

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS PARA APLICAÇÃO
NO TRATAMENTO DE EFLUENTES FENÓLICOS**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química

Orientador: Ernesto Raizer Neto

Sergio Mauro Cordova da Rosa

Florianópolis, Julho de 1995

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS PARA APLICAÇÃO
NO TRATAMENTO DE EFLUENTES FENÓLICOS**

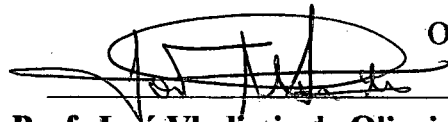
por

Sergio Mauro Cordova da Rosa

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química
especialidade **Engenharia Química**
área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**
e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação.

Prof. Ernesto Raizer Neto, Dr.

Orientador



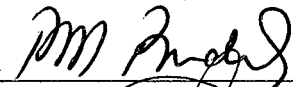
Prof. José Vladimir de Oliveira, D.Sc.

Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

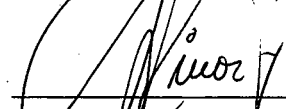
Banca Examinadora:



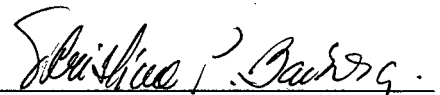
Ernesto Raizer Neto, Dr. (Presidente)



Pedro Mauricio Büchler, Dr.



Jorge Luiz Ninow, Dr.



Tereza Cristina Pereira Barbosa, Dra.

Florianópolis, 4 de Julho de 1995

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ernesto Raizer Neto pela orientação.

Aos alunos Kleber e Cyntia pelo auxílio prestado na realização dos experimentos.

Aos professores Tereza e Nelson e pesquisadoras Mara e Adriana do Departamento de Biologia e Bioquímica pela colaboração na área de microbiologia

Ao professor Agenor pelo apoio na realização deste trabalho

Aos colegas do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos que de uma maneira ou outra colaboraram na realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Fundação Banco do Brasil pelo suporte financeiro na aquisição de equipamentos e reagentes necessários à realização deste trabalho.

Aos dirigentes e funcionários da empresa Eliane pelo atendimento as nossas solicitações que contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

**À
minha grande família e à
Diene Criz**

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.	3
2.1 Introdução.	3
2.2 Classificação dos principais tipos de microorganismos.	3
2.2.2 Fontes de carbono e energia.	4
2.2.3 Nutrientes essenciais.	5
2.2.4 Metabolismo e a necessidade de oxigênio.	5
2.2.5 Fatores ambientais que afetam o crescimento.	6
2.3 Crescimento microbiano em cultura pura.	6
2.4 Crescimento microbiano em cultura mista.	9
2.5 Cinética de crescimento microbiano.	10
2.5.1 Crescimento celular.	10
2.5.2 Consumo de substrato.	11
2.5.3 Rendimento celular.	11
2.5.4 Modelos de crescimento.	12
2.5.5 Modelagem do crescimento celular em cultura mista.	14
2.6 Uso de microorganismos no tratamento de efluentes.	15
2.7 Estudo da degradação biológica de fenóis.	18
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.	21
3.1 Métodos Analíticos.	21
3.1.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO).	21
3.1.2 Análise de Fenóis.	21
3.1.3 Crescimento dos Microorganismos.	22
3.2 MEIOS DE CULTURA.	22
3.2.1 Meio de Nutrientes.	22
3.2.2 Meio de Sais.	23
3.3 Ensaio com Microorganismos Isolados a Partir de Águas Contaminadas com Fenol.	23
3.3.1 Ensaio com efluente bruto.	24
3.3.2 Ensaio com fenol como única fonte de carbono.	25
3.4 Ensaio com Microorganismos de Cultura Mista.	28

3.4.1 Ensaio utilizando culturas microbianas mistas em sistema de regime contínuo.	29
3.4.2 Ensaio utilizando culturas microbianas mistas em sistema de regime descontínuo.	33
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.	36
4.1 Ensaio com Microorganismos Isolados.	36
4.1.1 Ensaio com Efluente Bruto.	36
4.1.2 Ensaio com Fenol com Única Fonte de Carbono.	41
4.2 Ensaio Utilizando Microorganismos de Cultura Mista.	45
4.2.1 Ensaio em Sistemas de Regime contínuo.	45
4.2.2 Ensaio com culturas microbianas mistas em sistemas de regime descontínuo.	53
5.0 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.	58
ABSTRACT.	60
BIBLIOGRAFIA.	61
APÊNDICE.	65

LISTA DE TABELAS

1	Resumo dos experimentos envolvendo microorganismos de cultura pura.	27
2	Resumo dos experimentos realizados em sistemas de regime contínuo empregando microorganismos de cultura mista	33
3	Resumo dos experimentos realizados em sistema de regime descontínuo empregando microorganismos de cultura mista.	35
4	Dados de caracterização de três estados estacionários obtidos com controle de pH, com a cultura mista MC.	51

LISTA DE FIGURAS

1	Modelo de curva do crescimento microbiano.	7
2	Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade específica de crescimento.	13
3	Esboço do reator de mistura contínuo com aeração.	29
4	Esboço do reator de mistura contínuo com aeração e reciclo de biomassa.	30
5	Dados de concentração de fenol na alimentação e tempo de retenção hidráulico (TRH) do reator contínuo com reciclo.	31
6	Dados de concentração de fenol na alimentação e tempo de retenção hidráulico (TRH) do reator contínuo sem reciclo.	32
7	Evolução da DQO para concentração inicial de 12600 mg/l.	36
8	Evolução do crescimento da biomassa.	37
9	Evolução da DQO para uma concentração inicial de 8000 mg/l.	37
10	Evolução do crescimento da biomassa.	38
11	Evolução da DQO para uma concentração inicial de 6000 mg/l.	39
12	Evolução do crescimento da biomassa.	39
13	Evolução de fenóis para uma concentração inicial de 420 mg/l.	40
14	Evolução da DQO durante a biodegradação do fenol.	41
15	Evolução do crescimento da biomassa.	42
16	Evolução da concentração de fenol.	42
17	Evolução da concentração do fenol empregando microorganismos de cultura pura.	43

18	Evolução da concentração do fenol com a cultura mista MC.	44
19	Evolução das concentrações do fenol e biomassa em um sistema contínuo. ...	45
20a	Evolução das concentrações do fenol e biomassa em um sistema contínuo. ...	47
20b	Dados da carga de fenol aplicada ao reator e de fator de carga.	47
21a	Efeito do aumento da concentração do fenol na entrada do reator.	50
21b	Dados da carga de fenol aplicada ao reator e de fator de carga.	50
22	Evolução da DQO e concentração do fenol no reator descontínuo.	54
23	Evolução da concentração do fenol no reator descontínuo.	55
24	Evolução da concentração do fenol no reator descontínuo.	56
25	Evolução da concentração do fenol no reator descontínuo.	57

RESUMO

Este trabalho ocupa-se do estudo da degradação do fenol utilizando microorganismos selecionados, resultantes do isolamento direto de águas contaminadas com compostos fenólicos ou do enriquecimento seletivo de culturas mistas num reator em regime contínuo. Testa-se microorganismos isolados, selecionados devido sua habilidade de degradar fenol na presença de TSB (*tryptic soy broth*), quanto a degradação do fenol contido no efluente bruto e em um meio sintético contendo fenol como única fonte de carbono e energia. Utilizando um reator em regime contínuo faz-se o enriquecimento seletivo, alimentando somente fenol como fonte de carbono e energia, obtendo-se culturas mistas com microorganismos hábeis na degradação do fenol. Realiza-se ensaios para obtenção de parâmetros cinéticos, avaliação de condições de operação e comportamento destas culturas microbianas. Experimentos em regime descontínuo são realizados para se avaliar etapas do enriquecimento seletivo do sistema em contínuo e a influência do pH na degradação do fenol. De acordo com os resultados obtidos nos ensaios com a cultura mista resultante, esta apresenta um grande potencial de aplicação em processos de biorremediação de solo contaminado com fenol e no tratamento de efluentes fenólicos com vantagens sobre os sistemas convencionais, como o aumento da capacidade das estações de tratamento de efluentes e a redução no volume de lodo gerado.

1.0 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a qualidade de vida que vem sendo afetada pela poluição ambiental, vem fazendo com que entidades governamentais adotem medidas de controle da poluição, como é o caso da ISO 14000. Uma das preocupações essenciais ligada ao meio ambiente está relacionada com as substâncias químicas recalcitrantes que se acumulam no seio de biótipos ou comunidades de seres vivos aquáticos e terrestres e são responsáveis por efeitos tóxicos ao homem, à flora e à fauna.

Os compostos fenólicos são um dos principais grupos de substâncias tóxicas e de difícil degradação presentes em efluentes de vários processos industriais. Entre os processos que geram efluentes fenólicos podem ser citados: a coqueificação do carvão, onde os fenóis são os principais contaminantes podendo se encontrar até algumas gramas por litro; caso semelhante são as de plantas de gaseificação de carvão mineral ou vegetal; nos processos de branqueamento da celulose onde encontram-se clorofenóis; indústrias químicas que processam resinas fenólicas; e indústrias de fabricação de insumos agrícolas.

Atualmente no Brasil, a maioria dos problemas de contaminação ambiental por compostos tóxicos estão sem solução havendo a necessidade de desenvolvimento ou adequação de novas tecnologias. Como exemplo dos avanços da biotecnologia nesta área, é interessante citar que já se encontram no mercado norte americano, culturas mistas que metabolizam DDT, PCBs e fenóis, ou que possuem alta atividade de protease, lipase ou celulase.

O fenol tem sido utilizado em inúmeros estudos da área de biotecnologia ambiental. Neste trabalho, com o objetivo de estudar a degradação de compostos aromáticos, utiliza-se o fenol como composto modelo, onde se pretende ter conhecimento sobre o comportamento dos microorganismos na degradação do fenol frente às condições empregadas e comparar com a degradação de outros substratos. Com este estudo pretende-se também, avançar no domínio de técnicas de obtenção de microorganismos para o tratamento de efluentes e nas soluções de problemas de contaminação ambiental por resíduos tóxicos.

Neste trabalho, cepas bacterianas isoladas a partir de águas residuárias de minas de carvão e de uma estação de tratamento de efluentes, selecionadas após terem apresentado melhores resultados na degradação do fenol na presença de TSB (*tryptic soy broth*), foram testadas no efluente bruto e em um meio contendo fenol como única fonte de carbono.

Utilizando um reator contínuo faz-se o enriquecimento seletivo a partir de uma amostra de lodo coletada numa estação industrial usando o sistema de lodo ativado, fornecendo somente fenol como fonte de carbono e energia, obtendo-se culturas mistas com microorganismos hábeis na sua degradação. Realiza-se ensaios para obtenção de parâmetros cinéticos, avaliação de condições de operação e comportamento destas culturas microbianas. Experimentos em regime descontínuo são realizados para se avaliar etapas do enriquecimento seletivo do sistema em contínuo e a influência do pH na degradação do fenol.

2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Introdução

O objetivo do tratamento biológico de efluentes, é a degradação, oxidação dos vários substratos constituintes, até a mineralização completa da matéria orgânica. Este processo é realizado biologicamente através de uma variedade de microorganismos, sendo que, o grupo das bactérias é o mais comumente utilizado. Outros grupos de microorganismos também são importantes, tais como os fungos, as algas e os protozoários. A matéria orgânica do efluente é utilizada pelos microorganismos em uma série de reações enzimáticas. As enzimas, agem como catalisadores formando complexos com o substrato orgânico que é convertido em um produto específico. Dois tipos de enzimas são produzidas: *enzimas extracelulares*, as quais convertem substratos extracelulares em compostos mais simples permitindo seu transporte para o interior da célula para posteriores reações com as *enzimas intracelulares*, as quais, estão diretamente envolvidas na síntese de material celular e reações de liberação de energia.

Para que os microorganismos se reproduzam e desempenhem suas funções, o meio deverá conter substâncias disponíveis para a síntese de material celular e energia. Os microorganismos têm necessidades muito diferentes quanto à composição do meio nutriente, bem como para outras condições ambientais.

2.2 Classificação dos microorganismos

A seguir apresentam-se algumas características dos microorganismos, componentes do reino dos protistas.

As bactérias, segundo a classificação proposta inicialmente por *Haeckel*, são organismos protistas procarióticos, caracterizados pelo pequeno tamanho (0,5 a 2 μm de espessura por 1 a 8 μm de comprimento), sendo em geral, unicelulares. Seu modo de reprodução mais comum é por fissão binária. De acordo com a espécie, as células individuais são esféricas, em bastão ou espiraladas. Certas espécies de células bacterianas se dispõem em grupamentos, os mais comuns dos quais são os pares, em grumos, em cadeias e filamentos.

Os fungos são organismos protistas eucarióticos, geralmente multicelulares. Exercem papel similar ao das bactérias na economia da natureza, são tipicamente consumidores de matéria orgânica. A reprodução sexuada é comum neste grupo, entretanto, todos os fungos têm algum modo de reprodução assexuada. Os fungos são subdivididos em dois grupos:

- os chamados *fungos verdadeiros ou mofos*, os quais produzem unidades microscópicas chamadas hifas, que coletivamente formam uma massa filamentosa denominada micélio;

- e as *leveduras*, que se diferenciam dos fungos verdadeiros por se apresentarem predominantemente sob a forma unicelular. Sua reprodução vegetativa se faz, geralmente, por gemulação (brotamento). Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os mofos. Também são mais eficientes, numa base ponderal, na realização de alterações químicas, por causa de sua maior relação área/volume. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas.

Os protozoários são organismos protistas eucarióticos, móveis, que ocorrem como células isoladas ou na forma de colônias de células. Em geral são de maior porte que as bactérias, e frequentemente se nutrem delas, o que os torna particularmente úteis para a manutenção do equilíbrio biológico nas unidades de tratamento de efluentes, consumindo bactérias e matéria orgânica particulada.

As algas tratam-se de organismos protistas eucarióticos. Se encontram nas formas unicelular e multicelular. A capacidade de realizar fotossíntese é a característica fisiológica fundamental das algas. São importantes para os processos biológicos de tratamento de efluentes devido a sua habilidade de produzir oxigênio por fotossíntese.

2.2.1 Fontes de carbono e energia

Quanto a nutrição os microorganismos podem ser divididos em:

- *autotróficos*, os que obtém energia via fotossíntese ou por oxidação de compostos inorgânicos e podem usar dióxido de carbono como principal fonte de carbono. As algas se caracterizam por realizarem este tipo de nutrição.

- *heterotróficos*, os que obtém o carbono celular predominantemente de compostos orgânicos. Estes compostos orgânicos, são parcialmente assimilados no material celular e parcialmente oxidados para o fornecimento de energia. As bactérias, os fungos e os protozoários se enquadram predominantemente nesta categoria.

2.2.2 Nutrientes essenciais

Além de fontes de energia e carbono, os microorganismos necessitam de nutrientes inorgânicos para a síntese do material celular e crescimento. Os nutrientes inorgânicos principais, são N, S, P, K, Mg, Ca, Fe, Na e Cl. Outros nutrientes, também chamados de micronutrientes, incluem Zn, Mn, Mo, Se, Co, Cu, Ni, V e W.

Em adição aos nutrientes inorgânicos, citados acima, alguns nutrientes orgânicos também podem ser necessários para alguns microorganismos. Esses nutrientes, também conhecidos como *fatores de crescimento* (SCHLEGEL, 1968), são compostos constituintes do material celular orgânico que não podem ser sintetizados de outras fontes de carbono. Embora as exigências com relação aos fatores de crescimento sejam diferentes para cada tipo de microorganismo, em geral pode-se agrupá-los em três categorias: Aminoácidos, purinas e pirimidinas e vitaminas.

2.2.3 Necessidade de oxigênio

Todos os microorganismos necessitam de oxigênio, fornecido em forma combinada, por exemplo da água, dióxido de carbono e de substâncias orgânicas. No entanto, muitos organismos são também dependentes do oxigênio molecular (O_2). A principal função do O_2 é atuar como um receptor terminal de elétrons na respiração aeróbia.

De acordo com a necessidade ou tolerância ao oxigênio, podem ser distinguidos pelo menos três grupos de microorganismos:

- os *aeróbios obrigatórios*, que somente podem obter energia via respiração aeróbia e são dependentes do oxigênio molecular;

- os *anaeróbios obrigatórios*, somente podem crescer na ausência de oxigênio. Para este grupo o oxigênio é tóxico;

- *aneróbios facultativos*, que podem crescer na presença ou na ausência de oxigênio.

Os compostos inorgânicos oxidados, tais como nitritos e nitratos, podem atuar como aceptores de elétrons na ausência de oxigênio molecular. Processos que fazem uso destes microorganismos são chamados de *anoxicos*.

2.2.4 Fatores físico-químicos que afetam o crescimento

Certas condições ambientais podem tornar mais lenta, inibir, ou ao contrário, favorecer a nutrição, o crescimento ou a multiplicação dos microorganismos. Destes fatores, os de maior importância são a temperatura, pH, concentração de oxigênio e pressão osmótica.

Em geral o crescimento ótimo ocorre dentro de uma faixa estreita de temperatura. Temperaturas abaixo da ótima, têm efeitos muito mais significativos do que temperaturas acima desta. De acordo com a faixa ótima de desenvolvimento, os microorganismos podem ser classificados em:

- *mesófilos*, que se desenvolvem em temperaturas médias entre 20 °C e 40 °C;
- *termofílicos*, que se desenvolvem em temperaturas entre 45 °C e 60 °C;
- e *psicrófilos*, que se desenvolvem bem, em temperaturas abaixo de 20 °C.

Os íons H^+ e OH^- são os íons de maior mobilidade e pequenas alterações em suas concentrações causam efeitos significativos ao crescimento microbiano. A obtenção de um pH inicial ótimo e a manutenção deste durante o crescimento de uma cultura é de grande importância. A maioria dos organismos crescem melhor quando os íons H^+ e OH^- estão presentes em concentrações aproximadamente iguais (pH=7). Todavia, muitas bactérias preferem valores de pH mais altos e poucas são ácido tolerantes. Já os fungos preferem faixas de pH mais baixos.

A concentração de oxigênio é fator determinante para o crescimento microbiano de acordo com a tolerância ou a necessidade, conforme exposto no item 2.2.3.

2.3 Crescimento microbiano em cultura pura

O controle efetivo das condições ambientais no tratamento de efluentes é baseado no entendimento dos princípios básicos que governam o crescimento dos microorganismos. O modelo geral de crescimento microbiano de uma cultura num sistema fechado, registrando-se a concentração de microorganismos em função do tempo, é mostrado na Figura 1.

