

Vódice Amoroz Feisther

**CINÉTICA DA BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS  
BENZENO, TOLUENO E XILENO EM LODO AERÓBIO  
UTILIZANDO BIOFILME.**

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-graduação em  
Engenharia Química da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química.

Orientador: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Selene Maria de  
Arruda Guelli Ulson de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Antônio  
Augusto Ulson de Souza.

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Feisther, Védice Amoroz

CINÉTICA DA BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BENZENO, TOLUENO  
E XILENO EM LODO AERÓBIO UTILIZANDO BIOFILME. [dissertação]  
/ Védice Amoroz Feisther ; orientador, Selene Maria de  
Arruda Guelli Ulson de Souza ; co-orientador, Antônio  
Augusto Ulson de Souza. - Florianópolis, SC, 2013.

218 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Biodegradação. 3. Tolueno. 4. o-  
Xileno. I. Guelli Ulson de Souza, Selene Maria de Arruda .  
II. Ulson de Souza, Antônio Augusto. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química. IV. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e meus queridos pais.







## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e acima de tudo a Deus, por ter me dado vida, saúde e estas oportunidades, por ininterruptamente me oferecer força, coragem e esperança para seguir adiante em busca de superação e conquistas.

Ao Programa de Pós-graduação, CPGENQ, da UFSC.

Ao Instituto Brasileiro do Petróleo – IBP, PRH N°009, pelo apoio financeiro e pelo incentivo durante esses dois anos.

Aos professores, em especial à orientadora, Professora Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza e ao coorientador Professor Antônio Augusto Ulson de Souza, pelos conhecimentos transmitidos, pela orientação, confiança e credibilidade empregada e principalmente pelas oportunidades fornecidas e pelo carinho com o qual fui sempre tratado.

Aos meus pais, Clóvis e Valise, meu irmão Janquiel, minha irmã Lyandra ao Gino e a Michelle, pelo amor, ajuda, apoio nos momentos difíceis, incentivo, atenção, carinho, paciência, preocupação, compreensão, confiança e entusiasmo que me proporcionaram alento para a realização e conclusão deste trabalho.

À doutoranda e Heloísa Fernandes e à mestranda Karina Cescal, que me auxiliaram nas análises de identificação das bactérias.

À professora Josiane Maria Muneron de Mello, pela sua atenção constante, sua grande disponibilidade e pela enorme ajuda no desenvolvimento de todo o trabalho, sempre disposta a propor soluções, comentando e criticando nos momentos necessários, um exemplo de profissionalismo e uma pessoa maravilhosa.

À Professora Daniela Estelita Goes Trigueiros, pela ajuda, comprometimento, envolvimento e pelas ilustres ideias apresentadas, extremamente importantes na realização deste projeto.

Aos meus amigos, familiares e a todos os colegas que entenderam as minhas ausências, animaram-me em muitos momentos e tentaram me ajudar sempre, estando desde o início ao meu lado nos melhores e piores momentos.

Aos colegas do LABSIN-LABMASSA em especial à bolsista Marthina Wagener Jonck e Thiago Batisa, pelo companheirismo nos bons e maus momentos e agradável convívio que me proporcionaram a amizade compartilhada.

Agradeço Ao Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, ao

Laboratório FLUORBEG da UFSC, ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC e principalmente ao LABMASSA que me proporcionou espaço e infraestrutura para completar meu trabalho.

E finalmente agradeço a todos que se envolveram e me ajudaram para que este trabalho fosse realizado.



“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber”

(Confucio)







## RESUMO

Os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, coletivamente conhecidos como BTEX são compostos tóxicos presentes em derivados de petróleo, como a gasolina, e utilizados em larga escala nas indústrias químicas e petroquímicas. Estes compostos quando liberados no meio ambiente contaminam o solo e as águas subterrâneas, podendo inviabilizar a exploração de aquíferos, que atualmente representam uma fonte alternativa de água potável. Dessa forma, é fundamental a pesquisa de processos de biodegradação, particularmente quando múltiplos substratos estão presentes no sistema. Neste trabalho investigou-se a cinética de biodegradação dos compostos BTX, individualmente e em mistura. Para tanto, foi avaliado o desempenho de diversos modelos não-estruturados de crescimento microbiano, utilizando dados experimentais. As equações do balanço material em operação batelada foram numericamente resolvidas aplicando os modelos de Monod e Andrews à cinética de biodegradação individual dos substratos. Igualmente, as equações aplicadas à cinética de biodegradação da mistura BTX foram resolvidas considerando os modelos de inibição competitiva, acompetitiva e não-competitiva, bem como o modelo soma cinética dos parâmetros de interação (*sum kinetic interactions parameters* – SKIP). Os parâmetros cinéticos foram estimados por meio de um método de otimização global conhecido como Enxame de Partículas (Particle Swarm Optimization – PSO), implementado no *software Maple*<sup>®</sup> 14. Além disso, também foi realizada a identificação das bactérias presentes no lodo *in natura*, lodos adaptados (batelada e fluxo contínuo), o teste de toxicidade e analisada a influência dos parâmetros diâmetro de partícula, concentração de glicose e substrato (BTX) na biodegradação dos BTX. Foi utilizado lodo aeróbio de estação de tratamento sanitário como fonte de micro-organismos. As leituras de concentração de BTX foram realizadas em HPLC. Através das análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia ótica de contrastes de fundo escuro observou-se uma abundância em micro-organismos presentes e uma adequada formação de biofilme. Observou-se que o gênero *Pseudomonas* foi encontrado no lodo adaptado, o que indica que este gênero possui afinidade aos substratos BTX. A biodegradação individual dos substratos tolueno e o-xileno foram adequadamente representados pelos modelos de Monod e Andrews, onde foi observado que o tolueno apresentou maior facilidade de degradação quando comparado ao xileno. Com respeito aos modelos de degradação multicomponente, para a associação tolueno-xileno, o

modelo SKIP proporcionou a melhor representação da cinética para a associação bicomponente TX, pois além de apresentar um ótimo ajuste aos dados experimentais também mostrou o menor valor de função objetivo, quando comparado aos modelos de inibição. Na avaliação das variáveis na biodegradação monocomponente e bicomponente, o diâmetro de partícula apresentou diferença significativa ao nível de 95% de confiança, seguido pelo substrato utilizado, sendo que pela avaliação a concentração de glicose não apresentou diferença significativa. Quando se avaliou a associação tricomponente, o modelo de inibição acompetitiva apresentou o menor valor de função objetivo, no entanto, nenhum dos modelos pode ser descartado para as interações multicomponentes, visto a pequena diferença dos valores de função objetivo. Os parâmetros cinéticos encontrados para as associações multicomponentes coincidem com valores encontrados na literatura. Dessa forma, os resultados alcançados neste trabalho mostram que todos os modelos avaliados podem ser aplicados com sucesso na avaliação e otimização de processos biodegradativos de compostos tóxicos.

