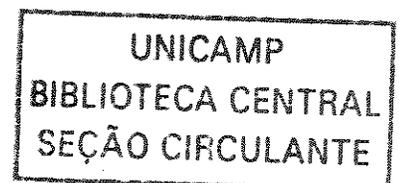


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL**

**BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
INCORPORADOS EM AREIA DE MOLDAGEM
UTILIZANDO MICRORGANISMOS DO SOLO**

Anjaina Fernandes de Albuquerque



**Campinas
2000**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL

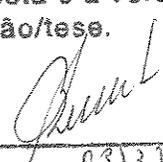
**BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
INCORPORADOS EM AREIA DE MOLDAGEM
UTILIZANDO MICRORGANISMOS DO SOLO**

Anjaina Fernandes de Albuquerque

Orientador: Prof. Dr. Bruno Coraucci Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à
Comissão de Pós Graduação da Faculdade
Engenharia Civil da Universidade Estadual
de Campinas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Civil na área de concentração Saneamento.

Atesto que esta é a versão definitiva
da dissertação/tese.

Prof. Dr. 

Matrícula: 03437-1

12/02/03

Campinas, SP
2000

03437-1

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	AL15b
V	EX
TOMBO BC/	53257
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	23/09/03
Nº CPD	

CM001B214B-0

01B 10 287889

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

AL15b
AL15b

Albuquerque, Anjaina Fernandes de

Biodegradação de compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem utilizando microrganismos do solo / Anjaina Fernandes de Albuquerque.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Bruno Coraucci Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil.

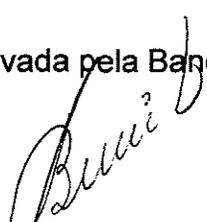
1. Biodegradação. 2. Areia de Fundição. 3. Microorganismos do solo. 4. Fenóis. I. Coraucci Filho, Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil. III. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL**

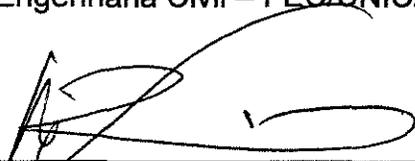
**BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
INCORPORADOS EM AREIA DE MOLDAGEM UTILIZANDO
MICROORGANISMOS DO SOLO**

Anjaina Fernandes de Albuquerque

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:



Prof. Dr. Bruno Coraucci Filho
Presidente e Orientador
Faculdade de Engenharia Civil – FEC/UNICAMP



Prof. Dr. Antônio Roberto Siviero
Colégio Técnico de Limeira – COTIL/UNICAMP



Prof. Dr. Edson Aparecido Abdul Nour
Faculdade de Engenharia Civil – FEC/UNICAMP

Campinas, 15 de agosto de 2000.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
irmãos e ao meu grande companheiro Paulo.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Bruno Coraucci Filho pela oportunidade, orientação, amizade e estímulo para realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Antonio Roberto Siviero pelo auxílio e amizade durante toda a pesquisa, principalmente na sua contribuição para minha formação intelectual e humana.

Aos Professores Doutores da Área de Saneamento Edson Aparecido Abdul Nour, Eglé Novaes Teixeira e José Roberto Guimarães pela atenção no decorrer do trabalho.

Aos Professores Joaquim Augusto Pereira Lazari e Angela Albino pelo incentivo e apoio no decorrer do trabalho.

A Professora e Diretora do Centro Superior de Educação Tecnológica (CESET), Maria Auciliadoura Marinho, pelo apoio, incentivo e acima de tudo amizade.

Ao chefe do Departamento de Exatas do Colégio Técnico de Limeira, por disponibilizar o laboratório para realização da parte experimental da pesquisa.

À indústria TRW Varga pelo custeio das análises químicas do resíduo e ao Sr. Antônio Francisco Peixoto Zabin pela atenção e colaboração no fornecimento do resíduo areia de moldagem.

À indústria Máquinas Furlan pelo auxílio na trituração das amostras de areia de moldagem e ao Sr. Raimundo Nonato pela atenção.

Aos Laboratórios Bioagri e TASQA pela facilidade e atenção na realização das análises químicas.

Aos amigos da DPA Engenharia Mecânica, Alexandre, Édson, Igor, Andrezza e Tiago, pelo apoio, recursos disponibilizados e momentos de descontração.

Aos amigos, Geraldo, Emerson, Ivonei, Reginaldo, Adria, Josiane, Cristiane, Andréia Campos, Ana, Silvana, Michele, Gilberto, Fábio, Milena, Paulo Soldera, Carolina, Sandro, Renata, Andréia, Elizete, Paulo Venâncio, Estefânia, Roberta, Marta, Cissa, Kátia, Edmilson, Luciano, Obadias, Marcelo Balbino, Luis Fernando, Luis Almeida, Ritinha, Helena, Edil, Ronaldo, Celina, Pacheco, Vanda, Érika, Daniele, Mariana, Marta Siviero, Beto, Sandro, Luís, Márcia, Rosa, Rosa F., Lilian, Adílson, Rita, Ruth, Irleny, Antônio, Luis Klusener, pela compreensão, alegria, estímulo e apoio nos momentos nos quais parecia que não daria para prosseguir.

A minha família que soube compreender a minha ausência e, mesmo distante, me apoiou. Em especial a minha mãe, meu exemplo de força e amor.

Ao meu sobrinho Caio pela alegria e carinho, sempre.

A toda família Piccinini, em especial a Sra. Célia e Sr. João pelo carinho e incentivo permanente.

Ao querido Paulo Rogério Piccinini, com o qual compartilhei os momentos difíceis e de alegria, agradeço a paciência, incentivo e carinho demonstrado durante todos esses anos.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
RESUMO	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 <i>Resíduos sólidos: classificação e gerenciamento</i>	4
3.2 <i>Geração do resíduo “areia de moldagem”</i>	8
3.3 <i>Fenol</i>	14
3.4 <i>Biodegradação de compostos fenólicos</i>	15
3.5 <i>Microrganismos do solo</i>	20
3.6 <i>Avaliação da biodegradação</i>	24
3.6.1 <i>Respirometria</i>	25
3.6.2 <i>Contagem dos microrganismos</i>	26
3.6.3 <i>Determinação do fenol</i>	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 <i>Desenvolvimento do trabalho experimental</i>	28
4.2 <i>Material</i>	30
4.2.1 <i>Areia de moldagem</i>	30
4.2.2 <i>Solo</i>	31
4.2.3 <i>Respirômetros</i>	31
4.2.4 <i>Meios de cultura</i>	33

4.2.4.1 Meio para quantificação de bactérias	33
4.2.4.2 Meio para quantificação de fungos	33
4.2.4.2.1 Meio ágar Sabouraud	34
4.2.4.3 Meio para quantificação de actinomicetos	34
4.2.4.4 Meio para adaptação dos microrganismos ao fenol	35
4.2.4.5 Meios utilizados no Ensaio da Mínima Concentração Inibitória	35
4.2.4.5.1 Meio mínimo para bactérias.....	35
4.2.4.5.2 Meio mínimo para fungos	36
4.2.4.5.3 Meio mínimo para actinomicetos	37
4.2.4.6 Meios de cultura para "Reação de Bavendamm.....	37
4.2.4.6.1 Meio ácido gálico 0.5%	37
4.3 Métodos.....	38
4.3.1 Caracterização e classificação da areia de moldagem.....	38
4.3.1.1 Amostragem do Resíduo	38
4.3.1.2 Ensaio de Lixiviação e Ensaio de Solubilização	38
4.3.1.3 Caracterização físico-química da areia de moldagem.....	39
4.3.2 Caracterização e Classificação do solo	39
4.3.2.1 Amostragem e preparo das amostras de solo	39
4.3.2.2 Caracterização do solo	40
4.3.3 Contagem dos microrganismos do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem.....	40
4.3.4 Coleta de amostras do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem nos respirômetros	41
4.3.5 Preparo das diluições de solo e areia de moldagem para análise microbiológica.....	41
4.3.6 Contagem dos microrganismos	42
4.3.6.1 Contagem das bactérias.....	42
4.3.6.2 Contagem dos fungos.....	42
4.3.6.3 Contagem dos actinomicetos.....	43
4.3.7 Determinação da umidade das amostras de mistura do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem.....	43

4.3.8 Isolamento dos microrganismos que cresceram na mistura solo/areia	43
4.3.9 Adaptação dos microrganismos ao fenol	44
4.3.10 Ensaio da Mínima Concentração Inibitória (MCI)	46
4.3.11 Seleção dos microrganismos degradadores de fenol pela "Reação de Bavendamm"	49
4.3.12 Preparo dos inóculos	51
4.3.13 Respirometria utilizando areia de moldagem com inoculação de microrganismos	53
4.3.13.1 Determinação da quantidade da areia de moldagem aplicada nos respirômetros	53
4.3.13.2 Determinação do teor de umidade da areia de moldagem	54
4.3.13.3 Montagem dos respirômetros	54
4.3.13.4 Balanceamento dos nutrientes	57
4.3.14 Determinação da quantidade de CO ₂ produzido nos respirômetros	57
4.3.14.1 Cálculo da Geração de CO ₂ produzido nos respirômetros	58
4.3.15 Determinação da concentração de fenol na areia de moldagem durante a respirometria	58
4.3.16 Contagem de microrganismos presentes na areia de moldagem	59
4.3.16.1 Contagem dos microrganismos da areia "in natura" e após aglomeração com resina fenólica	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Caracterização da areia de moldagem	60
5.1.1 Características químicas da areia de moldagem	60
5.1.2 Concentração de fenol na areia de moldagem (2ª Fase)	61
5.2 Caracterização do solo	62
5.3 Contagem dos microrganismos da mistura solo/areia de moldagem	63
5.4 Número de microrganismos isolados da mistura solo/ areia de moldagem	65
5.5 Adaptação dos microrganismos ao fenol	65
5.6 Determinação da Mínima Concentração Inibitória	68
5.7 Número de colônias obtidas da Reação de Bavendamm	71
5.8 Biodegradação do fenol presente na areia de moldagem	71

5.9 <i>Respirometria</i>	74
5.9.1 Cálculo do CO ₂ teórico e quantificação do efetivo produzido em função da biodegradação de compostos fenólicos incorporados no resíduo	76
5.10 <i>Quantificação de bactérias, fungos e actinomicetos nas amostras de areia ao final de 90 dias</i>	77
5.10.1 Contagem dos microrganismos presentes na areia “in natura”.	78
6 DISCUSSÃO	80
6.1 <i>Caracterização e classificação da areia de moldagem</i>	80
6.2 <i>Caracterização do solo</i>	81
6.3 <i>Contagem dos microrganismos do solo</i>	82
6.4 <i>Isolamento dos microrganismos</i>	83
6.5 <i>Adaptação ao fenol e determinação da Mínima Concentração Inibitória</i>	84
6.6 <i>“Reação de Bavendamm”</i>	85
6.7 <i>Remoção de fenol durante o ensaio de respirometria</i>	85
6.8 <i>Respirometria</i>	87
6.9 <i>População de microrganismos ao final de 90 dias</i>	89
7 CONCLUSÕES	90
8 RECOMENDAÇÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ABSTRACT	100

Lista de Figuras

	Página
3.1 Fluxograma para classificação de resíduos.....	6
3.2 Sequência de operações na fundição de um metal.....	10
3.3 Esquema mostrando os grupos hidroxilas fornecidos pela resina fenólica da parte I que reagem com os grupos isocianatos da parte II na presença do catalisador amina, para formar a resina uretânica sólida	13
3.4 Vias de biodegradação do fenol.....	16
4.1 Esquema do trabalho experimental	29
4.2 Aspecto de um macho de fundição.....	30
4.3 Modelo do respirômetro de Bartha.....	32
4.4 Procedimento empregado para isolamento dos microrganismos	45
4.5 Esquema do procedimento empregado para adaptação dos microrganismos ao fenol.....	46
4.6 Procedimento empregado para adaptação dos microrganismos ao fenol e determinação da Mínima Concentração Inibitória (MCI).....	48
4.7 Procedimento empregado para a realização da Reação de Bavendamm.....	50
4.8 Procedimento empregado para o preparo dos inóculos	52
4.9 Procedimento empregado para montagem dos respirômetros	56
5.1 Valores de absorvância referentes ao crescimento das bactérias no período de 72 horas, em diferentes concentrações de fenol.....	67
5.2 Valores de absorvância referentes ao crescimento dos fungos no período de 72 horas, em diferentes concentrações de fenol	67

5.3 Valores de absorvância referentes ao crescimento dos actinomicetos no período de 72 horas, em diferentes concentrações de fenol	68
5.4 Valores de absorvância obtidos no ensaio MCI com meio mínimo para bactérias	70
5.5 Valores de absorvância obtidos no ensaio MCI com meio mínimo para fungos.....	70
5.6 Valores de absorvância obtidos no ensaio MCI com meio mínimo para actinomicetos.....	71
5.7 Degradação do fenol para os diferentes inóculos aplicados: (a) controle, (b) bactérias, (c) fungos, (d) actinomicetos, (e) misto com nutrientes, (f) misto sem nutrientes.....	73
5.8 Produção acumulada de CO ₂ obtida no ensaio de respirometria, durante o período de 90 dias devido a biodegradação dos compostos fenólicos na areia de moldagem.....	76
5.9 Log das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, fungos e actinomicetos na areia retirada dos respirômetros após 90 dias.....	78
5.10 Contagem dos microrganismos presentes na areia "in natura" e após a aglomeração com resina fenólica	79

Lista de Tabelas

	Página
3.1 Número aproximado de organismos comumente encontrados nos solos, baseado na contagem em placas.....	20
5.1 Caracterização química do lixiviado, do solubilizado e da massa bruta do resíduo areia de moldagem.....	61
5.2 Resultados das análises químicas e físicas do solo utilizado no experimento ...	63
5.3 Contagem dos microrganismos no solo para o perfil de solo 0,0 – 0,25 m.....	63
5.4 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, fungos e actinomicetos do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem coletados dos respirômetros no período de 90 dias	64
5.5 Valores de absorvância a 585 nm referentes ao crescimento dos microrganismos em diferentes concentrações de fenol.....	66
5.6 Valores de absorvância a 585 nm referentes ao crescimento dos microrganismos no ensaio de Mínima Concentração Inibitória (MCI) utilizando Meio Mínimo contendo fenol.....	69
5.7 Avaliação da concentração de fenol na areia de moldagem durante o período de 90 dias	72
5.8 Porcentagem de remoção do fenol no período de 90 dias	72
5.9 Quantificação do CO ₂ (mg) acumulado, gerado pelo processo de biodegradação dos compostos fenólicos incorporados no resíduo areia de moldagem, durante 90 dias à temperatura de 28 °C	75
5.10 Produção de CO ₂ teórico calculado e efetivo medido nos respirômetros	77

5.11 Unidades Formadoras de colônias de bactérias, fungos e actinomicetos nas amostras de areia retiradas dos respirômetros após 90 dias.....	77
5.12 Unidades Formadoras de Colônias dos microrganismos (bactérias e fungos e actinomicetos) em duas amostras de areia antes - "in natura" - e após a adição de resina fenólica - areia de moldagem	79

RESUMO

ALBUQUERQUE, Anjaina Fernandes de. Biodegradação de compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem utilizando microrganismos do solo. Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 2000. 100 pág. Dissertação.

O resíduo areia de moldagem gerado na indústria de fundição, apresenta em sua composição, entre outros constituintes resina fenólica. Este resíduo representa cerca de 2% em peso, do total de areia base utilizada para confecção dos machos, e não são recuperadas no processo de fundição da empresa em estudo. Em função da concentração de fenol de 164 mg/Kg na massa bruta este resíduo foi classificado de acordo com a NBR 10.004 (ABNT), como Classe I – perigoso. O trabalho teve como objetivos o isolamento dos microrganismos do solo e seleção dos mais eficientes na degradação de fenol para estudo de biodegradação dos compostos incorporados no resíduo. Foram isolados três grupos de microrganismos: bactérias, fungos e actinomicetos, da mistura solo/areia de moldagem. Estes microrganismos foram selecionados quanto a produção de fenol oxidases através da Reação de Bavendamm e, da concentração de 1200 mg/L de fenol, no ensaio de MCI. Para avaliar a eficiência de degradação destes microrganismos foi utilizado o método respirométrico de Bartha. Os microrganismos foram introduzidos nos respirômetros, através de inóculos de cada grupo e culturas mistas, incubados a 28 °C por 90 dias. Ao final do período, em todos os inóculos testados a remoção de fenol na massa bruta do resíduo, foi superior a 95%, sendo o melhor desempenho observado para os inóculos de cultura mista, com e sem balanceamento de nutrientes, com remoção de 99%. As concentrações residuais de fenol na massa bruta foram respectivamente de 1,7 e 1,6 mg/Kg, valores, inferiores a 10 mg/Kg que caracteriza o resíduo como perigoso. De uma forma prática verificou-se que com a cultura mista em apenas 37 dias aproximadamente, a concentração de fenol na massa bruta ficou abaixo do valor de 10 mg/Kg conforme legislação pertinente. Desta forma, o tratamento do resíduo através de processo biológico apresentou-se como uma alternativa na minimização do potencial de agressão ao ambiente.

Palavras Chave: biodegradação, fenol, respirometria, microrganismos do solo, areia de moldagem

1 INTRODUÇÃO

O crescimento das populações, assim como o grande desenvolvimento industrial tem contribuído para o aumento da geração de resíduos sólidos, o que acarreta a degradação ambiental, com reflexo negativo sobre a qualidade de vida das populações.

Este risco potencial pode ser ilustrado pelos resíduos industriais, em função da grande quantidade gerada e pelo gerenciamento inadequado.

De maneira geral não existem sistemas de gerenciamento que contemplam a minimização da geração, segregação, reutilização, assim como, tratamento e disposição final adequados. Dentre os resíduos industriais os mais preocupantes são os classificados como Classe I, ou seja, perigosos, tanto pela grande quantidade gerada como pela forma de gerenciamento. Num estudo realizado, denominado "Diagnóstico de Resíduos Sólidos nas Bacias dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí" a quantidade de resíduos Classe I a ser gerado no ano 2000 foi estimada em 125.773 toneladas, sendo 15% deste total estocados na própria indústria. Limeira, município onde está situada a indústria geradora do resíduo estudado, aparece com o maior percentual de geração de resíduos industriais destas bacias, sendo responsável por 17,1% do total.

Os resíduos industriais considerados Classe I – perigosos, apresentam periculosidade em função de suas propriedades físicas, químicas ou infecto-contagiosas, podendo colocar em risco a saúde pública e o ambiente. As

características que conferem periculosidade aos resíduos são inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e patogenicidade (ABNT, 1987a).

As indústrias de fundição geram resíduos sólidos, areia de moldagem, na produção dos machos¹ através de processo de moldagem. No processo "Cold Box" para produção dos machos, emprega-se a resina fenólica que atua como aglomerante e, por apresentar teores livres de fenol confere periculosidade ao resíduo.

A preocupação quanto ao resíduo areia de moldagem, está no fato de que grandes quantidades são geradas diariamente, sem possibilidade de recuperação e no destino adotado pela maioria das indústrias, que optam pela estocagem nos próprios pátios. Portanto, tornam-se necessários o estudo e desenvolvimento de novas metodologias que possam auxiliar na solução do problema com eficiência e baixo custo.

Neste trabalho, a degradação de compostos fenólicos incorporados no resíduo, pela ação dos microrganismos isolados do solo foi estudada. O isolamento de microrganismos degradadores de um poluente do ambiente é uma das fases de um programa de tratamento biológico, que compreende ainda, a otimização da atividade microbiana em escala laboratorial e de campo e, finalmente, a reintrodução dos microrganismos para acelerar o processo de biodegradação. Desta forma, o tratamento biológico apresenta-se como uma alternativa para redução ou eliminação do fenol e de outros compostos orgânicos presentes na areia de moldagem.

¹ Machos são peças de areia aglomerada que reproduzem exatamente a forma do oco que deve ter a peça fundida.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

Isolamento dos microrganismos do solo adaptados aos compostos fenólicos do resíduo areia de moldagem, coletados durante ensaios realizados com respirômetros de Bartha.

Verificação da presença de enzima fenol oxidase nas cepas isoladas através da Reação de Bavendamm e, determinação da Mínima Concentração Inibitória de fenol.

Avaliação da biodegradação dos compostos fenólicos incorporados no resíduo pelos microrganismos isolados adaptados ao fenol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Resíduos sólidos: classificação e gerenciamento

Os resíduos sólidos originados dos processos industriais, por sua peculiaridade e, em muitos casos, pelo perigo que podem representar para o ser humano e para o ambiente, necessariamente devem receber tratamento especial desde a sua geração até a sua disposição final.

São definidos como resíduos sólidos de acordo com norma NBR 10.004 (ABNT, 1987a), aqueles em estado sólido e semi-sólido que resultam da atividade industrial, domiciliar, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Incluem-se também nessa definição os lodos provenientes de estações de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água ou exijam para isso soluções técnicas e economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível.

A estrutura para a classificação dos resíduos sólidos está contida em normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas quais sejam (ROCCA et al., 1993):

- ◆ NBR 10.004 – Resíduos Sólidos – Classificação;
- ◆ NBR 10.005 – Lixiviação de Resíduos - Procedimento;
- ◆ NBR 10.006 – Solubilização de Resíduos - Procedimento;
- ◆ NBR 10.007 – Amostragem de Resíduos - Procedimento.

Para classificação dos resíduos, utiliza-se a Norma NBR 10.004 (ABNT, 1987a) que classifica um resíduo quanto ao seu potencial de agressão ao ambiente e a saúde pública, em três grupos definidos: Classe I - perigosos; Classe II - não inertes e Classe III - inertes.

O resíduo Classe I – perigoso é definido como resíduo sólido ou mistura de resíduos que, em função de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e patogenicidade, podem apresentar riscos à saúde pública, provocando ou contribuindo para um aumento de mortalidade ou incidência de doenças, e/ou apresentarem efeitos adversos ao ambiente, quando manuseados ou dispostos de forma inadequada.

São considerados como resíduos Classe I – perigosos, os resíduos que estiverem relacionados nas Listagens n.º 1 e 2 da NBR 10.004 (ABNT, 1987a), que relacionam os resíduos reconhecidamente perigosos e, os que submetidos ao Teste de Lixiviação, conforme NBR 10.005- “Lixiviação de Resíduos - Procedimento” (ABNT, 1987b), apresentarem teores de poluentes no extrato lixiviado em concentração superior aos padrões constantes da Listagem 7. A metodologia a ser adotada na classificação de um resíduo é apresentada na Figura 3.1.

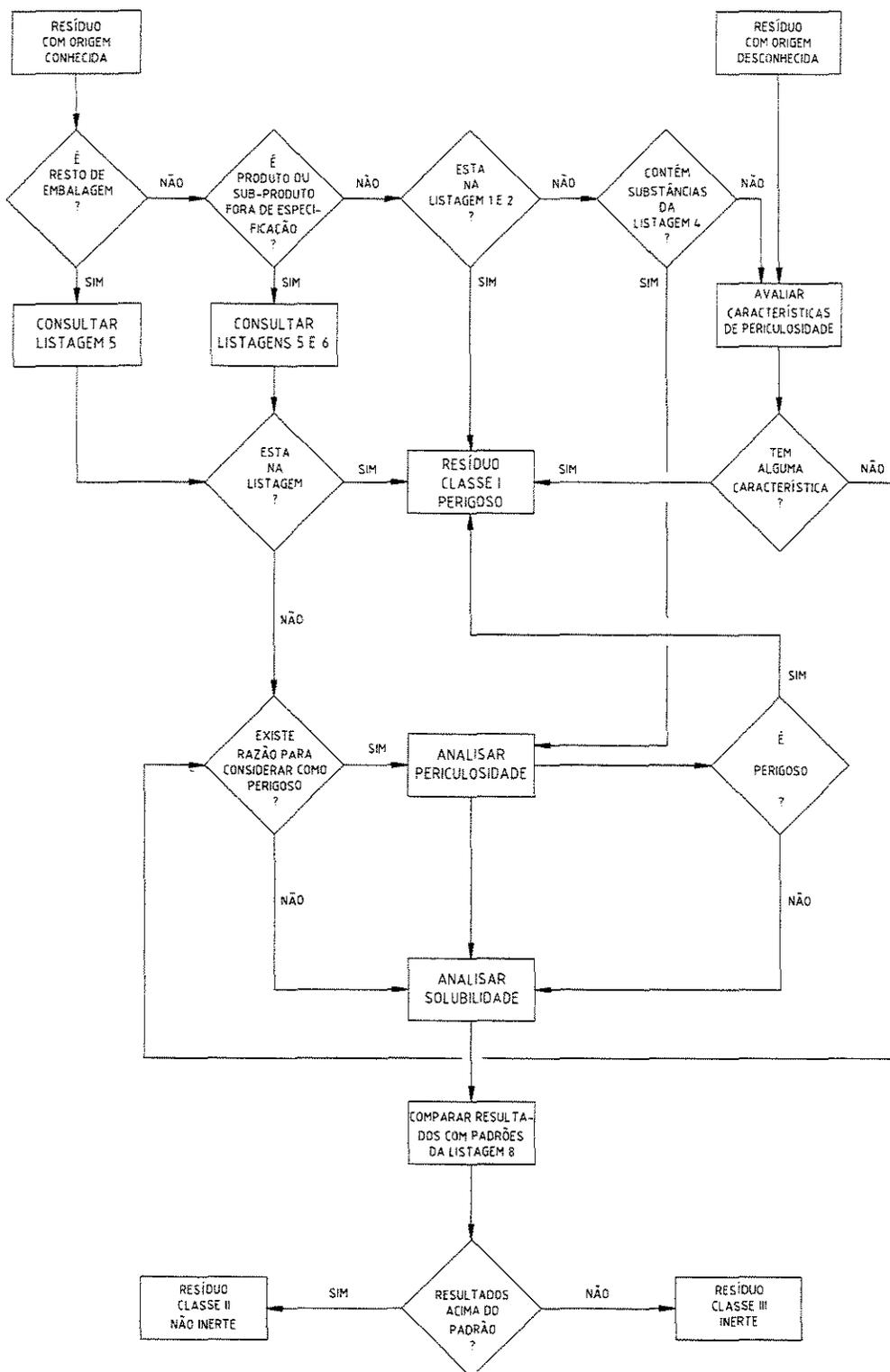


Figura 3.1 – Fluxograma para classificação de resíduos
 Fonte: ROCCA et al. (1993).