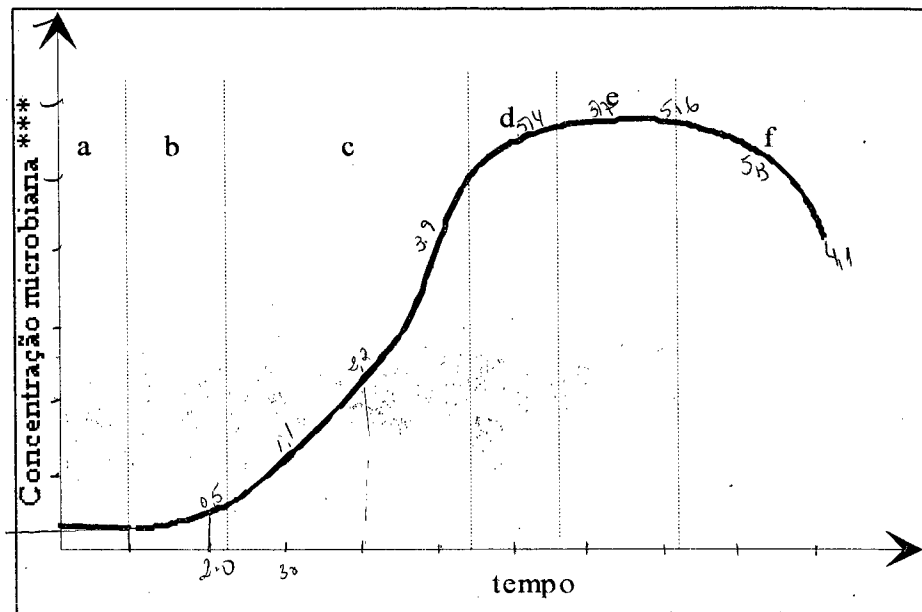


Figura 1 - Modelo de curva do crescimento microbiano

Quando é fornecido substrato e nutrientes em excesso à uma certa quantidade de inóculo de células microbianas, em condições ambientais ideais, pode ocorrer crescimento irrestrito. *Monod* (GRAY, 1989) plotou uma curva de crescimento microbiano mostrada na Figura 1, da qual, foram definidas seis fases discretas de desenvolvimento.

a) *Fase Lag*: representa a aclimação das células microbianas ao substrato, tendo a velocidade de crescimento próximo de zero. Os nutrientes são transferidos para o interior das células e, então, o tamanho e a massa das células aumentam, enquanto a quantidade de enzimas e de ácidos nucleicos também aumentam. No entanto, dependendo do grau de adaptação do inóculo às condições ambientais, a fase lag pode ser muito pequena ou até não existir. As células somente começam a se dividir quando alcançam uma concentração de enzimas apropriada. Uma vez iniciada a divisão celular, a densidade da população microbiana aumenta rapidamente.

b) *Fase de aceleração*: o tempo de geração diminui e há um aumento na velocidade de crescimento, levando à fase exponencial ou fase log.

c) *Fase de crescimento exponencial*: Nesta fase, o tempo de geração é mínimo, porém constante, com velocidade de crescimento específico máxima e constante, resultando num aumento rápido no número e massa dos microorganismos. Este é o período em que a conversão de substrato está na sua máxima velocidade. As condições de estado estacionário são indicadas pelas razões de DNA/célula, RNA/célula e

proteína/célula quase constantes. As células se mantêm com densidade constante e tamanho mínimo. A velocidade de metabolismo, em particular a velocidade de crescimento, é limitada somente pela geração microbiana e pela sua habilidade de processar o substrato. A fase exponencial continua até o substrato se tornar limitante.

d) *Fase de declínio*: A velocidade específica de crescimento microbiano diminui, conforme a redução da concentração de substrato. No caso do sistema descontínuo, ocorre o acúmulo de metabólitos tóxicos, ou alterações nas concentrações de nutrientes, ou nas condições ambientais, tais como a concentração de oxigênio ou pH, que também podem ser responsáveis pelo declínio da velocidade de crescimento.

e) *Fase estacionária*: Nesta fase a taxa de reprodução é aparentemente balanceada pela taxa de morte. O substrato e os nutrientes necessários ao crescimento são consumidos e há uma alta concentração de metabólitos tóxicos. Tem sido sugerido que a maioria das células permanecem viáveis durante esta fase, mas num estado de "animação suspensa" (GRAY, 1989), sem o substrato ou sem as condições ambientais necessárias para continuar a se reproduzir.

f) *Fase endógena ou de morte*: A densidade microbiana rapidamente diminui, com uma alta taxa de morte dos microorganismos, resultando num declínio do metabolismo e conseqüentemente da remoção do substrato. A massa total do protoplasma microbiano diminui, enquanto as células utilizam seu próprio protoplasma como fonte de energia. Este fenômeno é denominado de respiração endógena. Quando as células morrem e se rompem, liberam os constituintes internos da célula havendo então uma diminuição contínua da concentração dos microorganismos

A curva de crescimento microbiano não é uma propriedade básica das células microbianas, mas é uma resposta às condições ambientais dentro de um sistema fechado. Assim, esta curva não é aplicada diretamente em sistema contínuo, mas é possível manter tais sistemas em uma fase de crescimento em particular, através do controle da razão entre substrato e biomassa microbiana.

2.4 Crescimento microbiano em cultura mista

A maioria dos processos de tratamento biológico de efluentes consiste de populações biológicas mistas, complexas e inter-relacionadas, com cada microorganismo em particular, tendo sua própria curva de crescimento. A posição e o formato da curva de crescimento em um sistema em particular, na escala de tempo, depende da disponibilidade do substrato e nutrientes e, de fatores ambientais, tais como, temperatura, pH e se o sistema é aeróbio ou anaeróbio (GRAY, 1989)

Quando se analisa ou projeta um processo biológico de tratamento de efluentes, o projetista deverá pensar em termos de um ecossistema ou comunidade, e não em termos de uma "caixa preta" que contém misteriosos microorganismos.

Atualmente, com os avanços da biotecnologia, tem crescido o emprego de microorganismos selecionados para aumentar a eficiência dos processos convencionais e no desenvolvimento de novos processos, principalmente no caso de produtos de difícil degradação biológica.

Numa cultura mista pode ser observado interações entre as diferentes espécies microbianas, tais como *mutualismo*, *competição*, *comensalismo* e *amensalismo* (SCHLEGEL, 1968):

- *mutualismo*, ocorre quando as espécies crescem mais rapidamente juntas, do que quando isoladas;
- *competição*, ocorre quando cada espécie exerce uma influência negativa na velocidade de crescimento da outra espécie;
- *comensalismo*, quando uma espécie se beneficia com os metabólitos da outra. Ou seja, compostos produzidos por uma espécie aceleram o crescimento de outra;
- *amensalismo*, quando ocorre o inverso do *comensalismo*; isto é, o crescimento de uma espécie é inibido pela presença de uma outra. Os efeitos prejudiciais da espécie ofensiva usualmente são devido a síntese de produtos tóxicos ou remoção de nutrientes essenciais.

2.5 Cinética de crescimento microbiano

2.5.1 Crescimento celular

O crescimento microbiano pode ser definido matematicamente pela seguinte relação:

$$R_x = \mu \cdot X \quad (1)$$

onde: R_x = velocidade de crescimento, massa/volume x tempo

μ = velocidade específica de crescimento, tempo⁻¹

X = concentração de microorganismos, massa/volume

A equação (1) demonstra que a velocidade de crescimento é proporcional a concentração de microorganismos presentes na cultura.

Para um sistema descontínuo a volume constante $\frac{dX}{dt} = R_x$, e partindo da equação (1) tem-se as seguintes expressões:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2) \quad \text{ou} \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

Fazendo-se um balanço da massa num reator contínuo perfeitamente agitado (CSTR) e considerando-se que não há microorganismos na alimentação, resulta-se na seguinte equação:

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = V \cdot R_x - Q \cdot X \quad (4)$$

em regime permanente $\frac{d(V \cdot X)}{dt} = 0$, então:

$$R_x = \frac{Q}{V} X \quad (5)$$

Definindo-se a velocidade de diluição como $D = \frac{Q}{V}$ e substituindo na equação (5), resulta na seguinte equação: $R_x = D \cdot X$ (6)

$$\text{Logo: } \mu = D \quad (7)$$

2.5.2 Consumo de substrato

Num reator descontínuo, a velocidade de consumo do substrato é definida como a variação da concentração do substrato(S) no intervalo de tempo correspondente, que pode ser representada pela seguinte expressão:

$$R_s = -\frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} \quad (8) \quad \text{ou} \quad R_s = -\frac{dS}{dt} \quad (9)$$

onde: R_s =velocidade de consumo de substrato, massa/volume x tempo
 S =concentração de substrato, massa/volume

Em um sistema contínuo, fazendo-se um balanço de massa para o substrato, considerando reator perfeitamente agitado tem-se:

$$\frac{d(V.S)}{dt} = -V.R_s + Q.S_0 - Q.S \quad (10)$$

em regime permanente $\frac{d(V.S)}{dt} = 0$, então $R_s = \frac{Q}{V}(S_0 - S) \quad (11)$

ou $R_s = D.(S_0 - S) \quad (12)$

ou ainda, substituindo a equação (7), tem-se:

$$R_s = \mu.(S_0 - S) \quad (13)$$

2.5.3. Rendimento celular.

O fator de conversão ($Y_{x/s}$), representa a massa de microorganismos produzida por unidade de massa de substrato consumida.

Para o sistema descontínuo, este fator pode ser representado matematicamente por:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (14) \quad \text{ou} \quad Y_{x/s} = \frac{dX}{dS} \quad (15)$$

Conhecendo-se o fator de conversão pode se representar a taxa de consumo de substrato em função da taxa de crescimento,

$$\text{fazendo: } \frac{R_x}{R_s} = -\frac{dX}{dS} = Y_{x/s} \quad (16) \quad \text{ou}$$

$$R_s = -\frac{1}{Y_{x/s}} R_x = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \quad (17)$$

No caso do sistema em regime contínuo, substituindo as expressões da velocidade de crescimento (1) e de consumo do substrato (13), resulta na seguinte expressão para o fator de conversão:

$$Y_{x/s} = -\frac{R_x}{R_s} = \frac{D \cdot X}{D \cdot (S_0 - S)}, \quad \text{ou}$$

$$Y_{x/s} = X / (S_0 - S) \quad (18)$$

2.5.4 Modelos de crescimento microbiano

Existem basicamente dois tipos de modelo, os não estruturados, onde a célula é representada por uma única variável que é a concentração de células e os modelos estruturados onde as células são representadas por mais de uma variável, como a concentração de proteínas, RNA, DNA, etc. ou, dividem-se em compartimentos agrupados com determinadas funções como os compartimentos genético, de estoque de energia, etc.

Os modelos mais utilizados são os não estruturados. Neste tipo de modelo é assumido crescimento balanceado, isto é, a composição das células e as atividades metabólicas permanecem constantes durante o crescimento. Normalmente, esses modelos procuram representar a velocidade específica de crescimento (μ) através das variáveis que influenciam o crescimento celular, como a concentração de substrato ou nutriente limitante, pH, temperatura, etc. (FURIGO Jr., 1990)

Entre os modelos não estruturados, os mais simples são baseados no modelo proposto por MONOD (1949), onde a velocidade específica de crescimento é função de um único substrato ou nutriente limitante de crescimento:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (19)$$

onde: μ_m = velocidade específica de crescimento máximo, tempo⁻¹

S = concentração do substrato limitante, massa/volume

K_s = constante do modelo, massa/ volume

Este modelo só é válido para o estado estacionário ou na fase de crescimento exponencial de um processo descontínuo, onde os microorganismos estão em um pseudo estado estacionário

O efeito da concentração do substrato sobre a taxa específica de crescimento é mostrado na figura 2.

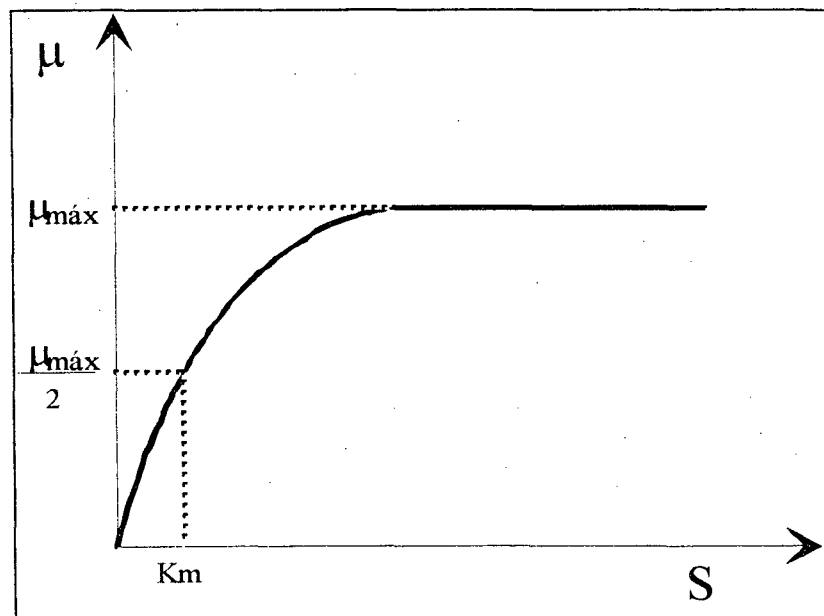


Figura 2 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade específica de crescimento

Assim, substituindo o modelo de (μ) na equação (1) a taxa de crescimento pode ser escrita na seguinte forma:

$$R_x = \mu_m \frac{S}{K_s + S} X \quad (20)$$

Existem modelos, baseados no modelo de *Monod* que levam em consideração a inibição do crescimento pelo substrato. Um destes, é o modelo de ANDREWS (1968) que considerou o efeito da inibição pelo substrato, expresso pela seguinte equação:

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S + S^2/K_i} \quad (21)$$

onde: K_i =constante de inibição, massa/volume

Outros modelos, também baseados no modelo de *Monod*, que descrevem a inibição por produtos metabólicos. Um destes modelos é descrito por AIBA & MAKOTS (1968):

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \times \frac{K_p}{K_p + P} \quad (22)$$

onde: K_p = constante de inibição do produto, massa/volume
 P = concentração do produto, massa/volume

Os modelos estruturados, devido à sua complexidade advinda de sua abordagem, ainda não apresentam aplicações práticas relevantes, restringindo-se até então em fase de trabalhos acadêmicos (FURIGO Jr., 1990).

2.5.5 Modelagem do crescimento celular em cultura mista

A complexidade envolvida nos processos de cultura microbiana mista dificulta a modelagem matemática, principalmente no caso de tratamento de efluentes onde existe uma diversidade de espécies, além de todos os problemas de hidrodinâmica destes sistemas.

Como exemplo de estudo de modelagem envolvendo cultura mista, pode ser citado o trabalho de BREUSEGEM & BASTIN (1990), onde os autores utilizaram uma cultura com duas espécies de microrganismos e relacionaram o crescimento com o perfil de temperatura e de pH. Em um outro trabalho, PAVLOV & KEVREKIDS (1990) fizeram uma modelagem para verificar a possibilidade de coexistência de duas espécies microbianas competitivas em um reator de mistura contínuo à concentração constante. No entanto estes exemplos tratam da modelagem em sistemas com condições controladas e isoladas das influências do meio ambiente, o que não é o caso do tratamento de efluentes.

As equações utilizadas em projetos e modelagem para o tratamento de efluentes consideram uma única variável para representar a comunidade microbiana envolvida no processo. Os compostos orgânicos que compõem os efluentes também são representados por uma única variável, como se tratasse de um único substrato.

O processo de lodo ativado, que é um dos sistemas de tratamento de efluentes mais utilizados, tem comportamento que se aproxima ao de um reator de mistura (CSTR). Assim, os estudos em escala de laboratório sobre o sistema de lodo ativado são realizados utilizando o modelo do reator de mistura. Este processo se baseia numa alta concentração de microrganismos em contato com o efluente sob agitação e aeração.

Outros processos de tratamento de efluentes que são bastante utilizados são as lagoas de estabilização e os sistemas de filtro biológico.

2.6 O uso de microrganismos no tratamento de efluentes

O processo de tratamento de efluentes convencional faz uso de microrganismos que se desenvolvem naturalmente no sistema. Pouca atenção tem sido dada no sentido de otimizar os organismos envolvidos. Uma técnica que tem se mostrado promissora para aumentar a eficiência dos processos de tratamento de efluentes, é a inoculação de microrganismos que tenham sido selecionados especialmente para um processo de tratamento de efluentes em particular.

Embora microrganismos selecionados possam encontrar aplicação no tratamento de efluente doméstico, como diminuir o tempo de partida de sistemas, o potencial de aplicação é muito maior no tratamento de rejeitos especiais, ou no vazamento acidental da indústria química. Tais despejos frequentemente não podem ser

canalizados para sistemas de tratamento comum, pois a toxicidade e a falta de biodegradabilidade comprometeriam a atuação dos organismos não adaptados.

Os problemas mais frequentes nos sistemas convencionais são:

- O "bulking", que ocorre nos sistemas de lodo ativado, que é o fenômeno onde os microorganismos filamentosos crescem dos flocos de lodo formando macro-estruturas, interferindo com a sedimentação do lodo, chegando até o comprometimento do desempenho do sistema. As causas deste fenômeno são atribuídas a falta de oxigenação, presença de metais pesados e compostos orgânicos tóxicos;

- O excesso de lodo produzido, atribuído a uma alta taxa de morte dos microorganismos como consequência da baixa resistência destes organismos frente à variações de concentração, pH, vazão, temperatura, etc;

- Camadas de gordura nos sistemas de lagoas, que se formam devido a baixa solubilidade das moléculas lipídicas poliméricas, que necessitam de microorganismos específicos que produzam enzimas extracelulares para a sua transformação em moléculas menores e assimiláveis;

- Compostos nitrogenados como nitrogênio amoniacal, nitritos e nitratos, que frequentemente são encontrados na saída dos sistemas de tratamento em concentrações ainda potencialmente poluidoras do meio ambiente. Neste caso, a falta de condições favoráveis ao crescimento dos microorganismos específicos responsáveis pelas diferentes etapas de degradação, faz com que estes compostos não sejam eliminados.

- Um grande número de substâncias constituintes do efluente industrial como *organoclorados, fenóis e polifenóis, cianetos e tiocianatos, pesticidas, hidrocarbonetos e metais pesados* são difíceis de serem degradados por via biológica. A velocidade de degradação é baixa quando comparada a efluentes tais como esgoto doméstico, efluentes de indústrias alimentícias, com sistemas operando em condições similares. A aplicação pura e simples de determinados conceitos estabelecidos na área de tratamento de efluentes industriais, é a principal razão do insucesso do sistema.

A presença de poluentes pertencentes aos grupos citados acima, mesmo à baixas concentrações, muitas vezes levam ao não funcionamento ou necessitam longos tempos de residência para seu tratamento.

Com os avanços da biotecnologia, empregando microorganismos selecionados, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de otimização de sistemas, principalmente no que se refere à redução do tempo de residência necessário, redução do tamanho das estações de tratamento, redução do consumo de oxigênio, redução da quantidade de lodo gerado e a eliminação de substâncias específicas.

De acordo com a literatura, a degradação biológica de compostos de difícil degradação, como fenóis, cianetos, tiocianatos, etc., é de provável responsabilidade dos organismos que sobrevivem nos efluentes contaminados com tais tipos de poluentes (RUBIN & ALEXANDER, 1993; BARTHOLOMEW & PFAENDER, 1983). Segundo BALDI et al (1991) o potencial de degradação dos poluentes é uma característica que se pode observar em espécies expostas a condições extremas de temperatura, acidez, concentração de poluentes, etc.

Este potencial vem sendo estudado em vários países. Alguns microorganismos são hoje utilizados na recuperação do meio ambiente ou bioremediação (KARGI, 1986; HERBES, 1981; GODDRD & BULL, 1989). Como exemplo dessa tecnologia, pode ser citado o processo desenvolvido com uma linhagem de *Pseudomonas putida*, contendo plasmídeo com codificação capaz de degradar octano, xileno, metil-xileno e camfor (KRUGUER, 1989).

