3

34	9,8	621,5	321,4	48,3	30,6
35	9,9	621,5	295,2	52,5	32,9
36	9,9	621,5	182	70,7	44,3
37	9,5	621,5	197,1	68,3	44,7
38	9,7	711,9	360,7	42	26,9
39	9,8	711,9	381,7	46,4	33,6
40	9,3	711,9	514	27,8	21,3
41	9,3	711,9	494,4	30,6	23,4
42	9,3	711,9	397,4	44,2	33,8
43	7	655,6	431,5	39,4	40,3
44	6,8	655,6	442,7	32,5	31,3

TABELA 10.3 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator de leito fluidizado. Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de fenol no afluente e efluente, eficiência de remoção de fenol e produtividade volumétrica de remoção de fenol.

Tempo (Dias)	TDH (h)	Fenol Efluente (mg / L)	Fenol Afluente (mg / L)	Remoção de fenol (%)	Produtividade (mg / L h)
1	14,2	187,8	717,1	100,0	19,4
2	11,6	172,1	717,1	99,4	23,0
3	11,6	316,2	660,8	98,8	22,9
4	11,6	351,9	660,8	93,3	23,3
5	11,9	424	660,8	100,0	24,3
6	11,7	270,2	660,8	97,3	24,2
7	11,7	407,9	653,4	90,2	22,4
8	11,5	224,1	653,4	89,3	20,8
9	11,4	187,8	653,4	88,4	20,6
10	11,6	149,7	653,4	89,5	20,5
11	10,7	121,3	653,4	90,7	22,7
12	10,8	110	623,2	92,5	22,8
13	6,3	283	623,2	62,0	26,2
14	6,7	147,8	623,2	83,5	33,5
15	6,1	92,3	623,2	93,1	40,8
16	6,1	77,8	692,6	94,6	46,3
17	5,8	106,8	692,6	92,3	47,8
18	5,8	82,6	649	93,6	47,9
19	5,8	94,7	654,6	93,0	46,9
20	5,5	116,4	654,6	89,9	47,6
21	5,2	111,6	654,6	87,2	48,4
22	4,4	152,6	659,4	82,5	55,5
23	4,3	162,3	652,2	87,7	61,8
24	4,5	106,8	652,2	92,0	59,1
25	3,9	133,3	673,9	89,7	66,8
26	4,0	152,6	683,6	89,8	65,1
27	4,0	145,4	683,6	86,9	69,7
28	3,9	169,5	683,6	84,6	69,7
29	3,8		654		
30	3,8	174,4	654	80,3	59,4
31	3,8	174,4	654	77,5	57,0
32	3,7	196,1	1146,4	74,0	55,3
33	8,8	210,5	1146,4	85,2	50,5

34	8,4	222,6	1146,4	83,9	52,0
35	8,1	302,3	1224,2	80,4	51,8
36	9,9	256,4	1204,9	79,2	41,2
37	9,9	256,4	1204,9	78,6	40,7
38	13,6	266,1	1204,9	80,2	30,3
39	9,8	273,2	1262,8	76,4	38,6
40	7,9	328,8	1262,8	75,5	49,5
41	7,9	331,3	1262,8	75,4	49,7
42	8,1	371,7	1262,8	72,3	46,3
43			1262,8		
44	7,8	386,7	1291,8	69,2	46,3
45	7,8	408,5	1291,8	70,6	47,0
46	7,8	418,1	1371,4	67,8	46,7
47	8,1	480,9	1371,4	67,1	44,3
48	8,0	463,4	1371,4	65,1	43,8
49	9,9	456,1	1371,4	65,8	35,9
50			1318,3		
51	10,3	342,7	1318,3	81,7	42,9
52	8,9	307,1	1318,3	78,5	45,2
53	8,1	340,9	1318,3	80,4	54,2
54	8,1	328,8	1318,3	77,6	52,3
55	8,0	354,7	1318,3	76,6	51,9
56	7,9	410,9	1306,2	74,3	51,1
57	8,5	363,1	1306,2	82,6	52,7
58	8,5	360,2	1306,2	82,1	51,8
59	8,4	302,3	1306,2	85,2	55,0
60	8,6	220,2	1361,7	89,0	57,0
61	8,7	179,2	1376,2	89,9	56,7
62	9,0	193,7	1376,2	93,1	56,4
63	8,8	203,3	1298,9	94,4	58,1
64	9,1		1298,9		
65	9,3	179,2	1298,9	98,6	58,9
66	9,3	133,3	1332,8	97,3	58,7
67	8,9	115,8	1332,8	100,0	60,9
68	12,4	143	1412,4	99,4	43,6
69	13,3	172	1412,4	99,2	42,7
70	12,3		1412,4		
71	12,3	133,3	1412,4	99,9	46,6
72	10,7		1344,9		
73	10,7	114	1120,1	99,5	51,1
74	9,4		1120,1		
75	9,4	164,7	1269	99,8	58,6
76	8,2	121,3	1311,1	99,6	68,0
77	8,1	155	2028,4	100,0	68,7
78	8,0		2028,4	99,3	69,5