**Palavras-chave:** Biodegradação. Tolueno. O-Xileno. Benzeno.

## ABSTRACT

The monoaromatic hydrocarbons benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes, collectively known as BTEX are toxic compounds present in petroleum products such as gasoline, and used extensively in chemical and petrochemical industries. These compounds when released into the environment contaminate soil and groundwater and may derail the exploitation of aquifers, which currently represent an alternative source of drinking water. Thus, it is essential to search for biodegradation processes, particularly when multiple substrates are present in the system. In this study we investigated the kinetics of biodegradation of BTX, individually and in combination. Therefore, we evaluated the performance of several models unstructured microbial growth, using experimental data. The material balance equations for batch operation were numerically solved by applying the biodegradation kinetics models of Andrews and Monod for individual substrates. Likewise, the equations applied to the biodegradation kinetics of the BTX mixture were resolved considering models for competitive, non-competitive and acompetitive inhibition and the model of sum interactions kinetic parameters - SKIP. The kinetic parameters were estimated using a global optimization method known as Particle Swarm (Particle Swarm Optimization - PSO), implemented in Maple<sup>®</sup> 14 software. Furthermore, analysis were also conducted to identify the bacteria present in the *in natura* sludge, sludge adapted (batch and continuous flow), and the toxicity test. It was also investigated the influence of the particle diameter, concentrations of glucose and substrate (BTX) in the biodegradation of BTX. It was used aerobic sludge from treatment plant as source of microorganisms. The concentration values were performed in HPLC. Through the analysis of scanning electron microscopy and optical microscopy contrast of dark background there was an abundance of microorganisms present and adequate biofilm formation. It was investigated that the *Pseudomonas* was found in sludge adapted, which indicates that this microorganism has affinity to substrates BTX. The biodegradation of individual substrates, toluene and o-xylene, was adequately represented by Andrews and Monod models, which revealed that toluene was easier to degradation when compared to o-xylene. With respect to multicomponent degradation models for the association toluene-o-xylene, the SKIP model provided the best representation of the kinetics for the TX bicomponent association, as well as presenting a good fit to experimental data. It also showed the lowest value of the objective

function compared to models of inhibition. In the evaluation of the variables in monocomponent and bicomponent biodegradation, the particle diameter presented significant difference at 95%, followed by substrate. The glucose concentration was not significantly different. When we assessed the tricomponent association, the inhibition model uncompetitive showed the lowest value of the objective function, however, none of the models can be discarded for multicomponent interactions, due to the small difference in the values of objective function. The kinetic parameters found for multicomponent associations coincide with values reported in the literature. Thus, the results obtained in this work showed that the models can be successfully applied in the evaluation and optimization of biodegradation processes of toxic compounds.

**Keywords:** Biodegradation. Toluene. O-xylene. Benzene.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1 - Hidrocarbonetos monoaromáticos derivados do petróleo mais conhecidos (TRIGUEROS, 2008).</b>	<b>38</b>
<b>Figura 2.2 - Distribuição de oxigênio em um floco de lodo ativado (FREIRE et al., 2000).</b>	<b>60</b>
<b>Figura 2.3: Trajetória de uma partícula do algoritmo PSO.</b>	<b>74</b>
<b>Figura 2.4: Algoritmo PSO.</b>	<b>76</b>
<b>Figura 3. 1 – (a) Biomassa na ETE; (b) Amostra coletada em um frasco de 5 L.</b>	<b>82</b>
<b>Figura 3.2 – Biorreatores usados para biodegradação de BTX.</b>	<b>82</b>
<b>Figura 3.3 – Aparato experimental para determinação da concentração de tolueno e o-xileno em fluxo contínuo.</b>	<b>83</b>
<b>Figura 3.4 – Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado nos experimentos.</b>	<b>86</b>
<b>Figura 3.5 – Shaker utilizado para agitação dos biorreatores em batelada.</b>	<b>89</b>
<b>Figura 3.6 – Esquema representativo do processo adaptativo dos biorreatores na concentração de 1000 mg/L de glicose.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 3.7 – Esquema representativo do processo adaptativo dos biorreatores na concentração de 100 mg/L de glicose e ausência de glicose.</b>	<b>91</b>
<b>Figura 3.8 - Aparato experimental utilizado para realização das cinéticas de biodegradação dos compostos BTX.</b>	<b>93</b>
<b>Figura 3.9 – Reator em fluxo contínuo (coluna) usada para biodegradação dos compostos BTX.</b>	<b>95</b>
<b>Figura 4.1 - Micrografias do carvão ativado vegetal de casca de coco com e sem biofilme aderido.</b>	<b>103</b>
<b>Figura 4.2 – Microscopia ótica de contraste de fundo escuro dos lodos in natura e adaptados.</b>	<b>105</b>
<b>Figura 4.3 – Gel do DGGE para as três amostras analisadas, sendo que a Banda 1 corresponde a Amostra 1; Banda 2: Amostra 2 e; Banda 3: Amostra3.</b>	<b>106</b>
<b>Figura 4.4 – Cromatograma obtido no sequenciamento de uma bactéria.</b>	<b>107</b>
<b>Figura 4.5 – Efeito do diâmetro nos compostos tolueno e xileno.</b>	<b>124</b>