Há um grande número de trabalhos publicados, envolvendo microorganismos selecionados para a biodegradação de compostos de difícil degradação biológica:

- SPAIN & NISHINO (1987), isolaram bactérias de uma espécie das *Pseudomonas*, a partir de amostras de esgoto doméstico e utilizaram na biodegradação de 1,4-Diclorobenzeno.

- BURBACK & PERRY (1993), em um estudo com a cepa *Mycobacterium vaccae*, constataram que estes microorganismos podem ser capazes de catabolizar uma variedade de contaminantes comuns de águas subterrâneas. Entre outros, foram testados acetona, ciclohexano, estireno, benzeno, etilbenzeno, propilbenzeno e tolueno. Somente acetona e tolueno se comportam como substratos de crescimento.

- HAVEL & REINEKE (1993), após enriquecimento seletivo dos microorganismos de uma combinação de amostras de solo, utilizaram uma cultura mista, composta por *Arthrobacter sp.* e *Micrococcus sp.* Esta cultura mista foi capaz de degradar totalmente acetofenonas cloradas, que são poluentes comuns que aparecem como subprodutos da biodegradação de PCBs (bifenis policlorados).

* - Um microorganismo que tem sido empregado em uma série de trabalhos envolvendo a degradação de poluentes ambientais de difícil degradação é o fungo

Phanerochaete chrysosporium que em certas condições produz a ligninase responsável pela degradação enzimática da lignina (VALLI & GOLD, 1991; HAMMEL, 1989; ALIC, 1987; BUMPUS, 1985; HUYNH, 1985)

2.7. Estudo da degradação biológica de fenóis

O fenol, polifenóis e seus derivados, são poluentes ambientais amplamente distribuídos, devido a presença destes compostos em efluentes de muitos processos industriais. Entre estes processos, tem-se refinaria de óleos, plantas petroquímicas, indústrias de conversão de carvão, indústrias de resinas fenólicas, e branqueamento de papel. Devido a sua toxicidade à maioria dos microorganismos, os compostos fenólicos frequentemente são responsáveis pelo mau funcionamento de estações de tratamento de efluentes, inibindo o crescimento microbiano. A preocupação de se encontrar soluções para os problemas existentes ou evitar a contaminação do meio ambiente, muitos estudos de biodegradação de compostos fenólicos têm sido desenvolvido.

Muitos trabalhos envolvendo a degradação de compostos fenólicos utilizam o lodo de sistemas de tratamento de efluentes como inóculo, cuja composição microbiana é desconhecida:

- BELTRAME et al (1984), em um estudo sobre a influência da concentração de alimentação sobre a cinética da biodegradação do fenol em um reator de mistura contínuo, teve como inóculo o lodo de uma mistura de amostras de sistemas de lodo ativado de tratamento de efluentes doméstico e industriais;

- BELTRAME et al (1988), empregando o lodo de um sistema de tratamento de efluentes, condicionado ao fenol como única fonte de carbono, estudou a degradação de fenol na presença de clorofenóis;

- KHOURY et al (1992), para o estudo da degradação anaeróbia do fenol sob condições denitrificantes, utilizou uma cultura mista que teve origem no lodo ativado de uma estação de esgoto doméstico;

- Dois outros trabalhos encontrados na literatura, que utilizam este tipo de inóculo são os de HOLLADAY (1978) e BELTRAME et al (1980).

Culturas mistas, compostas por microorganismos previamente isolados e testados, têm sido empregadas para estudos de degradação de derivados fenólicos e para investigar interações entre espécies microbianas diferentes:

- JONES & CARRINGTON (1971), a partir de três cepas isoladas, sendo duas delas degradadoras de fenol e uma de tiocianato, investigaram a influência de uma cepa sobre as outras e das concentrações dos substratos;

- YANG & HUMPHREY (1975), em um estudo sobre a degradação do fenol, utilizaram uma cultura mista formada por *Pseudomonas putida* e pela cepa de levedura *Trichosporum cutaneo*. Neste trabalho investigou-se a dinâmica e a estabilidade da degradação do fenol em um reator de mistura contínuo utilizando cultura microbiana mista.

Há um grande número de trabalhos envolvendo a degradação de compostos fenólicos com microorganismos isolados:

- KOROL et al (1991), com o objetivo de obter microorganismos potencialmente degradadores de fenol e derivados fenólicos em condições mais rigorosas como as encontradas em efluentes industriais, isolaram três cepas bacterianas degradadoras de *p*-clorofenóis. As cepas foram isoladas a partir de amostras coletadas de rios poluídos, após enriquecimento seletivo tendo fenol como única fonte de carbono;

- SPIKER et al (1992), estudaram a oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos com a cepa *Streptomyces viridosporus T7A*;

- HYNTEREGGER et al (1992), em um estudo sobre a degradação de fenol e derivados fenólicos utilizaram a cepa *Pseudomonas putida EKII*.

Alguns trabalhos utilizam o fenol para enriquecimento seletivo de microorganismos potencialmente degradadores de compostos aromáticos de estrutura semelhante, atuando como um indutor de enzimas:

- Em um estudo sobre uma comunidade microbiana aquática aclimatada em fenol para posterior verificação da biodegradação de fenóis monosubstituídos, SHIMP & PFAENDER (1987) verificaram que a cultura microbiana mista adaptada ao fenol como única fonte de carbono foi capaz de degradar compostos aromáticos estruturalmente relacionados como *m*-cresol, *m*-aminofenol e *p*-clorofenol.

- DAPAAH & HILL (1992), estudaram o comportamento do crescimento dinâmico de *Pseudomonas putida* com inoculações de em um meio contendo concentrações inibitórias de misturas de fenol e monoclorofenóis. A fase de crescimento logarítmica só foi observada quando os monoclorofenóis foram cometabolizados com fenol.

Encontram-se na literatura trabalhos envolvendo o estudo cinético da biodegradação de fenóis, entre os quais podem ser citados: SÁEZ & RITTMANN (1991) e HUTCHINSON & ROBINSON (1988).

Há alguns trabalhos utilizando compostos fenólicos para estudar a influência da estrutura do substrato, tipo de substituição no anel aromático, sobre a biodegradabilidade destes compostos; MENKE & REHM (1992), BELTRAME et al (1988) e BELTRAME et al (1989).

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram realizados vários experimentos para o estudo da degradação biológica de compostos fenólicos, empregando microorganismos de cultura pura e mista. Os microorganismos de cultura pura foram testados na degradação de fenóis contidos em efluente industrial e em soluções de fenol como composto modelo e única fonte de carbono.

A cultura microbiana mista, foi testada em solução de fenol, em um reator de regime contínuo. Utilizando-se como inóculo amostras do reator em contínuo, foram realizados alguns ensaios em regime descontínuo para estudar efeitos da concentração inicial de fenol e pH para avaliar alterações no comportamento das cepas predominantes no sistema contínuo.

3.1 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Durante os experimentos acompanhou-se a redução do teor de material orgânico. Para isso, coletava-se a amostra, diluía-se, filtrava-se em membrana de 0,45 microns (Millipore) para separação da biomassa e então, determinava-se a DQO através do método de refluxo do dicromato de potássio, conforme descrito na norma NBR 10357. Um digestor (Quimis modelo Q-325-27) foi utilizado para a digestão da amostra.

3.1.2 Análise de fenóis

Após a filtração da amostra (membrana de 0,45 microns) determinava-se a concentração pelo método da Amino-antipirina, conforme descrito na norma AFNOR T 90-109.

3.1.3 Crescimento dos Microorganismos

Densidade Ótica (D.O.): Para acompanhar o crescimento microbiano por densidade ótica foi utilizado um espectrofotômetro B280.(Micronal) a 540 nm. Em função das dificuldades na obtenção de quantidade de massa seca, suficiente para determinação de curvas absorvância/concentração, os dados apresentados são apenas de absorvância.

Determinação da Massa Seca: Para acompanhar a concentração microbiana através do método da massa seca, filtrava-se a amostra em membrana de 0,45 microns (Millipore) e mantinha-se por duas horas a 104 ± 1 °C, de acordo com a norma NBR 10664

3.2 MEIOS DE CULTURA

3.2.1 Meio de Nutrientes

Para garantir os nutrientes inorgânicos essenciais à síntese celular e ao crescimento, preparou-se uma solução estoque com a relação N-P-K de 10-4-1 (SCHÖBORN, 1986). Os compostos utilizados na formulação da solução estoque e suas respectivas concentrações estão listados a seguir:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15,76 g/l
$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	4,66 g/l
KH_2PO_4	1,36 g/l

Para se manter uma relação C-N de 100 - 10, utilizou-se 20 ml de solução por grama de fenol ou 25,56 ml de solução por grama de carbono.

3.2.2 Meio de Sais

Preparou-se um meio de sais, também utilizado para garantir as necessidades microbianas (RAIZER, 1991), cuja composição resultante é a seguinte:

NH ₄ Cl	0,1564 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1922 g/l
NaCl	0,1910 g/l
KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O	0,4158 g/l
KH ₂ PO ₄	0,7520 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2324 g/l
NaNO ₃	0,6054 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1594 g/l

3.3 ENSAIOS COM MICROORGANISMOS ISOLADOS A PARTIR DE ÁGUAS CONTAMINADAS COM FENOL

Uma das cepas utilizadas, denominada neste trabalho de cepa 304, foi identificada pelo sistema API 20 NE (Biomerieux), como *Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus* (BARBOSA, 1993).

As duas outras cepas utilizadas, denominadas de cepa 185 e 103, não foram identificadas.

As cepas foram isoladas seguindo o método de diluição em placas (Barbosa, 1993).

A preservação das cepas era feita em meio sólido contendo TSB 2,5 g/l, fenol 0,5 g/l e agar 15 g/l e mantidas em geladeira a 4 °C (BARBOSA, 1993).

Para a preparação do inóculo, as bactérias eram semeadas em um meio contendo água, TSB 2,5 g/l e fenol 0,5 g/l. A seguir, mantinha-se sob agitação até quase consumo total do fenol, com o objetivo de obter um inóculo com microorganismos em fase exponencial de crescimento. O período necessário para atingir o objetivo desejado era de 24 a 48 horas. Uma variação quanto ao tipo de inóculo utilizado consistia em acrescentar ao meio descrito acima, efluente esterelizado.

3.3.1 Ensaios com efluente bruto

O efluente bruto empregado nestes ensaios possuía a seguinte composição e concentração:

- Fenol	1000 - 3000 mg/l
- CN ⁻	30 - 100 mg/l
- SCN ⁻	100 - 800 mg/l
- Cresóis (<i>o, m, p</i>)	200 - 600 mg/l
- DQO	5000 - 20000 mg/l
- DBO	3500 - 15000 mg/l
- pH	9 - 11
- Amônia total	2000 - 4000 mg/l

EXPERIMENTO I.

Neste ensaio os microorganismos foram testados em efluentes da gaseificação do carvão de uma indústria cerâmica, contendo alto teor de fenóis (fenol, cresol, polifenóis, etc.).

Foram utilizados três Erlenmeyers de 500 ml com sistema para injeção de ar, equipado com difusores de ar e também providos de tampa asséptica. O ar inicialmente passava por um filtro com uma camada densa de algodão, para retenção de microorganismos e impurezas. A agitação do meio era promovida pela própria injeção de ar. Cada Erlenmeyer foi alimentado com 400 ml de solução de 35 % (v/v) de efluente bruto não esterelizado e 2,5 g/l de TSB. Num Erlenmeyer adicionou-se 20 ml de inóculo da cepa 103, em outro 20 ml de inóculo da cepa 185 e no terceiro, não foi inoculado microorganismo selecionado para acompanhar a redução da DQO pelos microorganismos presentes no próprio efluente.

EXPERIMENTO II.

Trata-se da continuação do experimento I, porém, com o meio de cultura diluído duas vezes afim de verificar a influência da concentração de fenol na eficiência da redução da DQO.

EXPERIMENTO III.

Neste teste, repetiu-se o experimento I, porém, com uma solução de efluente de apenas 12%(v/v).

3.3.2 Ensaio com fenol como única fonte de carbono

EXPERIMENTO IV.

Este experimento foi realizado para estudos dos microorganismos isolados tendo somente o fenol como fonte de carbono.

Utilizou-se dois Erlenmeyers de 500 ml equipados com sistema de injeção de ar, semelhante ao experimento I, agitador magnético e banho termostatizado, mantendo a temperatura a 25°C. Em cada Erlenmeyer alimentou-se 350 ml do meio em estudo, contendo 400 mg/l de fenol. Adicionou-se também 5 ml da solução de sais, descrita anteriormente. Num dos Erlenmeyers adicionou-se 20 ml de inóculo com a cepa 103 e no outro 20 ml de inóculo com a cepa 185.

Neste teste, acompanhou-se a DQO, concentração do fenol e a densidade ótica.

EXPERIMENTO V:

Neste ensaio, preparou-se dois litros de meio de cultura contendo 0,8 g de fenol, 16 ml de solução de nutrientes e 3 ml de meio de sais. Em cinco Erlenmeyers de 500 ml com 400 ml do meio descrito acima e inoculou-se em cada um destes, 20 ml de inóculo de uma das seguintes cepas: cepa 103 ; cepa 185; cepa 304; para efeitos de comparação um dos Erlenmeyers foi utilizado para o ensaio em branco; e no quinto foi adicionado 20 ml de inóculo, coletado do reator em regime contínuo (cultura mista). Os frascos eram equipados com tampa asséptica e mantidos sob agitação a 25°C em um Shaker (ÉTICA modelo 501). A injeção de ar era realizada de maneira semelhante aos experimentos anteriores.

As variáveis acompanhadas foram a concentração de fenol, densidade ótica e DQO. O pH foi medido no início e final do experimento.

EXPERIMENTO VI.

Neste ensaio, realizado sob condições de agitação, aeração e temperatura semelhantes ao anterior, a cepa microbiana 304 foi testada a diferentes concentrações de fenol.

Preparou-se 2 litros de meio de cultura contendo 1,0 g/l de fenol, 20 ml de meio de nutrientes, 4 ml de meio de sais. Fazendo-se as diluições necessárias adicionou-se 400ml de meio em cada Erlenmeyer com concentração de fenol de 1000 mg/l, 800 mg/l, 600 mg/l, 400 mg/l e 200 mg/l. Após esterilização adicionou-se 25 ml de inóculo em cada frasco.

Foi acompanhado a concentração de fenol, DQO, crescimento por densidade ótica e pH.

Um resumo dos experimentos empregando microorganismos isolados a partir de águas contaminadas com fenol é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1- Resumo dos experimentos envolvendo microorganismos de cultura pura

EXPERIMENTO	Cepa	Fonte de Carbono	Meio	Temp. (°C)	Vol. Inóc. (ml)	ABS.Inóc (dil. 1:10)	Duração (dias)
exp. I	185	efluente bruto 35%	TSB	amb.	20		11
	103	"	"	"	20		11
	branco	"	"	"	0		11
exp. II	185	efluente bruto 18%	TSB	amb.	0		20
	103	"	"	"	0		20
	branco	"	"	"	0		20
exp. III	185	efluente bruto 12%	TSB	amb.	20		11
	103	"	"	"	20		11
	branco	"	"	"	20		11
exp. IV	185	fenol 400 mg/l	meio de sais	25	20		13
	103		"	25	20		13
exp V	185	fenol 400 mg/l	meio de nutrientes	25	20	0,301	5
	103	"	"	25	20	0,155	5
	304	"	"	25	20	0,196	5
	cultura mista	"	"	25	20	0,230	5
	branco	"	"	25	20	0,0	5
exp. VI	304	fenol 200 mg/l	meio de nutrientes	25	20	0,106	3
	"	fenol 400 mg/l	"	25	20	"	3
	"	fenol 600 mg/l	"	25	20	"	3
	"	fenol 800 mg/l	"	25	20	"	3
	"	fenol 1000 mg/l	"	25	20	"	3

3.4 ENSAIOS COM MICROORGANISMOS DE CULTURA MISTA

A cultura mista foi obtida de uma amostra de lodo de uma estação industrial de tratamento de efluentes, onde os principais contaminantes são os resíduos fenólicos. A cultura (inóculo) foi aclimatada no laboratório utilizando um sistema de reatores em série, aerados através da injeção de ar garantindo a concentração de oxigênio dissolvido em excesso e a perfeita agitação do meio.

Do decantador, instalado na saída deste conjunto de reatores, através de um bomba peristáltica (Cole Parmer modelo 7550-62), promovia-se o retorno da biomassa, proporcionando concentrações adequadas ao bom funcionamento do sistema.

Foram realizadas análises de DQO e fenol, contidos na saída final da série de reatores, utilizando a metodologia descrita no ítem 3.1.

Após um mês de aclimação dos microorganismos, foram coletadas amostras de biomassa do decantador e filtradas em membrana de 0,45 microns (Millipore). O material retido foi lavado e dispersão em água de torneira. Esta suspensão, denominada de cultura mista MA foi empregada como inóculo dos experimentos no reator em regime contínuo.

Os experimentos em regime contínuo foram realizados com os objetivos de enriquecimento seletivo de microorganismos de interesse, adaptação de microorganismos selvagens a um meio artificial contendo somente fenol como fonte de carbono, caracterização das culturas predominantes e o estudo do comportamento destas culturas frente à variações hidrodinâmicas ou de composição do sistema em estudo.

Antes de iniciar os experimentos com a cultura mista, foi realizado um plaqueamento em meio gel TSA (tryptic soy agar) com fenol e foi observado a morfologia das colônias para acompanhar a evolução seletiva dos microorganismos mais adaptados.

A cultura mista do reator de regime contínuo foi testada num sistema de regime descontínuo, com o interesse de investigar os efeitos da concentração inicial do fenol sobre os microorganismos predominantes.

O inóculo empregado nos ensaios em regime descontínuo, é proveniente do próprio efluente do sistema em regime contínuo. Este procedimento, é aplicado, também com o objetivo de comprovar um método alternativo proposto por SÁEZ & RITTMANN (1991) para obtenção de inóculos com características semelhantes para a realização de experimentos em regime descontínuo com pouca interferência de efeitos iniciais.

3.4.1 Ensaio utilizando culturas microbianas mistas em sistema de regime contínuo

EXPERIMENTO VII.

Para a realização deste experimento em sistema de cultura em regime contínuo foi empregado um tanque em acrílico de 4.7 litros com injeção de ar, dotado de filtro e bomba peristáltica para a alimentação da solução de fenol. A agitação do meio era promovida pelo próprio ar, favorecida pelo formato do tanque, conforme pode ser observado na Figura 3. O reator foi adaptado dentro de um banho termostaticado e a temperatura mantida a 25 °C.

Iniciou-se o processo adicionando no reator 140 ml de inóculo a 1600 mg/l de massa seca e completando para 4 litros de meio de cultura com água da torneira.

A solução de alimentação foi preparada com meio de sais (item 3.2.2) e 500 mg/l de fenol como única fonte de carbono.

A vazão de alimentação inicial era de 0.34 ml/min. (tempo de retenção hidráulico de 10 dias) e estava programado para um aumento de 10% a cada dia.

Foi acompanhada a concentração de fenol, DQO e a concentração de massa seca.

No início do experimento, até completar 4.7 litros, o regime de operação foi de batelada alimentada, e a seguir contínuo.