79	8,0	163,7	2028,4	98,4	68,9
80	19,2	174,4	2028,4	100,0	43,4
81	16,2	113,4	1999,5	99,7	51,4
82	16,2	111,6	1999,5	98,3	50,5
83	12,9	169,5	2042,9	99,0	66,2
84	14,2	123,7	2042,9	100,0	60,8
85	18,4		2042,9	100,0	51,5
86	18,4	86,9	2042,9	98,4	50,7
87	13,2	239,5	2250,8	99,8	71,9
88	14,9	188,8	2250,8	95,6	63,1
89	14,9	228	2250,8	93,9	62,0
90	13,8	478,4	2549,7	92,0	67,8
91	13,4	421	2549,7	93,2	77,3
92	13,7	418	2255,3	92,9	75,5
93			2255,3		
94	21,3	244,3	2515,9	98,1	51,1
95	16,1	256,4	2515,9	97,2	63,8
96	23,8	464,5	2515,9	97,5	43,4
97	23,8	464,5	2515,9	97,4	43,3

TABELA 10.4 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator de leito fluidizado. Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de DQO no afluente e efluente, eficiência de remoção de DQO e produtividade volumétrica de remoção de DQO.

Tempo (Dias)	TDH (h)	DQO Efluente (mg / L)	DQO Afluente (mg / L)	Produtividade (mg / L h)	Remoção de DQO (%)
1	14,2	187,8	717,1	37,2	73,8
2	11,6	172,1	717,1	47,1	76,0
3	11,6	316,2	660,8	34,6	55,9
4	11,6	351,9	660,8	26,6	46,7
5	11,9	424	660,8	19,9	35,8
6	11,7	270,2	660,8	33,5	59,1
7	11,7	407,9	653,4	21,7	38,3
8	11,5	224,1	653,4	37,5	65,7
9	11,4	187,8	653,4	40,7	71,3
10	11,6	149,7	653,4	43,4	77,1
11	10,7	121,3	653,4	49,8	81,4
12	10,8	110	623,2	50,2	83,2
13	6,3	283	623,2	54,0	54,6
14	6,7	147,8	623,2	71,5	76,3
15	6,1	92,3	623,2	87,4	85,2
16	6,1	77,8	692,6	89,8	87,5
17	5,8	106,8	692,6	101,1	84,6
18	5,8	82,6	649	104,3	88,1
19	5,8	94,7	654,6	94,9	85,4
20	5,5	116,4	654,6	98,2	82,2
21	5,2	111,6	654,6	104,0	83,0
22	4,4	152,6	659,4	97,5	76,7
23	4,3	162,3	652,2	99,5	75,4
24	4,5	106,8	652,2	103,4	83,6
25	3,9	133,3	673,9	114,5	79,6
26	4,0	152,6	683,6	110,6	77,4
27	4,0	145,4	683,6	116,5	78,7
28	3,9	169,5	683,6	114,3	75,2
29	3,8		654		
30	3,8	174,4	654	109,1	73,3
31	3,8	174,4	654	108,4	73,3
32	3,7	196,1	1146,4	105,2	70,0
33	8,8	210,5	1146,4	91,1	81,6