De acordo com ROCCA et al. (1993), as decisões técnicas e econômicas a serem tomadas em todas as fases no trato dos resíduos sólidos industriais deverá estar fundamentada na classificação do mesmo.

O manejo ambientalmente saudável dos resíduos se encontra entre as questões mais importantes para a manutenção da qualidade do ambiente. Este manejo deve ir além do simples depósito ou aproveitamento, buscando resolver a causa do problema e, procurando mudar os padrões de produção e consumo (SEMA, 1998).

Isto implica na utilização do conceito de gerenciamento integrado, que envolve o controle da geração do resíduo, iniciando-se com o controle da matéria prima, o controle de todos os processos industriais na tentativa de não gerá-lo ou de minimizá-lo no final da produção, passando às técnicas de armazenamento, transporte, tratamento e disposição final adequada, num modelo de gerenciamento denominado “cadle to grave” (berço ao túmulo), ou seja, da geração à disposição final (DEMPSEY e OPPELT, 1993 apud SOUZA, 2000).

Quanto ao tratamento do resíduo areia de fundição SOUZA (2000), relata que recentemente, esta, tem sofrido recuperação mecânica e térmica, apesar, de um grande número de indústrias do setor ainda armazenarem estes resíduos em pátios ou em aterros dentro da própria instalação industrial. Em relação ao tratamento térmico, enfatiza que a recuperação da areia não é total e ainda são gerados resíduos nos filtros de controle de emissões atmosféricas, denominados “finos”, e ambos, devem ter um destino ambientalmente adequado.

Na maioria dos casos, o que se verifica é que para o resíduo areia de moldagem, a solução mais adotada é a estocagem dentro da própria indústria. PENTEADO (1997), destaca que esta prática pela nossa legislação deveria ser provisória, mas, muitas indústrias a adotam por não terem alternativas viáveis de tratamento e destinação. Não existe um procedimento padrão para tratamento e

disposição deste resíduo. O tratamento térmico, a lavagem físico-química, a oxidação química, a adsorção e a biodegradação são apontados na literatura como possíveis processos (SOUZA, 2000).

3.2 Geração do resíduo “areia de moldagem”

A fundição de metais é considerada uma atividade potencialmente poluidora, pois a transformação dos diversos insumos envolvidos no processo resulta na formação de resíduos sólidos e poluentes atmosféricos.

Por outro lado, a indústria de fundição figura como de extrema importância para o desenvolvimento de um país, uma vez que, a disponibilidade de peças metálicas para a fabricação de diversos tipos de máquinas e equipamentos é dependente deste tipo de processo (SIEGEL, 1978).

Desta forma, torna-se necessário buscar soluções que permitam compatibilizar esta atividade produtiva com a proteção sanitária e ambiental.

O processo de fundição consiste em aquecer o metal ou liga até que ele se funda e se transforme em um líquido homogêneo. Em seguida, o metal líquido é vazado em moldes e, ao se solidificar, adquirirá a forma da peça definida no molde (BRADASCHIA, 1989).

Na fundição de um metal, pode-se distinguir duas séries diferentes de operações que consistem, na preparação do molde e, fusão e vazamento do metal. Segundo TEIXEIRA (1993), após a solidificação e resfriamento do metal no molde, ocorre o processo de desmoldagem que pode ser mecânico ou manual. De acordo com BRADASCHIA (1989), as etapas deste processo são:

- Fabricação dos modelos;
- Fabricação dos moldes;
- Fabricação dos machos;
- Fusão do metal;
- Vazamento seguido de solidificação;
- Operações de desmoldagem;
- Operações de rebarbação e limpeza de peças;
- Inspeção;
- Tratamentos térmicos;
- Inspeção final.

Na Figura 3.2 está ilustrada a sequência das operações na fundição de peças metálicas em moldes de areia.

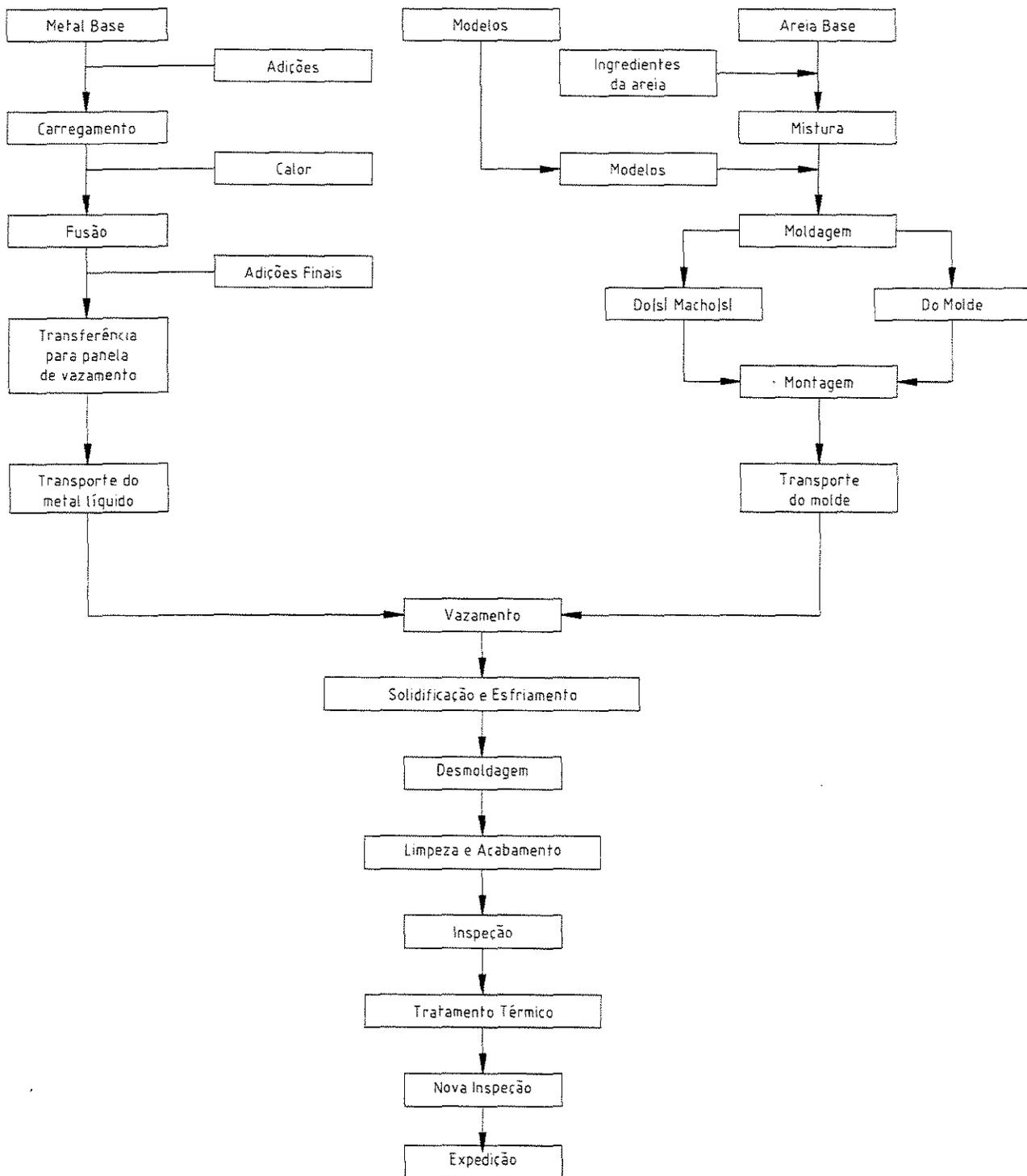


Figura 3.2 – Sequência das operações na fundição de um metal.
 Fonte: BRADASCHIA (1989)

As etapas de maior importância na geração de resíduos no processo de fundição são, produção dos moldes e machos a base de areia e diferentes ligantes (moldagem), a fundição de metais e o vazamento do metal líquido nos moldes, a limpeza das peças fundidas e recirculação das areias usadas.

De acordo com MORAES (1978), a produção dos machos é realizada em uma das etapas da produção de peças metálicas denominada macharia. O corpo denominado macho é toda porção de areia aglomerada que após, a moldagem, se apresenta consistente por secagem ou como consequência do próprio processo de fabricação. Quanto ao emprego de machos em fundição, BRADASCHIA (1989), relata que esta prática não deve ter se iniciado antes de 2000 AC, e que os mesmos eram confeccionados de argila e carvão de madeira, ou de areia.

Os machos são peças de areia que reproduzem exatamente a forma do oco que deve ter a peça fundida, de modo a obter as partes vazias no interior do molde. Estes são moldados preenchendo-se as caixas de macho, cuja forma interior é exatamente a da peça a que o macho corresponde (TORRE, 1978).

Segundo MARIOTTO (1989), para a confecção dos machos e moldes se utilizam ligantes químicos, ou resinas. Os processos baseados em ligantes químicos tiveram maior desenvolvimento após a Segunda Guerra e, dentre eles destacam-se:

Processo CO₂ – mais antigo dos processos que envolvem gasagem, baseia-se no sistema silicato de sódio – CO₂. Utilizado para ligas não-ferrosas e mais limitadamente para a produção de machos;

Processo “Shell Molding” ou processo casca– o sistema ligante é constituído por uma resina fenólica tipo novolaca e hexamina. A mistura destes dois constituintes é aplicada sobre os grãos de areia na forma de uma capa sólida, produzindo o que se

chama areia coberta. É utilizado tanto para moldes como para machos que necessitam de precisão dimensional e ótimo acabamento superficial.

Processo “ Hot Box” – pode empregar 03 tipos de resinas:

- uréia – formol/álcool furfurílico;
- uréia-formol/fenol-formol;
- fenol-formol/álcool furfurílico;

Os catalisadores são geralmente sais de amônio ou cloreto férrico.

Processo Caixa Fria (“Cold Box”) - introduzido formalmente na indústria de fundição no ano de 1968. O termo “Cold Box” é utilizado atualmente para descrever qualquer processo de aglomeração de machos que utilize um gás ou um catalisador vaporizado para curar a areia revestida com resina a temperatura ambiente.

O processo Cold Box utiliza um sistema de aglomerante dividido em três partes, constituindo a parte I em uma resina fenólica, a parte II em um isocianato polimerizado e a parte III em um catalisador de amina vaporizado. A areia é revestida com os componentes das partes I e II, posteriormente ela é soprada com ar seco para dentro da caixa de macho, na temperatura ambiente. O catalisador de amina terciária é vaporizado na caixa para endurecer o macho. Após o endurecimento rápido, a amina é lavada da massa de areia por um sistema de purga com ar seco (CAREY e ARCHIBALD, 1998).

Os componentes deste processo são: areia, resina parte I (tipo fenólica e solventes orgânicos), solução parte II (solução de poliisocianato com solventes orgânicos voláteis), catalisador (trietilamina TEA), veículos do catalisador (temperatura de referência 25 °C); ar seco, filtrado e isento de umidade; N₂; CO₂ e, aditivos como limonita e hematita (ABIFA, 1996). A figura 3.3 ilustra a composição da resina.



Figura 3.3 - Esquema mostrando os grupos hidroxilas fornecidos pela resina fenólica da parte I que reagem com os grupos isocianatos da parte II na presença do catalisador amina, para formar a resina uretânica sólida

Fonte: CAREY e ARCHIBALD (1998).

O processo de moldagem tipo "Cold Box" é utilizado pela indústria que gera o resíduo utilizado nesta pesquisa. O resíduo areia de moldagem é gerado no setor de macharia na etapa de moldagem dos machos, e é constituído por areias de perda no processo e da quebra de machos e restos de areias.

A resina fenólica empregada no processo é um polímero termoplástico e apresenta como componentes de risco fenol, formol e solventes aromáticos. Algumas características apresentadas: insolubilidade em água, solubilidade em álcool e solventes orgânicos, quanto à toxicologia apresenta DL_{50} (oral) para ratos de 490 mg/Kg (ASHLAND, 1997).

A periculosidade do resíduo areia de moldagem é justificada pela presença de resina fenólica uretânica, que apresenta teores de fenol livre.

3.3 Fenol

O fenol é sinteticamente produzido pela oxidação do cumeno. Está presente na composição dos mais variados produtos. É empregado em resinas fenólicas para a produção de moldes na fundição, em sistemas de freios para automóveis e de abrasão. Entra também em resinas para a fabricação de laminados decorativos para o setor moveleiro e chapas aglomerados para a construção civil. É ainda um intermediário químico para a produção de xampus e aditivos para óleos lubrificantes.

Apresenta-se como um dos poluentes mais comuns do ambiente, pertencente a classe de compostos orgânicos de série aromática em que pelo menos um grupo hidroxil encontra-se ligado ao anel benzênico, sendo uma substância pouco colorida, com um odor específico e solúvel em clorofórmio, éster, óleos e outros solventes orgânicos (IRPTC, 1984).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA) lista vários compostos como poluentes prioritários, os quais devem ser freqüentemente monitorados em função de apresentarem mutagenicidade, teratogenicidade, além de toxicidade e bioacumulação nas diferentes cadeias alimentares. O fenol figura como um destes poluentes, e por essa razão, torna-se importante conhecer a dinâmica deste composto para que se possa desenvolver métodos eficazes na sua remoção do meio.

Mesmo considerando que os compostos aromáticos, tal como fenol, podem desaparecer do meio através de processos abióticos, tais como, fotodegradação, volatilização e lixiviação. A biodegradação apresenta-se como um mecanismo importante na remoção deste no meio.

3.4 Biodegradação de compostos fenólicos

Atualmente os estudos relacionados à área ambiental enfatizam a degradação, biotransformação e assimilação de compostos xenobióticos. Xenobiótico (do grego Xéno =estrangeiro) é o termo utilizado para denominar os compostos sintetizados “ estranhos” ao ambiente (BARTHA, 1990). Dentre estes compostos podemos citar os fenóis e seus derivados.

As bactérias e alguns fungos podem clivar um anel aromático contendo 2 grupos hidroxila, se estes grupos estiverem localizados nas posições orto ou para. O tipo de clivagem depende do tipo de composto aromático (número de anéis e tamanho da cadeia) e a constituição genética dos organismos (WILSON e CLARK, 1994).

As principais vias de biodegradação do fenol baseiam-se na hidroxilação do fenol a catecol e posterior clivagem da cadeia aromática. (Figura 3.4).

Várias enzimas intracelulares têm sido reportadas na literatura como responsáveis pela fissão do anel aromático, entre elas as monooxigenases e as dioxigenases (GUIRAUD et. al., 1999). WILSON e CLARK (1994), relatam que estas enzimas possuem ampla especificidade de substrato e são produzidas por grupos específicos de bactérias aeróbias e, podem degradar moléculas não aromáticas, como por exemplo, etilenos clorados.

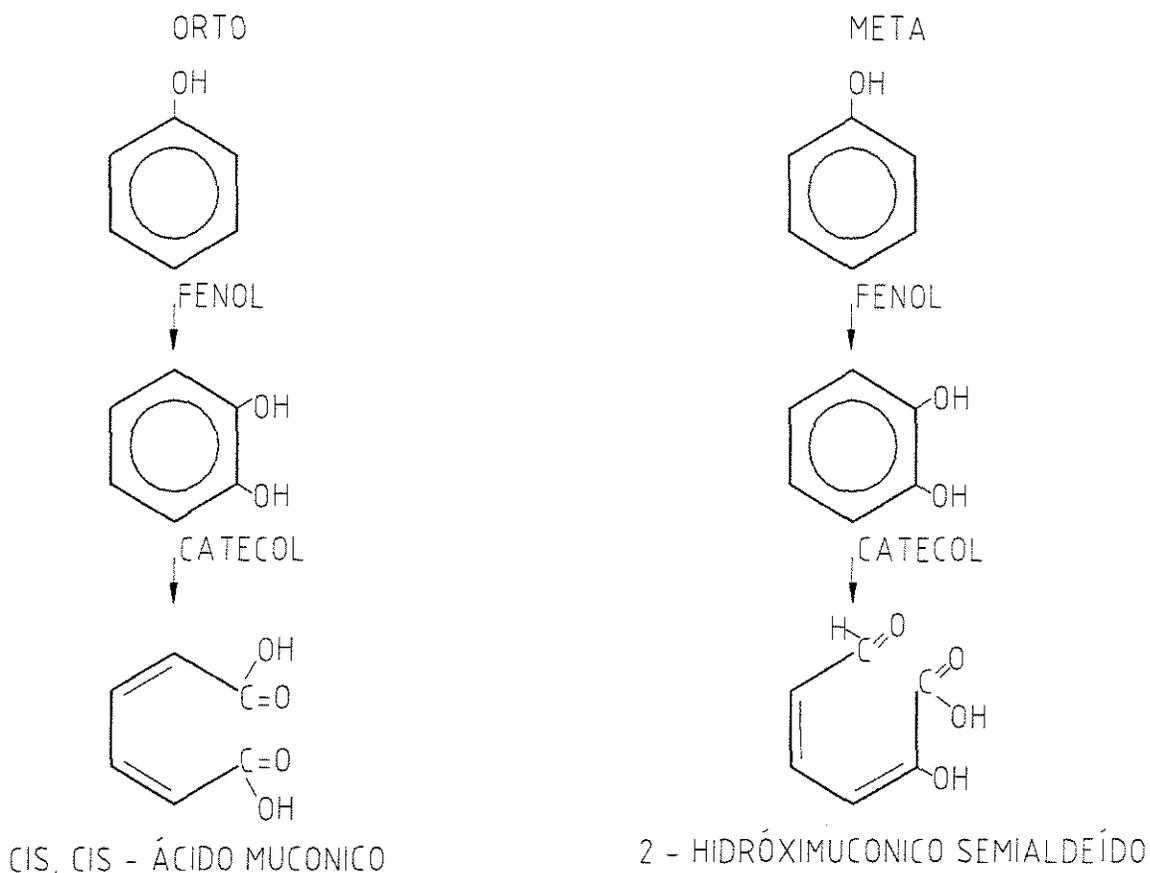


FIGURA 3.4 – Vias de biodegradação do fenol
 Fonte: WILSON e CLARK (1994).

De acordo com BARBIERI (1997), a biodegradação de compostos aromáticos é inversamente proporcional ao número de anéis na molécula benzênica. Desta forma a transformação de composto como o bifenil, que contém dois anéis, se processa mais rapidamente do que o benzeno com um anel.

A intensidade da biodegradação do fenol é influenciada por diversos fatores ambientais como a população autóctone envolvida, disponibilidade de nutrientes, oxigênio, pH, temperatura, umidade, qualidade, quantidade e biodisponibilidade do contaminante, além das propriedades do solo (MARGESIN et. al., 1999).

A adaptação dos microrganismos a um composto químico é uma fase importante no processo de biodegradação. A duração desta pode variar de horas a semanas ou meses dependendo da quantidade e qualidade do inóculo utilizado, a persistência do composto e do potencial catabólico dos mesmos (BUITRÓN et al., 1992).

Segundo BASTOS, et al. (1997), o solo representa uma fonte importante de microrganismos capazes de degradar fenol em concentrações diferentes daquelas encontradas na natureza. A adaptação destes microrganismos à molécula recalcitrante permite a indução de enzimas relacionadas à degradação e seleciona os sistemas mais eficientes. Conforme BARTHA (1990), o solo tende a atenuar o efeito tóxico de substâncias como fenol e aminas aromáticas pela adsorção.

Os compostos fenólicos também estão presentes no solo e, são originados pela lixiviação de materiais, degradação de folhas, degradação de lignina e, metabolismo microbiano. O conhecimento de compostos fenólicos no solo é limitado, uma vez que, possuem grande reatividade junto a matriz organo-mineral do solo e rápido desaparecimento em solução (GALLET e KELLER, 1999).

VARGA e NEUJHR (1970) isolaram do solo, linhagens de microrganismos capazes de crescer em meio contendo fenol como fonte essencial de carbono. A oxidação de fenol a catecol por esses microrganismos foi estudada através da técnica manométrica e os produtos da reação foram identificados por espectrometria. Os autores isolaram seis linhagens de bactérias, três de leveduras e quatro de fungos filamentosos. Na maioria dos isolados observou-se que o fenol foi degradado a catecol e posteriormente a cis, cis- muconato.

Espécies de bactérias como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas testosteroni*, *Xanthomonas sp*, *Pseudomonas putida* e fungos *Coprinus spp*, foram identificados como degradadores

de fenol (BEDIN, et al., 1997; ANSELMO e NOVAIS, 1984, LÉONARD e LINDLEY, 1999, SILVA e CAMPOS, 1997; HANNAFORD e KUEK, 1999; GUIRAUD et. al., 1999).

Em pesquisa realizada por TEIXEIRA (1993), foram isoladas 22 cepas de fungos filamentosos do extrato lixiviado e solubilizado de areia fenólica, demonstrando ser utilizados como possíveis degradadores de fenol os pertencentes aos gêneros: *Mucor*, *Paecilomyces*, *Dematium*, *Monillia*, *Homodendrum*, *Geotrichum* e *Alternaria*. Os fungos foram selecionados através do teste desenvolvido por Bavendamm em 1928.

O teste conhecido pela denominação de “Reação de Bavendamm” tem a finalidade de detectar a produção de fenol oxidases por fungos em meio ágar, com ácido gálico a 0,5%. Segundo ANDER e ERICKSON (1976) apud TEIXEIRA (1993), fenol oxidases é um nome genérico para designar três tipos de enzimas: lacase, peroxidase e tirosinase. As enzimas lacase e tirosinase possuem cerca de quatro átomos de cobre na molécula e não requerem peróxido de hidrogênio; a peroxidase contém ferro na molécula e requer peróxido. As lacases catalisam a oxidação de *o*-difenoil e *p* - difenoil, de compostos fenólicos e da própria lignina. As tirosinases catalisam a oxidação de fenol e *o*-difenoil, e em geral são intracelulares. As peroxidases, como a lacase e peroxidase, não são muitas específicas quanto ao substrato e catalisam a oxidação de diversos compostos fenólicos.

As enzimas fenol oxidases na maioria, são extracelulares e eficientes na degradação de lignina. Na degradação de derivados de lignina e compostos fenólicos, para outros compostos aromáticos e cloroaromáticos, as eficiências ainda constituem controvérsia. No trabalho de GUIRAUD, et. al. (1999), foi determinada a presença de enzima fenol oxidase em três espécies de fungos *Coprinus*. O objetivo foi relacionar a presença da enzima na eficiência de remoção do fenol e, demonstraram que estas não foram requeridas necessariamente para metabolizar o composto.