<b>Figura 4.6 – Efeito do composto em diferentes níveis de glicose.</b>	<b>124</b>
<b>Figura 4.7 – Efeito da glicose nos diâmetros.</b>	<b>125</b>
<b>Figura 4.8 – Efeito do diâmetro na glicose.</b>	<b>125</b>
<b>Figura 4.9 – Efeito da glicose nos compostos.</b>	<b>126</b>
<b>Figura 4.10 – Efeito do diâmetro nos compostos tolueno e xileno.</b>	<b>133</b>
<b>Figura 4.11 - Efeito do composto em diferentes níveis de glicose.</b>	<b>134</b>
<b>Figura 4.12 – Efeito da glicose nos diâmetros.</b>	<b>134</b>
<b>Figura 4.13 – Efeito do diâmetro na glicose.</b>	<b>135</b>
<b>Figura 4.14 – Efeito da glicose no substrato.</b>	<b>135</b>
<b>Figura 4.15 – Efeito dos substratos no diâmetro.</b>	<b>138</b>
<b>Figura 4.16 – Influência da vazão para cada composto.</b>	<b>141</b>
<b>Figura 4.17 – Comportamento de cada substrato de acordo com a vazão aplicada.</b>	<b>141</b>
<b>Figura 4.18 – Efeito das vazões de 1, 3, 5 e 10 mL/min sobre o Tolueno e Xileno.</b>	<b>142</b>
<b>Figura 4.19 – associação tolueno e xileno, efeito da vazão e do composto.</b>	<b>143</b>
<b>Figura AB.1 – Cromatograma no sistema CIS/SCAN dos efluentes tolueno e xileno coletados na saída da coluna.</b>	<b>199</b>
<b>Figura AB.2 – Cromatograma no sistema CIS/SCAN do efluente de tolueno coletado na saída da coluna.</b>	<b>200</b>
<b>Figura AB.3 – Cromatograma no sistema CIS/SCAN do efluente de xileno coletado na saída da coluna.</b>	<b>201</b>
<b>Figura AB.4 – Cromatograma no sistema CIS/SCAN da amostra branco de tolueno e xileno.</b>	<b>201</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1 – Comportamento do composto tolueno ao longo do comprimento da coluna em diferentes vazões.	139
Gráfico 4.2 – Comportamento do composto o-xileno ao longo do comprimento da coluna em diferentes vazões.	140
Gráfico 4.3 – Comportamento dos compostos tolueno e o-xileno ao longo do comprimento da coluna em diferentes vazões.	140
Gráfico B.1 – Curva de calibração da albumina bovina.	187
Gráfico AA.1 – Cinética de pseudo-segunda ordem do carvão ativado de 17 cm.	196
Gráfico AA.2 – Cinética de pseudo-primeira ordem de carvão ativado de 17 cm.	196
Gráfico AA.3 – Cinética pseudo-segunda ordem do carvão ativado de 24 cm.	197
Gráfico AA.4 – Cinética de pseudo-primeira ordem do carvão ativado de 24 cm.	197
Gráfico AC.1 – Curva de calibração para o benzeno.	203
Gráfico AC.2 – Curva de calibração para o tolueno.	204
Gráfico AC.3 – Curva de calibração do o-xileno.	205
Gráfico AD.1 - Curva de DQO.	208
Gráfico AE.1 – Isoterma de adsorção Tolueno, 24 cm.	211
Gráfico AE.2 – Isoterma de adsorção o-Xileno, 24 cm.	211
Gráfico AE.3 – Isoterma de adsorção Tolueno, 17 cm.	212
Gráfico AE.4 – Isoterma de adsorção o-Xileno, 17 cm.	212
Apêndice A – Gráficos experimentais das cinéticas e dos modelos de Monod, Andrews, Inibição Competitiva, Acompetitiva, Não-Competitiva e SKIP	166



## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas dos compostos BTX presentes no petróleo.	39
Tabela 2.2 - Parâmetros físicos químicos de importância para a mobilidade de hidrocarbonetos.	41
Tabela 2.3 - Valores de intervenção para os BTX, de acordo com a portaria N° 518, de 25 de março de 2004.	42
Tabela 2.4 – Proteína, atividade enzimática e micro-organismos heterotróficos três colunas submetidas a diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	47
Tabela 2.5 – Micro-organismos envolvidos na biodegradação de poluentes monoaromáticos.	57
Tabela 2.6 – Modelos cinéticos biodegradativos para único substratos	66
Tabela 2.7 – Modelos cinéticos biodegradativos para múltiplos substratos.	68
Tabela 3.1 – Composição do meio mineral para desenvolvimento dos Micro-organismos.	81
Tabela 3.2 – Combinações monocomponentes, bicomponentes e tricomponentes para as cinéticas de biodegradação dos compostos BTX.	93
Tabela 3.3 – Pontos de leitura da coluna de biodegradação ao longo de seu comprimento.	94
Tabela 4.1 – Percentual de similaridade baseado no alinhamento do gene RNAr 16S do Domínio <i>Bacteria</i> do lodo obtido da Casan – Inóculo.	108
Tabela 4.2 – Percentual de similaridade baseado no alinhamento do gene RNAr 16S do Domínio <i>Bacteria</i> da amostra de biofilme presente na coluna.	108
Tabela 4.3 – Percentual de similaridade baseado no alinhamento do gene RNAr 16S do Domínio <i>Bacteria</i> da amostra de biofilme presente no biorreator em batelada.	109
Tabela 4.4 – Resultados do teste de toxicidade aguda.	111
Tabela 4.5 – Descrição e símbolo dos parâmetros cinéticos avaliados pelos modelos de Monod e Andrews.	112

<b>Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos e tempo para as cinéticas monocomponente do tolueno e xileno com variação na concentração de glicose diâmetro de partícula para o modelo de Monod.</b>	<b>114</b>
<b>Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos para as cinéticas monocomponente para tolueno e xileno com variação na concentração de glicose e diâmetro de partícula (D) para o modelo de Andrews.</b>	<b>115</b>
<b>Tabela 4.8 – Razão entre as constantes <math>K_s/K_i</math>, taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica de substrato.</b>	<b>118</b>
<b>Tabela 4.9 – Resumo da cinética de crescimento bacteriano obtida em vários estudos de biodegradação dos compostos benzeno (B), tolueno (T), etilbenzeno (E), xileno (X) e fenol (F).</b>	<b>120</b>
<b>Tabela 4.10 - Quadro de ANOVA para a resposta tempo na biodegradação monocomponente.</b>	<b>123</b>
<b>Tabela 4.11 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação dos compostos TX.</b>	<b>128</b>
<b>Tabela 4.12 - Valores dos parâmetros cinéticos estimados para os compostos TX aplicando o modelo SKIP.</b>	<b>129</b>
<b>Tabela 4.13 – Valores dos parâmetros interativos estimados para os compostos TX aplicando o Modelo SKIP.</b>	<b>130</b>
<b>Tabela 4.15 - Quadro de ANOVA para a resposta tempo na biodegradação bicomponente.</b>	<b>133</b>
<b>Tabela 4.16 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação dos compostos BTX.</b>	<b>136</b>
<b>Tabela 4.17 - Valores dos parâmetros cinéticos estimados para os compostos BTX aplicando o modelo de inibição incompetitiva.</b>	<b>137</b>
<b>Tabela 4.18 - Quadro de ANOVA para a resposta tempo na biodegradação tricomponente.</b>	<b>138</b>
<b>Tabela 4.19– Pontos da coluna de biodegradação e seus respectivos comprimentos.</b>	<b>139</b>
<b>Tabela 4.20 – Influência dos fatores vazão e composto na biodegradação em fluxo de tolueno e xileno individuais.</b>	<b>143</b>
<b>Tabela 4.21 – Influência dos fatores vazão e composto na biodegradação em fluxo contínuo para associação de tolueno e xileno.</b>	<b>143</b>