34	8,4	222,6	1146,4	94,0	80,6
35	8,1	302,3	1224,2	89,3	73,6
36	9,9	256,4	1204,9	84,0	79,1
37	9,9	256,4	1204,9	82,0	78,7
38	13,6	266,1	1204,9	59,3	77,9
39	9,8	273,2	1262,8	81,2	77,3
40	7,9	328,8	1262,8	100,9	74,0
41	7,9	331,3	1262,8	101,1	73,8
42	8,1	371,7	1262,8	94,0	70,6
43			1262,8		
44	7,8	386,7	1291,8	96,5	69,4
45	7,8	408,5	1291,8	96,9	68,4
46	7,8	418,1	1371,4	95,5	67,6
47	8,1	480,9	1371,4	93,7	64,9
48	8,0	463,4	1371,4	97,3	66,2
49	9,9	456,1	1371,4	79,5	66,7
50			1318,3		
51	10,3	342,7	1318,3	81,5	74,0
52	8,9	307,1	1318,3	97,1	76,7
53	8,1	340,9	1318,3	103,5	74,1
54	8,1	328,8	1318,3	104,7	75,1
55	8,0	354,7	1318,3	102,6	73,1
56	7,9	410,9	1306,2	98,0	68,8
57	8,5	363,1	1306,2	94,6	72,2
58	8,5	360,2	1306,2	94,9	72,4
59	8,4	302,3	1306,2	103,0	76,9
60	8,6	220,2	1361,7	108,7	83,1
61	8,7	179,2	1376,2	116,6	86,8
62	9,0	193,7	1376,2	112,0	85,9
63	8,8	203,3	1298,9	114,6	85,2
64	9,1		1298,9		
65	9,3	179,2	1298,9	102,7	86,2
66	9,3	133,3	1332,8	108,0	89,7
67	8,9	115,8	1332,8	116,8	91,3
68	12,4	143	1412,4	82,1	89,3
69	13,3	172	1412,4	79,7	87,8
70	12,3		1412,4		
71	12,3	133,3	1412,4	89,2	90,6
72	10,7		1344,9	113,2	100,0
73	10,7	114	1120,1	98,6	91,5
74	9,4		1120,1	101,8	
75	9,4	164,7	1269	86,8	85,3
76	8,2	121,3	1311,1	120,5	90,4
77	8,1	155	2028,4	122,1	88,2
78	8,0		2028,4		

79	8,0	163,7	2028,4	200,7	91,9
80	19,2	174,4	2028,4	82,6	91,4
81	16,2	113,4	1999,5	101,5	94,4
82	16,2	111,6	1999,5	100,1	94,4
83	12,9	169,5	2042,9	121,6	91,5
84	14,2	123,7	2042,9	115,9	93,9
85	18,4		2042,9		
86	18,4	86,9	2042,9	91,1	95,7
87	13,2	239,5	2250,8	117,5	88,3
88	14,9	188,8	2250,8	118,4	91,6
89	14,9	228	2250,8	116,2	89,9
90	13,8	478,4	2549,7	110,1	78,7
91	13,4	421	2549,7	135,9	83,5
92	13,7	418	2255,3	133,4	83,6
93			2255,3		
94	21,3	244,3	2515,9	80,8	89,2
95	16,1	256,4	2515,9	120,4	89,8
96	23,8	464,5	2515,9	74,0	81,5
97	23,8	464,5	2515,9	74,0	81,5

TABELA 10.5 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm². Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de fenol no afluente e efluente, eficiência de remoção de fenol, produtividade volumétrica de remoção de fenol e massa seca celular (MS).