SHELYUG, et al. (1965) apud IRPTC (1984), demonstraram também que aplicações de fenol em concentrações de 10 a 100 mg em 100 g de solo seco, durante os dez primeiros dias conduzem a um aumento do número de bactérias contidas em um grama de solo. Com a decomposição do fenol o número de microrganismos tende a decrescer e se igualar ao solo controle. Estes mesmos autores, realizaram experimentos utilizando uma mistura de sais e culturas da enterobactéria *Escherichia coli*, em solo contendo 10, 20, 50 e 100 mg de fenol / 100 g de solo seco durante 126 dias e observaram que o fenol foi degradado completamente e o tempo necessário para sua biodegradação foi diretamente proporcional à quantidade de substâncias introduzidas. HEESE et al. (1999), isolaram e identificaram cepa de enterobactéria *Klebsiella* como degradadora de fenol.

SIVIERO (1999), através do ensaio de respirometria comprovou que os microrganismos do solo degradaram compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem, apresentando como principais responsáveis pela degradação as bactérias e actinomicetos.

3.5 Microrganismos do solo

O solo pode ser encarado como um habitat microbiano por excelência. A camada superior do solo é onde se processam intensas atividades biológicas. Segundo FULLER e WARRICK (1985), "os principais microrganismos de um solo fértil são: bactérias, actinomicetos, fungos, leveduras, algas, protozoários e nematóides. O peso desses microrganismos vivos é estimado, na faixa de 0,5 a 4 toneladas/ha, considerando o volume de solo numa profundidade de até 0,15 m". O número aproximado de organismos encontrados no solo, segundo PELCZAR et al. (1996) está apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Número aproximado de organismos comumente encontrados nos solos, baseado na contagem em placas

Organismo	Número estimado/grama de solo (UFC/grama)
Bactérias (exceto actinomicetos)	3.000.000 a 500.000.000
Actinomicetos	1.000.000 a 20.000.000
Fungos (exceto levedura)	5.000 a 900.000
Leveduras	1.000 a 100.000
Algas	1.000 a 500.000
Protozoários	1.000 a 500.000
Nematódeos	50 a 200

Fonte: PELCZAR et. al., (1996)

Os microrganismos presentes no solo são os principais responsáveis pelo sucesso da degradação de resíduos orgânicos, quando estes são lançados no solo (NUVOLARI, 1996).

A sobrevivência dos microrganismos no solo depende de certos fatores que podem inativá-los, como por exemplo, o tipo de organismo e a sua condição, o método de aplicação do resíduo, o grau de predação, a competição com outros microrganismos, as condições atmosféricas e a composição físico-química do solo (BORGES et al., 1996).

Segundo SIVIERO (1995), quando se adiciona em um solo, uma certa quantidade de matéria orgânica que apresenta características físicas e químicas que não conferem toxicidade aos organismos do solo, ocorre o aumento no número desses microrganismos. À medida que a quantidade de matéria orgânica diminui, o número de microrganismos também diminui.

As bactérias no solo formam o grupo de microrganismos que apresenta maior abundância e diversidade entre as espécies. A comunidade bacteriana é estimada em cerca de 10^8 a 10^9 organismos por grama de solo, variando de acordo com o método de contagem utilizado e com o tipo e manejo do solo (ALEXANDER, 1977).

De acordo com BRANDÃO (1992), o grupo das bactérias, em relação aos demais grupos de microrganismos, apresenta elevada taxa de crescimento e importante papel na degradação da matéria orgânica e na ciclagem dos elementos. No solo, também estão presentes bactérias fotossintetizantes, bactérias diazotróficas que apresentam capacidade de fixar nitrogênio molecular (N_2) presente na atmosfera e as bactérias quimiolitotróficas, de grande interesse agrônomo, por favorecer a oxidação de compostos minerais de nitrogênio e enxofre, como também fixar CO_2 .

Os fungos são encontrados no solo com comunidades variando de 10^4 a 10^6 organismos por grama de solo, podendo ser influenciada por diversos fatores como matéria orgânica, pH, compostos inorgânicos, umidade, aeração, temperatura, perfil, estação do ano. (ALEXANDER, 1977). Apresentam parede celular e podem ser uni ou multicelulares, são heterotróficos, mesofílicos e aeróbios em geral. Assim, como as

bactérias, absorvem nutrientes em vez de ingeri-los. A absorção é auxiliada pela produção de enzimas secretadas no meio, que quebram as moléculas orgânicas em porções menores que podem ser facilmente transportadas para dentro da célula. São predominantes em solos ácidos, onde sofrem menor competição, pois as bactérias e actinomicetos são favorecidos por valores de pH na região alcalina e neutra.

As principais classes e gêneros dos fungos no solo são descritos segundo a classificação de AINSWORTH (1973) apud ALEXANDER (1980):

Chytridiomycetes, Oomycetes: *Olpidium, Cladochytrium, Rhizophlyctis, Pythium, Phytophthora.*

Zigomycetes: *Absidia, Cunninghamella, Mortierella, Mucor, Rhizopus, Phycomyces.*

Pyrenomycetes: *Chaetomium, Thielavia, Neurospora, Sordaria.*

Hymenomycetes: *Agaricus, Amanita, Boletus.*

Coelomycetes, Hyphomycetes: *Phoma, Coniothyrium, Aspergillus, Alternaria, Botrytis, Cladosporium, Curvularia, Cylindroscarpon, Fusarium, Geotrichum, Helminthosporium, Humicola, Metharrizium, Monilia, Paecilomyces, Penicillium, Rhizoctonia, Trichoderma, Verticillium.*

Acrasiomycetes: *Dictyostelium, Polyphondylium.*

SIQUEIRA e FRANCO (1988), revelaram em seus estudos que os fungos se desenvolvem bem em umidade próxima à capacidade de campo do solo. Os fungos são ativos na decomposição dos principais constituintes dos vegetais, especialmente: celulose, lignina e pectina (PELCZAR et al., 1981).

A técnica de contagem de fungos em ágar é muito utilizada, mas como as bactérias e os actinomicetos tendem a crescer nesses meios, é necessária a adição de agentes bacteriostáticos como estreptomicina, penicilina, etc. Pode ser introduzido um erro na avaliação da contagem de fungos em placas em função de colônias aparecem

na superfície do ágar serem originadas de um esporo ou de fragmento de micélio vegetativo produzido pela agitação (ALEXANDER, 1977).

Segundo ALEXANDER (1977), a população de actinomicetos do solo em zonas temperadas é da ordem de 10^5 a 10^8 UFC/g de solo, sendo que estes valores podem ser influenciados pelas características físicas, matéria orgânica, pH, estações do ano, profundidade do solo. Solos ricos em matéria orgânica apresentam-se em grandes quantidades.

Quanto à nutrição os actinomicetos são muito versáteis. Uma grande variedade de fontes de carbono, tais como, açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, aminoácidos e alguns compostos aromáticos são utilizados para o seu crescimento. Alguns são saprófitas e outros patogênicos ao homem, animais e plantas. São responsáveis pelo odor característico de mofo e de terra de um campo recentemente arado, provocado pela liberação de uma substância denominada geosmim (PELCZAR et al., 1981).

Nos solos os gêneros mais predominantes são *Nocardia*, *Streptomyces* e *Micromonospora*, são capazes de degradar muitas substâncias químicas complexas e também tem propriedade de sintetizar e excretar antibióticos (PELCZAR et al., 1981). Entre estes antibióticos podem ser citados: estreptomicina, cloromicetina, neomicina e terramicina, substâncias com largo emprego na medicina.

3.6 Avaliação da biodegradação

De acordo com PAGGA (1997), tanto no ambiente natural como em laboratórios, os testes de biodegradação devem ter um número de parâmetros que afetam criticamente o seu nível. A biodegradabilidade das substâncias depende principalmente, mas não somente da sua estrutura molecular. Um grande número de diferentes enzimas encontradas em várias espécies de microrganismos ou contidas em seu genoma e plasmídios são necessárias para numerosas rotas metabólicas que conduzem a mineralização das substâncias. O plasmídeo é uma pequena molécula de DNA normalmente circular, auto-replicativa, que não faz parte do cromossomo bacteriano. Alguns carregam genes para resistência a antibióticos ou para enzimas que degradam substâncias químicas complexas.

Estes testes simulam os ambientes aquáticos e/ou terrestres, baseados em princípios estático, semi-contínuo ou contínuos, operados sob condições aeróbias ou anaeróbias. Em alguns destes testes, os fatores importantes que influenciam a biodegradação são:

- ◆ A concentração da substância estudada: que deve ser mais elevada que o limite de detecção do método escolhido, mas, suficientemente menor no caso de substâncias tóxicas ou quando são simuladas concentrações reais no ambiente;
- ◆ Propriedades físico-químicas da substância, tais como volatilidade ou solubilidade em água, que determina a sua biodisponibilidade e sua eliminação abiótica do meio;
- ◆ Composição e concentração de nutrientes no meio teste, especialmente nitrogênio e fósforo, assim como elementos traços, e uma capacidade tampão suficiente;
- ◆ A presença ou ausência de outras substâncias degradáveis no mesmo meio para processos cometabólicos;

- ◆ Condições e propriedades dos sistemas de testes, tais como volume e forma dos recipientes, sistemas abertos ou fechados, temperatura, procedimento de mistura e agitação e suprimento de oxigênio;
- ◆ Duração do teste.

Para avaliar os resultados da biodegradação, não é suficiente apenas medir a concentração remanescente de um composto no ambiente, a observação dos processos biológicos também se torna necessária, uma vez, que nem todo o composto é mineralizado a dióxido de carbono (CO_2) no curso da degradação.

De acordo com MARGESIN et al. (1999), os métodos biológicos para medir a atividade microbiana em um ambiente são restritas a respiração, atividade enzimática e contagem microbiana. Estas técnicas fornecem informações sobre a presença de organismos viáveis, assim como, os efeitos dos poluentes sobre a atividade metabólica do solo.

Para avaliar a atividade microbiana em solos, são utilizadas várias metodologias tais como: o ensaio de respirometria, contagem dos microrganismos em placas (UFC) ou em tubos (NMP), contagem através de microscopia direta.

3.6.1 Respirometria

O ensaio de respirometria é utilizado para avaliar a atividade microbiológica de um solo, baseando-se no princípio de que há uma correlação direta entre a geração de dióxido de carbono (CO_2) e a degradação da matéria orgânica num solo, pela ação dos microrganismos presentes. Quando se adiciona matéria orgânica a um determinado solo, há um crescimento da população microbiana, tendo como consequência um

aumento na geração de dióxido de carbono (CO₂) como resultado da respiração desses microrganismos (FULLER e WARRICK, 1985).

A medida do gás carbônico produzido poderá ser efetuada em sistemas de análises em fluxo contínuo ou em sistemas fechados. O respirômetro de Bartha (ABNT, 1993), é um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas. Em uma das câmaras, um erlenmeyer de 250 mL, é colocado o resíduo misturado com o solo e na outra câmara, a solução alcalina. É um equipamento simples e de baixo custo.

O ensaio tem como finalidade principal estimar o tempo para a estabilização de um resíduo orgânico quando este é lançado no solo e, além disso, tentar obter taxas de aplicação mais convenientes. Pode-se ainda detectar uma possível toxicidade aos microrganismos do solo, pelos elementos presentes no resíduo (NUVOLARI, 1996).

3.6.2 Contagem dos microrganismos

A contagem dos microrganismos do solo através da técnica de cultura em placas não revela a população total da amostra. Esta limitação é devida as condições específicas de cultivo. Os valores encontrados nestas contagens referem-se as células viáveis, esporos ou fragmentos de micélios capazes de crescer no meio utilizado. Mesmo, que se utilize meios e condições culturais diversas, é difícil estimar a população total, pois nestes meios pode ocorrer uma sobreposição entre grupos fisiológicos. Como por exemplo, alguns microrganismos termófilos podem crescer em temperaturas mesófilas. Além da contagem em placas outras técnicas como microscopia direta e enriquecimento são utilizadas (PELCZAR, et. al., 1996).

Quando se parte de culturas líquidas, o crescimento microbiano pode ser avaliado através de espectrofotometria, determinação do peso seco de células

(LÉONARD e LINDLEY, 1999), contagem em placas, membrana filtrante, conteúdo de nitrogênio e produtos metabólicos.

3.6.3 Métodos de determinação do fenol

Quanto à determinação da concentração do fenol em amostras de água, efluentes e resíduos sólidos (massa bruta, lixiviado, solubilizado), diferentes métodos podem ser empregados, dentre eles, espectrofotométrico com 4-aminoantipirina, espectrométrico infra-vermelho (IRPTC, 1984), colorimétrico baseado na reação do fenol com p-nitroanilina (BOHDZICWICZ, 1998), cromatografia gasosa (WANG e LOH, 1999), HPLC (LÉONARD e LINDLEY, 1999), absorção ultra-violeta (GOUDAR et al., 2000). Deve-se considerar quanto à escolha do método sua sensibilidade, confiabilidade, especificidade e custo.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenvolvimento do trabalho experimental

Neste ítem será descrito sucintamente a parte experimental da pesquisa. O trabalho experimental foi realizado em duas fases. Na primeira fase, foram caracterizados e classificados, o solo e o resíduo areia de moldagem para confecção dos respirômetros. A caracterização e classificação da areia foi baseada na Norma NBR 10.004 (ABNT, 1987a). No período de 90 dias, foram efetuadas quatro amostragens para contagem e isolamento dos microrganismos presentes na mistura solo/areia de moldagem retirada dos respirômetros. Convém ressaltar que nesta primeira fase a pesquisa foi desenvolvida juntamente com SIVIERO (1999). Os três grupos de microrganismos isolados das misturas de 25, 75 e 100 g de areia para 50 gramas de solo, foram bactérias, fungos e actinomicetos.

Na segunda fase, os microrganismos isolados foram submetidos a adaptação ao fenol seguido do ensaio de MCI (Mínima Concentração Inibitória) e, Reação de Bavendamm. O ensaio de MCI foi utilizado para determinação da concentração inibitória de fenol frente aos microrganismos isolados e, na obtenção daqueles adaptados a elevada concentração de fenol. Estes mesmos microrganismos, ao mesmo tempo, foram também selecionados segundo a "Reação de Bavendamm" e produção de fenol-oxidases, para verificação da capacidade destes em degradar o fenol presente na areia de moldagem.

Os microrganismos que apresentaram a enzima e os isolados do MCI foram utilizados para compor inóculos para aplicação na areia de moldagem.

Para avaliar a eficiência dos microrganismos na degradação dos compostos fenólicos incorporados no resíduo, estes foram inoculados diretamente na areia de moldagem. A eficiência da biodegradação foi avaliada por meio da produção de CO₂ no ensaio de respirometria após a adição dos microrganismos (Figura 4.1).

Para este teste foram montados seis conjuntos de respirômetros com diferentes inóculos e denominados: bactérias, fungos, actinomicetos, misto com nutrientes e misto sem nutrientes. Os respirômetros foram incubados a 28 °C durante 90 dias.

Durante o período, a cada 30 dias foram retiradas amostras de areia do respirômetro para determinação do fenol residual.

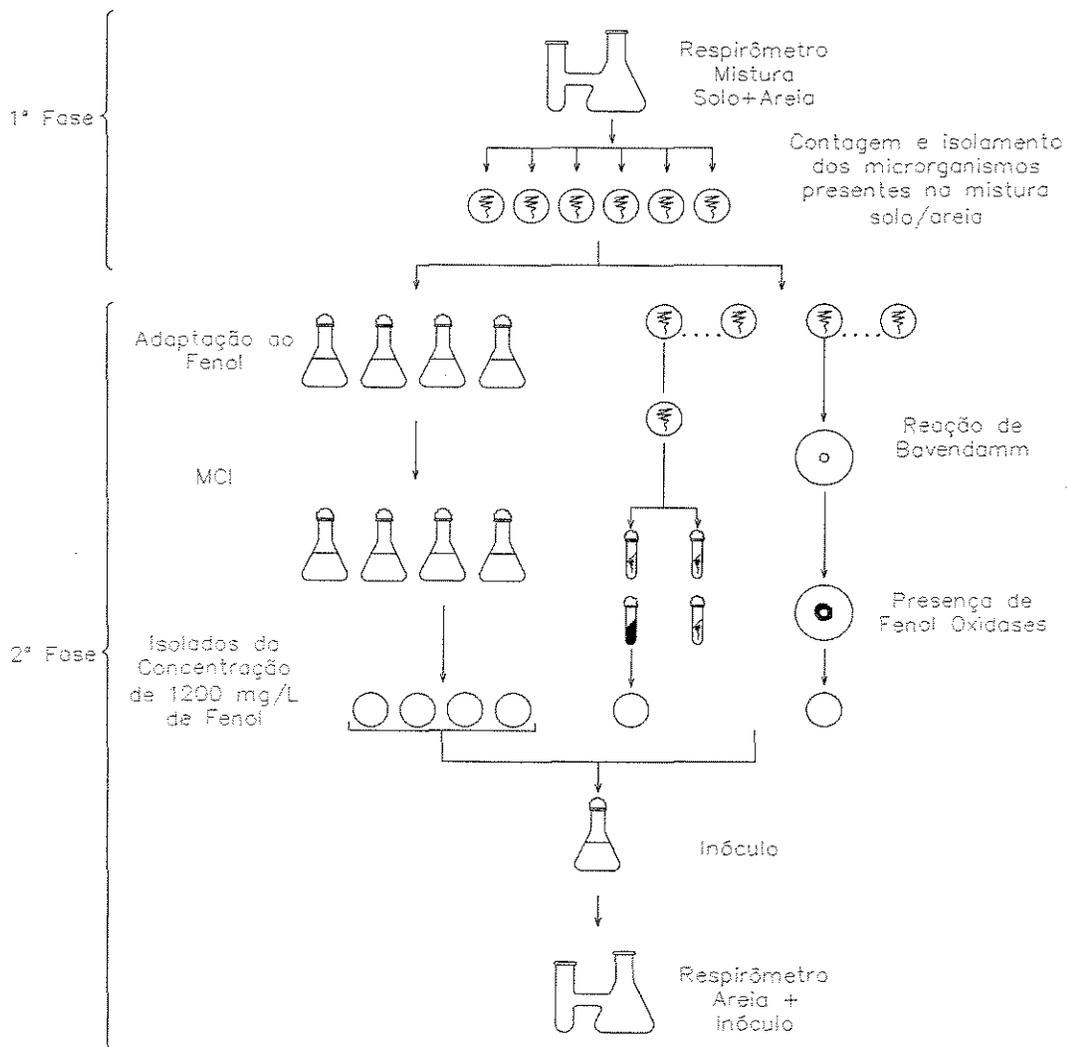


Figura 4.1 – Esquema do trabalho experimental

4.2 Material

4.2.1 Areia de moldagem

A areia de moldagem empregada nesta pesquisa, foi gerada durante o processo de moldagem dos machos, na unidade denominada macharia. Este material foi coletado na Indústria de freios TRW Varga, localizada na cidade de Limeira - SP.

Este resíduo é composto de areias oriundas de perdas durante o processo de moldagem, e da quebra dos machos durante a secagem e manipulação dos mesmos. Em virtude desta não poder mais ser retornada ao processo é denominada resíduo sólido. Do total de areia base utilizada para confecção dos machos, os refugos e descartes representam 2% (SIVIERO, 1999).

O resíduo estudado apresenta-se na forma de machos e para sua fabricação adiciona-se uma resina denominada fenólica/uretânica na areia base, que lhes confere rigidez. O macho varia muito em tamanho e forma, já que corresponde à parte “oca” da peça a ser fundida (Figura 4.2).

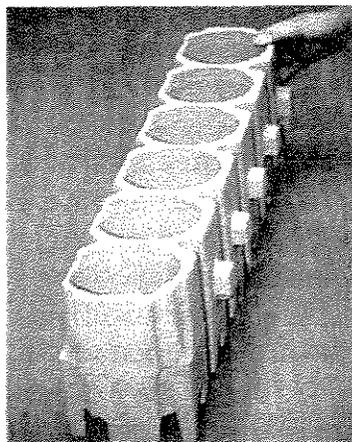


FIGURA 4.2 – Aspecto de um macho de fundição

Fonte: CAREY e ARCHIBALD (1998).

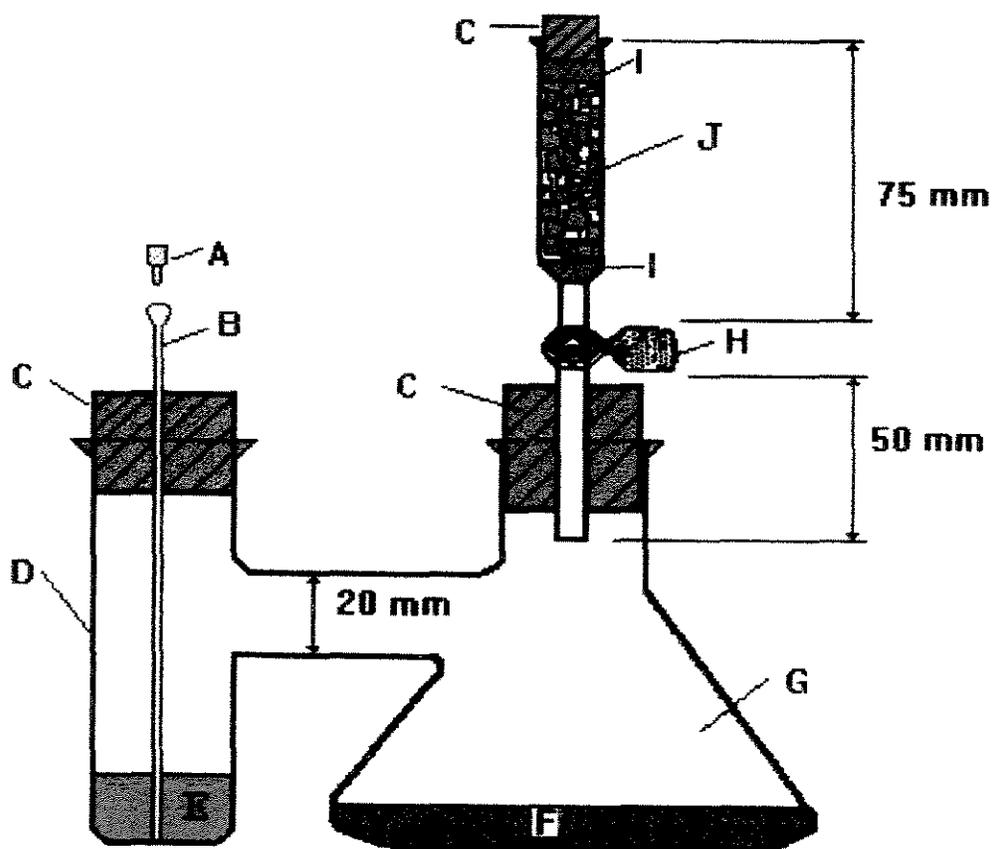
4.2.2 Solo

O solo utilizado no experimento foi coletado no Campus da UNICAMP na Cidade de Limeira - SP. Este foi classificado como argilo-arenoso (USDA). Na local de coleta, tomou-se o cuidado de coletar solo livre de resíduos, os quais poderiam afetar as características físicas, químicas e biológicas, e prejudicar a atividade microbiana durante o processo de biodegradação.

De acordo com SIVIERO (1999), o solo utilizado tem teor de carbono e concentração de nutrientes adequados para permitir a atividade microbiana, o que favorece a adaptação dos microrganismos. Por estes fatores optou-se por trabalhar com este tipo de solo.

4.2.3 Respirômetros

Para acompanhar a biodegradação dos compostos fenólicos incorporados na areia de moldagem, foram utilizados respirômetros padrão de Bartha (CETESB, 1990, ABNT, 1993). Os respirômetros padrão de Bartha (Figura 4.3), tem sido utilizados em diversas pesquisa de biodegradabilidade de diferentes resíduos no solo, dentre estes cita-se areia fenólica (SIVIEIRO, 1999; SOUZA, 2000), lodo de esgoto (NUVOLARI, 1996); óleo essencial cítrico (CORAUCCI FILHO et al., 1998).



- A – Tampa da cânula;
- B – Cânula;
- C – Vedação com rolha de borracha;
- D – Braço lateral;
- E – Solução de KOH;
- F – Amostra da mistura resíduo-solo a ser degradada;
- G – Frasco erlenmeyer de 300 mL;
- H – Válvula;
- I – Camada suporte (lã de vidro);
- J – Filtro de ascarita ou cal sodada.

Figura 4.3 - Modelo do respirômetro de Bartha
 Fonte: adaptado de CETESB (1990).