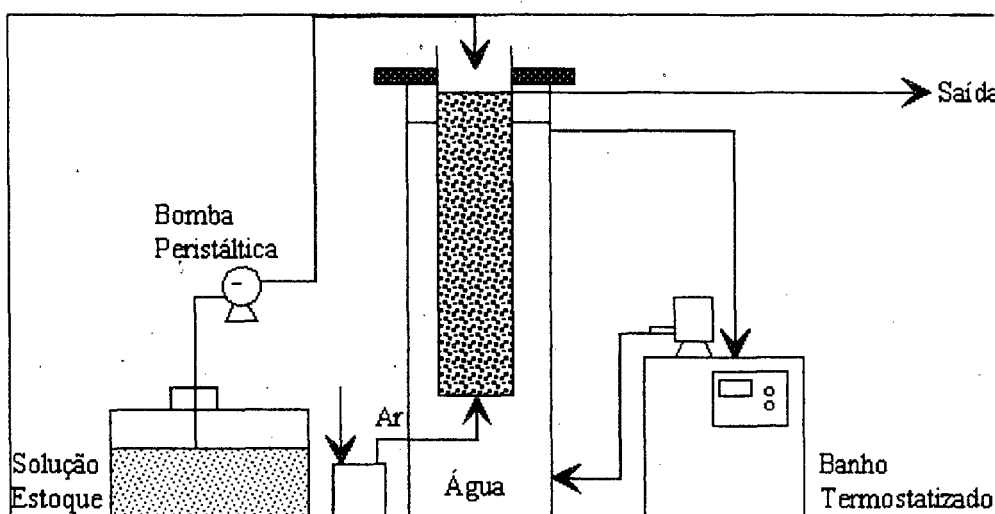


Figura 3 - Esboço do reator de mistura contínuo com aeração

EXPERIMENTO VIII - com reciclo.

Semelhante ao sistema anterior, com excessão da instalação de um decantador com volume útil de 2 litros na saída do reator e uma bomba dosadora (Cole Parmer modelo 7550-62), para reciclo de lodo, tendo como objetivo aumentar a concentração de biomassa no reator, conforme pode ser observado na Figura 4. A razão de reciclo era mantida em três vezes a vazão de alimentação.

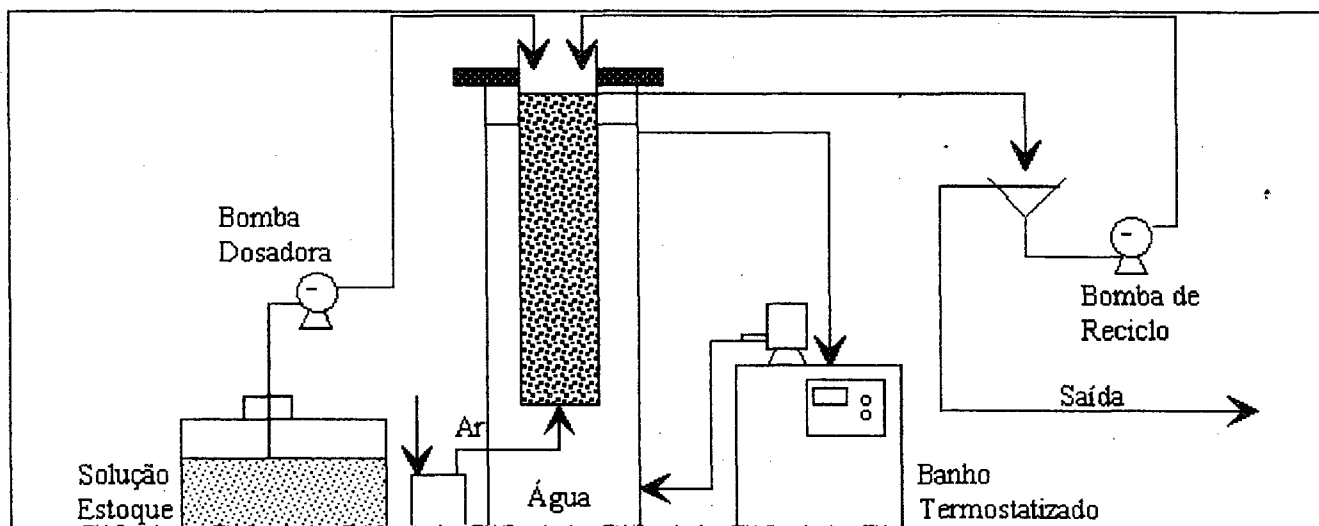


Figura 4 - Esboço do reator de mistura contínua com aeração e reciclo de biomassa

A solução de alimentação, continha fenol como única fonte de carbono, nutrientes na relação citada anteriormente (item 3.2.1) e meio de sais. A concentração de fenol inicialmente era de 500 mg/l e no decorrer do experimento foi aumentada para 800 mg/l.

Os dados de concentração de fenol na alimentação e tempo de retenção hidráulico (TRH), são apresentados na Figura 5.

Após quinze dias de operação, foi realizado estudo para verificação das alterações quanto à composição microbiana e a evolução do processo de seleção dos microorganismos de interesse.

Devido a dificuldade de estabilizar a concentração de biomassa no sistema, foi trocado o decantador de 2 litros por um de 260 ml.

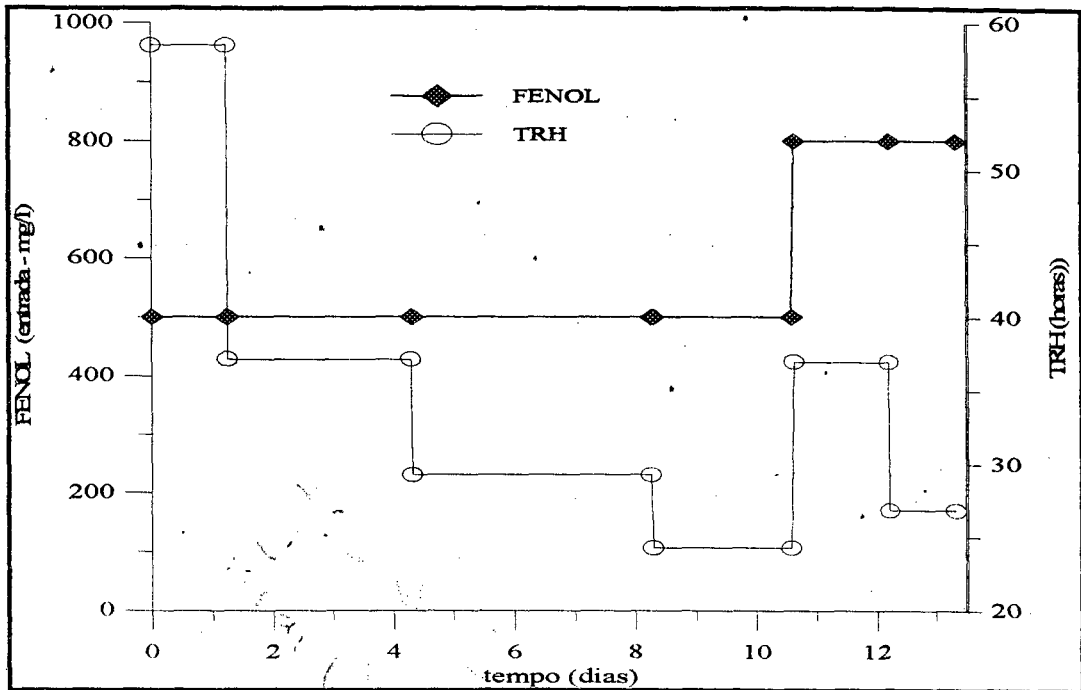


Figura 5 - Dados de concentração de fenol na alimentação e tempo de retenção hidráulico (TRH) do reator contínuo com reciclo.

EXPERIMENTO VIII - sem reciclo.

Trata-se do sistema em regime contínuo porém, operando novamente sem decantador e sem reciclo. O sistema de reciclo estava dificultando a determinação do fator de conversão de substrato em biomassa devido a oscilação da concentração de massa seca.

Este experimento foi iniciado com uma vazão de alimentação de 2 l/dia com 800 mg/l de fenol. A vazão foi sendo aumentada lentamente, sempre verificando se o fenol na saída mantinha-se próximo de zero, até atingir uma vazão de 5 l/dia. A partir de então, foram investigados estados estacionários com fenol a 800 mg/l e 1200 mg/l. Na Figura 6, são apresentados os dados de concentração de fenol na alimentação e TRH.

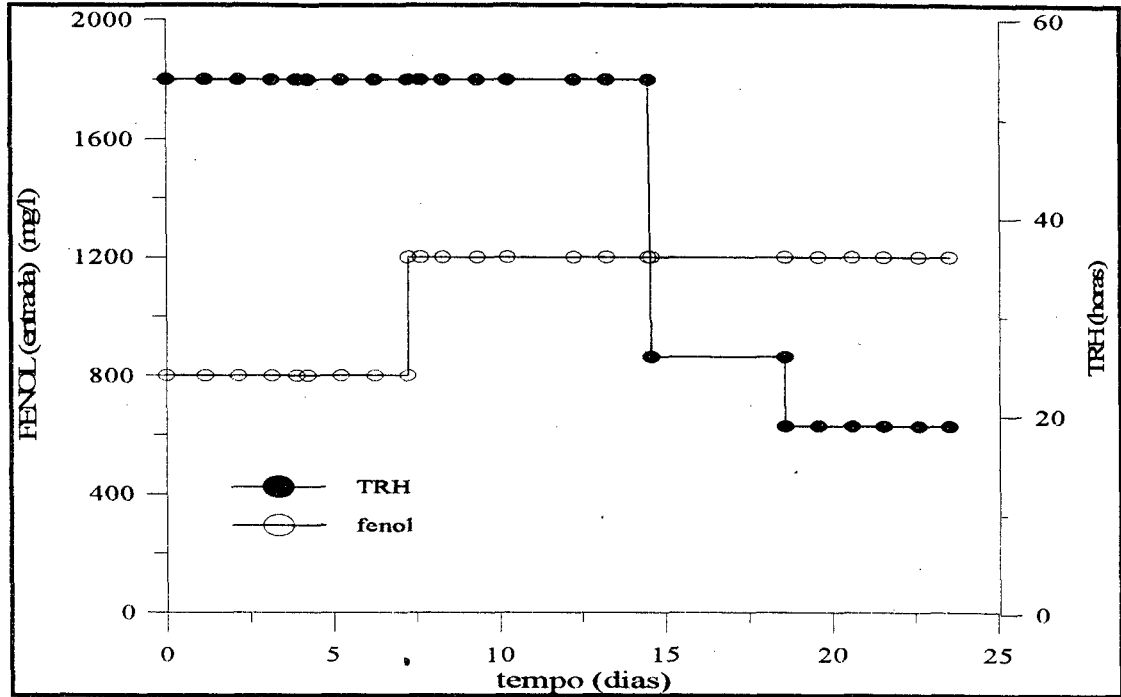


Figura 6 - Dados de concentração de fenol na alimentação e tempo de retenção hidráulico (TRH) do reator contínuo sem reciclo

A degradação do fenol com a cultura microbiana em estudo, tinha como consequência a redução do pH. Em razão disto foram determinados estados estacionários, alterando-se a vazão de alimentação, com controle de pH pela adição de uma solução de hidróxido de sódio. Utilizando-se a solução de hidróxido de sódio 0,025 N e fazendo-se o acompanhamento do pH, determinou-se o consumo desta solução, 68,5 ml por grama de fenol consumido, para que o pH se mantivesse entre 3 e 4.

Um resumo dos experimentos realizados com microorganismos de cultura mista no reator contínuo é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo dos experimentos realizados em sistema de regime contínuo empregando microorganismos de cultura mista

EXPERIMENTO	Cepa	Alimentação (Meio de cultura)	Nutrientes	Temperat. (°C)	Condições de pH	Regime contínuo
exp. VII	cultura mista	fenol 500 mg/l	-----	25	sem controle	sem reciclo
exp. VIII	cultura mista	fenol 500 mg/l	meio de nutrientes	25	sem controle	com reciclo
	"	fenol 800 mg/l	"	25	"	"
	cultura mista	fenol 800 mg/l	meio de nutrientes	25	sem controle	sem reciclo
	"	fenol 1200 mg/l	"	"	"	"
	"	fenol 1000 mg/l	"	"	com controle	"
	"	"	"	"	"	"

3.4.2 Ensaio com culturas microbianas mistas em sistema de regime descontínuo

Para a realização dos experimentos em regime descontínuo foi empregado um tanque em acrílico de 4,0 litros, com formato semelhante ao descrito nos experimentos de regime contínuo. O ar era injetado pela base do tanque para que este promovesse a aeração e agitação do meio de cultura. Semelhante aos experimentos anteriores, inicialmente o ar passava por um filtro para após ser injetado no reator.

Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e sem controle de pH.

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos consistia de fenol em torno de 500 mg/l, solução de nutrientes 20 ml por grama de fenol e meio de sais.

EXPERIMENTO IX.

No primeiro ensaio em regime descontínuo foi empregado o inóculo coletado da saída do reator contínuo (cultura mista MB), onde o próprio efluente foi utilizado. O teor de massa seca inicial utilizado foi de 310 mg/l. Neste experimento foi acompanhado a concentração de fenol e a DQO. Não foi acompanhado o pH.

EXPERIMENTO X.

O inóculo utilizado para a realização deste ensaio também foi coletado na saída do reator contínuo (cultura mista MB). No entanto, antes de iniciar o experimento o mesmo foi neutralizado para um pH = 6 com hidróxido de sódio. O teor de massa seca inicial deste ensaio foi de 372 mg/l. Neste ensaio foi acompanhado a concentração de fenol e o pH.

EXPERIMENTO XI.

Neste ensaio, além do efluente do reator contínuo utilizou-se uma parte de biomassa mantida em estoque para formar um inóculo inicial com maior concentração de biomassa. A cultura microbiana utilizada neste ensaio era a cultura mista MC. O teor de massa seca inicial utilizado foi 480 mg/l.

EXPERIMENTO XII.

Com o objetivo de compreender melhor a influência do pH sobre a velocidade da biodegradação do fenol, este ensaio foi iniciado com pH=3, pois os outros ensaios em regime descontínuo, foram realizados com pH mais elevado. A formação do inóculo deste experimento foi semelhante ao anterior, atingindo um teor de massa seca inicial de 535 mg/l.

Um resumo dos experimentos realizados em sistema de regime descontínuo empregando microorganismos de cultura mista é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resumo dos experimentos realizados em sistema de regime descontínuo empregando microorganismos de cultura mista

EXPERIMENTO	Cepa	Meio de cultura	pH inicial	pH final	Sólidos susp. início (mg/l)	Origem do inóculo
exp. IX	cultura mista	fenol 500 mg/l e nutrientes	-	-	310	reator contínuo
exp. X	"	"	6	3	370	reator contínuo
exp. XI	"	"	7	5	480	reator contínuo + estoque biomassa
exp. XII	"	"	3	2	535	reator contínuo - estoque biomassa

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS COM MICROORGANISMOS ISOLADOS

4.1.1 Ensaios com Efluente Bruto

No *experimento I*, nas condições em que foi realizado, durante dez dias, praticamente não houve redução da DQO, conforme pode ser observado na Figura 7. O baixo rendimento na redução da DQO (10%), pode ser explicado pela alta concentração inicial do efluente. Concentrações iniciais de DQO, menores que 12000 mg/l foram utilizadas nos experimentos a seguir.

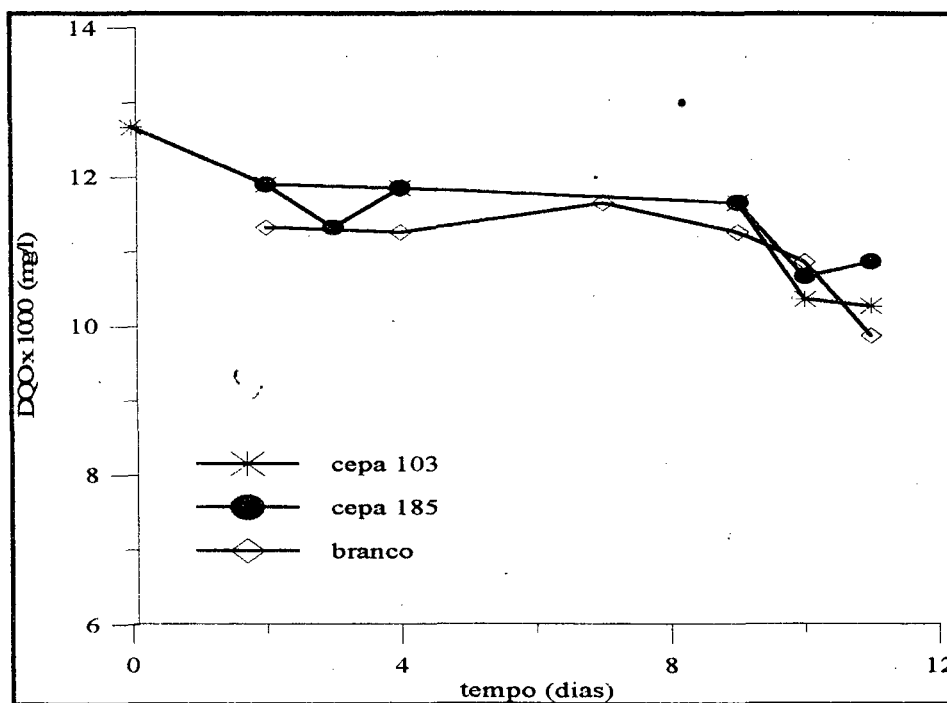


Figura 7 - Evolução da DQO para concentração inicial de 12600 mg/l

As curvas que estão ligando os pontos no gráfico apresentado, têm como objetivo melhor destacar os diferentes ensaios e não representam a melhor curva para os pontos de cada ensaio.

Os resultados do *experimento I*, referentes a evolução da biomassa, são apresentados na Figura 8. Conforme pode ser observado há poucas alterações nas medidas de densidade ótica.

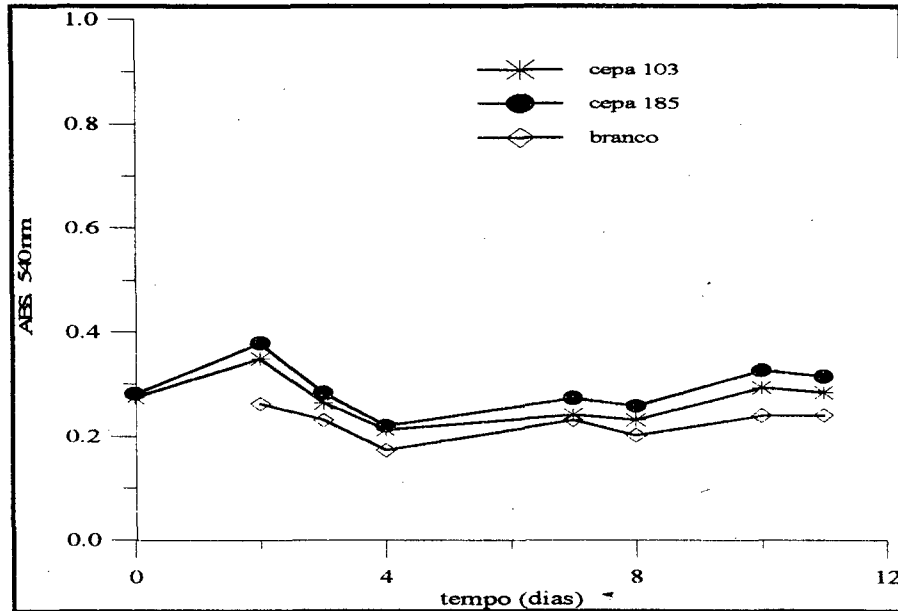


Figura 8 - Evolução do crescimento da biomassa

No *experimento II*, após a diluição do meio de cultura, observou-se aumento na redução de DQO (50%), conforme resultados apresentados na Figura 9.