Tempo (Dias)	TDH (h)	Fenol Afluente (mg / L)	Fenol Efluente (mg / L)	Remoção de fenol (%)	Produtividade (mg / L h)	MS (mg / L)
1	88,9	280	0	100	3,2	--
2	26,7	283	0	100	10,5	--
3	25,9	291	0	100	10,9	--
4	26,4	293	0	100	11	20
5	24,9	290	0	100	11,8	77,6
6	33,3	289	0	100	8,7	--
7	33,3	295	0	100	8,7	--
8	33,3	287	0	100	8,9	--
9	33,3	289	0	100	8,6	--
10	33,3	291	0	100	8,7	6,6
11	33,3	295	0	100	8,7	--
12	33,3	281,4	0	100	8,9	20
13	23,8	299,1	0	100	11,8	--
14	19,6	318,9	0	100	15,3	60
15	19,6	329	0	100	16,3	--
16	16,7	339,4	0	100	19,7	--
17	12,3	311,7	0	100	27,5	40
18	11,6	310,1	0	100	26,9	--
19	10,1	592,4	0	100	30,6	--
20	13	916,4	0,6	99,9	45,5	252,5
21	10,8	754,9	114,3	87,5	74,3	240
22	10,2	749,2	290,3	61,5	45,5	340
23	15,1	748,5	422,1	43,7	21,7	210
24	53,3	748,5	21,6	97,1	13,6	406,5
25	88,9	748,5	0	100	8,4	337,7

TABELA 10.6 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 1,0 kgf / cm². Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de DQO no afluente e efluente, eficiência de remoção de DQO, produtividade volumétrica de remoção de DQO e pressão manométrica.

Tempo (Dias)	TDH (h)	DQO Afluente (mg / L)	DQO Efluente (mg / L)	Remoção de DQO (%)	Produtividade (mg / L h)	Pressão (kgf /cm²)
1	88,9	700	133,9	80,9	6,4	0,6
2	26,7	700	137,1	80,4	21,1	0,6
3	25,9	700	125,6	82,1	22,2	0,7
4	26,4	700	110,6	84,2	22,3	0,7
5	24,9	700	121,3	82,7	23,2	0,7
6	33,3	700	101,9	85,4	17,9	0,6
7	33,3	700	109,7	84,3	17,7	0,6
8	33,3	700	107,4	84,7	17,8	0,6
9	33,3	700	161,7	76,9	16,1	0,6
10	33,3	700	98,3	86	18,1	0,6
11	33,3	700	66,5	90,5	19	0,6
12	33,3	666,7	65,3	90,7	19	0,6
13	23,8	703,1	112,9	83,1	23,3	0,6
14	19,6	706,1	110,3	84,3	30,2	1
15	19,6	726,1	163,7	76,8	27,7	0,6
16	16,7	777	190,7	73,7	32,1	0,6
17	12,3	709,1	150,3	80,7	50,8	0,6
18	11,6	717,3	191,3	73	44,7	0,6
19	10,1	1209	165,7	76,9	54,4	0,6
20	13	1209,7	186,4	84,6	78,6	0,75
21	10,8	1410	291,3	75,9	85,1	0,9
22	10,2	1423	311,3	77,9	107,5	1
23	15,1	1323,1	436,2	69,3	65,5	0,75
24	53,3	1323,1	239,5	81,9	20,3	0,75
25	88,9	1323,1	121,3	90,8	13,5	0,75

TABELA 10.7 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator de mistura pressurizado entre 1,2 e 1,5 kgf / cm². Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de fenol no afluente e efluente, eficiência de remoção de fenol, produtividade volumétrica de remoção de fenol e massa seca celular (MS).