4.2.4 Meios de cultura

4.2.4.1 Meio para quantificação de bactérias

Para quantificação de bactérias do solo foi empregado o meio "Plate Count Agar", de acordo com a Normalização L.5 201 da CETESB (1978).

Triptona	5,0g
Extrato de levedura	2,5g
Dextrose	1,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000 mL
pH	7,0 (após esterilização)

O preparo do meio para quantificação de bactérias atendeu às especificações do MANUAL DIFCO (1984).

4.2.4.2 Meio para quantificação de fungos

Para quantificação de fungos do solo foi empregado o meio "Mycological Agar" low/pH.

Peptona de soja	10,0g
Dextrose	10,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000 mL

O preparo do meio para quantificação de fungos atendeu às especificações do MANUAL DIFCO (1984).

4.2.4.2.1 Meio ágar Sabouraud

Na segunda fase do experimento para a quantificação e isolamento dos fungos foi utilizado o meio ágar Sabouraud dextrose.

Neopeptona	10g
Dextrose	40g
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL
pH	5,6 ± 0,2 a 25°C

O preparo do meio atendeu às especificações do MANUAL DIFCO (1984).

4.2.4.3 Meio para quantificação de actinomicetos

Para quantificação de actinomicetos do solo foi empregado o meio "ágar amido caseína".

Amido solúvel	10,0g
Caseína	0,3g
Nitrato de potássio	2,0g
Cloreto de sódio	2,0g
Fosfato de potássio dibásico	2,0g
Sulfato de magnésio	0,05g
Carbonato de cálcio	0,02g
Sulfato ferroso	0,02g
Água destilada	1000 mL
pH	7,0± 0,2 (após esterilização)

O preparo do meio para quantificação de actinomicetos atendeu às especificações da Norma L.5 219 da CETESB (1989).

4.2.4.4 Meio para adaptação dos microrganismos ao fenol

Para adaptação dos microrganismos foi utilizado o meio caldo nutriente, acrescido de diferentes concentrações de fenol.

Peptona	15,0g
Extrato de Levedura	3,0g
NaCl	6,0g
D(+)-glicose	100 mg
Água destilada	1000 mL
pH	6,7 – 7,0

O preparo do meio atendeu às especificações do MANUAL DIFCO (1984).

4.2.4.5 Meios utilizados no Ensaio da Mínima Concentração Inibitória

4.2.4.5.1 Meio mínimo para bactérias

Foi utilizado o meio descrito por AARONSON (1970).

Fosfato de potássio dibásico	1,0 g
Sulfato de magnésio pa	0,2g
Cloreto de sódio	0,1g
Cloreto de cálcio	0,1g
Cloreto férrico	0,02g
Sulfato de amônia pa	1,0g
Água destilada	1000 mL
pH	7,2 - 7,5

Os componentes do meio após pesagens foram diluídos em água destilada. Em seguida foram dispensados em erlenmeyers e os frascos foram fechados com tampão de algodão. Dispensa esterilização.

4.2.4.5.2 Meio mínimo para fungos

Foi utilizado o meio Czapek (DOX) ágar modificado de AARONSON (1970).

Nitrato de sódio pa	2,0g
Fosfato de potássio dibásico	1,0g
Cloreto de potássio	0,5g
Sulfato de magnésio pa	0,5g
Sulfato ferroso	0,01g
Água destilada	1000 mL

Os componentes do meio após pesagens foram diluídos em água destilada. Em seguida foram dispensados em erlenmeyers, os frascos foram fechados com tampão de algodão e esterilizados a 121 °C durante 15 minutos.

4.2.4.5.3 Meio mínimo para actinomicetos

O meio utilizado para os actinomicetos foi o meio "agar amido caseína" modificado da Norma L.5 219 de CETESB (1989).

Nitrato de potássio	2,0g
Cloreto de sódio	2,0g
Fosfato de potássio dibásico	2,0g
Sulfato de magnésio	0,05g
Carbonato de cálcio	0,02g
Sulfato ferroso	0,01g
Água destilada	1000 mL
pH	7,0±0,2 (após esterilização)

Os componentes do meio após pesagens foram diluídos em água destilada. Em seguida foram dispensados em erlenmeyers, os frascos foram fechados com tampão de algodão e esterilizados a 121 °C durante 15 minutos.

4.2.4.6 Meio de cultura para "Reação de Bavendamm"

4.2.4.6.1 Meio ácido gálico 0,5%

Extrato de malte	15g
Ágar	20g
Ácido gálico	5g
Água destilada	1000 mL

O meio foi esterilizado a 121 °C, durante 15 minutos.

4.3 Métodos

1ª Fase

4.3.1 Caracterização e classificação da areia de moldagem

4.3.1.1 Amostragem do resíduo

As amostras nas duas fases do experimento foram coletadas no setor de macharia da indústria de freios TRW Varga, conforme metodologia descrita na norma NBR 10.007 (ABNT, 1987d). Como a areia de moldagem apresentou-se aglomerada formando blocos rígidos, com a finalidade de se obter uma amostra representativa e de dimensões uniformes, os blocos foram triturados em “moinhos de martelo” e a seguir passados por malha de 0,59 mm. A amostra para as análises foi obtida após o processo de quarteamento.

4.3.1.2 Ensaio de Lixiviação e Ensaio de Solubilização

O resíduo areia de moldagem foi classificado de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de solubilização, lixiviação e massa bruta. A metodologia para os ensaios de lixiviação e solubilização está descrita na NBR 10.005 – Lixiviação de Resíduos e NBR 10.006 – Solubilização de Resíduos (ABNT 1987b,c), respectivamente.

Os ensaios foram realizados no Laboratório TASQA, localizado em Paulínia – SP.

4.3.1.3 Caracterização físico e química da areia de moldagem

No extrato lixiviado foram analisados os parâmetros arsênio, cádmio, chumbo, bário, cromo total, selênio, prata, mercúrio e fluoreto, que constam da Listagem nº 07, anexo G da NBR 10.004 (ABNT, 1987a).

No extrato solubilizado foram analisados os parâmetros: fenol, surfactantes, pH, arsênio, cádmio, chumbo, bário, cromo total, sódio, manganês, selênio, prata, ferro, cobre, mercúrio, zinco, alumínio, nitrato, fluoreto, cianetos, sulfatos, cloretos e dureza. Na massa bruta foi realizada análise de fenol. A concentração de fenol presente no resíduo foi utilizada como parâmetro de classificação de acordo com a Listagem nº9, do Anexo I, da NBR 10.004 (ABNT, 1987a),

Todas as análises para caracterização e classificação do resíduo, foram realizadas pelo Laboratório TASQA, utilizando a metodologia descrita no Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995).

4.3.2 Caracterização e classificação do solo

4.3.2.1 Amostragem do solo e preparo das amostras de solo

O solo foi coletado na profundidade de 0-0,25 m (nesta profundidade encontra-se grande parte da população microbiana aeróbia).

As amostras de solo coletadas no campo foram secas ao ar livre e passadas em peneiras de 0,2 mm de abertura. Essa fração de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA) foi armazenada em sacos plásticos e analisadas num prazo de 48 horas.

4.3.2.2 Caracterização do solo

Para caracterização do solo foram determinados os parâmetros pH, carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, alumínio, hidrogênio, enxofre, sódio, ferro, manganês, zinco, bário, cobre, CTC, composição granulométrica e densidade.

Os parâmetros foram analisados no Laboratório ICASA, localizado em Campinas – SP.

A determinação da capacidade de campo do solo e a curva de retenção da água do solo foram realizadas no Laboratório de Hidrologia da Faculdade de Engenharia Civil da UNICAMP, Campinas – SP.

A caracterização microbiológica foi feita através da enumeração da população microbiana através da contagem em placas. Foram determinadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para os três grupos de microrganismos de interesse para esta pesquisa, bactérias, fungos e actinomicetos, assim como a umidade para obter as UFC/grama de solo seco. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Colégio Técnico de Limeira.

4.3.3 Contagem dos microrganismos do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem

Na primeira fase, foram efetuados contagens e isolamento dos microrganismos presentes no solo controle e na mistura solo/areia de moldagem retirados dos respirômetros. As quantidades de areia aplicadas foram determinadas por SIVIERO (1999), com base em ensaios anteriores e concentração de fenol contido na massa bruta do resíduo. O resíduo apresentou concentração de fenol na massa bruta de 33,3 mg/Kg e as quantidades aplicadas foram de 50, 75 e 100 gramas de areia em 50 gramas de solo, correspondentes a 16,65, 19,98 e 22,20 mg de fenol/Kg da mistura solo/areia de moldagem.

A montagem dos respirômetros padrão de Bartha contendo apenas solo e mistura solo/areia de moldagem foi realizada de acordo com Norma L.6 350 (CETESB, 1990) e projeto de Norma 01:603.06-007 (ABNT, 1993). Para o solo controle e as quantidades de areia de moldagem aplicadas foram montados 3 (três) respirômetros para retirada de amostras e contagem dos microrganismos. O período de ensaio foi de 90 dias e a temperatura de incubação de 28 °C.

4.3.4 Coleta de amostras do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem nos respirômetros.

Durante o período de ensaio foram coletados 10 gramas da mistura solo/ areia de moldagem e do solo controle, contidas nos respirômetros e submetidos às análises microbiológicas. As coletas foram realizadas em ambiente asséptico, utilizando espátula esterilizada.

4.3.5 Preparo das diluições de solo e areia de moldagem para análise microbiológica

A diluição das amostras do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem coletadas dos respirômetros seguiu a metodologia descrita por GIRARD & ROUGIEUX (1964).

Foram pesados 10 gramas de solo e/ou da mistura solo/areia de moldagem em béquer de 100 mL, a seguir adicionados 20 mL de água de diluição (solução de NaCl 0,85%) e promoveu-se a agitação utilizando uma bagueta de vidro. O conteúdo foi transferido e o volume completado para 100 mL em proveta. A suspensão foi agitada manualmente, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} .

4.3.6 Contagem dos microrganismos

Para a contagem em placas das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, fungos e actinomicetos, as amostras foram incubadas em estufa, em triplicata a mesma temperatura do ensaio de respirométrico.

4.3.6.1 *Contagem das bactérias*

Para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias de bactérias foi empregada a Norma Técnica L5. 201 (CETESB, 1978), através da técnica de “pour plate”. As placas em triplicata foram incubadas a 28°C por 48 horas. Após este período, com o auxílio de um contador de colônias as leituras das UFC das placas foram realizadas. As UFC/g de mistura solo areia foram obtidas, multiplicando-se a média da contagem das colônias por placa pela diluição utilizada.

4.3.6.2 *Contagem de fungos*

Foi empregado o meio “Mycological Agar low /pH”, e utilizada a técnica de “pour plate”. As placas foram incubadas em triplicata a 28 °C durante 72 horas. Após este período, com o auxílio de um contador de colônias as leituras das UFC das placas foram realizadas. As UFC/g de mistura solo areia foram obtidas, multiplicando-se a média da contagem das colônias por placa pela diluição utilizada.

4.3.6.3 Contagem de actinomicetos

Foi empregada a Norma Técnica L.5 219 (CETESB,1989). As placas foram incubadas em triplicata a 28 °C por 7 dias. Após esse período, com o auxílio de um contador de colônias as leituras das UFC das placas foram realizadas. As UFC/g de areia foram obtidas multiplicando-se a média da contagem das colônias por placa pela diluição utilizada.

4.3.7 Determinação da umidade das amostras do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem

Após cada coleta de amostras nos respirômetros, a umidade do solo controle e da mistura solo/areia foi determinada através do método gravimétrico citado por VIEIRA (1983). A determinação da umidade das misturas permitiu transformar os resultados obtidos na contagem de microrganismos em UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama), de solo seco e mistura solo/areia de moldagem seca.

4.3.8 Isolamento dos microrganismos que cresceram na mistura solo/areia

Os microrganismos do solo que cresceram nas placas de cultura foram selecionados das três quantidades de areia aplicadas 50, 75 e 100 gramas de areia em 50 gramas de solo, nos respirômetros. A seleção das formas de crescimento foram feitas visualmente de acordo com as características morfológicas das colônias (tamanho e forma das colônias) e sua coloração, e semeadas em placas de Petri contendo meio específico para cada grupo de microrganismo.

Após o período de crescimento os microrganismos foram novamente semeados em tubos de ensaio contendo meio inclinado específico para cada grupo e preservados

em óleo mineral. Este procedimento foi realizado a cada 30 dias até se completar os 90 dias de ensaio

Os isolados foram então reativados pela técnica de semeadura em placas de Petri contendo meio específico. Após o período de crescimento os isolados foram adaptados ao fenol e então submetidos ao ensaio MCI (Mínima Concentração Inibitória). Os mesmos microrganismos isolados da primeira fase foram submetidos a “Reação de Bavendamm” para verificar a presença da enzima fenol oxidase, identificando as cepas degradadoras de fenol (Figura 4.4)

Foram isolados um total de 78 colônias sendo distribuídas da seguinte forma: 30 colônias de bactérias, 32 colônias de actinomicetos e 16 colônias de fungos.

2ª Fase

4.3.9 Adaptação dos microrganismos ao fenol

Os microrganismos isolados da 1ª fase (item 4.3.8) foram reativados para iniciar o processo de adaptação. Estes microrganismos foram suspensos em água deionizada estéril e utilizados na forma de inóculos. Neste ensaio foram utilizados inóculos isolados da mistura solo/areia, solução de fenol 25 g/L (água destilada - 100 mL; fenol p.a - 2,5 gramas), água estéril e caldo nutriente (Figura 4.5).

As concentrações de fenol aplicadas nos erlenmeyers com meio caldo nutriente, foram de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 e 1200 mg/L. Os frascos foram incubados a 28 °C e o crescimento dos microrganismos nesse meio foi observado por meio de leituras de absorvância em espectrofotômetro, no comprimento de onda 585 nm. O período de ensaio foi de 72 horas.

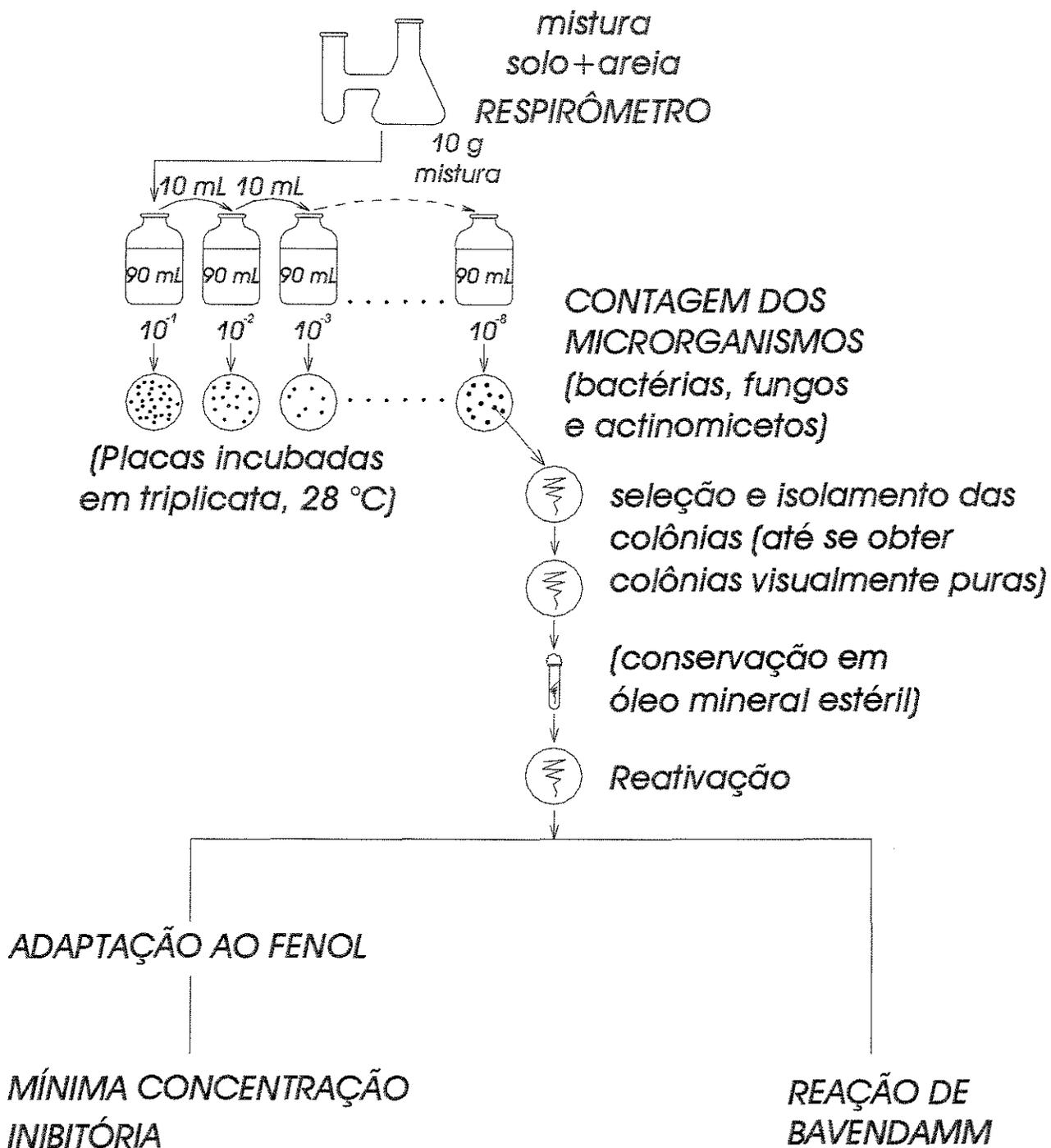
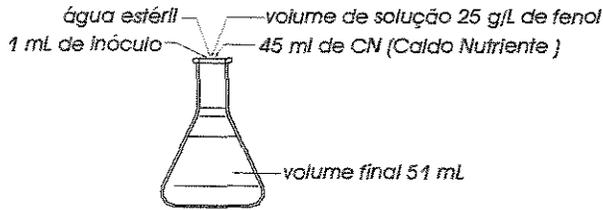


Figura 4.4 – Procedimento empregado para isolamento dos microrganismos.



CONCENTRAÇÃO FINAL DE FENOL - 0-100.....1200 mg/L

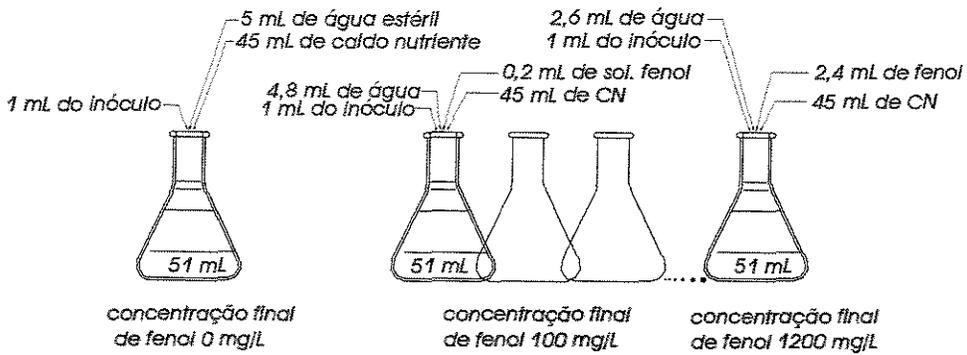


Figura 4.5 – Esquema do procedimento empregado para adaptação dos microrganismos ao fenol.

4.3.10 Ensaio da Mínima Concentração Inibitória (MCI)

De acordo com BROCK e MADIGAN (1991), a atividade antimicrobiana de um agente pode ser medida pela determinação da menor quantidade do agente necessária para inibir o crescimento do organismo testado, o valor encontrado é definido como Mínima Concentração Inibitória. Este valor não pode ser considerado uma verdade absoluta para o agente testado, uma vez que, este pode ser afetado pela natureza do organismo testado, o tamanho do inóculo, a composição do meio de cultura, tempo de incubação e as condições de incubação, tais como, temperatura, pH e aeração. Para a determinação da MCI pode ser utilizadas várias técnicas como a técnica de diluição e

difusão em ágar. Quando a técnica utilizada é a de diluição em frascos, o MCI é dado para o tubo onde o crescimento, após o período de incubação, não ocorrer, evidenciado pela ausência de turbidez. HASSEN et al. (1998), descrevem que a menores concentrações que a mínima concentração inibitória, o crescimento microbiano é parcialmente limitado e causa uma inibição proporcional a concentração do agente aplicado.

O objetivo deste ensaio foi determinar a mínima concentração inibitória de fenol frente aos microrganismos obtidos da adaptação, em meio contendo fenol como única fonte de carbono. Este ensaio também foi utilizado para a obtenção de microrganismos adaptados a concentrações mais elevadas de fenol, quando comparado às concentrações aplicadas nos respirômetros. Foram utilizados meios mínimos específicos para cada grupo de microrganismos e concentrações de fenol de 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 e 1800 mg/L. O procedimento empregado para os dois ensaios, de adaptação descrito acima e MCI estão ilustrados na Figura 4.6.

Para compor o inóculo foram retirados 5 mL dos frascos de cultura de microrganismo (bactérias, fungos e actinomicetos) com concentração de fenol de 200, 600, 800 e 1200 mg/L do ensaio de adaptação. Este volume foi transferido para um frasco contendo 50 mL de meio mínimo com concentração de fenol de 200 mg/L. Este frasco foi incubado a 28 °C por 48 horas. Após este período alíquotas de 1 mL de inóculo foram adicionadas aos frascos contendo meio mínimo e concentrações de fenol variando de 200 a 1800 mg/L. O acompanhamento do crescimento foi realizado por meio de leituras de absorbância a 585 nm, em espectrofotômetro, num período de 240 horas.

Ao final das 240 horas foram retiradas alíquotas de 1 mL dos frascos contendo cultura de bactérias, fungos e actinomicetos na concentração de 1200 mg/L de fenol. Estas alíquotas foram semeadas em placas de Petri, contendo meio sólido específico para cada grupo de microrganismo. Novamente, os microrganismos foram selecionados e isolados, deste procedimento obteve-se 6 colônias de bactérias, 5 de actinomicetos e 8 de fungos.

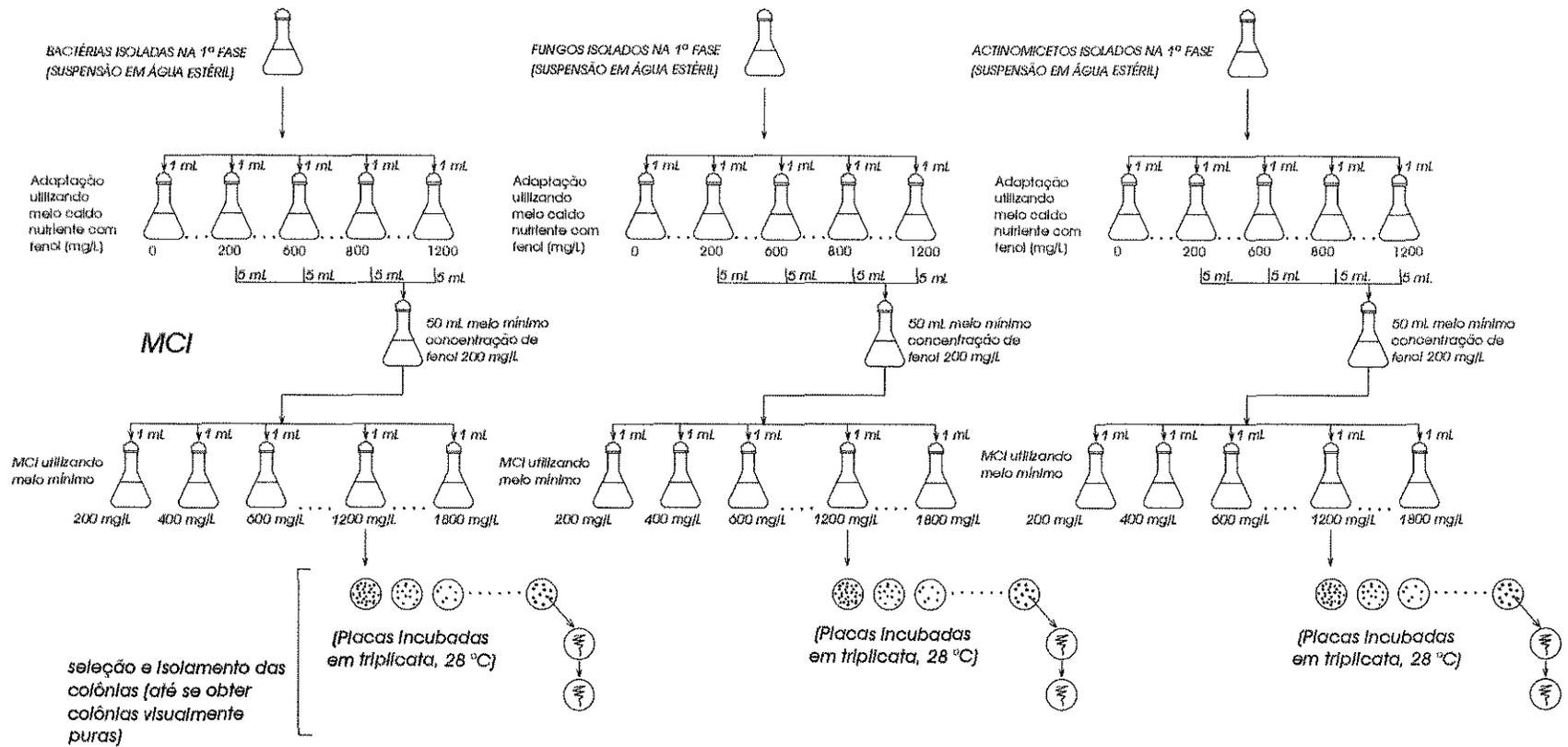


Figura 4.6 - Procedimento empregado para adaptação dos microrganismos ao fenol e determinação da Mínima Concentração Inibitória (MCI)

4.3.11 Seleção dos microrganismos degradadores de fenol pela "Reação de Bavendamm"

Os microrganismos foram selecionados segundo a "Reação de Bavendamm", pela produção de enzimas fenol-oxidases em meio seletivo ácido gálico a 0,5%. Para os fungos isolados foi utilizada a metodologia clássica, mas para as bactérias e actinomicetos a metodologia utilizada foi a desenvolvida por SOUZA (2000).