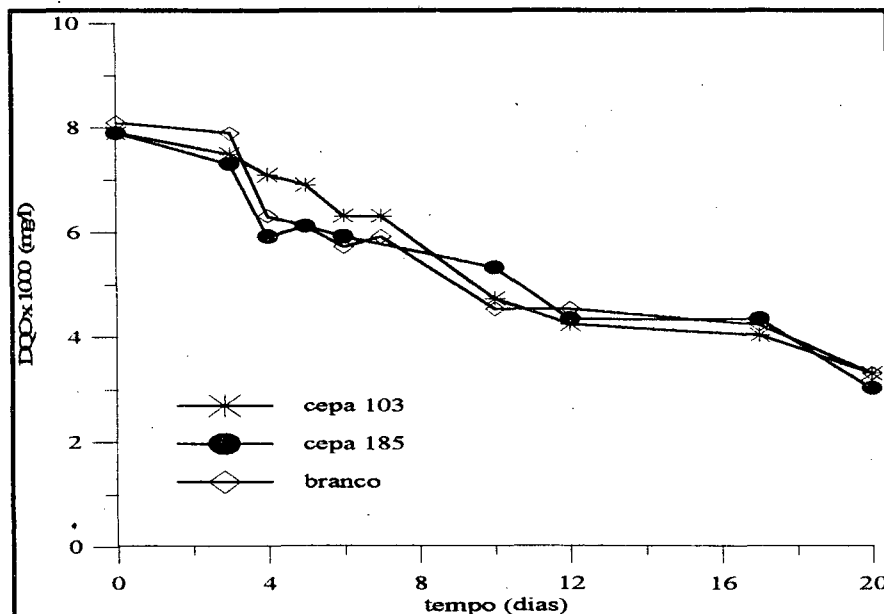


Figura 9 - Evolução da DQO para concentração inicial de 8000 mg/l

Neste experimento, também observou-se aumento da densidade ótica, conforme pode ser observado na Figura 10.

De acordo com os resultados deste experimento, pode-se afirmar que os microorganismos isolados, cepas 103 e 185, não foram mais eficientes que os contidos no próprio efluente. No entanto, a concentração inicial do efluente, sendo ainda muito alta, pode ter influenciado os resultados.

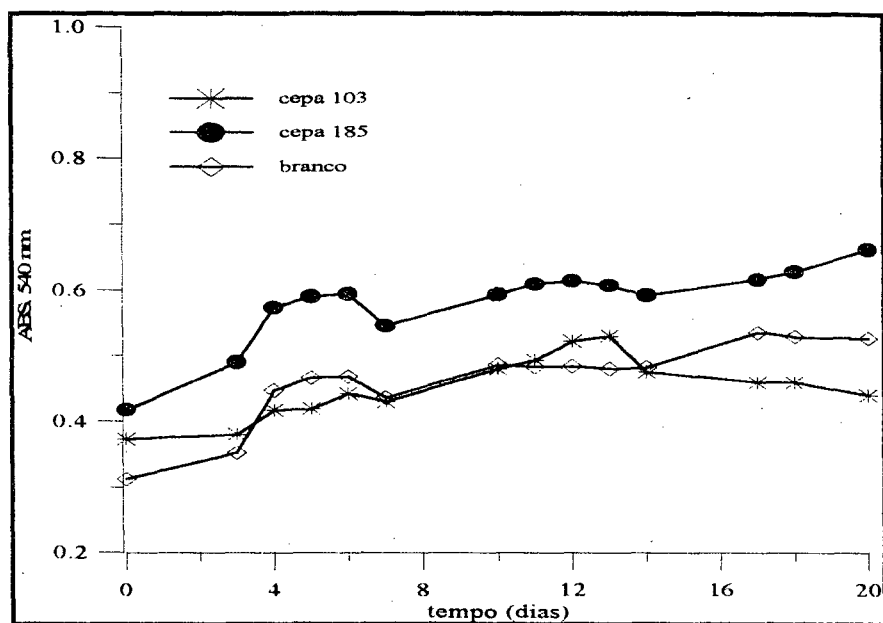


Figura 10 - Evolução do crescimento da biomassa

Os resultados do *experimento III*, referentes a redução da DQO, para os três tipos de cultura microbiana empregados, estão representados na Figura 11. Para uma DQO inicial de 6000 mg/l, a cepa 185 em dez dias reduziu para 2020 mg/l (66 %), a cepa 103 neste mesmo período reduziu a DQO para 2310 mg/l (62 %) e os microorganismos contidos no próprio efluente reduziram para 3640 mg/l (39 %). A cepa 185 apresentou maior rendimento na redução da DQO em menor tempo.

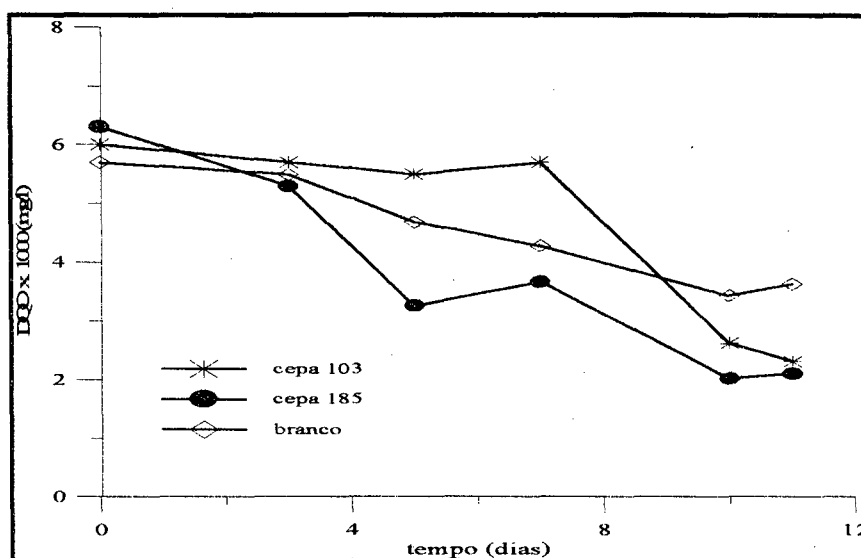


Figura 11 - Evolução da DQO para uma concentração inicial de 6000 mg/l

Com relação a densidade ótica, conforme pode ser observado na Figura 12, os resultados das leituras permaneceram praticamente inalterados.

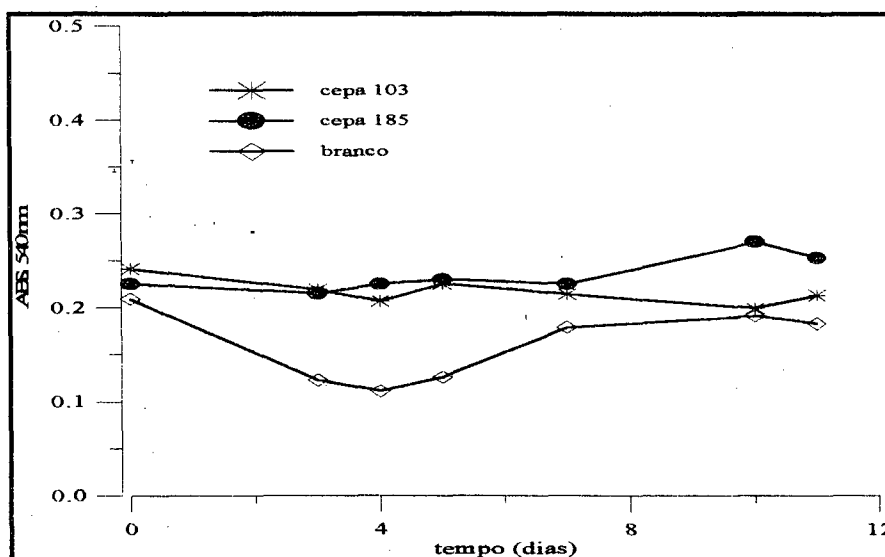


Figura 12 - Evolução do crescimento da biomassa

O fato de a densidade ótica praticamente não ter se alterado, significa que o consumo dos compostos fenólicos ocorreu com pouca produção de biomassa. Resultados nesse sentido são de grande interesse para o tratamento de efluentes, pois evitam a produção excessiva de lodo, dispensando ou diminuindo a necessidade de tratamentos posteriores.

Neste experimento, fazendo-se o acompanhamento da concentração de compostos fenólicos, conforme resultados apresentados na Figura 13, em onze dias temos os seguintes rendimentos: 96 % com a cepa 185, 71 % com a cepa 103 e 57 % com os microorganismos contidos no próprio efluente. Com relação a este parâmetro a cepa 185 também foi mais eficiente que os outros microorganismos testados.

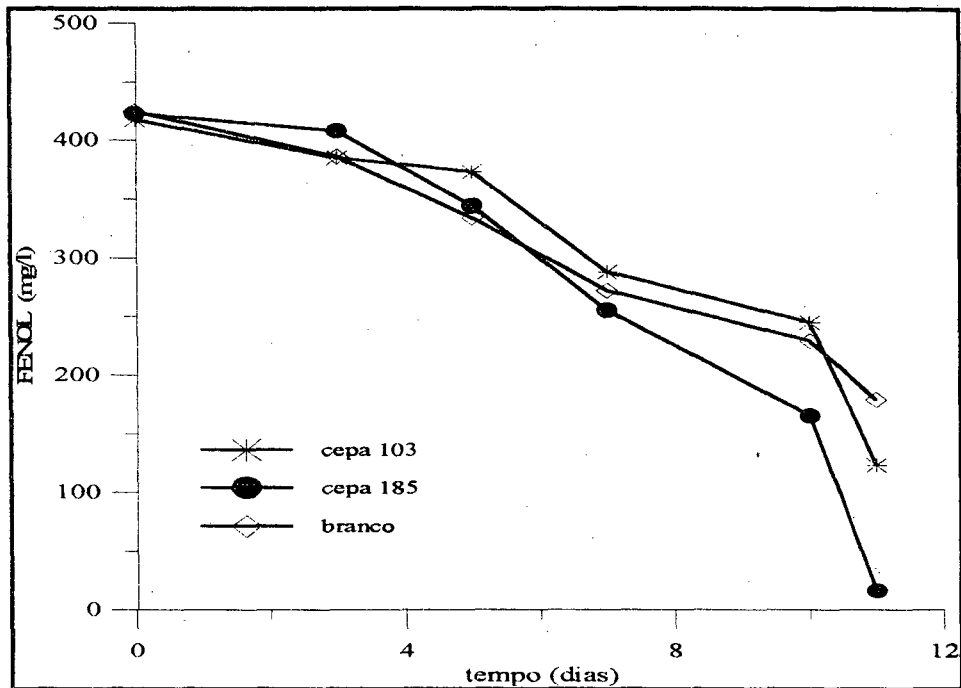


Figura 13 - Evolução de fenóis para uma concentração inicial de 420 mg/l

4.1.2 Ensaio com Fenol como Única Fonte de Carbono

Nos ensaios do *experimento IV*, contendo somente fenol como fonte de carbono e energia, inoculados com as cepas 185 ou 103 observou-se que a DQO, conforme resultados apresentados na Figura 14, inicialmente aumentou bruscamente e em seguida decresceu voltando aos valores que obedecem a relação estequiométrica de acordo com a concentração de fenol residual.

Uma hipótese para o aumento brusco da DQO, é a fase de adaptação dos microorganismos ao novo meio, fase esta em que os microorganismos sintetizam o complexo enzimático necessário para as reações bioquímicas e as liberam, contribuindo para o aumento da DQO.

Em treze dias de experimento, no ensaio empregando a cepa 185, obteve-se uma redução da DQO de 93 % (DQO final de 100 mg/l). Nesse mesmo período, no ensaio com a cepa 103 obteve-se um rendimento de 43 %.

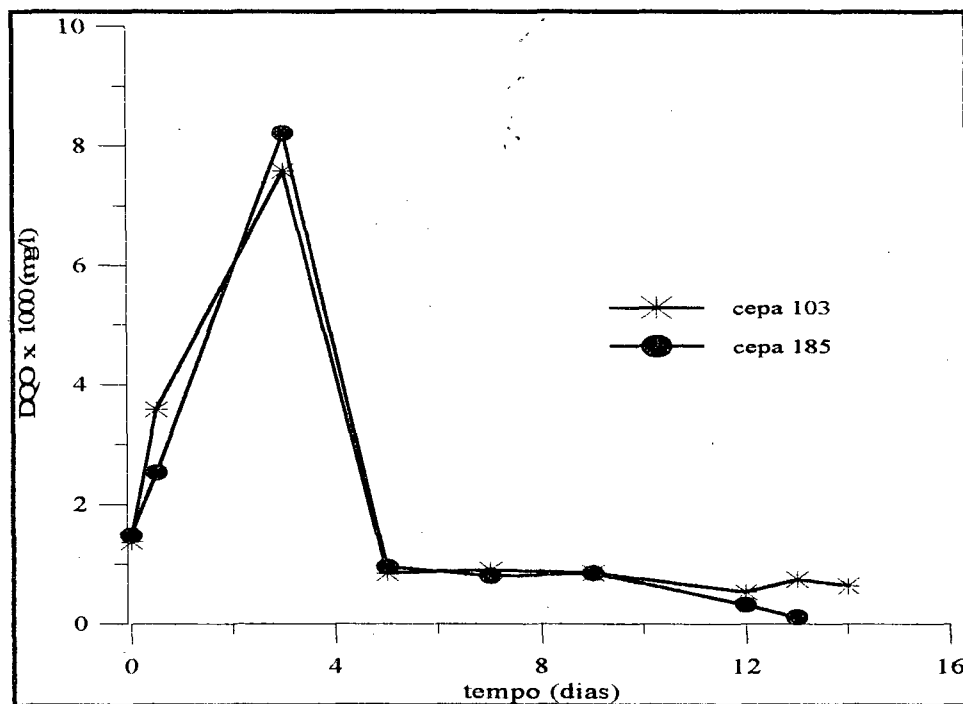


Figura 14 - Evolução da DQO durante a biodegradação do fenol

A Figura 15 representa para os mesmos ensaios descritos no parágrafo anterior, a evolução da biomassa no meio, medida através da densidade ótica. Observa-se na Figura 15 que para ambas as cepas praticamente não houve alteração da biomassa nestes ensaios.

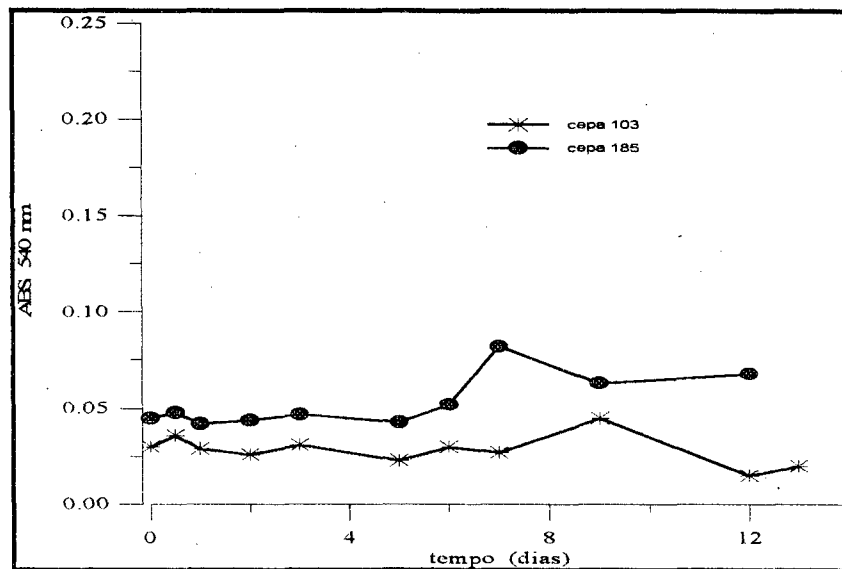


Figura 15 - Evolução do crescimento da biomassa

A Figura 16 representa a evolução da concentração do fenol, onde observa-se que a concentração deste é reduzida a praticamente zero em treze dias de experimento, quando inoculado com os microorganismos da cepa 185, enquanto que, para o mesmo período, com os microorganismos da cepa 103, houve pouca redução do fenol (25%).

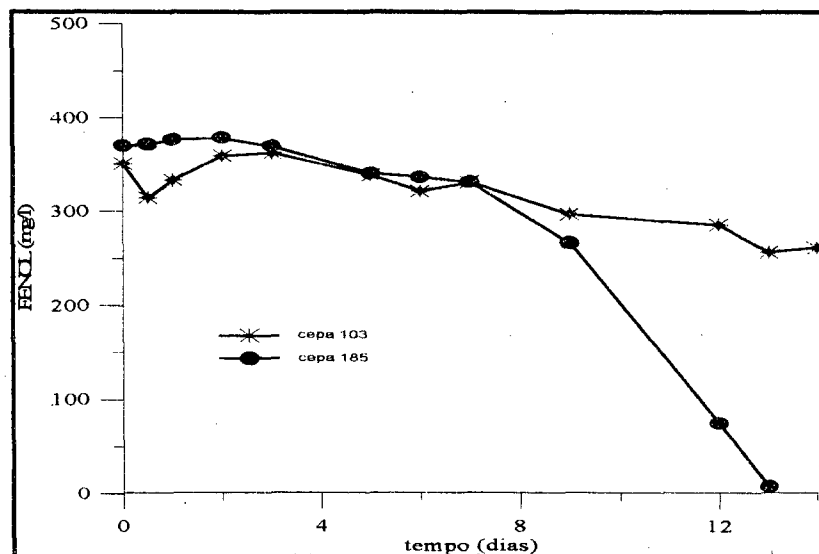


Figura 16 - Evolução da concentração de fenol

Comparando-se os resultados mostrados nas Figuras 14, 15 e 16, onde o fenol representava a única fonte de carbono, constata-se que a cepa 185 apresenta melhores resultado que a cepa 103. No meio de cultura ao qual as cepas foram inoculadas, conforme metodologia item 3.3.5, a cepa 185 demorou em torno de sete dias para se aclimatar e então começar a reduzir o fenol significativamente, porém, após este período degradou todo o fenol rapidamente. Já a cepa 103 em quatorze dias não se aclimatou, pois nesse período reduziu apenas 25 % do fenol presente inicialmente.

Nas Figuras 17 e 18 estão representados os resultados do *experimento V*, onde os microorganismos das cepas 103, 185, 304 e da cultura mista MC, foram testados tendo somente o fenol como fonte de carbono e, neste caso, com a adição da solução de nutrientes, descrita no item 3.2.1.

Os resultados dos ensaios empregando os microorganismos isolados são apresentados na Figura 17. Observa-se que a cepa 304 apresenta o melhor resultado quanto à degradação do fenol, onde a redução é de 93 % em 68 horas, enquanto nesse mesmo período a cepa 185 reduz o fenol em 33 % e a 103 em 19 %.