Tempo (Dias)	TDH (h)	Fenol Afluente (mg / L)	Fenol Efluente (mg / L)	Remoção de fenol (%)	Produtividade (mg / L h)	MS (mg / L)
1	18	595	229	100	33,3	200
2	18	595	0	100	33	--
3	18	622,9	0	100	33	228,6
4	18	652,1	0	100	34,6	195,7
5	12	617,4	0	100	54,5	160
6	10,3	617,4	33,6	94,6	56,9	--
7	10,3	631,2	181	70,7	42,5	180
8	9,9	710	346,5	45,1	28,7	122
9	66,7	710	0	100	10,7	--
10	53,3	710	0	100	13,3	--
11	17,8	703,1	49,8	93	37,1	--
12	14,7	631,2	108,2	84,6	40,6	60
13	10,8	631,2	123,1	80,5	46,9	--
14	10,8	633,4	71,2	88,7	51,7	280
15	16,7	663,2	33,2	94,8	36	--
16	16,7	663,2	250	62,3	24,8	--
17	11,3	663,2	540,1	18,6	10,9	20

TABELA 10.8 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator de mistura pressurizado entre 1,2 e 1,5 kgf / cm². Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de DQO no afluente e efluente, eficiência de remoção de DQO, produtividade volumétrica de remoção de DQO e pressão manométrica.

Tempo (Dias)	TDH (h)	DQO Afluente (mg / L)	DQO Efluente (mg / L)	Remoção de DQO (%)	Produtividade (mg / L h)	Pressão (kgf /cm²)
1	18	1315,9	512,2	61,1	44,6	1,5
2	18	1161,4	506,3	61,5	44,9	1,5
3	18	1161,4	555,7	52,2	33,6	1,5
4	18	1147	574,9	50,5	32,6	1,5
5	12	1147	186,4	83,7	80,3	1,5
6	10,3	1147	150,2	86,9	97,2	1,5
7	10,3	1191	333,7	70,9	79,3	1,5
8	9,9	1311,3	425,3	64,3	77,2	1,5
9	66,7	1311,3	532,3	58,4	11,7	1,5
10	53,3	1311,3	258,8	80,3	19,7	1,5
11	17,8	1250,1	118,8	90,9	67,1	1,5
12	14,7	1197	328,8	73,7	62,9	1,5
13	10,8	1197	280,5	76,6	84,5	1,5
14	10,8	1211	396,4	66,9	73,9	1,5
15	16,7	1257	237,1	80,4	58,4	1,5
16	16,7	1300,1	663,2	47,2	35,6	1,5
17	11,3	1317,9	664,3	48,9	56,3	1,5

TABELA 10.9 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator “air-lift” pressurizado. Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de fenol no afluente e efluente, eficiência de remoção de fenol, produtividade volumétrica de remoção de fenol e massa seca celular (MS).

Tempo (Dias)	TDH (h)	Fenol Afluente (mg / L)	Fenol Efluente (mg / L)	Remoção de fenol (%)	Produtividade (mg / L h)	MS (mg / L)
1	48,5	683,6	418,8	38,7	4,9	--
2	48,5	683,6	325	52,5	7,4	682
3	48,5	683,6	0	100	14,1	340
4	48,5	620,7	0	100	12,8	274,2
5	44,4	620,7	0	100	14	170
6	19,5	607,1	0	100	31,2	--
7	19,5	615,7	0	100	31,6	340
8	17,9	658,2	0	100	36,8	--
9	16,6	658,2	0	100	39,7	280
10	16,4	658,2	69,7	89,4	36	--
11	17,5	1208,3	357,8	70,4	48,5	--
12	22,8	1183	360,3	69,5	36,1	--
13	22,8	1268,9	360,3	71,6	39,9	170
14	26,4	1268,9	19,1	98,5	47,3	--
15	26,4	1203,3	2,3	99,8	45,5	220
16	23,2	1251,3	0	100	54	--
17	23,2	1245,7	0	100	53,7	450
18	23,4	1237,1	40,9	96,7	51,1	--
19	33,3	1645,2	114,3	93,1	45,9	560
20	35,6	1645,2	--	--	46,3	--
21	35,6	1645,2	219,1	86,7	40,1	410
22	37,6	2010,4	668,7	66,7	35,7	--
23	34,6	1630,1	818,7	49,8	23,4	--
24	34,6	1630,1	753,1	53,8	25,3	--
25	34,6	1612,1	434,3	73,1	34	--
26	35,6	1670,6	10	99,4	46,7	380
27	34,2	1670,6	--	--	--	--
28	34,2	1573,1	114,3	92,7	42,7	--
29	34,2	1779	6,1	99,7	51,9	560
30	34,6	1770	9,1	99,5	50,8	--
31	34,6	1751	191,7	89,1	45	--
32	35,1	1771,8	326,8	81,6	41,2	--
33	35,6	1639	321,8	80,4	37	300