Tabela A.1 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 0 mg/L de glicose, Tolueno-o-Xileno e 17 cm.	179
Tabela A.2 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 100 mg/L de glicose, Tolueno-o-Xileno e 17 cm.	179
Tabela A.3 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 1000 mg/L de glicose, tolueno-o-xileno e 17 cm.	180
Tabela A.4 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 0 mg/L de glicose, tolueno-o-xileno e 24 cm.	181
Tabela A.5 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 100 mg/L de glicose, tolueno-o-xileno e 24 cm.	181
Tabela A.6 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 1000 mg/L de glicose, tolueno-o-xileno e 24 cm.	182
Tabela A.7 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 0 mg/L de glicose, benzeno, tolueno-o-xileno e 17 cm.	183
Tabela A.8 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 0 mg/L de glicose, benzeno, tolueno-o-xileno e 24 cm.	183
Tabela B.1 – Diluições da Albumina Bovina (BSA) para preparação da curva de calibração.	186
Tabela B.2 – Quantidade de proteína (mg/L) do carvão virgem, para os biorreatores em batelada, contínuo e em suspensão.	187
Tabela B.3 – Quantidade de proteínas por grama de suporte ( $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$ ).	188
Tabela C.1 – Reagentes e volumes utilizados na preparação das soluções desnaturantes.	192
Tabela AA.1 – Valores de $R^2$ dos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para ambos os diâmetros de partícula.	198
Tabela AC.1– Pontos da curva de calibração do benzeno.	203
Tabela AC.2 – Pontos da curva de calibração do tolueno.	204

<b>Tabela AC.3 – Pontos da curva de calibração do o-xileno.</b>	<b>204</b>
<b>Tabela AD.1 – Padrões preparados para a curva de calibração.</b>	<b>207</b>
<b>Tabela AD.2 – Pontos para construção da curva de calibração da Demanda Química de Oxigênio (DQO).</b>	<b>208</b>
<b>Tabela AD.3 – Valores de DQO (mg O<sub>2</sub>/L) das amostras antes e depois para cada reator.</b>	<b>209</b>
<b>Tabela AE.1 – Resumo dos dados experimentais e modelos das isotermas de adsorção.</b>	<b>213</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BTX	Benzeno, Tolueno e Xileno
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
F	Fenol
$I_{ij}$	Grau de inibição do substrato $i$ sobre o substrato $j$
$K_i$	Constante de inibição (mg/L)
$K_s$	Constante de saturação (mg/L)
$S_i$	Concentração do substrato $i$ (mg/L)
X	Concentração celular (mg/L <sup>-1</sup> )
$Y_{x/s}$	Fator de conversão para células (mg/mg)
17 cm	Diâmetro de partícula de 17 cm
24c m	Diâmetro de partícula de 24c m
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
PSO	<i>Particle Swarm Optimization</i>
(NV)	Número de variáveis de decisão do problema de Otimização
(NP)	Número de partículas pré-definido
$(\lambda_1 \text{ e } \lambda_2)$	Variáveis randômicas
$c_1$	Coefficiente cognitivo
$c_2$	Coefficiente social
K	Número previamente definido de iterações
$X^{\text{exp}}$	Valor experimental
$X^{\text{exp}*}$	Máximo valor experimental
$X^{\text{pred}}$	Valor predito pelo modelo
F.O.	Função objetivo
NP	Número de partículas
NV	número de variáveis
K	número de iterações
C1	constante de aceleração local do enxame de partículas
C2	constante de aceleração global do enxame de partículas
W	fator de inércia do enxame
DQO	Demanda Química de Oxigênio (mg O <sub>2</sub> /L)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FD	Fator de Diluição
SKIP	Sum kinetics interactions parameters
S*	Concentração do substrato em que $x_{\mu}$ atinge o valor
SGR	Máximo (mg/L)
	Taxa de crescimento específico (h <sup>-1</sup> )

- $(\mathbf{X}_i^{(k)})$  Posição atual da partícula
- $(\mathbf{X}_{i_{melhor}}^{(k)})$  Melhor posição visitada pela partícula
- $(\mathbf{X}_{g_{melhor}}^{(k)})$  Melhor posição visitada pelo enxame
- $(\mathbf{X}_i^{(k+1)})$  Vetor nova posição atualizada da partícula
- $(\mathbf{V}_i^{(k+1)})$  Vetor de velocidade das partículas
- $(\mathbf{X}_{i_{melhor}}^{(k)})$  Melhor solução individual ou local

## Letras Gregas

- $\mu_x$  Velocidade de crescimento específico ( $h^{-1}$ )
- $\mu_{m\acute{a}x}$  Velocidade máxima de crescimento específico ( $h^{-1}$ )
- $\mu_{xi}$  Velocidade de crescimento específico no substrato  $i$  ( $h^{-1}$ )
- $\mu^*$  Valor máximo de  $\mu$  quando a concentração é  $S^*$  ( $h^{-1}$ )
- $\omega$  Fator inercial

## **SUMÁRIO**

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>31</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
1.1.1 Objetivo Geral	32
1.1.2 Objetivos Específicos	32
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>33</b>
2.1 A indústria do petróleo	33
2.2 O petróleo	34
2.2.1 Processos de refino	35
2.2.2 Gerações de efluentes na indústria do petróleo	37
2.2.3 Efluentes líquidos em refinarias de petróleo e o meio ambiente	37
2.3 Compostos BTEX	38
2.3.1 Toxicidade	39
2.3.2 Toxicologia dos compostos BTX	40
2.4 Requisitos nutricionais dos biofilmes	43
2.5 Biofilmes	47
2.5.1 Definição	47
2.5.2 Composição e formação dos biofilmes	48
2.5.3 Benefícios da associação de biofilmes para as células	50
2.7 Biodegradação	52
2.7.1 Processos aeróbios	58
2.7.2 Processos anaeróbios	59
2.7.3 Sistemas combinados anaeróbio-aeróbios	59
2.8 Induções apropriadas das enzimas biodegradativas	60
2.9 Biorreatores	61
2.9.1 Biorreatores com Biomassa Aderida	62
2.9.2 Biorreatores com Biomassa em Suspensão	62
2.10 Modelos cinéticos de biodegradação	63
2.10.1 Classificação dos modelos cinéticos	63
2.10.2 Taxa de crescimento específico	63