Cada colônia de fungo isolada na primeira fase (misturas solo/areia de moldagem), foi repicada para o meio Ágar Sabouraud e incubados a 28 °C por 72 horas. Através de uma alça de inoculação estéril foi cortado um disco de ágar de 6 mm da margem da colônia e inoculado no centro das placas contendo o meio ácido gálico 0,5%. Estas placas foram incubadas a 28 °C por sete dias.

Ao final de sete dias foi observada a capacidade dos fungos em crescer neste meio e produzir uma zona escura (de cor âmbar), em torno da colônia indicativa de excreção de fenol oxidases.

Para as bactérias e actinomicetos a metodologia foi realizada em tubos de ensaio conforme descrito por SOUZA (2000). Cada colônia isolada foi repicada para dois tubos de ensaios com meio ágar inclinado, um continha meio ácido gálico e o outro a mesma formulação sem o ácido gálico. O tubo contendo o meio sem ácido gálico foi utilizado como uma prova em branco (Figura 4.7). Neste teste a inoculação de cada colônia de bactérias e actinomicetos foi feita diretamente no tubo.

Os tubos foram incubados a 28 °C por 48 horas para bactérias e 168 horas para actinomicetos. A visualização da excreção de fenol oxidases foi observada pelo aparecimento da coloração marrom no meio ácido gálico quando comparado ao branco.

Dos tubos com reação fenol oxidase positiva foram repicadas as colônias em placas de Petri. As bactérias repicadas para o meio PCA e os actinomicetos para o meio ágar amido caseína. Estes foram utilizados para preparar o inóculo para a respirometria.

Neste ensaio foram isoladas 8 colônias de fungos, 6 de actinomicetos e 10 de bactérias.

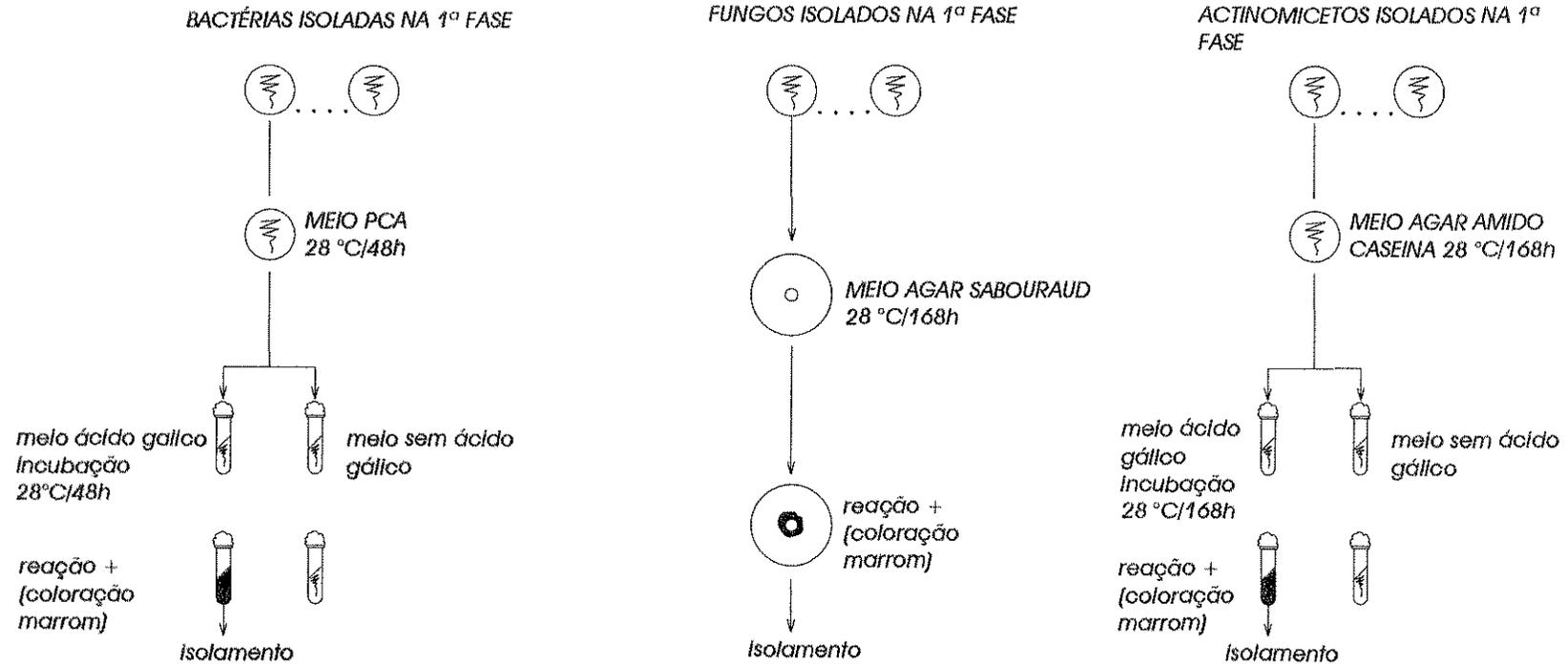


Figura 4.7 – Procedimento empregado para realização da Reação de Bavendamm

4.3.12 Preparo dos inóculos

A partir dos microrganismos isolados obtidos do ensaio de MCI e da “Reação de Bavendamm”, foram preparados os inóculos. O crescimento microbiano foi suspenso em meio mínimo, e as contagens das unidades formadoras de colônias de bactérias, fungos e actinomicetos foram efetuadas.

Para serem aplicados nos respirômetros foram preparados três inóculos (bactérias, fungos e actinomicetos). Para o preparo do inóculo de bactérias foram utilizadas as 10 colônias isoladas na Reação de Bavendamm e 6 colônias obtidas no MCI. Estas foram suspensas em frascos contendo 100 mL de meio mínimo para bactérias e incubadas a 28 °C por 48 horas. Procedeu-se da mesma forma para os fungos e actinomicetos, observando o meio mínimo específico para cada grupo (Figura 4.8).

Para o preparo do inóculo misto, no momento da montagem dos respirômetros, volumes iguais dos três inóculos já preparados foram transferidos para o interior dos mesmos.

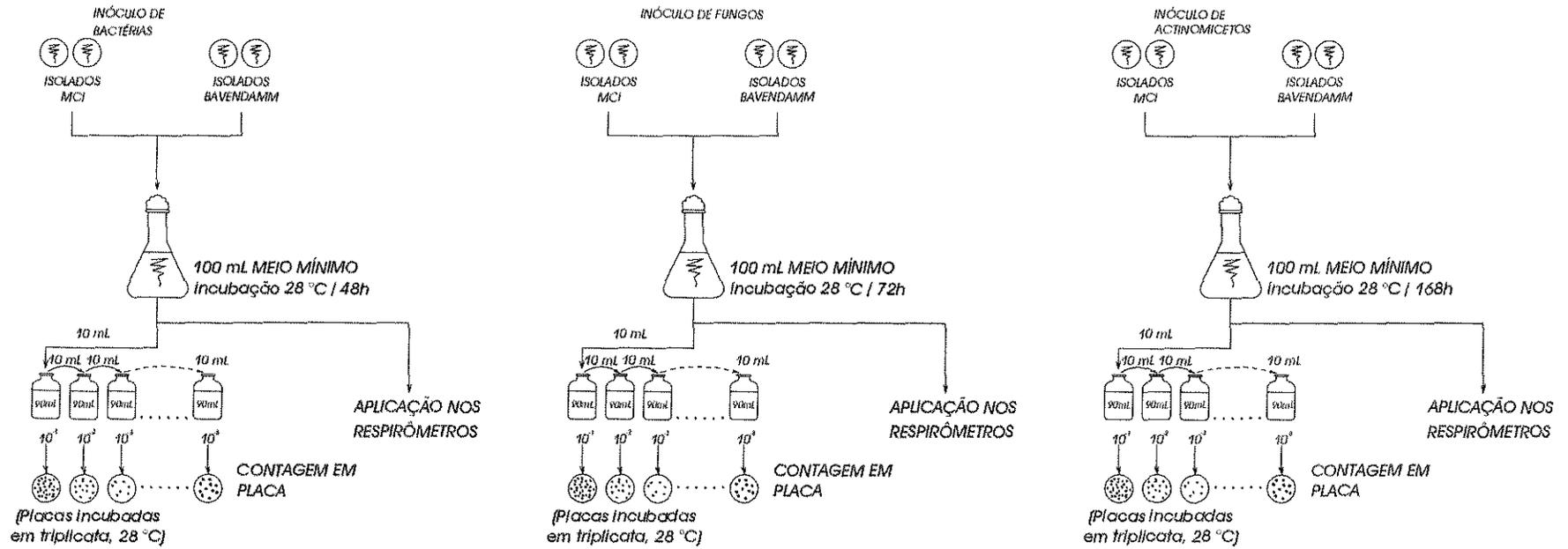


Figura 4.8 – Procedimento empregado para o preparo dos inóculos

4.3.13 Respirometria utilizando areia de moldagem com inoculação de microrganismos

Para avaliar a capacidade dos microrganismos isolados em degradar os compostos fenólicos incorporados na areia de moldagem, foi utilizado o método respirométrico. Neste ensaio foram utilizados os respirômetros padrão de Bartha, contendo areia de moldagem e microrganismos introduzidos no resíduo através de inóculos.

4.3.13.1 Determinação da quantidade de areia de moldagem aplicada nos respirômetros

Em função dos resultados obtidos na primeira fase, observou-se que na maior quantidade de areia aplicada (100 g) não ocorreu inibição do crescimento dos microrganismos e o volume do respirômetro foi suficiente para comportar a quantidade total de mistura utilizada (150 gramas).

Procurou-se determinar a quantidade de areia adequada de forma a não produzir uma camada espessa de resíduo dentro do respirômetro, que prejudicaria o ensaio, podendo ocasionar anaerobiose nas camadas mais profundas. A quantidade de 150 gramas mostrou-se a mais adequada em relação ao tamanho do respirômetro. Além disso, a concentração de fenol foi maior que na primeira fase, uma vez que, os microrganismos estavam adaptados a concentrações elevadas de fenol.

A concentração de fenol determinada na massa bruta de resíduo foi de 164,0 mg/Kg de resíduo, na quantidade de areia de moldagem aplicada nos respirômetros (150 gramas) de 24,6 mg.

4.3.13.2 Determinação do teor de umidade da areia de moldagem

Quando se trabalha com biodegradação de resíduos no solo, a umidade da mistura solo e resíduo deve estar compreendida entre 50 e 70% da capacidade de campo do solo (ABNT, 1993). Neste caso, o solo não foi utilizado e teor de umidade da areia de moldagem encontrado foi de 4,0%, sendo a umidade corrigida para 20%. Segundo ALEXANDER (1977), este teor favorece o crescimento microbiano.

Para a correção da umidade foram utilizados água deionizada estéril, inóculo e solução de nutrientes (apenas para os respirômetros denominados misto com nutrientes).

4.3.13.3 Montagem dos respirômetros

Foram preparados cinco conjuntos de respirômetros e denominados em função do tipo de inóculo utilizado como: bactérias, fungos, actinomicetos, misto com nutrientes e misto sem nutrientes. Um sexto conjunto foi montado para a areia de moldagem sem inoculação de microrganismos e denominado controle (Figura 4.9). Cada conjunto montado foi composto de três respirômetros conforme (ABNT, 1993).

Os respirômetros foram assim compostos:

Bactérias = 150 gramas de areia, 5 mL de inóculo (equivalente a 10^8 UFC/mL) e água deionizada estéril para correção da umidade.

Fungos = 150 gramas de areia, 5 mL de inóculo (equivalente a 10^5 UFC/mL) e água deionizada estéril para correção da umidade.

Actinomicetos = 150 gramas de areia, 5 mL de inóculo (equivalente a 10^6 UFC/mL) e água deionizada estéril para correção da umidade.

Misto com nutrientes = 150 gramas de areia, 5 mL de inóculo, sendo 1,66 mL de cada cultura (bactérias, fungos e actinomicetos), 10 mL de solução nutriente e água destilada estéril para correção da umidade.

Misto sem nutriente = 150 gramas de areia, 5 mL de inóculo sendo 1,66 mL de cada cultura (bactérias, fungos e actinomicetos) e água destilada estéril para correção da umidade.

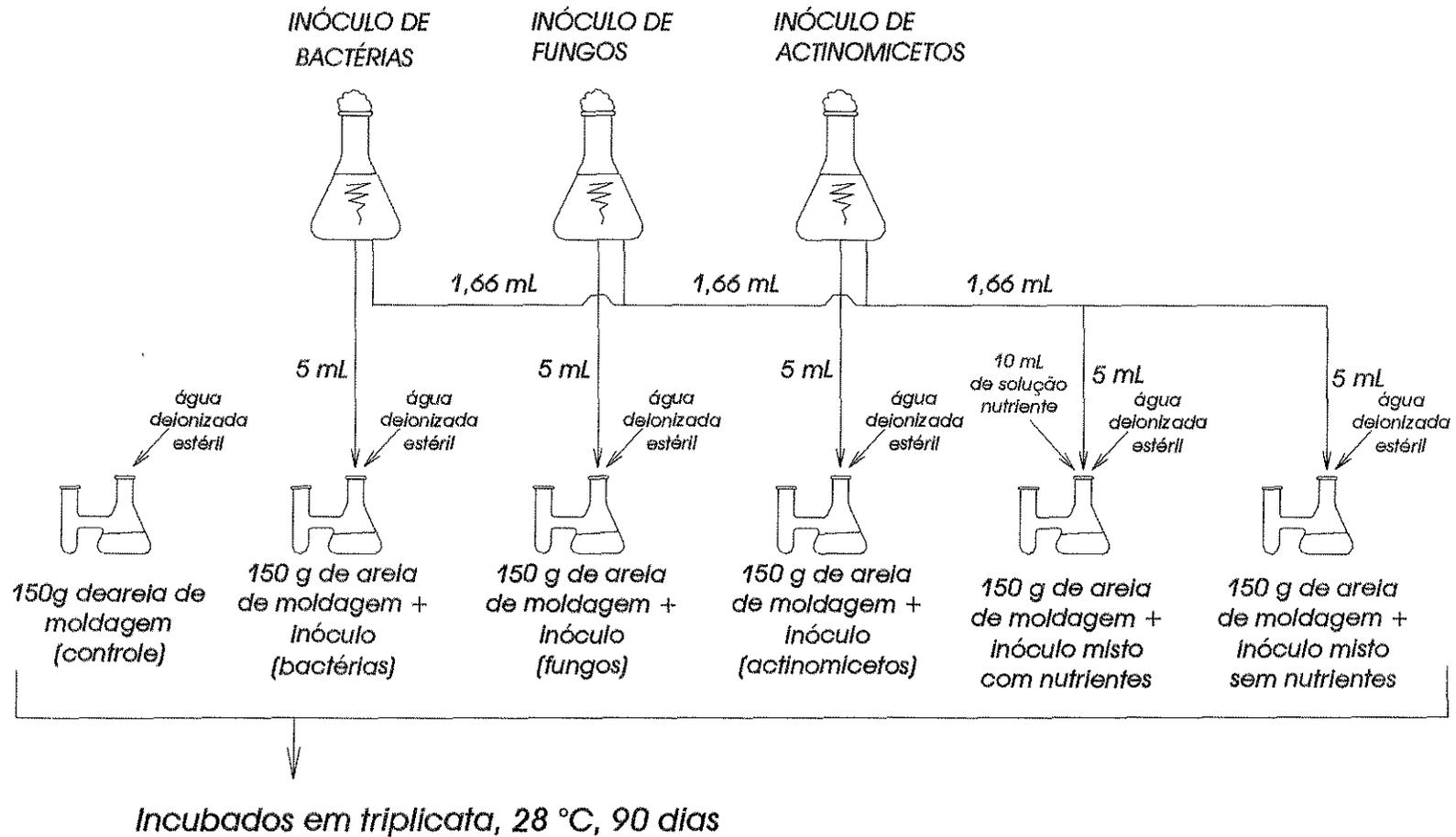


Figura 4.9 – Procedimento empregado para montagem dos respirômetros.

4.3.13.4 *Balanceamento de nutrientes*

Como o resíduo não apresentou nitrogênio e fósforo em sua composição, foi efetuado o balanceamento dos nutrientes de acordo com o projeto de norma (ABNT, 1993). Foram obedecidas as seguintes relações $C/N = 60$ e $C/P = 300$, para a areia de moldagem.

Como fonte de nitrogênio foi utilizado o sulfato de amônio e como fonte de fósforo, o fosfato de potássio. Estes sais foram adicionados na areia na forma de solução de nutrientes (K_2HPO_4 – 1,18 g; $(NH)_3SO_4$ – 4,95 g; $CaCO_3$ – 0,00371 g; água destilada – 1000 mL).

Foram aplicados 0,0105 g de nitrogênio e 0,0118 g de fósforo calculados em função da concentração de carbono no resíduo de 0,63 g.

Esta solução de nutrientes foi aplicada apenas no conjunto denominado misto com nutrientes e, foi aplicada no momento da montagem do conjunto, diretamente no resíduo.

4.3.14 Determinação da quantidade de CO_2 produzido nos respirômetros

Para cada respirômetro, a determinação da quantidade de CO_2 produzido no período de 90 dias, seguiu a Norma Técnica L6. 350 (CETESB, 1990) e o Projeto de Norma 01:603.06-007 (ABNT, 1993).

4.3.14.1 Cálculo da geração de CO₂ produzido nos respirômetros

Para cada inóculo aplicado na areia de moldagem, a determinação da **Geração de CO₂ individual "GCO₂"** (média de 3 medições consecutivas) foi calculada pela eq. (1):

$$\text{GCO}_{2\text{IND}} = (A-B) \times 50 \times f \text{ HCl} \times 0,044 \text{ (mg de CO}_2\text{)} \quad (1)$$

onde:

A = volume de HCl gasto para titular o branco (em mL);

B = volume de HCl gasto para titular o KOH, retirado do respirômetro (em mL);

50 = fator para transformar equivalente em μmol de CO₂;

0,044 = fator para transformar μmol de CO₂ em mg de CO₂;

f HCl = normalidade do HCl = 0,1N

Utilizando-se da média aritmética dos valores de **GCO₂ média**, para cada grupo de 3 respirômetros "**CO₂MED**", em cada medição efetuada, determinou-se, através da eq. (2), a Geração de CO₂ média acumulada "**GCO₂MED-ACUM**":

$$\text{GCO}_{2\text{MED-ACUM}} = \Sigma \text{GCO}_{2\text{MED}} \text{ (em mg de CO}_2\text{)} \quad (2)$$

4.3.15 Determinação da concentração de fenol na areia de moldagem durante a respirometria

Com a finalidade de se obter a degradação dos compostos fenólicos pelos microrganismos, a cada trinta dias foram retiradas amostras de areia dos respirômetros para determinação de fenol. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório BIOAGRI, localizado em Piracicaba – SP. O fenol nas amostras foi determinado por cromatografia gasosa, conforme metodologia descrita no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

4.3.16 Contagem dos microrganismos presentes na areia de moldagem

Ao final dos 90 dias do ensaio de respirometria a população de bactérias, fungos e actinomicetos presentes no resíduo foram quantificadas.

Para a contagem dos microrganismos foi utilizada a metodologia descrita em 4.3.6

4.3.16.1 Contagem dos microrganismos na areia "in natura" e após aglomeração com resina fenólica

No respirômetro denominado controle montado apenas com areia de moldagem, durante os 90 dias de ensaio observou-se produção de CO₂. Desta forma, foi realizada uma nova amostragem do material. Foram coletadas duas amostras de areia dentro do processo de moldagem dos machos, antes e após a adição da resina, com o intuito de verificar se os microrganismos responsáveis pela produção de CO₂ estavam presentes na areia "in natura" e após a adição da resina.

Para a contagem dos microrganismos foi utilizada a metodologia descrita em 4.3.6.

5 RESULTADOS

1ª Fase

5.1 Caracterização da areia de moldagem

Foram realizadas duas caracterizações da areia de moldagem, a primeira para sua classificação e, segunda, para determinação de fenol apenas na massa bruta.

5.1.1 Características químicas da areia de moldagem

Os resultados das análises químicas do lixiviado, solubilizado e da massa bruta foram determinados no Laboratório TASQA, Paulínia – SP (Tabela 5.1).

O resíduo foi classificado de acordo com a Norma Técnica ABNT – NBR 10.004/87, como resíduo Classe I – Perigoso, em função da concentração de fenol na massa bruta ser superior a 10 mg/Kg.

TABELA 5.1 – Caracterização química do lixiviado, do solubilizado e da massa bruta do resíduo areia de moldagem

Parâmetros	Lixiviado		Solubilizado		Massa Bruta	
	Resultado (mg/L)	(*) Valor da Listagem 7	Resultado (mg/L)	(*) Valor da Listagem 8	Resultado (mg/Kg)	(*) Valor da Listagem 9
Alumínio	NA	NC	< 0,1	0,2	NA	NC
Arsênio	< 0,05	5,0	< 0,05	0,05	< 0,1	1000,0
Bário	0,15	100,0	0,16	1,0	NA	NC
Cádmio	< 0,05	0,5	< 0,05	0,05	NA	NC
Chumbo	< 0,05	5,0	< 0,05	0,05	0,5	1000
Cianetos	NA	NC	< 0,1	0,1	< 0,5	1000
Cloretos	NA	NC	161,0	250	NA	NC
Cobre	NA	NC	0,25	1,0	NA	NC
Cromo total	0,13	5,0	0,04	0,05	NA	NC
Cromo VI	NA	NC	NA	NC	0,51	100
Dureza	NA	NC	10,0	500,0	NA	NC
Fenol	NA	NC	0,90	0,001	33,3	10,0
Ferro	NA	NC	0,42	0,3	NA	NC
Fluoreto	< 0,5	150	< 0,5	1,5	NA	NC
Manganês	NA	NC	0,24	0,1	NA	NC
Mercúrio	< 0,01	0,1	< 0,001	0,001	< 0,1	100
Nitrato – N	NA	NC	< 0,1	10	NA	NC
pH	NA	NC	6,9	NC	7,0	> 2 < 12,5
Prata	< 0,05	5,0	< 0,05	0,05	NA	NC
Selênio	< 0,01	1,0	< 0,01	0,01	< 0,1	100
Sódio	NA	NC	21,1	200,0	NA	NC
Sulfatos	NA	NC	< 5,0	400	NA	NC
Surfactantes	NA	NC	< 0,1	0,2	NA	NC
Vanádio	NA	NC	NA	NC	< 2,0	1000
Zinco	NA	NC	0,15	5,0	NA	NC

Notas: (*) Listagens 7, 8 e 9 constam na NBR 10004/87.
parâmetro não consta na listagem.