34	37	1655	--	--	--	--
35	37	1656	336,8	79,7	35,6	--
36	36,5	1252,8	196,1	84,3	28,9	268
37	37	1258,2	103,2	91,8	31,2	--
38	37	1162	117,8	89,9	28,2	--
39	36,5	1298,1	170	86,9	30,9	290
40	36,5	1298,1	201,5	84,5	30	--
41	32,1	1140	--	--	--	--
42	32,1	1140	120,9	89,4	31,7	--
43	35,6	1236,9	31	97,5	33,9	--
44	35,1	1259,1	0	100	35,9	350
45	35,1	1259,1	4	99,7	35,8	--
46	35,1	1270,1	4,5	99,6	36,1	670
47	37	1653,1	2,9	99,8	44,6	--
48	37	1679,1	5,6	99,7	45,2	600
49	44,4	1679,1	16,1	99	37,4	--
50	41	1680,1	19,1	98,9	40,5	--
51	40,4	1680,1	7,3	99,6	41,4	620
52	53,3	1993	2,3	99,9	37,3	490
53	44,4	1975	8,4	99,6	44,2	--
54	35,1	1959,6	72,4	96,3	53,8	--
55	32,5	1898,7	99,4	94,8	55,3	310
56	53,3	2038	--	--	--	--
57	38,6	2038	93,8	95,4	50,3	495
58	41,7	2076,6	101,1	95,1	47,4	--
59	33,3	2076,6	358,1	82,8	51,6	--
60	37	2076,6	332,7	84	47,1	370
61	39,8	2168,4	528,6	75,6	41,2	--
62	39,8	2168,4	539,6	75,1	40,9	--
63	39,8	2168,4	461,3	78,7	42,9	326,7

TABELA 10.10 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator “air-lift” pressurizado. Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de DQO no afluente e efluente, eficiência de remoção de DQO, produtividade volumétrica de remoção de DQO e pressão manométrica.

Tempo (Dias)	TDH (h)	DQO Afluente (mg / L)	DQO Efluente (mg / L)	Remoção de DQO (%)	Produtividade (mg / L h)	Pressão (kgf /cm²)
1	48,5	1285,4		--	--	1
2	48,5	1285,4	512	60,2	16	1
3	48,5	1285,4	343,3	73,3	19,4	1
4	48,5	1243	278,8	77,6	19,9	1
5	44,4	1243	98,4	92,1	25,8	1
6	19,5	1231,2	97	92,1	58,3	1
7	19,5	1234,6	87,5	92,9	58,9	1,2
8	17,9	1265,4	70,6	94,4	66,8	1,1
9	16,6	1265,4	90	92,9	71	1,1
10	16,4	1265,4	121,3	90,4	69,9	1,2
11	17,5	2614	741,5	71,6	106,7	1,1
12	22,8	2614	780	70,2	80,5	1,1
13	22,8	2614	809,1	69	79,2	1,1
14	26,4	2614		--	--	1,2
15	26,4	2589	195,5	92,4	90,7	1,3
16	23,2	2607		--	--	1,2
17	23,2	2612	302,0	88,4	99,6	1,2
18	23,4	2639	487	81,5	92	1,2
19	33,3	3460	516	85,1	88,3	1,2
20	35,6	3460		--	--	1,1
21	35,6	3460	543,0	84,3	82	1,1
22	37,6	4168		--	--	1
23	34,6	3365		--	--	1,1
24	34,6	3365	598	82,2	79,9	1,1
25	34,6	3314	453	86,3	82,6	1,1
26	35,6	3365	196	94,2	89,1	1,2
27	34,2	3365		--	--	1,2
28	34,2	3365	265	92,1	90,7	1,2
29	34,2	3785	157	95,9	106,1	1,2
30	34,6	3785	159	95,8	104,7	1,2
31	34,6	3696	356	90,4	96,4	1,2
32	35,1	3758	418	88,9	95,2	1,2
33	35,6	3499	613	82,5	81,2	1,2