<b>2.10.3 Modelos para único substrato</b>	<b>64</b>
<b>2.10.3.1 Modelo de Monod</b>	<b>64</b>
<b>2.10.3.2 Modelo de Andrews</b>	<b>67</b>
<b>2.10.4 Modelos para múltiplos substratos</b>	<b>68</b>
<b>2.10.4.1 Modelo de inibição competitiva</b>	<b>69</b>
<b>2.10.4.2 Modelo de inibição não competitiva</b>	<b>70</b>
<b>2.10.4.3 Modelo de inibição acompetitiva</b>	<b>70</b>
<b>2.10.4.4 Modelo SKIP</b>	<b>71</b>
<b>2.11 Procedimento para estimativa dos parâmetros</b>	<b>72</b>
<b>2.11.1 Otimização por Enxame de Partículas</b>	<b>72</b>
<b>2.11.2 Implementação do algoritmo</b>	<b>73</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>79</b>
<b>3.1 MATERIAL</b>	<b>79</b>
<b>3.1.1 Compostos orgânicos utilizados</b>	<b>79</b>
<b>3.1.2 Material suporte para Imobilização da biomassa – carvão Ativado</b>	<b>79</b>
<b>3.1.3 Solventes</b>	<b>80</b>
<b>3.1.4 Composição mineral do meio de cultura</b>	<b>80</b>
<b>3.1.5 Inóculo</b>	<b>81</b>
<b>3.1.6 Reatores</b>	<b>82</b>
<b>3.1.6.1 Reatores batelada</b>	<b>82</b>
<b>3.1.6.2 Reator em fluxo contínuo</b>	<b>83</b>
<b>3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>84</b>
<b>3.2.1 Concentração de oxigênio</b>	<b>84</b>
<b>3.2.2 pH</b>	<b>84</b>
<b>3.2.3 Análise de DQO</b>	<b>84</b>
<b>3.2.4 Caracterização Morfológica do carvão ativado e da biopartícula</b>	<b>85</b>
<b>3.2.5 Análises Cromatográficas</b>	<b>86</b>
<b>3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>87</b>
<b>3.3.1 Imobilização e adaptação da biomassa no suporte para o processo batelada</b>	<b>87</b>

<b>3.3.2 Adaptação da biomassa em biorreator tipo coluna</b>	<b>91</b>
<b>3.3.3 Obtenção da cinética de degradação</b>	<b>92</b>
<b>3.3.3.1 Cinéticas para o processo batelada</b>	<b>92</b>
<b>3.3.3.2 Cinéticas em fluxo contínuo</b>	<b>93</b>
<b>3.3.4 Teste de adsorção</b>	<b>95</b>
<b>3.3.5 Cinética de Adsorção</b>	<b>96</b>
<b>3.3.6 Isoterma de adsorção</b>	<b>96</b>
<b>3.3.7 Quantificação da biomassa</b>	<b>97</b>
<b>3.3.8 Caracterização microbiológica</b>	<b>97</b>
<b>3.3.8.1 Identificação dos micro-organismos – Análises de Biologia Molecular</b>	<b>97</b>
<b>3.3.9 Teste de Toxicidade</b>	<b>98</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>101</b>
<b>4.1 Microscopia eletrônica de varredura e microscopia ótica de contraste de fundo escuro</b>	<b>102</b>
<b>4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura - MEV</b>	<b>102</b>
<b>4.1.2 Microscopia ótica de contraste de fundo escuro</b>	<b>104</b>
<b>4.2 Análises de biologia molecular</b>	<b>105</b>
<b>4.3 Teste de toxicidade</b>	<b>110</b>
<b>4.4 Cinéticas de biodegradação dos compostos BTX</b>	<b>112</b>
<b>4.4.1 Cinéticas de biodegradação monocomponente</b>	<b>113</b>
<b>4.4.2 Avaliação dos modelos cinéticos para biodegradação individual dos substratos TX</b>	<b>113</b>
<b>4.4.3 Análise estatística dos substratos monocomponentes</b>	<b>123</b>
<b>4.4.4 Avaliação dos modelos cinéticos em multi-substratos</b>	<b>127</b>
<b>4.4.4.1 Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura tolueno e o-xileno</b>	<b>127</b>
<b>4.4.4.2 Análise de significância dos substratos bicomponentes (tolueno e o-xileno)</b>	<b>132</b>

<b>4.4.4.3 Avaliação dos modelos cinéticos na mistura dos substratos Benzeno, Tolueno e o-Xileno</b>	<b>136</b>
<b>4.4.4.4 Análise de significância dos substratos tricomponentes (benzeno, tolueno e o-xileno)</b>	<b>137</b>
<b>4.5 Cinéticas em fluxo contínuo</b>	<b>138</b>
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b>	<b>145</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>149</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>165</b>
<b>APÊNDICE A</b>	<b>166</b>
<b>APÊNDICE B</b>	<b>185</b>
<b>APÊNDICE C</b>	<b>191</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>195</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>196</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>199</b>
<b>ANEXO C</b>	<b>203</b>
<b>ANEXO D</b>	<b>207</b>
<b>ANEXO E</b>	<b>211</b>
<b>ANEXO F</b>	<b>215</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As indústrias petroquímicas são responsáveis pela geração de grandes quantidades de efluentes líquidos que são formados durante as etapas de produção, transporte e refino. Estes efluentes, na maioria das vezes, apresentam um elevado potencial de poluição, pois possuem uma grande variedade de compostos tóxicos. Estes compostos, mesmo em baixas concentrações, podem representar um sério risco ao meio ambiente e à saúde. Entre esses compostos pode-se destacar aqueles conhecidos por BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos). Estes compostos têm a capacidade de contaminar águas subterrâneas representando sérios problemas à saúde pública (LANÇAS *et al.*, 2001 apud MINATTI, 2009).

Com a atual preocupação da racionalização do uso de água e com as leis cada vez mais rigorosas para o descarte de efluentes industriais, tem-se a necessidade de melhorias nos sistemas de tratamento destes efluentes. A degradação biológica é citada como uma alternativa eficiente para a minimização das características tóxicas dos poluentes em efluentes aquosos. Muitos avanços na área de tratamento biológico de efluentes líquidos estão sendo alcançados através de processos que utilizam biofilmes suportados em materiais inertes particulados que, através da biodegradação, são capazes de degradar compostos tóxicos.

A escolha do processo de degradação biológica utilizando biomassa fixa se justifica, pois devido ao biofilme ser um ecossistema no qual coabitam muitas espécies de micro-organismos, onde as culturas aderidas tornam-se menos afetadas pelas condições ambientais (temperatura, pH, concentração de nutrientes, produtos metabólitos e substâncias tóxicas), possibilitando apresentar maior taxa de utilização do substrato em relação à massa livre.