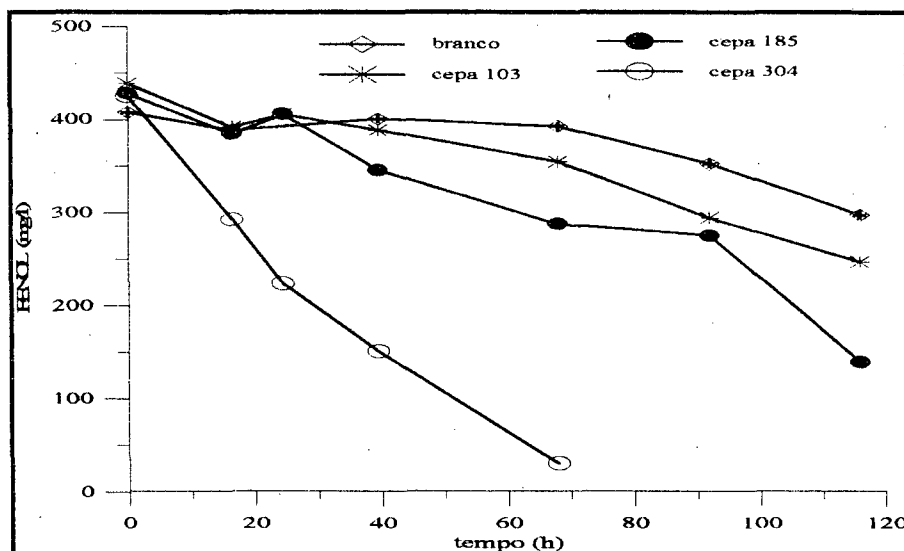


Figura 17 - Evolução da concentração do fenol em cultura pura

Na Figura 18, são apresentados os resultados do ensaio com a cultura mista MC, os quais se comparados com os resultados das culturas puras, representam um melhor rendimento, onde o fenol é reduzido em 98 % em apenas 40 horas.

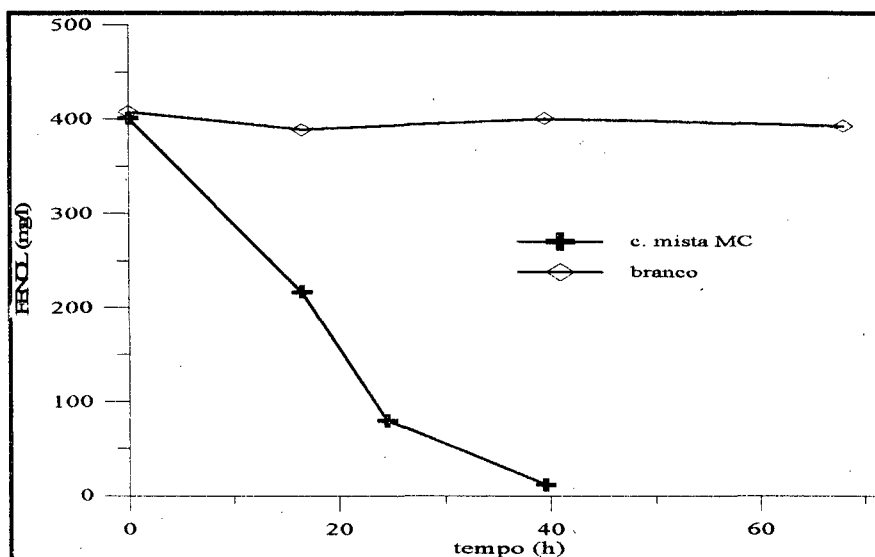


Figura 18 - Evolução da concentração do fenol com a cultura mista MC

Com a utilização do meio de nutrientes neste experimento, observando os resultados obtidos com as cepas 185 e 103, pode-se concluir que o período necessário para a aclimatação foi bem menor, se comparado com os resultados obtidos para estes microorganismos no experimento anterior. No *experimento V*, a cepa 185 em 116 horas, reduziu a concentração de fenol em 67 % e a cepa 103 em 43 %, enquanto que no *experimento IV*, onde não se utilizou a solução de nutrientes, para esse mesmo período a cepa 185 reduziu o fenol em apenas 8 % e a cepa 103 em 3%. Assim, esta solução de nutrientes descrita no ítem 3.2.1, fica proposta para novas investigações e comparações com outras soluções de nutrientes encontradas na literatura.

No *experimento VI*, no qual a cepa 304 foi submetida a várias concentrações iniciais de fenol, não se confirmou o resultado obtido com esta cepa para uma mesma concentração inicial de fenol de 400 mg/l como verificado no *experimento V*. As reduções de fenol, para a maioria das concentrações utilizadas foram baixas. Somente no caso da concentração inicial de 200 mg/l, é que o fenol foi totalmente consumido em menos de três dias.

Uma causa possível é que o inóculo utilizado no *experimento V* estava sendo repicado frequentemente, devido a outros trabalhos com esta cepa. Enquanto que neste experimento o inóculo foi preparado a partir de um estoque, onde os microorganismos

estavam em estado de latência (conservação). Inclusive, houve muita dificuldade para se obter um inóculo com densidade ótica semelhante aos de outros experimentos.

Para uma avaliação sobre a influência da concentração inicial do fenol na velocidade de degradação com a cepa 304, deverão ser realizadas novas investigações.

4.2 ENSAIOS UTILIZANDO MICROORGANISMOS DE CULTURA MISTA

4.2.1 Ensaio em Sistemas de Regime Contínuo

Os resultados obtidos no *experimento VII*, referentes a concentração de fenol e biomassa são apresentados na Figura 19. Observou-se que no início (primeiras 24 horas) o fenol estava sendo praticamente todo consumido. Após este período, começou a acumular-se no meio, apresentando um baixo rendimento de degradação.

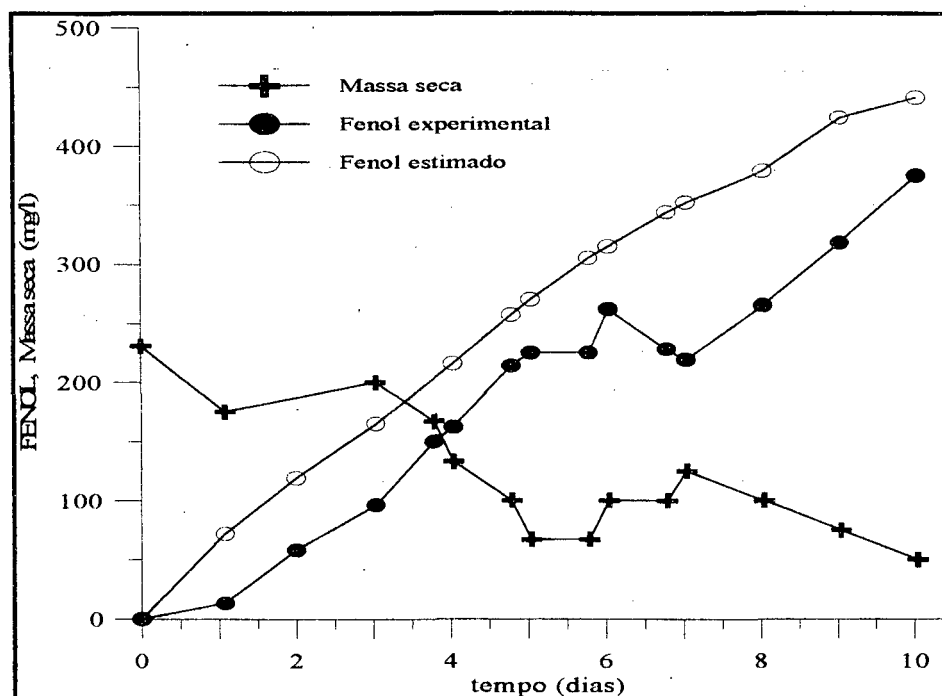


Figura 19 - Evolução da concentração do fenol e biomassa em sistema contínuo

As principais razões deste baixo rendimento podem ser atribuídas a:

- falta de aclimação da biomassa no meio utilizado;
- condições de operação desfavoráveis;
- ausência de reciclo, o arraste foi observado a partir de 75 horas.

O inóculo deste experimento, proveniente do sistema de reatores utilizados para aclimação do lodo, para fins de caracterização dos diferentes estágios de enriquecimento da cultura microbiana, denominamos de cultura mista MA

No *experimento VIII*, neste caso com reciclo de biomassa para evitar o problema de arraste, todo o fenol que entrava no reator era consumido. A vazão era aumentada suavemente, conforme metodologia ítem 3.4, com verificação da concentração de fenol no reator a cada degrau de alimentação. Até uma carga aplicada de 141 mg-fenol/h e tempo de retenção hidráulico (TRH) de 27 h, todo o fenol era consumido, conforme pode ser observado na Figura 20a.

Conforme resultados apresentados na Figura 20a, a DQO média no reator em 10 dias de operação era de 50 mg/l. Esse resultado indica que possivelmente estava ocorrendo degradação completa do fenol e todos os metabólitos intermediários, pois a DQO na alimentação durante este período era de 1920 mg/l (redução de 97 %). No entanto, para um melhor entendimento sobre o metabolismo do fenol com esta cultura microbiana deverá ser investigado a rota metabólica e acompanhado a degradação de metabólitos intermediários.

Em 13 dias de operação, não se atingiu estabilidade quanto à concentração de biomassa no reator, conforme resultados apresentados na Figura 20a.

O fator de carga foi calculado dividindo a carga de fenol aplicada ao reator pela média da biomassa (massa seca) total presente no reator. A média da biomassa foi calculada, considerando-se a concentração de massa seca no intervalo de uma mesma carga de fenol. Os resultados do fator de carga obtidos neste experimento, são apresentados na Figura 20b.

A variação da carga de fenol, se deve a variações na vazão ou na concentração de fenol na alimentação. O aumento da carga devido ao aumento da vazão teve como consequência o aumento do fator de carga, já o aumento da carga devido o aumento da concentração de fenol diminuiu o fator de carga, o que era esperado.

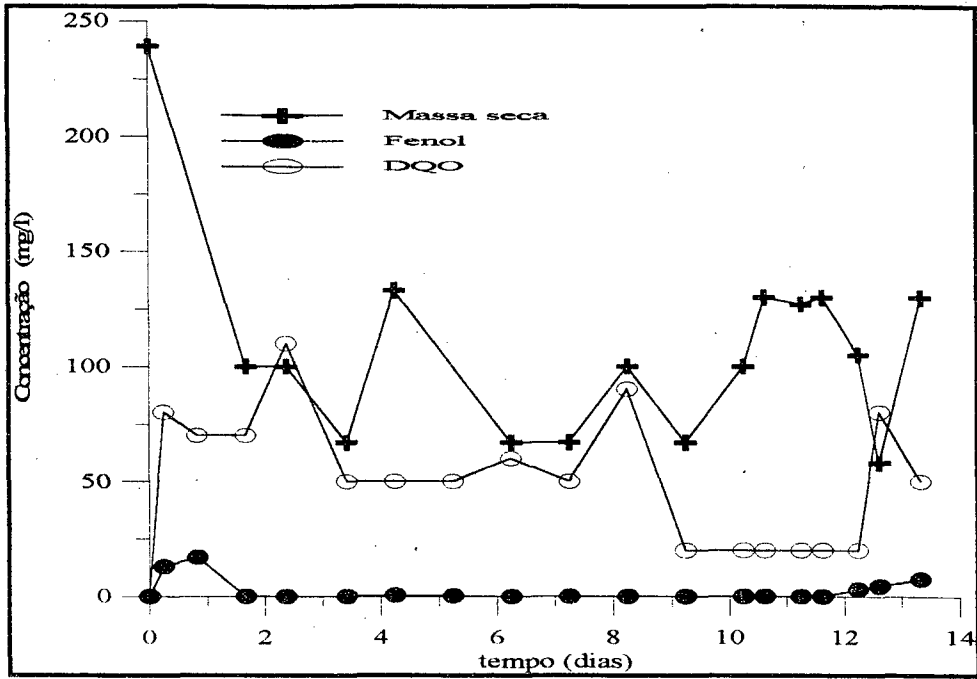


Figura 20a- Evolução das concentrações de fenol e biomassa em um sistema contínuo

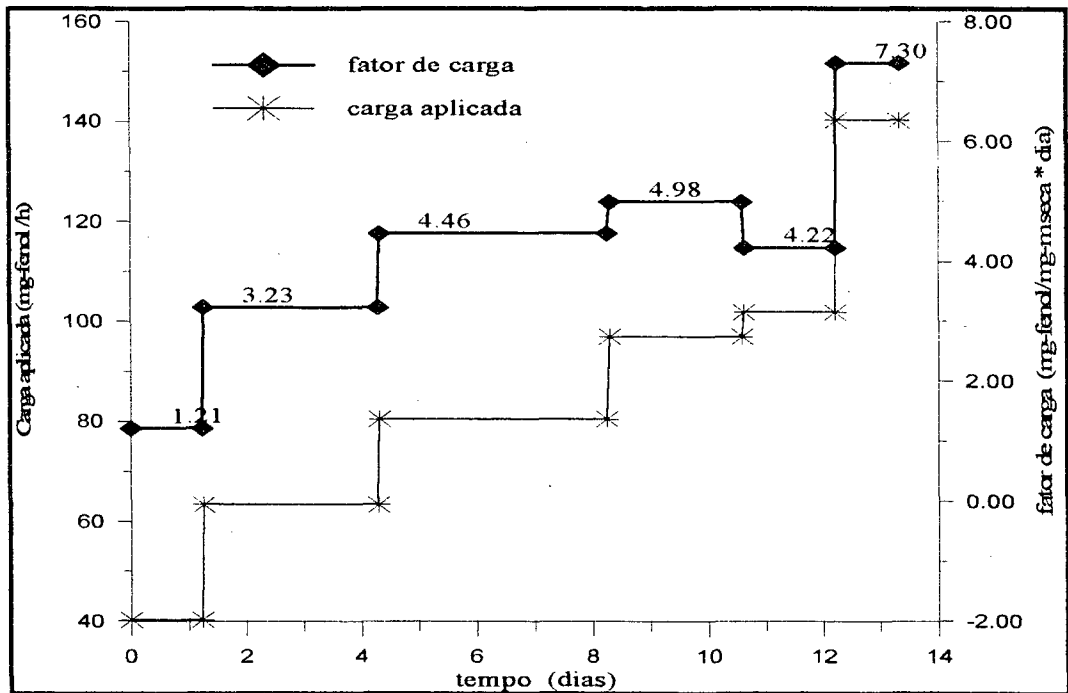


Figura 20b - Dados da carga de fenol aplicada ao reator e fator de carga

Fazendo-se uma investigação quanto aos microorganismos presentes no inóculo empregado no sistema contínuo, foi observado o crescimento de dez colônias de bactérias morfologicamente diferentes. Também foi observado a presença de leveduras.

Após o isolamento, as bactérias isoladas de seis colônias eram GRAM negativas e foram identificadas pelo Sistema API 20 NE (BARBOSA, 1993), como sendo:

- duas das colônias de *Pseudomonas alcaligenes*;
- duas colônias de *Pseudomonas mesophilicas*;
- e as outras duas colônias tratavam-se de *Acinetobacter calcoaceticos*;

As bactérias isoladas das quatro colônias restantes, eram GRAM positivas e não foram identificadas.

Com o sistema em operação, todo o lodo de cor escura do inóculo inicial, aos poucos foi sendo substituído por um lodo formado por novos flocos de coloração clara.

Após quinze dias de operação, foi constatado que haviam em torno de cinco cepas predominantes no sistema, baseado na morfologia de crescimento de colônia. Nesta etapa, também foi observado que havia aumentado bastante a população de leveduras. A partir desta avaliação, a cultura microbiana foi denominada de cultura mista MB.

Quando o processo completou 22 dias de operação, decidiu-se trabalhar sem reciclo, pois, devido ao grau de floculabilidade da biomassa e tamanho dos flocos, o sistema de retorno da biomassa era obstruído com frequência, causando oscilações na concentração da biomassa do reator, enquanto que o objetivo do reciclo aumentar a estabilidade.

A floculabilidade da biomassa é uma propriedade de grande interesse para os sistemas de tratamento de efluentes, pois permite separar a biomassa do efluente tratado.

Experimento VIII - Sem reciclo. Após alteração no modo de operação deste experimento a concentração de fenol no reator se manteve próximo de zero, mesmo com aumentos de vazão e concentração de fenol na alimentação. Sem o reciclo, foi possível estabilizar a concentração de biomassa no reator. Esses resultados podem ser observados na Figura 21a.

Deste modo foi possível a avaliação de estados estacionários, os quais foram considerados após um período de três a seis vezes o tempo de retenção hidráulico. O primeiro estado estacionário foi caracterizado nas seguintes condições:

ENTRADA:

Vazão = 2,074 l/dia
 Conc. fenol = 800 mg/l
 DQO = 1920 mg/l
 carga de fenol = 69,13 mg/h

SAÍDA

Conc. fenol = zero
 DQO = 80 mg/l
 Conc. Biomassa = 234 mg/l

DADOS CINÉTICOS

TRH = 54 h
 $\mu = D = 0,018 \text{ h}^{-1}$
 $R_x = 4,3 \text{ mg-m.seca/l}^*h$
 $Y_{x/s} = 0,293 \text{ mg-fenol/mg-m.seca}$
 $R_s = 14,7 \text{ mg-fenol/l}^*h$
 fator de carga = 1,51 mg-fenol/mg-m.seca*dia

Quando aumentou-se a concentração de alimentação de fenol de 800 para 1200 mg/l, o teor de massa seca, de acordo com o fator de conversão calculado acima, deveria passar de 234 para 351 mg/l. No entanto, após 6 dias (150 h) a massa seca já estava em 600 mg/l (que equivale a um $Y_{x/s}$ de 0.5 mg-s/mg-m.seca), conforme pode ser observado na Figura 21a, não confirmando o resultado obtido no primeiro estado estacionário. Isto pode ter sido provocado pela alteração na composição da cultura microbiana. Uma explicação, é que com o aumento da carga de fenol para 104 mg/h, como pode ser observado na Figura 21b, criou-se condições favoráveis ao predomínio dos microorganismos degradadores de fenol, resultando numa cultura com fator de conversão bem diferente da cultura predominante na etapa anterior.

O sistema suportou bem o aumento da concentração de fenol na alimentação. Não houve alteração com relação a DQO e fenol no reator, conforme mostra a Figura 17a. Com relação a biomassa, em 7,5 dias de operação com uma carga de 104 mg-fenol/h (TRH de 54 h), ainda não havia atingido o novo estado estacionário.

O arraste dos microorganismos e acúmulo de fenol e DQO, ocorreu quando o sistema estava operando com uma carga de alimentação de fenol de 297 mg/h (conc. de 1200 mg/l e TRH de 19 h). Nesse instante, foi observado que o pH do sistema estava próximo de 2, e isso inibido o crescimento dos microorganismos, resultando no arraste.

Quando ocorreu o arraste, o fator de carga era de 2,11 mg-fenol/mg-m.seca, enquanto que o sistema neste experimento esteve em operação com fatores de carga até da ordem de 7,30 mg-fenol/mg-m.seca, como visto na Figura 20b. Assim, pode se concluir que a inibição verificada e conseqüente arraste dos microorganismos não se deve a concentração inicial nem a carga de fenol aplicada.