34	37	3499		--	--	1,2
35	37	3499	589	83,2	78,6	1,3
36	36,5	2657	341	87,2	63,4	1,3
37	37	2657	301	88,7	63,6	1,2
38	37	2549	315	87,6	60,3	1,2
39	36,5	2786	313	88,8	67,7	1,3
40	36,5	2786	359	87,1	66,4	1,3
41	32,1	2449		--	--	1,3
42	32,1	2449	298	87,8	66,9	1,3
43	35,6	2587	184	92,9	67,6	1,3
44	35,1	2688	136	94,9	72,7	1,3
45	35,1	2688	150	94,4	72,3	1,3
46	35,1	2688	126	95,3	73	1,3
47	37	3547	278	92,2	88,3	1,3
48	37	3547	286	91,9	88	1,3
49	44,4	3596	299	91,7	74,2	0,6
50	41	3658	302	91,7	81,8	1
51	40,4	3658	1	--	--	1
52	53,3	4259	489	88,5	70,7	1
53	44,4	4259	508	88,1	84,4	1,1
54	35,1	4259	564	86,8	105,3	1,1
55	32,5	4136	569	86,2	109,7	1,2
56	53,3	4402		--	--	0,6
57	38,6	4402	596	86,5	98,5	1,5
58	41,7	4402	625	85,8	90,6	1,3
59	33,3	4402	729	83,4	110,2	1,5
60	37	4402	714	83,8	99,6	1,5
61	39,8	4641	948,0	79,6	92,8	1,5
62	39,8	4641	986,0	78,8	91,8	1,1
63	39,8	4641	856,0	81,6	95,1	1,1

TABELA 10.11 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado. Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de fenol no afluente e efluente, eficiência de remoção de fenol, produtividade volumétrica de remoção de fenol e massa seca celular (MS).

Tempo (Dias)	TDH (h)	Fenol Afluente (mg / L)	Fenol Efluente (mg / L)	Remoção de fenol (%)	Produtividade (mg / L h)	MS (mg / L)
1	--	681	0	--	--	--
2	43,7	675	0	100	15,4	--
3	43,7	655	0	100	15	--
4	43,7	655	0	100	15	--
5	43,7	655	0	100	15	460
6	35,6	655	44,2	93,3	17,2	380
7	49,4	1309,8	14,4	98,9	26,2	--
8	47,6	1309,8	--	--	--	--
9	47,6	1309,8	321,1	75,5	20,8	--
10	43,7	1080,4	412,1	61,9	15,3	250
11	35,6	1080,4	--	--	--	--
12	35,6	1080,4	448,6	58,5	17,8	340
13	35,1	1050,7	376,1	64,2	19,2	350
14	32,1	1050,7	--	--	--	--
15	32,1	1050,7	--	--	--	--
16	32,1	1050,7	393,4	62,6	20,5	180
17	37	1168,6	--	--	--	--
18	37	1168,6	--	--	--	--
19	37	1168,6	577,7	50,6	16	--
20	37	1131,6	451,4	60,1	18,4	230
21	35,1	1115,6	475,6	57,4	18,2	160
22	35,1	1179,1	504,1	57,2	19,2	230
23	35,1	714	11,7	98,4	20	--
24	35,1	714	7,2	99	20,1	370
25	35,1	714	0	100	20,3	--
26	35,1	714	0	100	20,3	--
27	35,1	970	0	100	27,6	--
28	32,5	970	0	100	29,8	90
29	29,6	970	0	100	32,7	440
30	30,3	970	0	100	32	200
31	31,4	1350	1,1	99,9	43	160
32	36,5	1350	34,9	97,4	36	130
33	36,5	1350	--	--	--	240