O presente trabalho pretende contribuir com o desafio de mitigar a poluição de efluentes líquidos com compostos do grupo BTEX, gerados em grande escala pela indústria petroquímica, através da avaliação de diferentes modelos cinéticos, experimentos em fluxo contínuo, identificação de bactérias presentes no lodo aeróbio capazes de degradar os BTX e análises complementares de formação de biofilme, entre outras.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar a biodegradação de tolueno e o-xileno individuais, associados e misturados ao benzeno, para o processo em batelada e em fluxo contínuo, através da utilização de diferentes modelos cinéticos utilizando lodo aeróbio.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- (a) Avaliar os modelos de Monod, Andrews, para o processo biodegradativo monocomponente dos substratos tolueno e o-xileno, individuais e associados à glicose, para dois diâmetros de partícula de carvão ativado utilizado como suporte do biofilme;
- (b) Estudar a associação tolueno-xileno e benzeno-tolueno-xileno através da utilização dos modelos de inibição competitiva, inibição não competitiva, inibição acompetitiva e modelo SKIP para o processo biodegradativo em batelada;
- (c) Analisar através do método estatístico ANOVA e dos gráficos de efeitos a significância ao nível de 95% de confiança, de dois diâmetros de partícula de carvão ativado (17  $\mu$ m e 24  $\mu$ m), diferentes concentrações de glicose (ausência, 100 e 1000 mg/L) e dos substratos benzeno, tolueno e xileno;
- (d) Caracterizar as bactérias no lodo adaptado em batelada, adaptado em coluna e do lodo *in natura* da estação de tratamento de esgoto sanitário;
- (e) Examinar, para o processo em fluxo contínuo, diferentes vazões de alimentação e estimar o efeito provocado na biodegradação dos compostos tolueno e xileno;
- (f) Verificar a toxicidade dos efluentes gerados após a biodegradação dos compostos BTX, em batelada e para o efluente de BTX na vazão de 3 mL/min em fluxo contínuo, utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentado o levantamento bibliográfico abordando alguns aspectos fundamentais sobre um reator biológico com biofilme, utilizado em tratamento de efluentes líquidos, incluindo processos biológicos para tratamento de efluentes e formação do biofilme. Será dada ênfase a indústria petroquímica, bem como à geração de efluentes e à toxicidade dos compostos BTX.

### 2.1 A indústria do petróleo

A indústria nacional do petróleo tem uma importante participação na economia brasileira. Desde a descoberta do primeiro poço de petróleo em Lobato, na Bahia, em 1939, passando pela criação da PETROBRÁS em 1953, desenvolveu-se uma importante estrutura de exploração, produção, refino e distribuição de petróleo e derivados (MELLO, 2007).

Em 1995, o Brasil terminou com o monopólio legal sobre a produção, refino, importação e exportação de petróleo da Petrobras. A Petrobras é uma das maiores e economicamente mais importantes empresas no Brasil. Essa reforma levou a um aumento significativo no crescimento da produtividade desta empresa. Entre 1976 e 1994 a produtividade do trabalho (medida pelo óleo extraído por trabalhador) cresceu a uma média anual de 4,7%, enquanto que entre 1995 e 2001, o crescimento médio anual foi de 14,6%. Para conseguir estes resultados, a Petrobras reduziu o uso de insumos mantendo o crescimento da produção. Ela também começou a mudar a sua carteira de poços de petróleo para as regiões mais produtivas e mudou sua estrutura societária (BRIDGMAN *et al.*, 2011).

A produção de petróleo e gás natural no Brasil em janeiro de 2011 foi de aproximadamente 2.122 mil barris por dia e 66 milhões de m<sup>3</sup> por dia, respectivamente, totalizando em torno de 2.539 mil barris de óleo equivalente por dia. O campo de Roncador foi o maior produtor tanto de petróleo quanto de gás natural. Em janeiro de 2011 foi registrado um aumento de 6,3% se comparado ao mês de janeiro de 2010 e redução de aproximadamente 2,5% se comparado ao mês de dezembro de 2010 na produção de petróleo (ANP, 2011).

O refino do petróleo consiste na série de beneficiamentos pelos quais passa o mineral bruto, para a obtenção de derivados, estes sim, produtos de grande interesse comercial. Esses beneficiamentos englobam etapas físicas, e químicas de separação, que originam as

grandes frações de destilação. Estas frações são então processadas através de outra série de etapas de separação e conversão que fornecem os derivados finais do petróleo. Refinar petróleo é, portanto, separar as frações desejadas, processá-las e lhes dar acabamento, de modo a se obterem produtos vendáveis (NEIVA, 1983, apud MARIANO, 2001).

O principal objetivo dos processos de refinação é a obtenção da maior quantidade possível de derivados de alto valor comercial, ao menor custo operacional possível, com a máxima qualidade, minimizando-se ao máximo a geração de efluentes líquidos, gasosos e resíduos sólidos.

## 2.2 O petróleo

O petróleo se formou há milhões de anos, quando a matéria orgânica derivada de organismos marinhos e terrestres, e depositada em ambientes sedimentares, maturou-se pela ação de micro-organismos, calor e pressão.

O elemento mais importante e fundamental para a ocorrência de petróleo em quantidades significativas em uma bacia sedimentar, em algum tempo geológico passado ou presente, é a existência de grandes volumes de matéria orgânica de qualidade adequada acumulada quando da deposição de certas rochas sedimentares que são denominadas de geradoras. São estas rochas que, submetidas a adequadas temperaturas e pressões, geraram o petróleo em subsuperfície (MILANI *et al.*, 2000).

O petróleo pode ser classificado, de acordo com sua densidade relativa, em leve, médio e pesado. O petróleo considerado leve apresenta uma densidade inferior a  $0,82 \text{ g/cm}^3$ ; o médio apresenta densidade variando entre  $0,82 \text{ g/cm}^3$  e  $0,97 \text{ g/cm}^3$  e o pesado têm uma densidade superior a  $0,97 \text{ g/cm}^3$ . Com a crescente extração petrolífera, grandes desastres ecológicos estão diretamente relacionados ao petróleo e seus derivados liberados para o ambiente mediante acidentes durante a carga, descarga, transporte ou produção de subprodutos. Quando liberado na água, o petróleo espalha-se quase que imediatamente. Alguns componentes solubilizam-se e são lixiviados para fora da mancha de óleo; os componentes voláteis sofrem evaporação. Ao mesmo tempo, o óleo emulsifica-se em óleo-água ou água-óleo (VICTÓRIO, 2006).

O petróleo e seus derivados são substâncias que em contato com a água criam uma película bloqueadora à penetração de luz impedindo trocas gasosas e caracterizando mortalidade de animais e plantas que encontram na água as condições de manutenção biológica.

Mudanças na estrutura da comunidade local causadas por este tipo de perturbação ambiental podem ser manifestadas por meio de extinções de espécies, reduções ou aumento populacional, dependendo do grau de tolerância da espécie (COUCEIRO *et al.*, 2006).