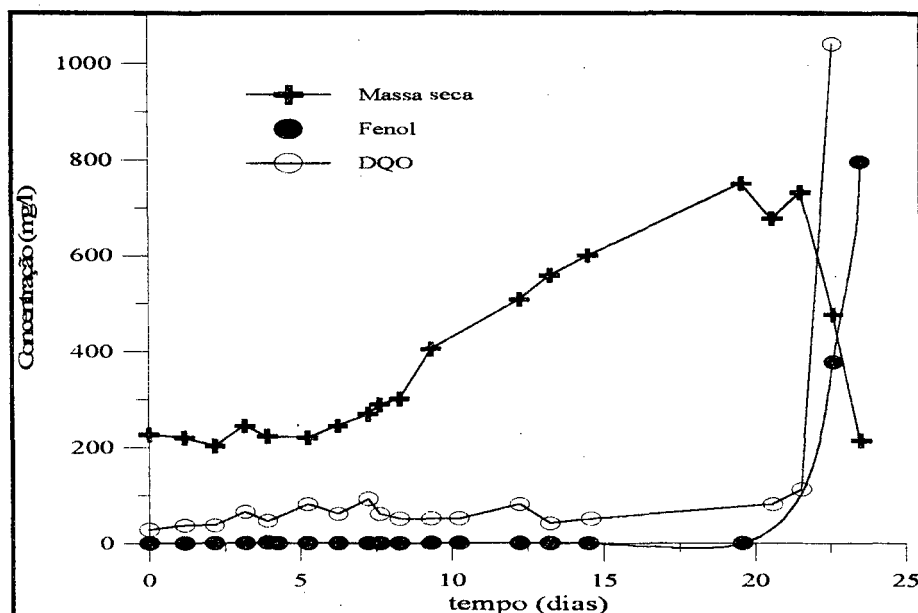


Figura 21a - Efeito do aumento da concentração do fenol na entrada do reator sobre a concentração de biomassa.

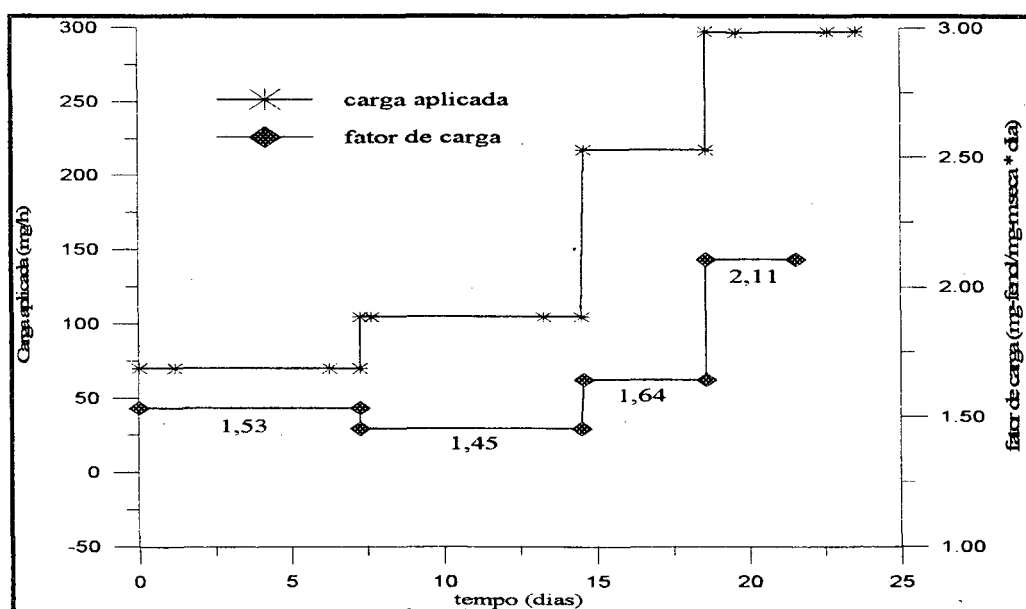


Figura 21b - Dados de carga de fenol aplicada ao reator e de fator de carga.

Neste estágio do trabalho observou-se o crescimento predominante de um tipo de colônia microbiana no reator. O microorganismo foi isolado e caracterizado como sendo uma levedura e foi conservada para futuras investigações. A cultura mista, a partir deste estágio passou a denominar-se cultura mista MC.

Na continuação do experimento fez-se o controle do pH para verificar se desse modo o efeito da inibição seria eliminado e com isso investigar a capacidade de degradação do fenol com esta cultura mista MC.

Assim, fazendo-se o controle de pH através da adição da solução de hidróxido de sódio (0,025 N) determinou-se mais três estados estacionários nas condições apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados da caracterização de três estados estacionários obtidos com controle de pH, com a cultura mista MC.

		2º ESTADO ESTACIONÁRIO	3º ESTADO ESTACIONÁRIO	4º ESTADO ESTACIONÁRIO
ENTRADA	TRH (h)	31	19	13
	vazão (l/dia)	3,60	5,76	8,64
	fenol (mg/l)	1000	1000	1000
	carga (mg/h)	152	247	362
SAÍDA	fenol (mg/l)	zero	zero	zero
	DQO (mg/l)	70	80	-
	massa seca (mg/l)	527	522	530
DADOS	$\mu = D$ (h ⁻¹)	0,032	0,051	0,077
CINÉTICOS	R _x (mg-m.seca/l*h)	16,8	26,1	40,6
	Y _{x/s} (mg-m.seca/mg-fenol)	0,527	0,522	0,530
	R _s (mg-fenol/l*h)	32,0	50,0	76,6
	fator de carga (mg-fenol/mg-m.seca*dia)	1,47	2,42	3,49

Com o tempo de retenção hidráulico de 13 horas, tornou-se difícil o controle do pH, pois estava sendo realizado sem controle automático.

O pH foi um fator determinante para o desempenho do sistema contínuo. Fazendo-se um controle, embora precário, todo o fenol era degradado até um tempo de retenção hidráulico de 13 horas e carga aplicada de 362 mg-fenol/h, resultando num fator de carga de 3,49 mg-fenol/mg-m.seca*dia, 65% superior quando se verificou o arraste anterior. Isso confirma que o pH inibiu o crescimento desta cultura microbiana. Um estudo do pH ótimo para o crescimento da levedura se faz necessário para que se possa avaliar todo o potencial de degradação do fenol por esta cultura microbiana em estudo.

Com os resultados obtidos, quanto a capacidade de degradação do fenol pela cultura mista MC, se comparados com dados da estação de tratamento de efluentes fenólicos da empresa ELIANE, pode se avaliar o potencial de aplicação deste microorganismo:

- Empresa: TRH = 26 h
 concentração de fenol na entrada = 500 mg/l
 $Rs = 21,3 \text{ mg-fenol/l} \cdot \text{h}$
 fator de carga = 0,23 mg-fenol/mg-m.seca*dia
 Obs.: 60 % do afluente do reator é água utilizada para diluição

- Comparados com os resultados obtidos no terceiro estado estacionário:
 TRH = 13 h
 concentração de fenol na entrada = 1000 mg/l
 $Rs = 76,6 \text{ mg-fenol/l} \cdot \text{h}$
 fator de carga = 3,49 mg-fenol/mg-m.seca*dia

Baseando-se na comparação acima, caso se confirme estes resultados numa unidade piloto utilizando efluente bruto, a aplicação do microorganismo selecionado poderá trazer vantagens como redução ou eliminação da água de diluição, pois com este microorganismo pode-se trabalhar com concentrações de alimentação mais elevadas e aumento da capacidade da estação.

Com relação ao fator de conversão do fenol em biomassa, nas etapas do sistema de regime contínuo, observou-se duas faixas bem distintas: inicialmente com a cultura mista MA o fator de conversão era de 0,293 mg-m.seca/mg-fenol; este fator pulou para 0,530 quando foi utilizada a cultura mista MC. Através da determinação deste parâmetro, foi possível fazer um acompanhamento da estabilidade da cultura microbiana.

Neste trabalho fator de conversão é proposto como um dos parâmetros para se caracterizar alterações no comportamento da cultura microbiana na degradação de substratos de estruturas diferentes.

Para a determinação dos demais parâmetros de crescimento dessa cultura, entre estes K_S , μ_{max} , pretendia-se trabalhar em condições tais que o fenol na saída do reator fosse diferente de zero, para que se utilizasse um modelo de crescimento para comparação da velocidade de degradação do fenol com outros substratos. Para uma mesma concentração inicial de fenol, isso implicaria em diminuir sensivelmente o tempo de retenção, pelo aumento da vazão de alimentação. Tentativas foram feitas, mas a instabilidade do pH, provocada pela forma de controle adotado, não permitia a obtenção de dados confiáveis e reprodutíveis, o que prejudicou a determinação destes parâmetros.

4.2.2 ENSAIOS COM CULTURAS MICROBIANAS MISTAS EM SISTEMA DE REGIME DESCONTÍNUO.

Os resultados dos experimentos realizados no reator em regime descontínuo, empregando como inóculo o efluente dos experimentos em contínuo, são apresentados a seguir, de acordo com as condições em que foram realizados.

No *experimento IX*, de acordo com os resultados apresentados na Figura 22, observa-se que o fenol começou a ser consumido rapidamente, confirmando a adaptação dos microorganismos (cultura mista MB) no meio com uma concentração inicial de fenol de 538 mg/l. Num período de 30 horas o fenol foi totalmente consumido. Com relação a DQO, observa-se sua redução a medida em que o fenol é consumido, atingindo no final um rendimento de 94% (80 mg/l).

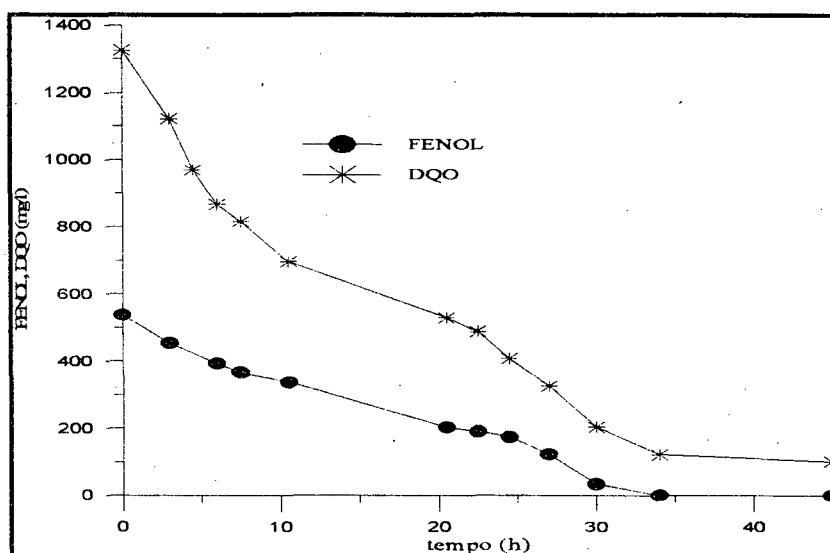


Figura 22 - Evolução da DQO e concentração de fenol no reator descontínuo

Considerando todos os pontos da curva de evolução da concentração do fenol, Figura 22, determinou-se a velocidade de consumo do fenol, onde $R_s = 14,3$ mg/l*h.

Neste experimento não foi acompanhado o pH.

No *experimento X*, quando o meio de cultura (cultura mista MB), antes de iniciar o ensaio, foi neutralizado com hidróxido de sódio para um pH neutro, foram obtidos os resultados representados na Figura 13.

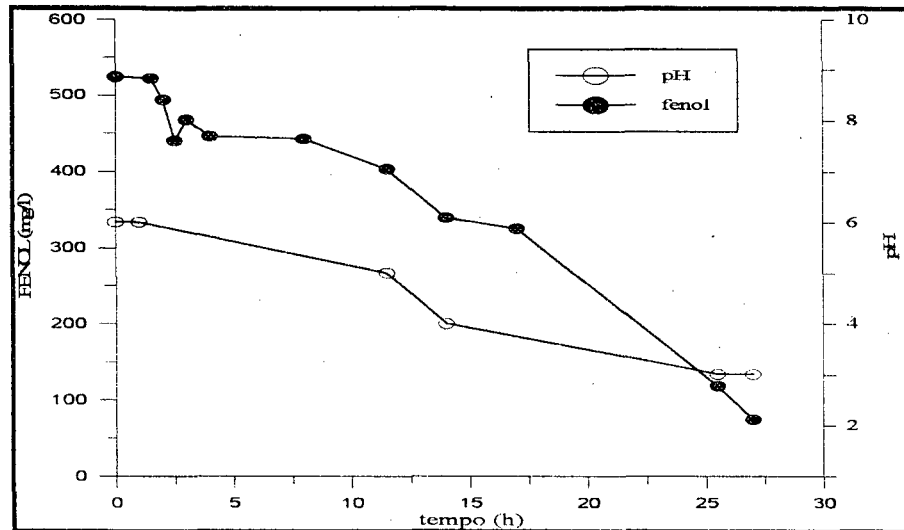


Figura 23 - Evolução da concentração de fenol no reator descontínuo

A velocidade de consumo do fenol foi de $15,3 \text{ mg/l}\cdot\text{h}$, considerando todos os pontos da curva, que é um valor bem próximo daquele obtido no experimento anterior. Desprezando-se os pontos iniciais (até 5 horas), possíveis efeitos de concentração inicial ou inibição devido a alteração de pH, obtém-se uma velocidade de consumo de fenol de $19,7 \text{ mg/l}\cdot\text{h}$.

No *experimento XI*, empregando o inóculo (cultura mista MC) coletado na saída do reator em contínuo operando com pH próximo de 6, foram obtidos os resultados representados na Figura 24.

Considerando todos os pontos da curva de evolução da concentração do fenol, obteve-se uma velocidade de consumo deste substrato de 51,6 mg/l*h. Desconsiderando os seis primeiros pontos que apresentam um comportamento diferente do restante da curva, efeitos do pH inicial e concentração do substrato, obtém-se uma velocidade de consumo de fenol de 79,6 mg/l*h. Esses valores de velocidade de consumo de fenol são bem superiores às obtidas nos *experimentos IX* e *X*. O que comprova a obtenção do enriquecimento seletivo do microorganismo de interesse.

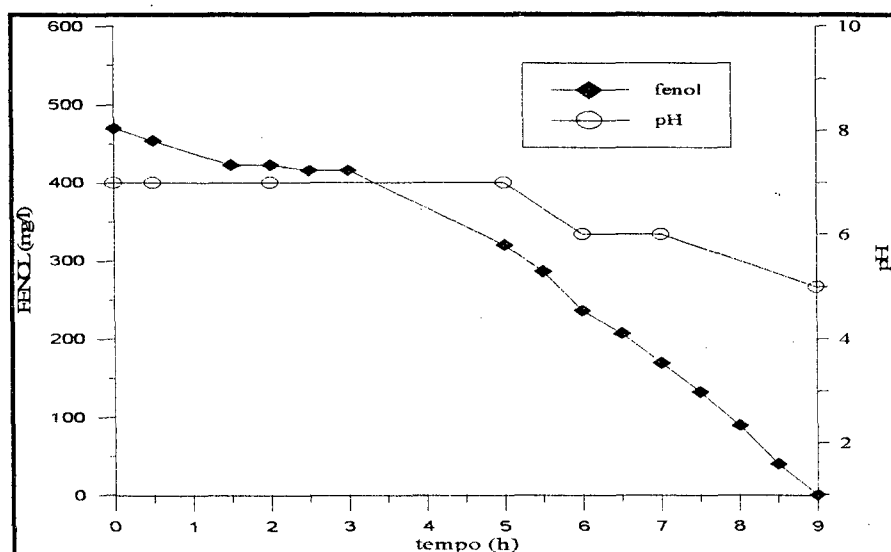


Figura 24 - Evolução da concentração de fenol no reator descontínuo

No *experimento XII*, onde se utilizou um inóculo (cultura mista MC) coletado do sistema em contínuo operando com pH entre 2 e 3, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 25.

Fazendo-se o cálculo da velocidade de consumo do fenol considerando todos os pontos da curva de evolução da concentração de fenol, obtém-se uma velocidade de 61,2 mg/l*h, pouco superior a velocidade obtida no experimento anterior. Neste experimento, observa-se duas regiões de velocidades de consumo do substrato: considerando o consumo do fenol até uma concentração de 350 mg/l, obtém-se um velocidade de 43,2 mg/l*h, menor que a velocidade global provavelmente devido ao efeito de inibição pela concentração do substrato; e considerando o consumo do fenol para uma concentração abaixo de 350 mg/l, obtém-se um velocidade de 93,6 mg/l*h.

Com relação ao pH, observa-se que com um pH baixo (pH=3) a velocidade de consumo do substrato é maior se comparada com o experimento anterior onde o pH inicial era mais elevado (pH=7).

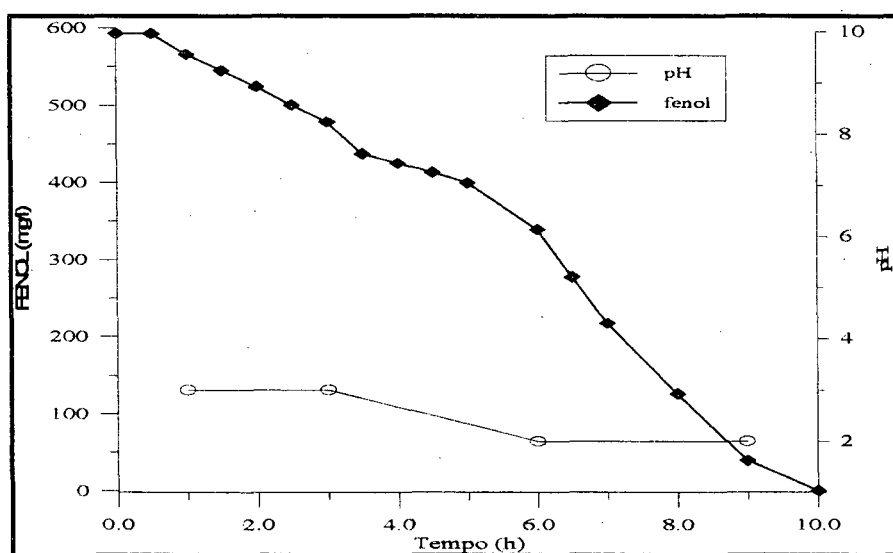


Figura 25 - Evolução da concentração de fenol no reator descontínuo

5.0 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Nos ensaios utilizando microorganismos isolados a partir de águas contaminadas com fenol, foi possível comparar a eficiência das cepas testadas e assim selecionar a mais eficiente quanto à degradação do fenol nas condições empregadas. Para dar continuidade às investigações com esses microorganismos, sugere-se que estes sejam produzidos em maior quantidade e testados em reatores contínuos em escala piloto, para que se possa avaliar o potencial de aplicação desta técnica.

Através da técnica de enriquecimento seletivo de microorganismos para o tratamento de efluentes, num sistema em regime contínuo, obteve-se uma cultura mista com um microorganismo predominante, eficiente na degradação do fenol. Como esta cultura mista reduz o pH durante a degradação do fenol haverá a necessidade de controle do pH no tratamento de efluentes, que resultaria em aumento de custos. Sugere-se assim, fazer o enriquecimento seletivo controlando-se o pH próximo da neutralidade, para obter uma cultura mista eficiente na degradação do fenol que possa ser aplicada no tratamento de efluentes sem o controle desta variável.

Com o microorganismo obtido, tem-se a possibilidade de aplicação em sistemas de tratamento de efluentes, com vantagens sobre os convencionais como a redução no volume de lodo gerado, aumento da capacidade das estações e em processos de bioremediação de solo contaminado com fenol. Para melhor avaliar o potencial de aplicação da cultura mista MC, sugere-se a continuidade destes estudos através da:

- investigação do pH ótimo de crescimento;
- obtenção de parâmetros cinéticos no sistema em regime contínuo com controle de pH;
- avaliação da eficiência na degradação do fenol presente no efluente bruto e em solo contaminado.

A utilização do efluente do reator contínuo em regime permanente, pode ser um método alternativo para obtenção de inóculos com características semelhantes para realização de experimentos de regime descontínuo. Essa técnica poderá ser empregada para estudo comparativo com diferentes substratos, podendo-se avaliar alterações nos resultados com pouca interferência das condições iniciais.