34	35,6	1405	504,3	64,1	25,3	--
35	35,6	1091	329,4	69,8	21,4	160
36	31,7	927,9	294,7	68,2	19,9	230
37	32,1	927,9	359,2	61,3	17,7	193,3
38	31,7	927,9	460	50,4	14,7	90
39	32,5	696,1	--	100	21,4	--
40	32,5	696,1	6,7	99	21,2	--
41	31,7	696,1	5	99,3	21,8	630
42	36	696,1	7,2	99	19,1	500
43	32,9	1220	4,5	99,6	36,9	473,3
44	32,5	1220	3,4	99,7	37,4	480
45	32,5	1220	6,1	99,5	37,3	430
46	32,1	1270	--	100	39,5	--
47	32,1	1293	118,1	90,9	36,6	346,6
48	35,1	1293	200	84,5	31,2	300
49	35,1	1293	337,2	73,9	27,2	150

TABELA 10.12 Resultados do ensaio contínuo de degradação de fenol em reator “air-lift” pressurizado com carvão ativado. Dados de tempo de operação do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentrações de DQO no afluente e efluente, eficiência de remoção de DQO, produtividade volumétrica de remoção de DQO e pressão manométrica.

Tempo (Dias)	TDH (h)	DQO Afluente (mg / L)	DQO Efluente (mg / L)	Remoção de DQO (%)	Produtividade (mg / L h)	Pressão (kgf /cm²)
1	--	1302		--	--	
2	43,7	1302		--	--	1
3	43,7	1302	138,2	89,4	26,6	1
4	43,7	1302	121,0	90,7	27	1,1
5	43,7	1302	108,0	91,7	27,3	1,1
6	35,6	1302	109,2	91,6	33,5	1,2
7	49,4	2706	256	90,5	49,6	1,4
8	47,6	2706		--	--	1,3
9	47,6	2706	598	77,9	44,3	1,4
10	43,7	2706	746,3	72,4	44,8	1,3
11	35,6	--		--	--	1,2
12	35,6	2870	721	74,9	60,4	1,2
13	35,1	2870	804,2	72	58,9	1,2
14	32,1	--		--	--	1,2
15	32,1	--		--	--	1,2
16	32,1	2870	720	74,9	66,9	1,3
17	37	2029,1		--	--	1,3
18	37	2029,1	618,4	69,5	38,1	1,3
19	37	2029,1		--	--	1,3
20	37	2010,9	922,5	54,1	29,4	1,3
21	35,1	2010,9	961	52,2	29,9	1,3
22	35,1	2090,3	941,8	54,9	32,7	1,3
23	35,1	1251	215	82,8	29,5	0
24	35,1	1251	106,8	91,5	32,6	0
25	35,1	1251	130	89,6	31,9	0
26	35,1	1291	159	87,7	32,3	0
27	35,1	1291	178	86,2	31,7	1
28	32,5	2001	106,8	94,7	58,2	1
29	29,6	2001	109,2	94,5	63,8	0,8
30	30,3	2001	104,4	94,8	62,6	1
31	31,4	--		--	--	1
32	36,5	2350	196,1	91,7	59	1
33	36,5	--		--	--	1
34	35,6	2450	988	59,7	41,1	1

35	35,6	1930	654,6	66,1	35,9	1
36	31,7	--		--	--	1
37	32,1	1930	786,0	59,3	35,6	1
38	31,7	1930	854,9	55,7	33,9	1
39	32,5	1307		--	--	1,1
40	32,5	1307		--	--	1,1
41	31,7	1307	94,0	92,8	38,2	1
42	36	1351	89	93,4	35	1
43	32,9	2101,5	98	95,3	60,9	1
44	32,5	2101,5	110	94,8	61,2	1
45	32,5	2101,5	115	94,5	61,1	1
46	32,1	2101,5	109	94,8	62	1
47	32,1	2130,1	260	87,8	58,2	1
48	35,1	2130,1	240	88,7	53,9	1
49	35,1	2130,1	329	84,6	51,3	1