A *American Society for Testing and Materials* (ASTM) define o petróleo como "uma substância de ocorrência natural, consistindo predominantemente de hidrocarbonetos e derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados e/ou oxigenados, a qual é, ou pode ser removida da terra no estado líquido. Está comumente acompanhado de compostos tais como água, matéria inorgânica e gases (PEDROZO *et al.*, 2002).

### **2.2.1 Processos de refino**

As refinarias de petróleo, assim como as demais indústrias de grande escala, são fontes potenciais de poluição ambiental devido à geração de grandes quantidades de resíduos durante as etapas de produção, transporte e refino (MORAIS, 2005).

De acordo com Neiva (1983), apud Mello (2007), o refino do petróleo compreende uma série de operações físicas e químicas interligadas entre si que garantem o aproveitamento pleno de seu potencial energético através da geração dos cortes, ou produtos fracionados derivados, de composição e propriedades físico-químicas determinadas. Refinar petróleo é, portanto, separar suas frações e processá-las, transformando-o em produtos de grande utilidade.

Durante o processo de refino do petróleo, são utilizados em média 246 a 340 litros de água por barril de óleo cru, gerando uma quantidade de água residuária em torno de 0,4 a 1,6 vezes o volume de óleo processado (FICA-PIRAS, 2000, apud SANTANELLA *et al.*, 2009).

Durante a transformação do material bruto em produtos tais como gasolina, querosene, lubrificantes, nafta, diesel etc., empregam-se para o refino, grande variedade de solventes com diferentes graus de solubilidade para extrair substâncias desejáveis (ALVA-ARGÁEZ; KOKOSSIS; SMITH, 2007; apud SANTANELLA *et al.*, 2009).

Essas atividades geram efluentes que apresentam grande diversidade de poluentes orgânicos e inorgânicos, incluindo compostos fenólicos, sulfetos, amônia, cianetos, hidrocarbonetos poliaromáticos e alifáticos que podem ser tóxicos para diversos organismos e potencialmente cancerígenos (ALAJBEG *et al.*, 2000; BARRON *et al.*, 1999; MARIANO, 2001; apud SANTAELLA *et al.*, 2009).

Mariano (2001) apresenta como objetivo básico de uma refinaria de petróleo: a produção de combustíveis, lubrificantes básicos, parafinas e matérias-primas petroquímicas. Relata ainda que, independentemente do objetivo do esquema de refino, as operações de uma refinaria podem ser divididas em três grupos de processos: Processos de Separação ou Refino; Processos de Conversão e Processos de Suporte.

Além disso, os processos de separação e refino são sempre de natureza física e tem por objetivo desmembrar o petróleo em suas frações básicas, ou processar uma fração previamente produzida, no sentido de retirar dela um grupo específico de compostos. Mariano (2001) apresenta as principais operações de separação encontradas em uma refinaria de petróleo são: dessalinização, destilação atmosférica, destilação à vácuo, desasfaltação a propano, desaromatização a furfural, desparafinação e desoleificação de parafinas.

Ainda de acordo com Mariano (2001), os processos de conversão visam transformar uma fração do petróleo em outra através de processos químicos. São processos que possuem elevada rentabilidade, pois transformam frações de baixo valor comercial, como é o caso do gasóleo e dos resíduos de destilação, em outras frações de maiores valores de mercado. Esses processos mudam a estrutura das moléculas dos hidrocarbonetos, através da quebra das mesmas em moléculas menores, ou da sua junção para a formação de moléculas maiores, ou mesmo do rearranjo delas em moléculas de melhor qualidade. O autor destaca ainda os principais processos de conversão utilizados no refino de petróleo são: craqueamento térmico, viscorredução, coqueamento, craqueamento catalítico, hidrocraqueamento catalítico, alquilação, hidrotratamento, isomerização, polimerização, reforma catalítica e processos de tratamento.

Já os processos de suporte são aqueles que se destinam a fornecer insumos à operação dos outros processos anteriormente citados, ou a tratar rejeitos desses mesmos processos. Mariano (2001) descreve alguns dos processos de suporte mais comuns, como tratamento de efluentes, tratamento de gás e recuperação de enxofre, produção de aditivos, limpeza dos trocadores de calor, tanques de estocagem e torres de resfriamento.

## 2.2.2 Gerações de efluentes na indústria do petróleo

Com o crescimento da consciência ambiental tem havido um aumento do valor atribuído aos recursos naturais e a necessidade de preservá-los é cada vez maior. A tendência é que o custo da água aumente e conseqüentemente eleve o custo do tratamento de efluentes devido às novas restrições sobre as descargas para o meio ambiente levou as indústrias a adotar programas que visem à minimização do consumo de água, e favorecendo, cada vez mais, o desenvolvimento de novas metodologias para a otimização desses recursos (GUELLI U. SOUZA *et al.*, 2006).

Uma operação ecologicamente correta reduz os custos de captação de água, mas aumenta o investimento em tecnologia e o valor dos insumos necessários, o que leva a um aumento no custo do tratamento fluxo aquoso.

Refinarias de petróleo consomem quantidades substanciais de água e, como conseqüência, geram grandes quantidades de efluentes líquidos. Estes efluentes variam em quantidade e qualidade de acordo com o tipo de petróleo processado, as unidades de processamento de que são compostos, e a forma em que estas unidades são operadas. O consumo de água em uma refinaria típico é de aproximadamente 1 m<sup>3</sup> de água para 1 m<sup>3</sup> de petróleo processados (BAGAJEWICZ, 2000).

Os poluentes tipicamente gerados incluem hidrocarbonetos voláteis, monóxido de carbono, óxido de enxofre, óxido de nitrogênio, material particulado, amônia, sulfeto de hidrogênio, metais e numerosos compostos orgânicos tóxicos (MARIANO, 2001).

## 2.2.3 Efluentes líquidos em refinarias de petróleo e o meio ambiente

O tratamento de águas residuárias em uma refinaria de petróleo é composto dos efluentes oriundos de várias unidades (tais como craqueamento, reformação, *topping*, e lubrificante) e contém substâncias tóxicas cujo descarte no meio ambiente pode resultar em graves conseqüências ambientais e danos ao ecossistema (WAKE, 2005).

O primeiro passo em uma planta típica de tratamento de águas residuárias é um tratamento primário em que através de uma combinação de processos de separação física e físico-químicas o óleo livre, sólidos em suspensão e materiais coloidais são removidos. No

entanto, estes processos não são capazes de remover o óleo emulsionado ou dissolvido, que são removidos no tratamento secundário.