Com os ensaios em regime descontínuo foi possível diferenciar etapas do enriquecimento no reator em regime contínuo e avaliar a influência do pH na degradação do fenol utilizando a cultura microbiana mista.

ABSTRACT

The aim of this work is to study the phenol degradation using selected microorganisms, obtained from direct isolating of contaminated water with phenolic compounds or from selective enrichment of mixed cultures in a continuous reactor. Isolated microorganisms are tested, selected due to the ability of degrading phenol in the presence of TSB (tryptic soy broth), about degradation of phenol in industrial effluent and in a synthetic medium with phenol as the only source of carbon and energy. Using a continuous reactor, the selective enrichment is performed, feeding with phenol as the sole source carbon and energy, achieving mixed cultures with great capability in metabolizing phenol. Tests for determining the kinetic parameters, evaluating the operational conditions and the behavior of the microbial cultures are carried out. Batch experiments are performed in order to investigate the steps of the selective enrichment of the continuous system and the pH influence in the phenol degradation. According to experimental results obtained, the mixed culture presents a great potential for application in bioremediation processes of contaminated soil with phenol and in the treatment of phenolic effluents with advantage when compared to conventional systems, such as the increase in capacity of stations of effluent treatment and the reduction in sludge production.

BIBLIOGRAFIA

AIBA, S. et al., Kinetics of Product Inhibition in alcohol Fermentation, **Biotechnol. Bioeng.**, 10, p. 845-864

ANDREWS, J. F., **Biotech. Bioeng.**, 10, p.707 (1968)

BARBOSA, T. C. P., Estudo de Cepas Acidofílicas Isoladas de Águas Residuárias de Minas de Carvão - Criciúma - SC - Relatório enviado ao CNPq, Nº 260137/93-8, 1993, 33p.

BALDI, F., SEMPLICI, F., FILIPPELLI, M., Environmental Applications of Mercury Resistant bacteria. **Water, Air and Soil Pollut.** 56, p.465-475 (1991)

BARTHOLOMEW, G. W., PFAENDER, F. K., Influence of Spatial and Temporal Variations on Organic Pollutant Biodegradation rates in an estuarine environment., **Appl. Environ. Microbiol.**, 45, p.103-109 (1983)

BELTRAME, P., BELTRAME, P. L., CARNITI, P., Influence of Feed Concentration on the Kinetics of Biodegradation of Phenol in a Continuous stirred Reactor, **Water Res.**, 18, p.403-407 (1984).

BELTRAME, P., BELTRAME, P. L., CARNITI, P., GUARDIONE, D., Inhibiting Action of Chlorophenols on Biodegradation of Phenol and Its Correlation with Structural Properties of Inhibitors, **Biotechnol. Bioeng.**, 31, p. 821-828 (1988).

BELTRAME, P., BELTRAME, P. L., CARNITI, P., Lipophilic and Eletrophilic Factors in the Inhibiting Action of Substituted Phenols on the Biodegradation of Phenol, **Chemosphere**, 17, pp. 235-242 (1989).

BREUSEGEM, V., BASTIN, G., Optimal Control of Biomass Growth in a Mixed Culture, **Biotechnol. Bioeng.**, 35, pp. 349-355 (1990).

BURBACK, B. L., PERRY, J. J., Biodegradation and Biotransformation of Grawundwater Pollutant Mixtures by *Mycobacterium vaccae*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 59, p.1025-1029 (1993)

CRUEGER, C., CRUEGER, A. *Biotechnology; A Textbook of Industrial Microbiology*. 2ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1989, 344p.

DAPAAH, S. Y. , HILL, G.A., Biodegradation of Chlorophenol Mixtures by *Pseudomonas putida*, **Biotechnol. bioeng.** , 40, pp. 1353-1358 (1992).

FURIGO Jr., AGENOR, Modelagem de Sistemas de Crescimento Microbianos, cap. 2, Exame de Qualificação ao Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, p. 5-54 (1990)

GODDRD, P., BULL, A. T., The Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Accumulating Silver, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 31, p. 308-313 (1989)

GRAY, N. F. *Biology of Wastewater Treatment*. New York: Oxford University Press, 1989, 828p.

HAVEL, J., REINEKR, W., Microbial Degradation of Chlorinated Acetophenones, **Appl. Environ. Microbiol.** 59, p.2706-2712 (1993)

HERBS, S. E., Rates of Microbial Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in water and sediments in the vicinity of a coal-coking wastewater discharge, **Appl. Environ. Microbiol.**, 41, p. 20-28 (1981)

HINTEREGGER, C., LEITNER, R., LOIDL, M., FERSCHL, A., STREICHSBIER, F., Degradation of Phenol and Phenolic Compounds by *Pseudomonas putida* EKII, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** , 37, p. 252-259 (1992).

HUTCHINSON, D. H., ROBINSON, C. W., Kinetics of the Simultaneous Batch Degradation of *p*-Cresol and Phenol by *Pseudomonas putida*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 29, p. 599-604 (1988).

JONES, G. L., CARRINGTON, C. G., Growth of Pure and Mixed Cultures of Microorganisms Concerned in the Treatment of Carbonization Waste Liquors, **J. Appl. Bact.** , 35, p. 395-404 (1971).

KARGI, F., Microbial Desulfurization of coal by Thermophilic Microorganism *Sulfolobus acidocaldarius*, **Biotechnol. Bioeng.**, 24, p. 2115-2121 (1986)

- KHOURY, N., DOTT, W., KÄMPFER, P., Anaerobic Degradation of Phenol in Batch and Continuous Culture by a denitrifying Bacterial Consortium, **Appl. Microbial Biotechnol.** 37, p. 524-528 (1992).
- KOROL, S., NATALE, P., MERETTON, J. SANTINI, P., AQUINO, M. Isolation and Characterization of a New p-Chlorophenol Degrading Strain of *Pseudomonas* from Samples of Natural Waters, **Rev. Microbiol.**, 22, p. 313-318 (1991)
- MENKE, B., REHM, H.J., Degradation of Mixtures of Monochlorophenols and Phenol as Substrates for Free and Immobilized cells of *Alcligenes sp. A7-2*, **Appl. Microbial. Biotechnol.** , 37, p. 655-661 (1992).
- MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures, **Ann. Rev. Microbiol.**, 3, p. 371-394 (1949)
- PAVLOV, S. , KEVREKIDIS, I.,G., On the Coexistense of Competing Microbial Species in a Chemostat Under Cycing, **Biotechnol. Bioeng.** , 35, pp. 224-235 (1990).
- RAIZER NETO, E. Amelhoration de la Stabilité de Fonctionement et des Performances des Stations D'épuration Biologique D'effuents de Coquerie. Nancy-France, ENSIC/INPL, 1991,130p. Tese Doutorado.
- SÁEZ, P. B., RITTMANN, B. E., Biodegradation Kinetics of 4-Chlorophenol, an Inhibitory Co-metabolite, **Research Journal WPCF**, 63, p. 838-847 (1991)
- SCHLEGEL, G. H., **General Microbiology**. 6ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1968, 587p.
- SCHÖBORN, W., **Biotechnology**, New York, VCH, 1986, vol. 8
- SHIMP, R. J. , PFAENDER, F. K., Effect of Adaptation to Phenol on Biodegradation of Monosubstituted Phenols by Aquatic Microbial Communities, **Appl. Environ. Microbiol.**, 53, p. 1496-1499 (1987).
- SPAIN, J., NISHINO, S. F., Degradation of 1,4-Dichlorobenzene by a *Pseudomonas sp.*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 53, p. 1010-1019 (1987)

SPIKER, J. K., CRAWFORD, L. D., THIEL, E. C., Oxidation of Phenolic and non-Phenolic Substrates by the Lignin Peroxidase of *Streptomyces viridosporus* T7A, **Appl. Microbial. Biotechnol.**, (1992).

VALLI, K., GOLD, M.H., Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, **J. Bacteriol.** , 173, p.345-352 (1991).

YANG, R. D., HUMPHREY, A. E. , Dynamic and Steady State Studies of Phenol Biodegradation in Pure and Mixed Cultures, **Biotechnol. Bioeng.** , 17, p. 1211-1235 (1975).

APÊNDICE

Tabela 5 - Dados da evolução da DQO para uma concentração inicial de 12700 mg/l, apresentados na Figura 7

tempo (dias)	DQO (mg/l) * 1000		
	cepa 185	cepa 103	branco
0	12,67	-	-
2	11,90	11,90	11,33
3	-	11,33	-
4	11,86	11,86	11,26
7	-	-	11,66
9	11,66	11,66	11,26
10	10,37	10,67	10,87
11	10,28	10,87	9,88

Tabela 6 - Dados de crescimento da biomassa apresentados na Figura 8

tempo (dias)	ABS (nm)		
	cepa 103	cepa 185	branco
0	0,275	0,281	-
2	0,348	0,378	0,262
3	0,263	0,282	0,230
4	0,212	0,219	0,172
7	0,240	0,272	0,230
8	0,239	0,257	0,201
10	0,293	0,326	0,239
11	0,283	0,314	0,240

Tabela 7 - Dados da evolução da DQO para uma concentração inicial de 8000 mg/l, representados na Figura 9

tempo (dias)	DQO (mg/l) * 1000		
	cepa 103	cepa 185	branco
0	7,90	7,90	8,50
3	8,10	7,31	7,90
4	7,11	5,93	6,32
5	6,92	6,13	6,13
6	6,32	5,93	5,73
7	6,32	-	5,93
10	4,74	5,34	4,54
12	4,25	4,35	4,54
17	4,04	4,35	4,04
20	3,31	3,03	3,31

Tabela 8 - Dados de crescimento da biomassa apresentados na Figura 10

tempo (dias)	ABS (nm)		
	cepa 103	cepa 185	branco
3	0,380	0,490	0,352
4	0,417	0,573	0,447
5	0,419	0,590	0,466
6	0,442	0,594	0,468
7	0,429	0,545	0,435
10	0,480	0,593	0,486
11	0,493	0,609	0,483
12	0,522	0,614	0,484
13	0,530	0,607	0,480
14	0,475	0,592	0,482
17	0,459	0,616	0,535
18	0,459	0,628	0,529
20	0,440	0,662	0,527

Tabela 9 - Dados da evolução da DQO para uma concentração inicial de 5000 mg/l, apresentados na Figura 11

tempo (dias)	DQO (mg/l) * 1000		
	cepa 103	cepa 185	branco
5	5,50	3,26	4,68
7	5,70	3,66	4,28
10	2,63	2,02	3,43
11	2,31	2,10	3,64

Tabela 10 - Dados de crescimento da biomassa apresentados figura 12

tempo (dias)	ABS (nm)		
	cepa 103	cepa 185	branco
5	0,225	0.23	0.126
7	0,214	0.225	0.179
10	0,199	0.27	0.191
11	0,213	0.253	0.183

Tabela 11 - Dados da evolução de fenóis para uma concentração inicial de 400 mg/l, representados pela Figura 13

tempo (dias)	FENOL (mg/l)		
	cepa 103	cepa 185	branco
5	373	344	334
7	288	255	272
10	245	252	229
11	123	16	179

Tabela 12 - Dados da evolução da DQO para uma concentração inicial de 1470 mg/l, representados na Figura 14

tempo (dias)	DQO (mg/l)	
	cepa 103	cepa 185
0,0	1370	1470
0,5	3580	2520
3,0	7570	8210
5,0	840	950
7,0	890	790
9,0	840	840
12,0	530	320
13,0	740	100
14,0	630	-

Tabela 13 - Dados de crescimento da biomassa, apresentados na Figura 15

tempo (dias)	ABS (nm)	
	cepa 103	cepa 185
0,0	0,030	0,045
0,5	0,036	0,048
1,0	0,029	0,042
2,0	0,026	0,044
3,0	0,031	0,047
5,0	0,023	0,043
6,0	0,030	0,052
7,0	0,027	0,082
9,0	0,045	0,063
12,0	0,015	0,068
13,0	0,020	-

Tabela 14 - Dados da evolução da concentração do fenol, representados na Figura 16

tempo (dias)	FENOL (mg/l)	
	cepa 103	cepa 185
0,0	351	370
0,5	315	372
1,0	334	377
2,0	360	379
3,0	363	370
5,0	339	341
6,0	322	337
7,0	332	332
9,0	298	267
12,0	286	75
13,0	257	8
14,0	262	-

Tabela 15 - Evolução da concentração do fenol, empregando microorganismos de cultura pura representados na Figura 17

tempo (horas)	FENOL (mg/l)			
	branco	cepa 304	cepa 103	cepa 185
0,0	408	425	439	428
16,5	389	293	392	385
24,5	-	224	406	406
39,5	401	151	389	346
68,0	393	31	355	288
92,0	299		295	276
116,0	234		247	140

Tabela 16 - Dados da evolução da concentração de fenol, representados na Figura 18

tempo (horas)	FENOL (mg/l)	
	branco	c. mista
0,0	408	401
16,5	389	217
24,5	-	80
39,5	401	12
68,0	393	

Tabela 17 - Dados da evolução da concentração do fenol para várias concentrações iniciais do experimento VI.

tempo (horas)	CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL (mg/l)				
	1000	800	600	400	200
0	972	791	564	379	182
16	869	648	496	236	14
25	845	640	510	246	0
46	766	578	486	230	
65	658	504	383	224	

Tabela 18 - Dados da evolução da concentração do fenol e biomassa no reator contínuo, representados na Figura 19

tempo (horas)	massa Seca (mg/l)	fenol experimental (mg/l)	fenol estimado (mg/l)	DQO (mg/l)
0	231	0	0	0
26	175	13	72	40
48	-	58	119	130
73	200	96	165	240
91	167	150	-	-
97	133	162	216	530
115	100	214	257	660
121	67	225	270	580
139	67	225	305	640
145	100	262	315	680
163	100	228	344	620
169	125	219	352	600
193	100	265	352	680
217	75	318	381	800
241	50	375	407	900

Tabela 19 - Dados da evolução da concentração do fenol e biomassa no reator contínuo, apresentados na Figura 20a

tempo (horas)	massa seca (mg/l)	fenol (mg/l)	DQO (mg/l)
0	239	0	0
6	-	13	80
20	-	17	70
40	100	0	70
57	100	0	110
82	67	0	50
102	133	1	50
126	-	0	50
150	67	0	60
174	67	0	50
198	100	0	90
222	67	0	20
246	100	0	20
255	130	0	20
270	127	0	20
279	130	0	20
294	105	3	20
303	58	4	80
320	130	8	50

Tabela 20 - Condições de operação do reator contínuo com reciclo, representadas na Figura 5

tempo (horas)	vazão de entrada (ml/min)	vazão de reciclo (ml/min)	fenol na entrada (mg/l)
0,0	0,34	1,00	500
29,5	0,34	1,00	500
30,0	0,51	1,60	500
103,0	0,51	1,60	500
103,5	0,68	2,00	500
198,0	0,68	2,00	500
199,0	0,83	2,40	500
254,0	0,83	2,40	500
255,0	0,52	1,60	800
293,0	0,52	1,60	800
293,5	0,72	2,20	800
320,0	0,72	2,20	800

Tabela 21 - Dados da evolução da concentração do fenol e biomassa no reator contínuo, apresentados na Figura 21a

tempo (dias)	massa seca (mg/l)	fenol (mg/l)	DQO (mg/l)
0,00	227	0	28
1,17	220	0	37
2,17	203	0	37
3,17	245	0	65
3,92	223	1	46
4,25	-	0	-
5,25	220	0	81
6,25	245	0	61
7,25	270	0	92
7,63	290	0	61
8,29	302	0	51
9,33	405	0	51
10,25	-	0	51
12,25	508	0	81
13,25	558	0	41
14,50	600	0	-
14,58	-		51
18,58	-		-
19,58	750	0	-
20,58	677		81
21,54	732		112
22,63	477	378	1040
23,54	215	795	-

Tabela 22 - Condições de operação do reator contínuo sem reciclo, representadas na Figura 6

tempo (dias)	retenção hidraulica (horas)	fenol na entrada (mg/l)
0,00	54	800
1,17	54	800
2,17	54	800
3,17	54	800
3,92	54	800
4,25	54	800
5,25	54	800
6,25	54	800
7,25	54	800
7,25	54	1200
7,63	54	1200
8,29	54	1200
9,33	54	1200
10,25	54	1200
12,25	54	1200
13,25	54	1200
14,50	54	1200
14,58	26	1200
18,58	26	1200
18,58	19	1200
19,58	19	1200
20,58	19	1200
21,54	19	1200
22,63	19	1200
23,54	19	1200

Tabela 23 - Dados da evolução da concentração do fenol e DQO, representados na Figura 22

tempo (horas)	fenol (mg/l)	DQO (mg/l)
0,0	538	1326
3,0	454	1122
4,5	-	969
6,0	393	867
7,5	366	816
10,5	337	696
20,5	202	530
22,5	190	489
24,5	173	408
27,0	122	326
30,0	34	204
34,0	0	122
45,0	0	102

Tabela 24 - Dados da evolução da concentração do fenol, representados na Figura 23

tempo (horas)	fenol (mg/l)	pH
0,0	524	6
1,0	-	6
1,5	522	-
2,0	494	-
2,5	440	-
3,0	468	-
4,0	446	-
8,0	443	-
11,5	403	5
14,0	339	4
17,0	325	-
25,5	118	3
27,0	74	3

Tabela 25 - Dados da evolução da concentração do fenol, representados na Figura 24

tempo (horas)	fenol (mg/l)	pH
0,0	470	7
0,5	454	7
1,5	423	-
2,0	423	7
2,5	416	-
3,0	416	-
5,0	320	7
5,5	286	-
6,0	236	6
6,5	207	-
7,0	169	6
7,5	132	-
8,0	89	-
8,5	40	-
9,0	0	5

Tabela 26 - Dados da evolução da concentração do fenol no reator descontínuo, representados na Figura 25

tempo (horas)	fenol (mg/l)	pH
0,0	593	-
0,5	593	-
1,0	566	3
1,5	545	-
2,0	524	-
2,5	500	-
3,0	478	3
3,5	437	-
4,0	425	-
4,5	413	-
5,0	399	-
5,5	-	-
6,0	339	2
6,5	277	-
7,0	217	-
8,0	126	-
9,0	39	2
10,0	0	-

LISTA DE FIGURAS

1	Modelo de curva do crescimento microbiano.	7
2	Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade específica de crescimento.	13
3	Esboço do reator de mistura contínuo com aeração.	29
4	Esboço do reator de mistura contínuo com aeração e reciclo de biomassa.	30
5	Dados de concentração de fenol na alimentação e tempo de retenção hidráulico (TRH) do reator contínuo com reciclo.	31
6	Dados de concentração de fenol na alimentação e tempo de retenção hidráulico (TRH) do reator contínuo sem reciclo.	32
7	Evolução da DQO para concentração inicial de 12600 mg/l.	36
8	Evolução do crescimento da biomassa.	37
9	Evolução da DQO para uma concentração inicial de 8000 mg/l.	37
10	Evolução do crescimento da biomassa.	38
11	Evolução da DQO para uma concentração inicial de 6000 mg/l.	39
12	Evolução do crescimento da biomassa.	39
13	Evolução de fenóis para uma concentração inicial de 420 mg/l.	40
14	Evolução da DQO durante a biodegradação do fenol.	41
15	Evolução do crescimento da biomassa.	42
16	Evolução da concentração de fenol.	42
17	Evolução da concentração do fenol empregando microorganismos de cultura pura.	43