NA – parâmetro não analisado NC –

5.1.2 Concentração de fenol na areia de moldagem (2ª Fase)

Na segunda fase do experimento, uma nova amostra de areia foi coletada e analisado o fenol na massa bruta, através de cromatografia gasosa. A análise foi realizada pela BIOAGRI Laboratórios, localizada em Piracicaba - SP.

O valor encontrado de fenol na massa bruta foi de 164,0 mg/Kg de resíduo areia de moldagem.

5.2 Caracterização do solo

Os parâmetros físicos e químicos foram determinados no Laboratório ICASA, localizado em Campinas – SP. Os resultados das análises são apresentados na Tabela 5.2.

Através da análise granulométrica, o solo foi classificado de acordo o USDA (United State Department of Agriculture), como argilo-arenoso. A curva característica do solo para a profundidade de 0,0 – 0,50 metros foi determinada no Laboratório de Solos e Hidrologia da Faculdade de Engenharia Civil de Campinas, Campinas – SP. A capacidade de campo do solo e o ponto de murcha permanente foram determinados em 24,9% e 19,5% respectivamente. O teor de umidade determinado foi de 17 % (SIVIERO, 1999).

As análises para a quantificação dos microrganismos do solo foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia do Colégio Técnico de Limeira, Limeira – SP (Tabela 5.3).

TABELA 5.2 – Resultados das análises químicas e físicas do solo utilizado no experimento

Valores das análises químicas														
%		pH		%		mg.Kg ⁻¹		Meq/100 cm ³ TFSA						
N	CaCl	Água	Carbono	P	P res	K	Ca	Mg	Al	H	“S”	CTC	V(%)	
0,12	5,9	6,4	1,1	1,0	2,0	0,24	5,7	1,2	—	1,0	7,14	8,25	86,5	
(mg. Kg ⁻¹)				Micronutrientes (mg. Kg ⁻¹)										
S		Na		Fe		Mn		Cu		Zn		B		
12,2		5,0		112,0		49,0		2,1		44,4		0,17		
Valores das análises físicas														
Composição Granulométrica (%)					Classificação				Densidades (g/cm ³)					
Areias		Argila	Limo	Cascalho						Aparente		Real		
Grossa	Fina									Aparente	Real	Real	Real	Real
12,8	43,1	42,1	1,5	0,0						0,99	2,53			

TABELA 5.3 – Contagem dos microrganismos no solo para o perfil de solo 0,0– 0,25 m.

	UFC/grama de solo seco
Bactérias	3,5 x 10 ⁶
Fungos	9,0 x 10 ⁴
Actinomicetos	1,8 x 10 ⁶

5.3 Contagem dos microrganismos da mistura solo/areia de moldagem

Os microrganismos da mistura solo e areia retirada dos respirômetros foram quantificados durante um período de 90 dias. Os valores das Unidades Formadoras de Colônias de bactérias, fungos e actinomicetos, obtidos são apresentados na Tabela. 5.4.

A partir dessas culturas, foram isoladas colônias que posteriormente foram empregadas nos ensaios de adaptação, MCI e Reação de Bavendamm.

TABELA 5.4 - Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, fungos e actinomicetos do solo controle e da mistura solo/areia de moldagem coletados dos respirômetros no período de 90 dias.

UFC/ grama de mistura solo e areia				
Respirômetro	Intervalo de coletas (dias)	Bactérias	Fungos	Actinomicetos
Solo Controle	0*	$3,5 \times 10^6$	$9,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$
	15	$3,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
	30	$3,1 \times 10^6$	$8,4 \times 10^4$	$1,96 \times 10^6$
	60	$3,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$
	90	$3,2 \times 10^6$	$8,3 \times 10^4$	$3,5 \times 10^6$
50 gramas de areia	15	$8,0 \times 10^6$	$5,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$
	30	$2,9 \times 10^6$	$7,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^6$
	60	$1,7 \times 10^6$	$6,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$
	90	$4,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$
75 gramas de areia	15	$8,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$
	30	$4,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$4,8 \times 10^6$
	60	$2,5 \times 10^6$	$8,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^6$
	90	$5,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	$2,4 \times 10^6$
100 gramas de areia	15	$9,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$
	30	$3,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$
	60	$4,5 \times 10^6$	$7,3 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$
	90	$2,9 \times 10^6$	$3,5 \times 10^4$	$4,0 \times 10^6$

* UFC/grama de solo seco.

5.4 Número de microrganismos isolados da mistura solo/areia de moldagem

Foram isoladas um total de 78 colônias dos três grupos de microrganismos, sendo distribuídas da seguinte maneira: 30 colônias de bactérias, 32 colônias de actinomicetos e 16 colônias de fungos.

2ª Fase

5.5 Adaptação dos microrganismos ao fenol

Neste ensaio foi utilizado o meio de cultura caldo nutriente, com concentrações de fenol de 0 a 1200 mg/L, com intervalos de 100 mg/L. A absorvância referente ao crescimento microbiano foi medida num período de 0 - 72 horas.

Na Tabela 5.5 são apresentados os valores de absorvância no comprimento de onda de 585 nm, referentes ao crescimento microbiano, em meio caldo nutriente contendo diferentes concentrações de fenol.

As curvas de crescimento dos microrganismos bactérias, fungos e actinomicetos são apresentadas nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3, respectivamente.

TABELA 5.5 – Valores de absorvância a 585 nm referentes ao crescimento dos microrganismos em diferentes concentrações de fenol

Microrganismos	Intervalo de leituras (horas)	Concentração de fenol nos erlenmeyers (mg/L)												
		0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200
Bactérias	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	24	1,439	1,298	1,264	0,939	0,553	0,550	0,441	0,451	0,374	0,379	0,420	0,451	0,304
	48	1,826	1,746	1,781	1,249	0,927	0,901	0,660	0,562	0,553	0,457	0,477	0,466	0,481
	72	1,931	1,820	1,730	1,348	1,155	1,115	0,991	0,841	0,653	0,563	0,578	0,533	0,490
Fungos	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	24	0,627	0,553	0,489	0,409	0,407	0,410	0,415	0,383	0,378	0,316	0,330	0,300	0,244
	48	1,657	1,400	0,959	0,777	0,625	0,553	0,543	0,523	0,428	0,397	0,381	0,382	0,357
	72	1,867	1,681	1,677	1,193	0,935	0,851	0,708	0,705	0,546	0,489	0,544	0,496	0,435
Actinomicetos	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	24	0,747	0,676	0,553	0,511	0,496	1,346	0,475	0,438	0,386	0,291	0,352	0,221	0,194
	48	1,231	1,348	1,329	0,935	0,917	1,643	0,778	0,665	0,534	0,459	0,497	0,442	0,389
	72	2,101	1,923	1,955	1,186	1,111	1,698	1,066	0,871	0,767	0,734	0,749	0,670	0,596

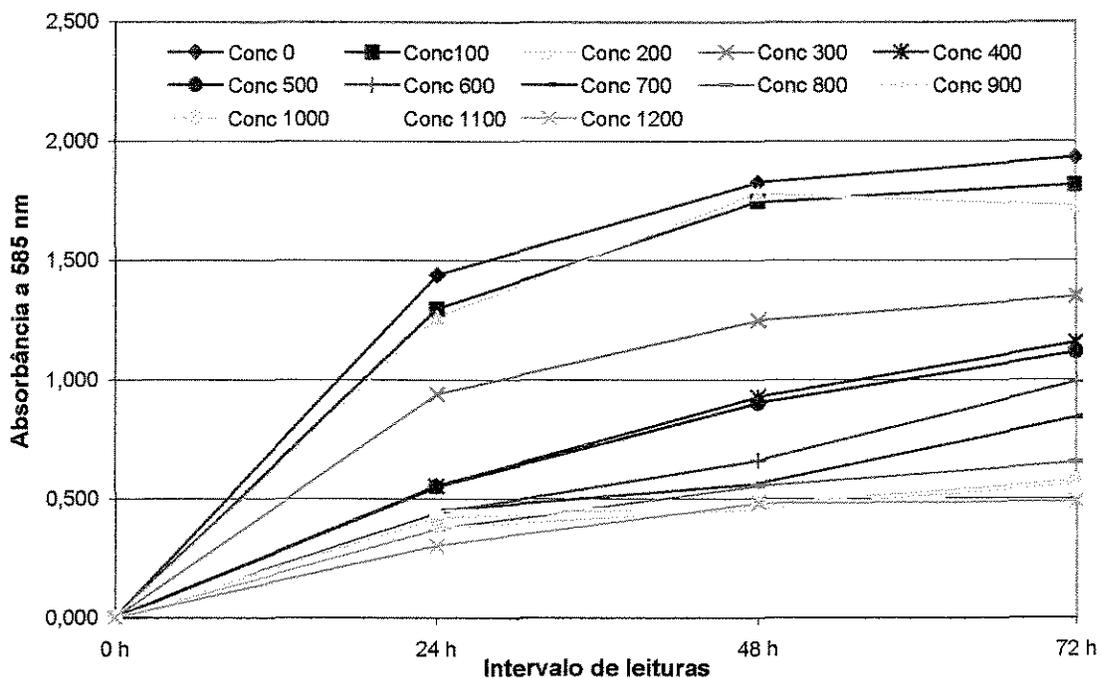


FIGURA 5.1 – Valores de absorvância referentes ao crescimento das bactérias no período de 72 horas, em diferentes concentrações de fenol.

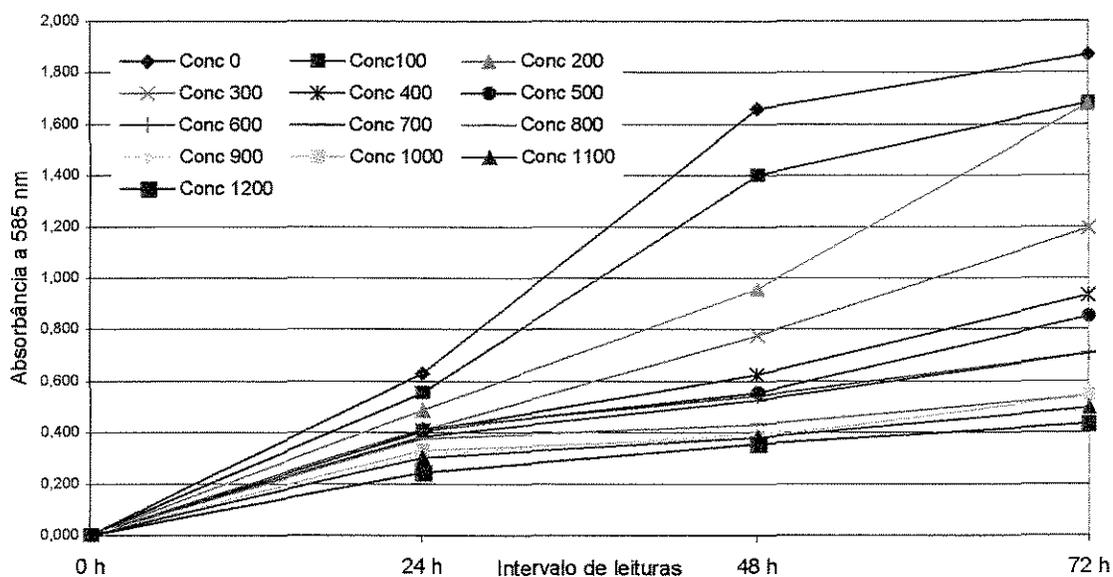


FIGURA 5.2 – Valores de absorvância referentes ao crescimento dos fungos no período de 72 horas, em diferentes concentrações de fenol.

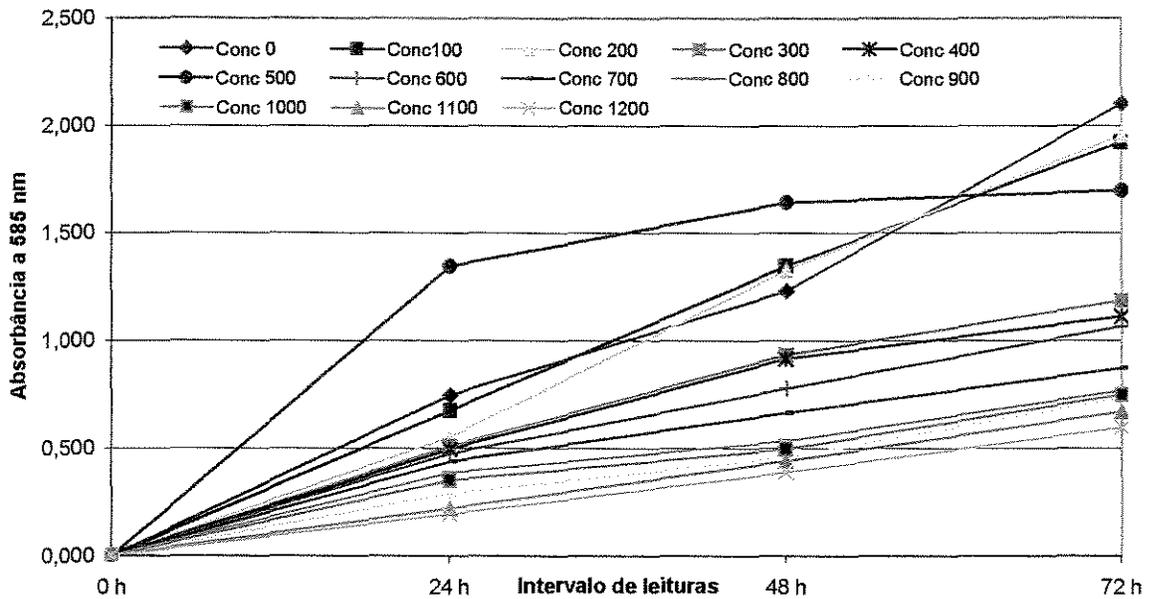


FIGURA 5.3 – Valores de absorvância referentes ao crescimento dos actinomicetos no período de 72 horas, em diferentes concentrações de fenol.

5.6 Determinação da Mínima Concentração Inibitória (MCI)

A Tabela 5.6 apresenta os valores de absorvância no comprimento de onda de 585 nm, referentes ao crescimento microbiano, em meio mínimo contendo diferentes concentrações de fenol.

As curvas de crescimento dos microrganismos bactérias, fungos e actinomicetos são apresentadas nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6, respectivamente.

TABELA 5.6 – Valores de absorvância a 585 nm referentes ao crescimento dos microrganismos no Ensaio de Mínima Concentração Inibitória (MCI) utilizando Meio Mínimo contendo fenol.

Microrganismos	Intervalo de leituras (horas)	Concentração de fenol nos erlenmeyers (mg/L)								
		200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800
Bactérias	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	48	0,109	0,087	0,083	0,070	0,053	0,038	0,033	0,024	0,020
	96	0,436	0,477	0,480	0,155	0,121	0,075	0,059	0,040	0,046
	144	0,312	0,711	0,864	0,295	0,197	0,094	0,064	0,040	0,044
	192	0,323	0,680	0,921	0,868	0,336	0,158	0,078	0,047	0,050
	240	0,258	0,618	0,819	1,114	0,616	0,247	0,141	0,059	0,061
Fungos	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	48	0,251	0,098	0,065	0,053	0,037	0,017	0,010	0,001	0,001
	96	0,251	0,416	0,207	0,184	0,138	0,095	0,052	0,010	0,007
	144	0,161	0,388	0,552	0,284	0,241	0,164	0,097	0,018	0,011
	192	0,118	0,238	0,685	0,456	0,320	0,234	0,134	0,039	0,015
	240	0,111	0,202	0,583	0,553	0,395	0,285	0,163	0,097	0,014
Actinomicetos	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	48	0,127	0,106	0,090	0,082	0,060	0,049	0,051	0,044	0,043
	96	0,343	0,514	0,360	0,235	0,147	0,104	0,090	0,075	0,077
	144	0,212	0,444	0,706	0,677	0,246	0,164	0,130	0,107	0,117
	192	0,188	0,354	0,732	0,855	0,367	0,229	0,182	0,140	0,134
	240	0,161	0,313	0,621	0,741	0,634	0,272	0,225	0,172	0,159

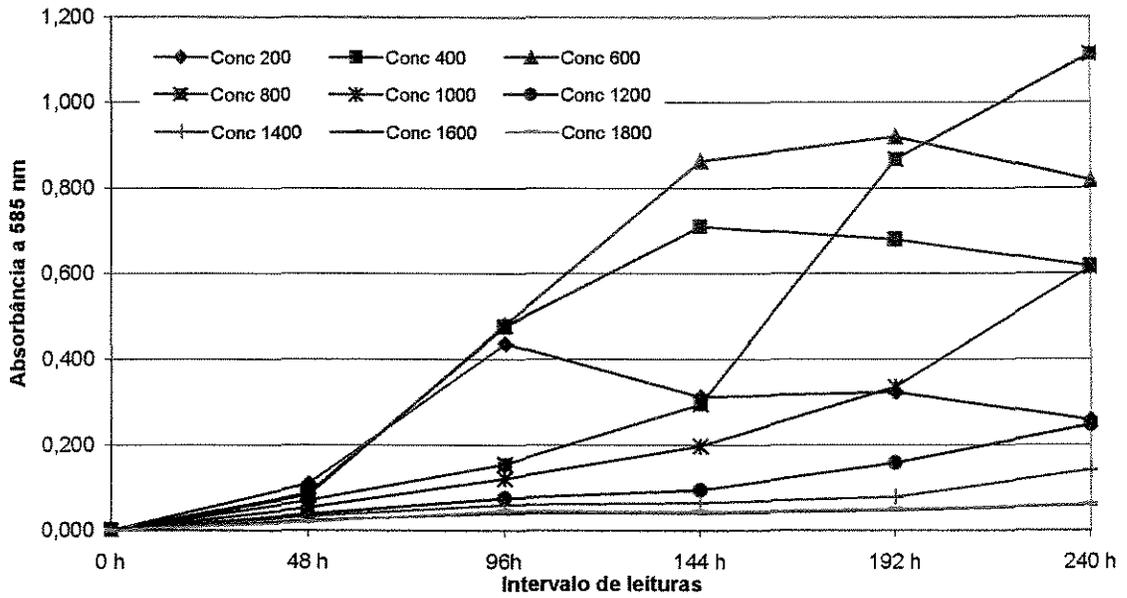


FIGURA 5.4 – Valores de absorbância obtidos no Ensaio MCI com meio mínimo para bactérias

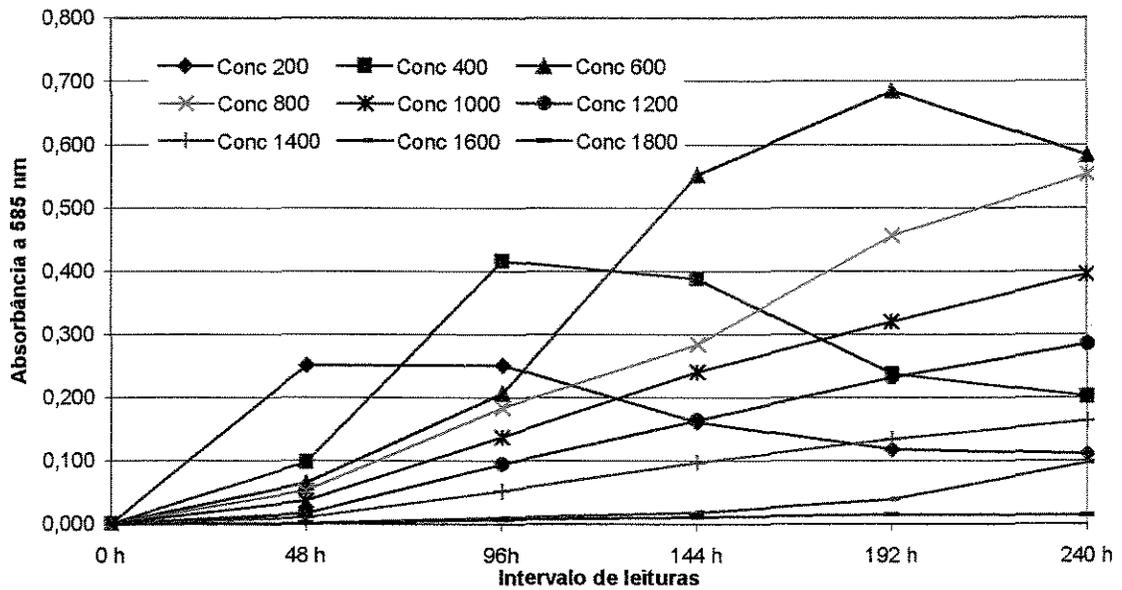


FIGURA 5.5 – Valores de absorbância obtidos no Ensaio MCI com meio mínimo para fungos.

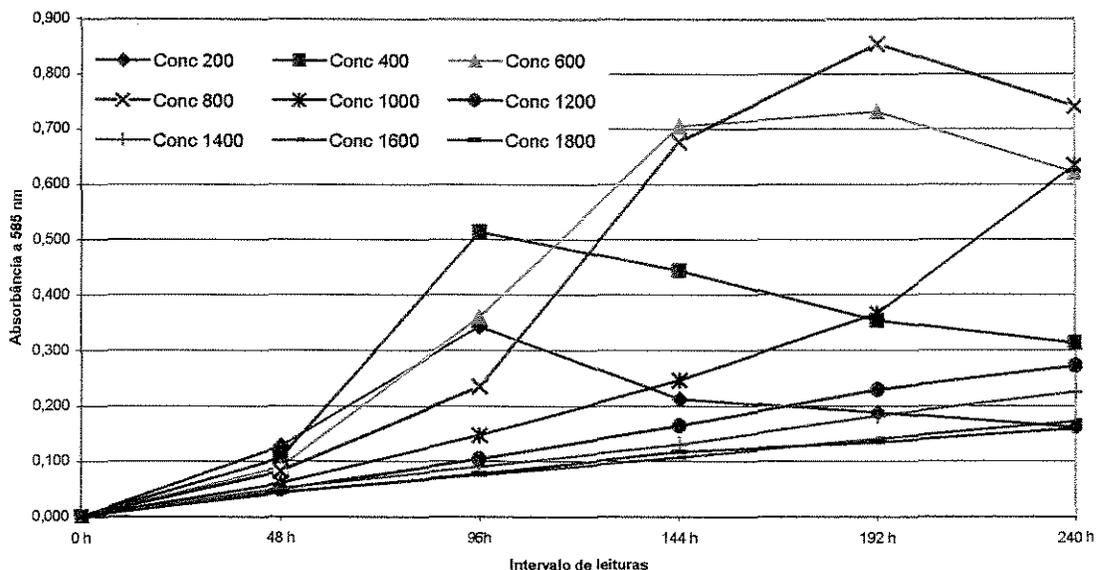


FIGURA 5.6 – Valores de absorvância obtidos no Ensaio MCI com meio mínimo para actinomicetos.

5.7 Número de colônias obtidas da Reação de Bavendamm

As 78 colônias isoladas das misturas solo e areia de moldagem foram submetidas à Reação de Bavendamm. Das 78 isoladas disponíveis, foi verificada a presença de enzima fenol oxidase em apenas 24 colônias, sendo: 10 colônias de bactérias, 6 colônias de actinomicetos e 8 colônias de fungos.

5.8 Biodegradação do fenol presente na areia de moldagem

No estudo da biodegradação do fenol presente na areia de moldagem foi preparada uma série de respirômetros com diferentes tipos de inóculo e mesma quantidade de areia de moldagem (150 gramas). A areia de moldagem apresentou concentração de fenol de 164,0 mg/Kg, o que significa que em cada respirômetro a concentração de fenol aplicada foi de 24,6 mg. Na Tabela 5.7 e Figura 5.10 estão os

valores obtidos da análise de fenol da areia de moldagem retirada dos respirômetros, por tipo de inóculo, a cada 30 dias. As determinações de fenol foram realizadas através de cromatografia gasosa.

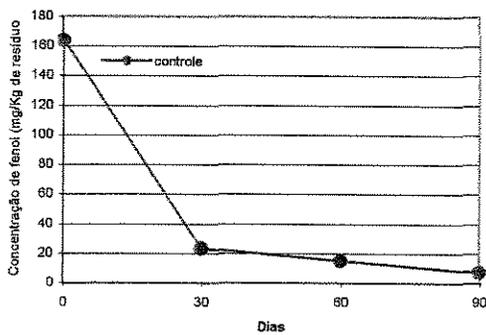
TABELA 5.7 – Avaliação da concentração de fenol na areia de moldagem durante o período de 90 dias.

Intervalo de leituras (dias)	Concentração de fenol em mg/Kg de resíduo					
	Tipo de inóculo aplicado nos respirômetros					
	Controle	Bactérias	Fungos	Actinomicetos	Misto com nutrientes	Misto sem nutrientes
0	164,0	164,0	164,0	164,0	164,0	164,0
30	23,3	19,2	18,1	14,1	13,5	13,5
60	15,1	6,9	4,5	3,8	3,1	3,7
90	7,2	4,1	3,1	2,1	1,7	1,6

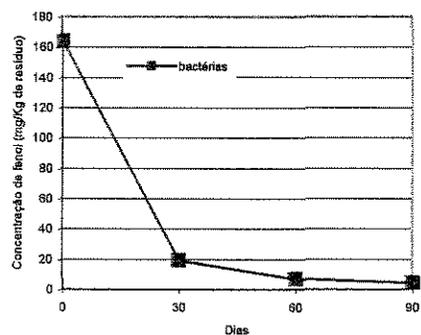
A Tabela 5.8 apresenta a porcentagem de remoção de fenol incorporado no resíduo areia de moldagem quando submetido a biodegradação por diferentes tipos de inóculo no período de 90 dias.

TABELA 5.8 – Porcentagem de remoção do fenol no período de 90 dias.

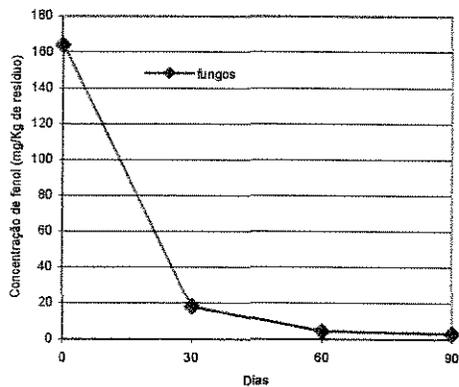
Período (Dias)	Remoção de Fenol (%)					
	Tipo de inóculo aplicado nos respirômetros					
	Controle	Bactérias	Fungos	Actinomicetos	Misto com nutrientes	Misto sem nutrientes
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	85,8	88,3	89,0	91,4	91,8	91,8
60	90,8	95,8	97,3	97,7	98,1	97,7
90	95,6	97,5	98,1	98,7	99,0	99,0



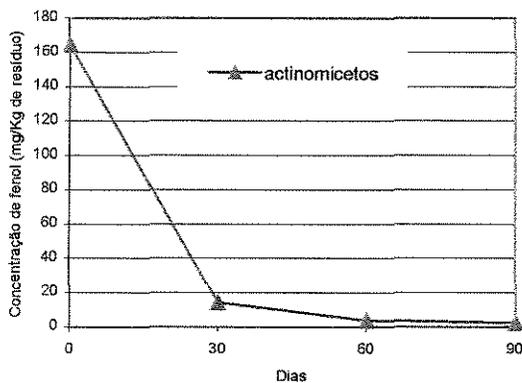
(a)



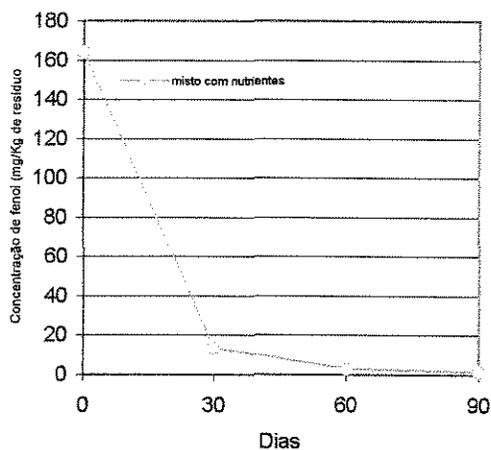
(b)



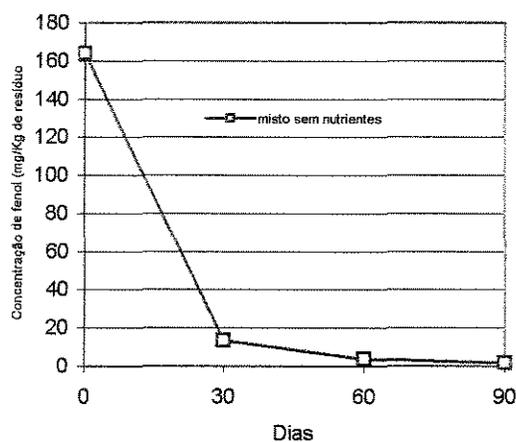
(c)



(d)



(e)



(f)

FIGURA 5.7 – Degradação do fenol para os diferentes inóculos aplicados: (a) controle, (b) bactérias, (c) fungos, (d) actinomicetos, (e) misto com nutrientes, (f) misto sem nutrientes

5.9 *Respirometria*

No período de 90 dias avaliou-se a biodegradação dos compostos fenólicos incorporados na areia de moldagem, através da quantificação do CO₂ liberado durante a respiração dos microrganismos. A Tabela 5.9 e Figura 5.8 apresentam os resultados de CO₂ acumulado durante o período, para controle e para os 5 diferentes tipos de inóculo testados.

TABELA 5.9 - Quantificação do CO₂ (mg) acumulado, gerado pelo processo de biodegradação dos compostos fenólicos incorporados no resíduo areia de moldagem, durante 90 dias a temperatura de 28 °C.

Dias de leitura acumulados	Tipo de Inóculo Aplicado nos Respirômetros					
	Controle	Bactérias	Fungos	Actinomicetos	Misto com nutrientes	Misto sem Nutrientes
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	3,4	16,0	13,1	6,0	9,8	10,0
2	4,5	38,0	34,8	35,6	37,0	37,3
3	6,0	56,1	50,0	49,0	54,5	56,5
4	10,3	72,1	74,5	73,9	80,5	81,2
6	28,9	103,9	113,8	114,1	120,4	122,3
7	35,5	122,4	131,9	134,0	134,6	137,7
9	45,7	144,4	145,6	148,9	145,4	150,2
12	54,1	157,3	155,7	160,9	154,1	158,9
16	66,0	169,0	164,8	173,0	164,0	169,3
19	77,5	175,6	171,3	179,8	170,9	176,6
23	94,0	186,2	181,8	189,3	181,8	188,1
27	104,7	188,6	182,6	189,6	182,6	190,0
31	118,3	195,1	188,4	194,9	188,3	196,3
34	125,6	198,7	191,9	198,0	191,6	200,0
38	130,8	201,1	195,1	200,7	195,0	201,3
44	142,3	206,9	201,2	205,8	200,6	206,8
51	155,1	216,0	210,1	213,1	208,8	215,2
58	163,3	221,0	215,6	217,0	213,0	219,3
67	171,1	227,4	222,2	222,8	218,7	224,8
90	183,9	238,2	222,2	231,7	227,4	233,9

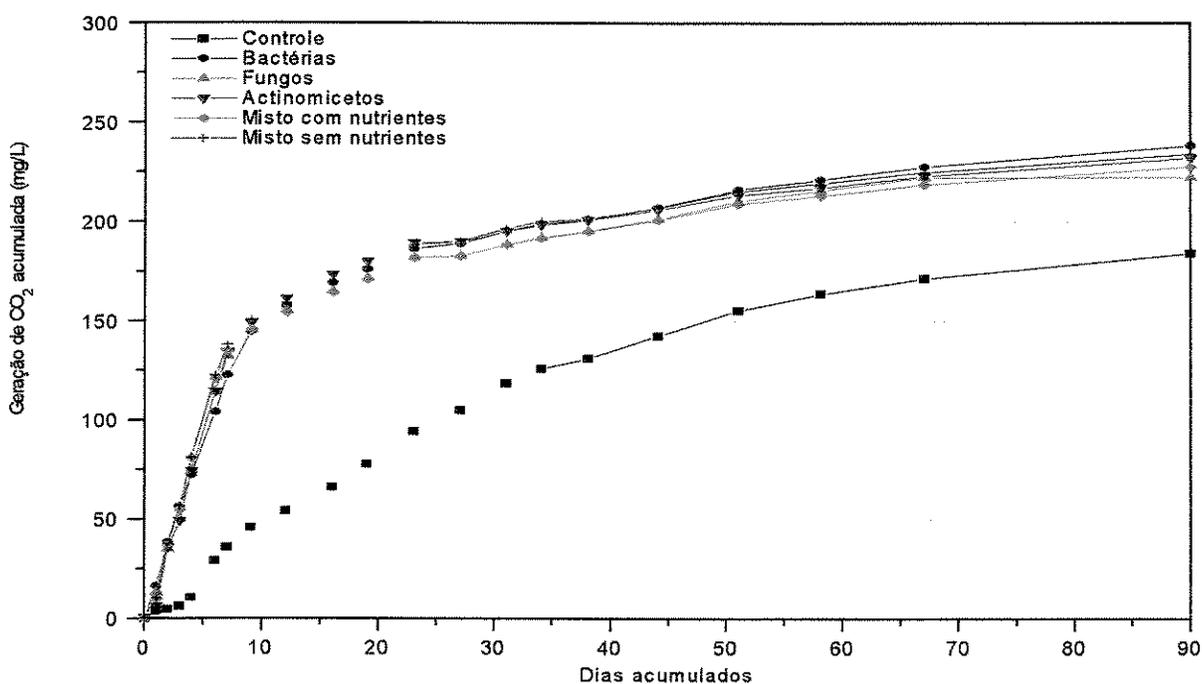


FIGURA 5.8 – Produção acumulada de CO₂ obtida no ensaio de respirometria, durante o período de 90 dias devido a biodegradação dos compostos fenólicos na areia de moldagem.

5.9.1 Cálculo do CO₂ teórico e quantificação do efetivo produzido em função da biodegradação de compostos fenólicos incorporados no resíduo

Quimicamente 1 mg de fenol produz 2,81 mg de CO₂, por via oxidativa. Baseado neste valor foi calculada a produção teórica de CO₂ para a quantidade de areia aplicada nos respirômetros. Cada respirômetro foi montado com 150 gramas de areia de moldagem e o inóculo de microrganismo. Na Tabela 5.10 estão alocados os valores teóricos de produção de CO₂ calculado para a quantidade de areia aplicada no respirômetro e a produção efetiva produzida no ensaio respirométrico, durante 90 dias a 28 °C.

TABELA 5.10 – Produção de CO₂ teórico calculado e efetivo medido nos respirômetros

Respirômetro	Concentração de fenol (mg)	CO ₂ teórico (mg)	CO ₂ efetivo (mg)
Controle	24,6	69,13	183,9
Bactérias	24,6	69,13	238,2
Fungos	24,6	69,13	222,2
Actinomicetos	24,6	69,13	231,7
Misto com nutrientes	24,6	69,13	227,4
Misto sem nutrientes	24,6	69,13	233,9

5.10 Quantificação de bactérias, fungos e actinomicetos nas amostras de areia ao final de 90 dias.

Após 90 dias de ensaio respirométrico a população de microrganismos que atuaram na biodegradação dos compostos fenólicos foi quantificada. Os resultados das Unidades Formadoras de Colônias estão na Tabela 5.11 e o log das UFC na Figura 5.9.

Tabela 5.11 – Unidades Formadoras de Colônias de bactérias, fungos e actinomicetos nas amostras de areia retiradas dos respirômetros após 90 dias.

Respirômetro com inóculos	UFC/ grama de areia		
	Bactérias	Fungos	Actinomicetos
Controle	1,68 x 10 ⁷	4,34 x 10 ⁴	< 1
Bactérias	1,28 x 10 ⁷	-	-
Fungos	-	7,28 x 10 ⁴	-
Actinomicetos	-	-	1,14 x 10 ³
Misto com nutrientes	3,24 x 10 ⁷	1,62 x 10 ⁵	1,16 x 10 ³
Misto sem nutrientes	2,73 x 10 ⁷	3,64 x 10 ⁴	3,86 x 10 ³

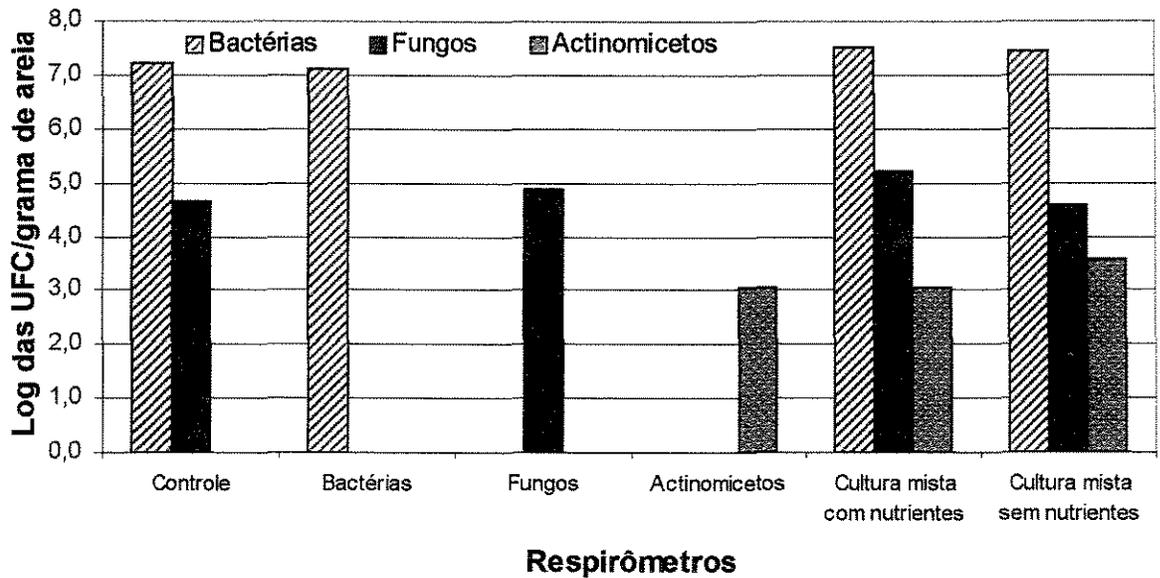


FIGURA 5.9 – Log das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, fungos e actinomicetos na areia retirada dos respirômetros após 90 dias.

5.10.1 Contagem dos microrganismos presentes na areia “in natura”

Como o respirômetro denominado controle, montado apenas com areia de moldagem, apresentou produção de CO_2 foi então, realizada uma nova amostragem do material. Foram coletadas duas amostras de areia dentro do processo de moldagem dos machos. A areia antes e após a adição da resina. Os valores das Unidades Formadoras de Colônias foram determinados para os três grupos de microrganismos objetos do estudo (Tabela 5.12 e Figura 5.10).

TABELA 5.12 – Unidades Formadoras de Colônias dos microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos) em duas amostras de areia, antes - "in natura"- e após a adição de resina fenólica - areia de moldagem.

Microrganismos	UFC/grama de areia	
	Areia "in natura"	Areia de moldagem
Bactérias	$5,3 \times 10^1$	$4,4 \times 10^1$
Fungos	$2,7 \times 10^1$	< 1
Actinomicetos	< 1	< 1

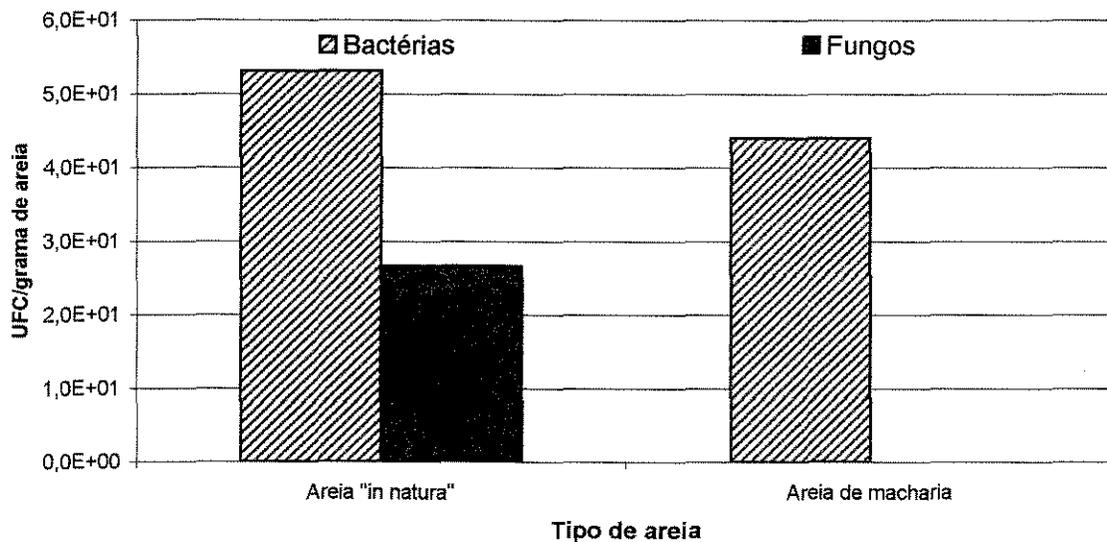


FIGURA 5.10 – Contagem dos microrganismos presentes na areia "in natura" e após a aglomeração com resina fenólica.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização e classificação da areia de moldagem

Na primeira fase do experimento o resíduo areia de moldagem foi submetido aos ensaios de lixiviação, solubilização e massa bruta para a determinação dos parâmetros (Tabela 5.1), constantes das listagens 7, 8 e 9 da Norma NBR 10.004 (ABNT, 1987a) e, para sua classificação. O resíduo estudado foi classificado como Classe I – perigoso.

O resíduo para ser classificado como tóxico deverá conter quaisquer contaminantes no extrato lixiviado, em concentrações superiores aos constantes na Listagem 7. Quanto ao resíduo estudado a concentração do fenol no extrato lixiviado não foi utilizada para caracterizá-lo como tóxico, uma vez que, este contaminante não consta como parâmetro nesta listagem.

Os teores de fenol foram determinados no extrato solubilizado e na massa bruta, as concentrações encontradas foram respectivamente de 0,090 mg/L e 33,3 mg/Kg. Estas concentrações apresentaram-se superiores as constantes na listagem 8 e 9, respectivamente 0,001 mg/L e 10 mg/Kg (1ª Fase).

Os metais nas concentrações determinadas no resíduo foram inferiores aos valores da Listagem 7, desta forma não sendo utilizados para avaliação da toxicidade do resíduo. Assim como os teores de ferro e manganês encontrados, 0,42 e 0,24 mg/L respectivamente, serem superiores aos valores da Listagem 8 e, também não foram utilizados para classificar o resíduo como perigoso.

Pelo exposto a alternativa para classificar o resíduo como Classe I, foi o de utilizar o teor de fenol na massa bruta. Na primeira fase a concentração de fenol na massa bruta foi de 33,3 mg/Kg enquanto na segunda de 164,0 mg/kg. Pode-se observar que nas duas fases do experimento a concentração de fenol na massa bruta apresentou-se superior a 10 mg/Kg, permanecendo o resíduo na mesma classe. A diferença de concentração de fenol na primeira e segunda fase foi muito grande, o que permite concluir que existem variações no processo de moldagem.

6.2 Caracterização do solo

O solo foi caracterizado em seus parâmetros físicos, químicos e microbiológicos, para sua utilização como agente na degradação de compostos fenólicos e isolamento dos microrganismos responsáveis por essa transformação.

A quantidade e diversidade de microrganismos do solo, dependem de muitos fatores ambientais tais como disponibilidade de nutrientes, pH, umidade, grau de aeração, temperatura e eventos advindos da atividade antropogênica, em aumentar ou diminuir a biota. A umidade é um dos fatores que mais afetam a atividade microbiana do solo, sendo a água um elemento indispensável, constituindo o protoplasma celular. O principal efeito do baixo teor de umidade do solo é a redução da biomassa e de sua atividade. A umidade facilita as trocas gasosas, a dissolução e transporte de nutrientes. (ALEXANDER, 1977).

A determinação da capacidade de campo do solo foi importante para o ajuste do teor de umidade da mistura solo e areia de moldagem, de modo a permitir a atividade microbiana. O ajuste foi realizado de acordo com o projeto de Norma 01:603.06-007 (ABNT, 1993), para 50 a 70% da capacidade de campo. Para este ajuste foi utilizado o teor de umidade encontrado no solo inicialmente de 17% e, considerando a areia com teor de umidade como 0%. O pH não foi corrigido uma vez que estava próximo da neutralidade.

A população microbiana do solo tem papel fundamental na ciclagem dos nutrientes e carbono, participando de processos importantes como a nitrificação, denitrificação e a mineralização do carbono. Os principais microrganismos responsáveis por essa ciclagem são as bactérias, fungos e os actinomicetos. Por essa razão os três grupos foram avaliados. A contagem inicial dos microrganismos (Tabela 5.3) apresentou valores muito próximos daqueles apresentados na Tabela 3.1.

Em relação a sua granulometria o solo foi classificado como Argilo Arenoso (Tabela 5.2), tipo de solo comum da região de Limeira.

6.3 Contagem dos microrganismos do solo

Os objetivos da quantificação dos microrganismos foram o de verificar a adaptação e crescimento destes ao substrato introduzido, e recuperação dos microrganismos atuantes na degradação dos compostos fenólicos incorporados no resíduo.

Utilizando-se para quantificação de microrganismos a técnica de contagem em placas contendo meio de cultura sólido, obtém-se apenas uma estimativa do número de microrganismos da amostra. O resultado obtido não reflete a população total, uma vez que se refere apenas a células viáveis, esporos ou fragmentos de micélios são capazes de se desenvolver nos meios utilizados (PELCZAR et al., 1996). Mesmo com esta limitação, esta técnica é bastante utilizada e mostrou-se uma importante ferramenta para comparar o crescimento da população microbiana em diferentes concentrações do resíduo e avaliar o efeito dos compostos introduzidos durante o período de 90 dias do estudo.

Dentro do período de 90 dias foram efetuadas contagens dos microrganismos presentes na mistura solo e areia de moldagem, o que pode ser visualizado na Tabela 5.4 e, durante o período não foi observada a inibição do crescimento.

Comparando-se a população encontrada nas misturas com o solo controle observa-se que não ocorreu inibição pela adição do fenol e os mesmos mantiveram-se

na mesma faixa inicial, para as bactérias 10^6 , fungos 10^4 e actinomicetos 10^6 UFC/g de mistura solo e areia.

Com quinze dias observou-se um aumento relativo do número de bactérias, fungos e actinomicetos comparado ao controle, demonstrando que os mesmos utilizaram o carbono disponível introduzido com o resíduo. Na leitura com 30 dias, observou-se uma diminuição do número de microrganismos que permaneceu até 90 dias. Em relação à leitura com 15 dias, esta diminuição pode ser relacionada com a diminuição do teor de carbono disponível. Um dos fatores que leva a inferir esta hipótese é a liberação do fenol no meio para ataque dos microrganismos. Esta liberação pode ser lenta uma vez que a resina apresenta-se fortemente ligada ao grão de areia, e considerando o tamanho do grão em relação aos microrganismos, o que dificulta a utilização do fenol. A diminuição apresenta ser mais lenta para as maiores taxas (75 g e 100 g), uma vez que a quantidade de carbono aplicado foi maior e alguns fatores de crescimento foram controlados, tais como, pH, temperatura de 28 °C (constante), umidade, além de alguns elementos denominados elementos traços (Mn, Zn, etc) presentes na própria areia.

Foram observadas variações das características morfológicas e coloração das colônias desenvolvidas nas placas correspondentes as diferente misturas solo e areia, quando comparada às placas do solo controle. Essa distinção foi utilizada para o isolamento dos microrganismos.

6.4 Isolamento dos microrganismos

O isolamento das colônias foi realizado através da comparação visual levando em consideração as características morfológicas e coloração das colônias. As colônias foram isoladas de todas as taxas de areia durante as quatro amostragens, com 15, 30, 60 e 90 dias.

Dentre os isolados destacam-se as bactérias e os actinomicetos com o maior número de colônias, 30 e 32 respectivamente, já que a população dos mesmos é mais

numerosa no solo do que os fungos, e tem sido reportados como melhores degradadores de compostos aromáticos.

Os microrganismos foram preservados em meio inclinado com óleo mineral esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Este tipo de preservação foi escolhido pois apresenta como vantagens a longa viabilidade dos microrganismos, baixo custo, elimina a necessidade de equipamentos especiais e a prevenção de ácaros (MURO e LUCHI, 1989). O objetivo da preservação de culturas é de manter as culturas num estado viável e estável sem mudanças morfológicas.

6.5 Adaptação ao fenol e determinação da Mínima Concentração Inibitória

Na adaptação, as dosagens crescentes de fenol produziram absorvâncias variadas, sendo crescente em todas as concentrações testadas. A presença de glicose permitiu um maior crescimento e nas 12 concentrações testadas não foi observada inibição (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3). Os valores de absorvância maiores no ensaio (Tabela 5.5), indicam um grande crescimento em função da utilização da glicose como fonte de carbono, além do fenol.

Esta fase de adaptação permitiu observar a presença de microrganismos tolerantes a concentrações de fenol mais elevadas do que as presentes no resíduo. Estes microrganismos adaptados foram importantes para compor o inóculo na determinação da mínima concentração inibitória de fenol frente aos microrganismos isolados.

Para determinação da MCI foi utilizado os meios mínimos com o fenol como única fonte de carbono. Neste ensaio a mínima concentração inibitória foi determinada para cada grupo de microrganismos respectivamente para bactérias 1600 mg/L, fungos e actinomicetos 1800 mg/L (Figuras 5.4, 5.5 e 5.6). Os valores encontrados são superiores aos obtidos por BASTOS (1995), de 1300 mg/L de fenol.

6.6 *“Reação de Bavendamm”*

Este ensaio foi realizado como forma de selecionar os microrganismos isolados, quanto a possibilidade de degradar o composto poluente. No item 5.7 estão relacionados os números de colônias que apresentaram resultado positivo neste ensaio.

A metodologia utilizada por SOUZA (2000), mostrou-se uma alternativa quando se deseja determinar a presença de enzimas fenol oxidase em bactérias, fungos e actinomicetos.

Até esta etapa do trabalho, foram considerados os microrganismos tolerantes ao resíduo, sobreviventes ao fenol e produtores de fenol oxidase, passando agora para a manipulação dos possíveis isolados eficientes na utilização do fenol como fonte de carbono e energia, no ensaio de respirometria.

6.7 *Remoção de fenol durante o ensaio de respirometria*

Nesta etapa da pesquisa os microrganismos da fase anterior foram utilizados para o preparo do inóculo e aplicados nos respirômetros contendo 150 gramas de areia e concentração de fenol igual a 24,6 mg. Considerando que os microrganismos agora adaptados a concentrações mais elevadas de fenol sejam mais eficientes na degradação do mesmo incorporado na areia de moldagem. Analisou-se o teor de fenol das amostras retiradas dos respirômetros com 30, 60 e 90 dias (Tabela 5.7).

Os resultados obtidos indicaram que em todos os tipos de inóculo utilizados ocorreu a biodegradação do fenol incorporado na areia. Com 30 dias observa-se uma redução acima de 80% para todos os inóculo estudados (Tabela 5.8).

Mesmo com as percentagens de remoção elevadas, somente após 60 dias a concentração de fenol na massa bruta mostrou-se abaixo de 10 mg/Kg, o que não mais caracteriza o resíduo como perigoso, para os seis tipos de inóculo testados. Os dados

obtidos deixam claro que embora o percentual de remoção atinja 99%, a concentração inicial é decisiva na quantidade residual.

Observa-se na Tabela 5.8, que as culturas mistas com e sem adição de nutrientes apresentaram melhor remoção de fenol, acima de 90% nos primeiros 30 dias de ensaio. Isto demonstra que culturas mistas são mais hábeis em degradar compostos, levando em consideração a importância do cometabolismo e sinergismo na transformação destes e comparando-se aos grupos isoladamente.

Neste experimento, comparando os resultados do misto com e sem nutrientes, não foi observada diferença significativa na remoção de fenol. O nitrogênio e o fósforo são importantes para os microrganismos, o primeiro é parte essencial dos aminoácidos que formam as proteínas e síntese celular, o segundo, para a síntese de ácidos nucléicos e ATP (adenosina trifosfato). Neste estudo, a adição de nitrogênio e fósforo não foram fatores limitantes para o processo.

Com apenas 37 dias aproximadamente, a concentração de fenol na massa bruta ficou abaixo de 10 mg/Kg, que não mais caracteriza como resíduo Classe I.

6.8 *Respirometria*

Na Tabela 5.9 e Figura 5.8 estão alocados os resultados obtidos no ensaio respirométrico, os dados referem-se a produção acumulada de CO₂ no período de 90 dias. Em todos os inóculos testados observou-se que ocorreu a biodegradação dos compostos orgânicos incorporados no resíduo.

A produção de CO₂ foi utilizada como indicativo da degradação do resíduo. A Tabela 5.10 mostra a produção teórica e efetiva medida durante o experimento, nota-se que a produção acumulada em todos os inóculos apresenta-se maior do que a teórica. Esta diferença pode ser explicada de acordo com SIVIERO (1999), uma vez que o resíduo areia de moldagem, apresenta em sua composição além do fenol outros compostos como formol, solventes orgânicos, aminas e poliisocianatos e, desta forma sendo utilizados como fonte de energia.

Durante o experimento, notou-se a produção de CO₂ medida no respirômetro controle, já que no mesmo não foi realizada inoculação de microrganismos e somente corrigida a umidade. Através de nova amostragem da areia foi justificada esta produção, com a realização da contagem microbiana. Na Tabela 5.12 estão alocados os valores das Unidades Formadoras de Colônias, obtidos nas areia "in natura" e após a adição de resina fenólica, nas duas amostras foram encontrados microrganismos, apesar da pequena contagem. As bactérias não sofreram diminuição significativa de seu número após passar pelo setor de moldagem, onde se adiciona o produto químico, enquanto os fungos foram eliminados.

Pode-se concluir que os microrganismos que produziram o CO₂ no controle, estavam presentes no resíduo e o seu número foi aumentado após os 90 dias em função de serem propiciadas condições de desenvolvimento, como temperatura constante (28 °C), umidade e substrato (o próprio resíduo). Observa-se na Figura 5.8, que durante os primeiros 4 dias a produção de CO₂ foi muito baixa, o que demonstra uma adaptação dos microrganismos aos compostos incorporados no resíduo. Após este período a produção aumentou e até o final de 90 dias não houve estabilização. A contagem dos microrganismos presentes e a remoção de fenol ao final de 90 dias

comprovam a eficiência dos microrganismos presentes no resíduo na degradação do mesmo. A remoção do fenol e a quantidade de CO₂, no controle foi menor quando comparado à adição dos microrganismos, isto indica que a introdução de microrganismos adaptados ao fenol é importante, pois acelera o processo de biodegradação.

Os respirômetros com inoculação de actinomicetos, apresentando-se em menor número ao final de 90 dias quando comparados com os números obtidos na 1ª fase, mostraram-se mais eficientes na remoção do fenol quando comparados com as bactérias e fungos (Tabela 5.8). A redução dos actinomicetos pode ser devida as diversas etapas do experimento, onde foram retirados de meio completo (ágar amido caseína) para outros meios como caldo nutriente e mínimo, sem a caseína e o amido, fatores primordiais para o seu crescimento.

Os inóculos se comportaram de maneira semelhante (Tabela 5.9), ocorreu uma rápida adaptação ao resíduo e, rápida produção de CO₂, tornando-se pequena a partir do 23º dia.

No controle devido a microbiota autóctone, a adaptação foi lenta e a produção de CO₂ crescente durante todo o período analisado. Apesar de ter ocorrido a biodegradação do fenol numa alta proporção, quando comparado aos outros ensaios contendo microrganismos adaptados, deve-se considerar a velocidade da biodegradação.

Na Tabela 5.8, verifica-se após 30 dias que a concentração de fenol no respirômetro controle reduziu para 23,3 mg/Kg de resíduo, com eficiência de remoção de 85,8%, enquanto na areia contendo inóculo misto a concentração de fenol reduziu para 13,5 mg/Kg de resíduo, com eficiência de remoção de 91,8%. Esta maior eficiência era esperada, uma vez que, os microrganismos inoculados já estavam adaptados ao fenol.

No gráfico de respirometria (Figura 5.8), pode-se comprovar o que foi citado. No controle, com 31 dias de ensaio, a produção de CO₂ foi de 118,3 mg, enquanto no misto sem nutrientes a produção foi de 196,3 mg, ficando muito próximo para os outros inóculos.

6.9 População de microrganismos ao final de 90 dias

Após 90 dias foi efetuada a contagem dos microrganismos presentes nos respirômetros. Os resultados obtidos estão alocados na Tabela 5.11 e Figura 5.9.

Comparando-se os números obtidos com os da 1ª Fase, para o mesmo resíduo e período de tempo (t=90 dias), observa-se um aumento do número de bactérias, demonstrando uma maior adaptação deste grupo; já os fungos permaneceram na mesma faixa (10^4) e uma diminuição para os actinomicetos (10^3).

7 CONCLUSÕES

A determinação do fenol na massa bruta mostrou-se uma alternativa para a sua classificação como Classe I – perigoso, conforme NBR 10.004/87.

As condições de ensaio permitiram o crescimento e adaptação dos microrganismos do solo, aos compostos fenólicos incorporados no resíduo areia de moldagem;

A metodologia para determinação de enzima fenol oxidase, teve boa reprodutibilidade e foi importante para comprovar capacidade dos microrganismos isolados em degradar fenol;

Tanto os ensaios de MCI e Reação de Bavendamm foram importantes porque permitiram a obtenção de cepas degradadoras de fenol;

A utilização de microrganismos adaptados acelerou o processo de biodegradação dos compostos orgânicos incorporados na areia de moldagem, quando submetidos ao ensaio de respirometria. A introdução de cultura mista de microrganismos mostrou ser a melhor alternativa para o tratamento do resíduo, com eficiência de remoção de fenol de 99% em 90 dias de ensaio. Com 37 dias a concentração de fenol na massa bruta para o inóculo misto foi menor que 10 mg/Kg, não mais caracterizando o resíduo como perigoso.

Neste experimento comprovou-se a capacidade dos microrganismos presentes na mistura solo/areia de moldagem em se adaptar ao fenol e utilizá-lo como fonte de carbono.

O trabalho com cultura mista é facilitado, uma vez que os microrganismos estão presentes no resíduo e, não é necessário isolar cada grupo. A alternativa é produzir inóculo com os mesmos.

O teste respirométrico de Bartha mostrou-se uma importante ferramenta para avaliar a biodegradação dos compostos fenólicos incorporados no resíduo, através da quantificação do CO₂ gerado como resultado da mineralização, mesmo levando em consideração a baixa quantidade de carbono aplicado.

8 RECOMENDAÇÕES

Para estudos futuros de tratabilidade do resíduo areia de moldagem recomenda-se:

- Identificação em nível de gênero dos microrganismos isolados, responsáveis pela biodegradação dos compostos fenólicos incorporados ao resíduo;
- Estudar a utilização dos microrganismos em sistemas pilotos de tratamento, através da introdução de consórcio dos isolados eficientes;
- Estudar o tratamento deste resíduo em escala piloto, através de pilhas aeradas, controlando as condições necessárias para o desenvolvimento dos microrganismos presentes na própria areia;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 AARONSON, S. Procedures for the enrichment and/or isolation. In: **Experimental Microbial Ecology**. New York: Academic Press, 1970. 235 p.
- 02 AINSWORTH, G.C. In: AINSWORTH, G.C., SPARROW, F.K., SUSSMAN, A S.. **The fungi**. Vol. 4A. New York: Academic Press, 1973. p. 1-7.
- 03 ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2 Ed. New York: John Willey & Sons, 1977. 476p.
- 04 ALEXANDER, M. **Introducción a la Microbiología del Suelo**. Traduzido por Q.B.P. Juan José Peña Cabriales. AGT EDITOR, S.A., 491 p., 1980.
- 05 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 19 ed. Washington: 1995.
- 06 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 20 ed. Washington: 1998.
- 07 ANDER, P., ERIKSSON, K.E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**. 109, 1976. p. 1-8
- 08 ANSELMO, A M.; NOVAIS, J.M. Isolation and selection of phenol degrading microorganisms from industrial effluent. **Biotechnology Letters**, 06 (9), p. 601-606, 1984.
- 09 ASHLAND. Ashland Bentonit Resinas Ltda. Fichas de informações de segurança do produto – FISP n. 03. Fac-símile. 21/08/1997, 16:50h, p. 10.
- 10 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE FUNDIÇÃO, Caderno Técnico, **Fundição e Matérias Primas**, vol. 16, Ano II, Nov/Dez 1996.

- 11 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10.004 - Resíduos Sólidos - Classificação**. 33 p, 1987a.
- 12 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10.005 - Lixiviação de Resíduos** - 10 p, 1987b.
- 13 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10.006 - Solubilização de Resíduos** - 2 p, 1987c.
- 14 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10.007 - Amostragem de Resíduos**. 25 p, 1987d.
- 15 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Projeto de Norma 01:603. 06-007 (no prelo). **Determinação da Biodegradação em Solos - Método Respirométrico**. Jan. 1993.
- 16 BARBIERI, S.M. Avaliação da correlação entre biodegradabilidade de compostos aromáticos e hidrofobicidade da membrana celular. In: I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, Instituto de Química, 1997. 276 p. p.24 - 29.
- 17 BARTHA, R. Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. In: LABEDA, D.P. **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**. p. 284-307, 1990.
- 18 BASTOS, A E.R. **Seleção de Microrganismos Degradadores de Fenol, em Dois Sistemas de Uso da Terra em Ariquemes – Rondônia**. - 1995. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 19 BASTOS, A E.R., TSAI, S.M., MOON, D.H. et al. Biodegradação de fenol por microrganismos do solo. In: I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, Instituto de Química, 1997. 276 p. p.11 - 17.
- 20 BEDIN, M.L.; BARBOSA, T.C.P.; GABILAN, N.H. Cinética da degradação do fenol e análises de plasmídios em *Acinetobacter calcoaceticus*. In: I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, Instituto de Química, 1997. 276 p. p. 42 - 47.
- 21 BOHDZICWICZ, J. Biodegradation of phenol by enzymes from *Pseudomonas sp.* Immobilized onto ultrafiltration membranes. **Process Biochemistry**. Great Britain, Vol. 33, n. 8, p. 811-818, 1998.

- 22 BORGES, C. J., BALDIN, S. M., MEDEIROS, L. B., ANDRAUS, S. Viabilidade e Sobrevivência de bactérias do Lodo de Esgotos em Solos. Estado da Arte, Curitiba, 1996.
- 23 BRADASCHIA, C. Apanhado histórico do desenvolvimento de fundição de metais e ligas não ferrosas, sua importância atual no Brasil e no Mundo. Aula N.º 02. In: **Curso de Fundição de Ligas Não - Ferrosas**. Associação Brasileira de Metais - ABM, 3ª edição, São Paulo, 1989.
- 24 BRANDÃO, E. M. Os Componentes da Comunidade Microbiana do Solo. In: CARDOSO E. J. B. N., TSAI, S. M., NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do solo. 1992. cap.1.
- 25 BROCK, T. D., MADIGAN, M. T. **Biology of microorganisms**. 6 ed. Prentice - Hall International, 1991. 874p.
- 26 BUITRÓN, G., KOEFOED, A., CAPDEVILLE, B. Microbial activity evolution during the acclimation of a mixed culture to phenol: use of CO₂ evolution rate as indicator. **Water Science and Technology**. Great Britain, v. 26, n. 9-11, p 2049-2052, 1992.
- 27 CAREY, P., ARCHIBALD, J. Um estudo detalhado do sistema cold box amino – uretânico - fenólico. **Revista Fundição e Serviços**. São Paulo, n. 65, p. 28 – 51, maio. 1998.
- 28 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Norma Técnica L5. 201: **Contagem padrão de colônias de bactérias**. São Paulo, 1978. 11p.
- 29 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Norma Técnica. L5. 219: **Actinomicetos Contagem em placas**. São Paulo, 1989. 22p.
- 30 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Norma Técnica L6.350: **Solos Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. São Paulo, 1990.15p.
- 31 CORAUCCI FILHO, B., SIVIEIRO, A.R., ALBUQUERQUE, A.F. et al. O solo como agente na biodegradação de óleo essencial cítrico. In 1^{er} Simposio Latinoamericano de Tratamiento y Reuso del Agua y Residuo Industriales, 1998, México. **Anais...** México: 25 – 29 de maio, 1998.
- 32 DEMPSEY, C.R., OPPELT, E.T. Incineration of hazardous waste: A critical review update. **Journal of the Air and Waste Management Association**. V. 37, Jan. 1993.

- 33 DIFCO MANUAL. **Deydrated culture media and reagents for Microbiology**. 10 Ed., Detroit: Difco Laboratories, 1984, 1115 p.
- 34 FULLER, W.H., WARRICK, A W. **Soils in Waste treatment and utilization**. 3 ed., Boca Raton CRC - PRESS, 1985. 2V.
- 35 GALLET, C., KELLER, C. Phenolic composition of soil solutions: comparative study of lysimeter and centrifuge waters. **Soil Biology and Biochemistry**. V. 31, n. 8, p. 1151-1160, July 1999.
- 36 GIRARD, H., ROUGIEUX, R. **Técnicas de microbiología agrícola**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1964, 264 p.
- 37 GOUDAR, C.T., GANJI, S.H., PUJAR, B.G. et al. Substrate Inhibition Kinetics of phenol biodegradation. **Water Environment Research**. Alexandria, vol.72, n.1, p. 50 – 55, Jan/fev 2000.
- 38 GUIRAUD, P., STEIMAN, R., LAYDI-AIT, L. et al. Degradation of phenolic and chloroaromatic compounds by *Coprinus spp.* **Chemosphere**. Vol. 38, n. 12, p. 2775 – 2789, 1999.
- 39 HANNAFORD, A.M., KUEK, C. Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 22 (2), p. 121-126, 1999.
- 40 HASSEN, A., SAIDI, N., CHERIF, M et al. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**. Great Britain, vol. 65, p. 73-82, 1998.
- 41 HEESE, W. K., SCHWARZ, T., KAUFMANN, M. Phenol degradation by an enterobacterium: a *Klebsiella* strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase. **Canadian Journal of Microbiology**. 45 (2), p. 162-171, 1999.
- 42 IRPTC - International Register of Potentially Toxic Chemicals, **Phenol**, vol. 61, p 3 - 37, Moscow, 1984.
- 43 LÉONARD, D., LINDLEY, N.D. Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 25, n. 3-5, p. 271-277, Aug. 1999.
- 44 MARGESIN, R., ZIMMERBAUER, A., CHINER, F. Monitoring of biorremediation by soil biological activities. **Chemosphere**. Vol. 40, p. 339 – 346, 1999.

- 45 MARIOTTO, C.L. Evolução dos sistemas ligantes de areia para moldes e machos. In: **Curso de Fundição de Ligas Não - Ferrosas.** Associação Brasileira de Metais - ABM, 3ª edição, São Paulo, 1989.
- 46 MORAES, M. Machos, processos de confecção: a verde, a seco. Tintas para macho. Processos especiais. Execução de machos. Equipamentos empregados: "core blower", "core shooter". Máquinas de moldar macho, mecanização. Aula N.º 12. In: SIEGEL, M. (coord), **Fundição**, 10ª edição. Associação Brasileira de Metais - ABM, São Paulo, 1978.
- 47 MURO, M.A., LUCHI, M.R. Preservação de microrganismos. Campinas, 1989, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia. 65p.
- 48 NUVOLARI, A. **Aplicação de Lodos de Esgotos Municipais no Solo**. 1996. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.
- 49 PAGGA, U. Testing biodegradability with standardized methods. **Chemosphere**. Great Britain. V. 32, n. 12, p. 2953 – 2972, 1997.
- 50 PELCZAR, M; REID, R., CHAN, E. C. S. **Microbiologia**, McGraw-Hill do Brasil, 1981.
- 51 PELCZAR, M; REID, R., CHAN, E. C. S. **Microbiologia**, McGraw-Hill do Brasil, 1996.
- 52 PENTEADO, P. CETESB conclui inventário e prepara plano de ação. **Saneamento Ambiental**. São Paulo. n. 46, p.30-34, jul./ago. 1997.
- 53 ROCCA, A F.C, IACOVONE, AM.M.B., BAROTTI, A. J., et al. **Resíduos Sólidos Industriais**. 2ª Edição. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1993. 233Pp.
- 54 SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE (São Paulo). **Resíduos Sólidos. Agenda 21, Projetos de Lei Federal e Estadual**. 1998.
- 55 SHELYUG, M.Y., LAKIZA, P.I., KALINICHENKO, G.S. et.al.. The effect of phenols released into the air on the sanitary state of the soil. In: 28th scien, session of Dneprop. Med. Inst. 1965, Dnepropetrovsk. **Proceedings...**, Dnepropetrovsk, 1965. Vol. I, p. 184-187.
- 56 SIEGEL, M. Métodos de dar forma aos metais. A fundição: suas peculiaridades e vantagens, histórico de seu desenvolvimento e importância. Aula N.º 02. In:

Fundição, SIEGEL coord., 10ª edição. Associação Brasileira de Metais - ABM, São Paulo, 1978.

- 57 SILVA, E.L.; CAMPOS, J.R. Biodegradação de fenol por células de *Pseudomonas putida* imobilizadas em reator de leito fluidificado trifásico. In I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, Instituto de Química, 1997. 276 p. p.30 - 35.
- 58 SIQUEIRA, J. O., FRANCO, A. A. **Biotecnologia do Solo, Fundamentos e Perspectivas**. Brasília, D.F: MEC, ISAL, FAEP, ABEAS, 1988. 235p.
- 59 SIVIERO, A.R. **Influência da Aplicação no Solo do Resíduo Líquido da Indústria Cítrica sobre Fungos e Bactérias e Avaliação da sua Toxicidade sobre *Daphnia similis***.1995. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rio Claro.
- 60 SIVIERO, A.R. **Avaliação da Biodegradação em Solo de Resíduos Sólidos de Fundição - Areia Fenólica - Utilizando o Método Respirométrico**. 1999. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rio Claro.
- 61 SOUZA, A M.G.F. **Estudo da Possibilidade de Utilização de Areia Fenólica de Fundição na Cobertura de Valas de Aterro Sanitário, através da Avaliação por Método Respirométrico de Diferentes Misturas Solo-Resíduo**. 2000. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rio Claro.
- 62 TEIXEIRA, C.E. **Ensaíos de Tratabilidade de Resíduo Sólido Industrial - Areia Fenólica: Isolamento, Identificação e Seleção de Fungos Filamentosos**. 1993. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 63 TORRE, J. **Manual Prático de Fundição e Elementos de Prevenção da Corrosão**. São Paulo: Hemus livraria editora limitada, 1978. 248p.
- 64 VARGA, J.M.; NEUJHR, H.Y. Isolation from soil of phenol-utiling organisms and metabolic studies on the pathway of phenol degradation. **Plant and Soil**, The Hague, v.33, p. 565-571, 1970.
- 65 VIEIRA, D.B. **Engenharia de Irrigação**. Limeira: Faculdade de Engenharia Civil de Limeira, UNICAMP, 1983.

- 66 WANG, S. J., LOH, K.C. Modeling the role of metabolic intermediate in kinetic of phenol biodegradation. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 25, n. 3-5, p. 177-184, august 1999.
- 67 WILSON, D.J., CLARKE, A N. **Hazardous waste site soil remediation theory an aplication of innovative technologies**. [S.l.: s.n.], 1994.

ABSTRACT

The residue molding sand generated in the foundry industry presents in its composition, among other constituent phenolic resin. This residue represents about in weight 2%, of the total of sand base used for making matrix elements, and they are not recovered in the process of foundry of the company in study. In function of 164 mg/Kg phenol concentration in the gross mass. This residue was classified in agreement with as Brazilian Legislation, as Class I - dangerous. The work had as objectives the isolation of the soil microorganisms and selection of the most efficient in the phenol degradation for study of biodegradation of the compounds incorporated in the residue. Then, three microorganisms groups were isolated in mixture soil/sand such as bacteria, fungi and actinomycetes. These microorganisms were selected as the production of phenoloxidases through of the Bavendamm Reaction and of the 1200 phenol mg/L concentration, in the MIC. The degradation efficiency of this microorganisms was evaluated through Bartha respirometric method. The microorganisms was introduced in the respirometers, through inoculum of each group and mixed cultures, incubated 28 °C by 90 days. At the end of the period, in all tested inoculum, the phenol removal in the gross mass of the residue more than 95%, while the best acting observed for the inoculum of mixed culture, with and without addition of nutrients, with removal of 99%. The phenol residual concentrations in the gross mass were 1,7 and 1,6 mg/Kg respectively, values lower than 10 mg/Kg, that characterizes the residue as dangerous. It was verified that phenol concentration in the gross mass was below the value of 10 mg/Kg according to pertinent legislation with the mixed culture in just 37 days approximately. The residue treatment through biological process came as an alternative in the minimization of its aggression potential to the environment.

KEYWORDS: biodegradation, phenol, respirometry, soil microorganisms, foundry sand.