Após o tratamento primário, normalmente ainda contém hidrocarbonetos alifáticos até  $C_{12}$  enquanto a fração de aromáticos inclui compostos como o etilbenzeno, tolueno, benzeno e (1-metiletil) benzeno, de acordo com Saien e Nejati (2007) e Stepnowski *et al.* (2002). De acordo com Stepnowski *et al.* (2002), após o tratamento mecânico e físico-químicos (coagulação, flotação), a matéria em suspensão e óleos e graxas nos efluentes tratados são reduzidas em cerca de 10% e 20-30%, respectivamente.

### 2.3 Compostos BTEX

Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTX, além de serem encontrados em derivados de petróleo, também são largamente utilizados em indústrias químicas como matérias-primas para síntese de outros produtos (RIBEIRO, 2005).

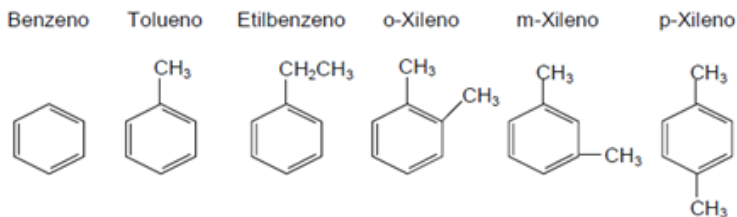


Figura 2.1 - Hidrocarbonetos monoaromáticos derivados do petróleo mais conhecidos (TRIGUEROS, 2008).

O benzeno é utilizado na produção de borrachas, plásticos, *Nylon*, pesticidas e tintas. O tolueno é um importante produto químico comercial usado geralmente como um agente de diluição de tintas e como solventes na produção de resinas, colas e óleos. Os xilenos geralmente são usados como solventes em borrachas e nos processos de tingimento de couro, além de serem utilizados na produção do anidrido ftálico, bactericidas, herbicidas, óleos lubrificantes e ácido *para*-ftálico (MINATTI, 2009).

Sabe-se que o benzeno é comprovadamente o composto mais tóxico de todos os BTX, pois se trata de uma substância carcinogênica e mutagênica, podendo causar leucemia, se ingerida mesmo em baixas concentrações durante períodos não muito longos de tempo. Uma

exposição a altas concentrações em curtos períodos, por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte (FERNANDES *et al.*, 2002).

O tolueno é um contaminante ambiental comum, encontrado em muitos locais de descarte de resíduos. Este é um depressor do sistema nervoso central e, mesmo em baixas concentrações, produz fadiga, fraqueza e confusão mental (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

O xileno também apresenta sérios riscos à saúde pública a exposição ao composto resulta no aparecimento de cefaleia, transtornos da visão, diminuição da coordenação, irritação no nariz e garganta; também pode causar dores de cabeça, náuseas e vômitos, além do cansaço e danos ao estômago. Altos níveis podem causar tonteiras, delírios, desmaios e até a morte (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

A Tabela 2.1 descreve as principais propriedades físico-químicas dos compostos BTX presentes no petróleo.

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas dos compostos BTX presentes no petróleo.

	Benzeno	Tolueno	Xileno
Fórmula química	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>
Massa molecular (g/mol)	78,11	92,1	106,17
Solubilidade em água (mg/L) em 25°C	1785,5	532,6	171,5
Ponto de ebulição (°C)	80,0	110,6	144,5
Pressão de vapor (mm Hg) em 20°C	95,16	28,4	6,6
Massa específica (g/mL)	0,874	0,880	0,870
Constante Lei de Henry 25°C (Kpam <sup>3</sup> /mol)	0,557	0,660	0,551

Fonte: Farhadian *et al.* (2008)

### 2.3.1 Toxicidade

A toxicidade é a habilidade de uma substância em causar dano a um sistema biológico; é a medida de quão venenoso ou perigoso uma substância pode ser para uma planta, um animal, um micro-organismo ou para o ser humano (NEPC, 1999).

De acordo com Mello (2007), para se avaliar a toxicidade causada por um contaminante a um organismo, podem-se realizar os testes toxicológicos. Para tanto, é necessária a seleção de elementos importantes como os organismos teste adequados, o número de organismos, a resposta biológica esperada, o período de exposição e a dose ou série de doses. Seu resultado é expresso em termos da dose administrada, mas também em curvas de dose-resposta que são obtidas

quando os resultados se enquadram numa relação matemática consistente. Os valores mais importantes dados pela curva dose-resposta são o NOEL (maior dose em que não se observa nenhum efeito no organismo) e o LOEL (menor dose na qual se observa qualquer efeito no organismo). Estes valores são mais expressivos que a letalidade na avaliação de risco ecológico, pois demonstram os níveis em que efeitos na reprodução, fisiologia e comportamento poderiam ocorrer. Efeitos deste gênero podem causar desestruturação da comunidade e do ecossistema.

### **2.3.2 Toxicologia dos compostos BTX**

O efluente petroquímico contém frações voláteis de hidrocarbonetos, alguns dos quais são tóxicos para a saúde humana, como benzeno, tolueno, xileno, e outros compostos tóxicos aromáticos (NIVEN e MCLEOD, 2009).

Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e possuem maior mobilidade em água, em função da sua solubilidade em água ser da ordem de 3 a 5 vezes maior. Hidrocarbonetos aromáticos têm também maior mobilidade em sistemas solo-água, característica que pode ser representada significativamente pelo menor coeficiente de partição entre octanol-água. Um menor coeficiente de partição implica em uma lenta absorção no solo e, conseqüentemente, um transporte preferencial *via* água. Além de migrarem mais rapidamente através das águas atingindo mananciais de abastecimento como pode ser observado pelos dados da Tabela 2.2, os compostos aromáticos apresentam uma toxicidade crônica mais significativa do que os hidrocarbonetos alifáticos (WATTS, 2000, apud TIBURTIUS *et al.*, 2004).



Tabela 2.2 - Parâmetros físicos químicos de importância para a mobilidade de hidrocarbonetos.

Composto	Solubilidade em água (mg/L)	Log $K_{ow}$
Benzeno	1760	2,12
Tolueno	532	2,73
Xileno	163 – 185	2,95 – 3,26
Nonano	0,122	4,67
Decano	0,021	6,69
Dodecano	0,005	7,24

$K_{ow}$ : Coeficiente de partição octanol – água.

Dos vários solventes, benzeno, tolueno e xileno estão entre os produtos químicos amplamente utilizados em diversos processos industriais e comerciais, de acordo com Singh et al. (2006). Estes hidrocarbonetos monocíclicos também são gerados através da combustão, processamento e evaporação de gasolina e que são componentes de vários produtos comerciais, tais como fluidos de limpeza, tintas e colas, de acordo com (Arlien-Suborg, 1992 e Indulski *et al.*, 1996, apud BRANDÃO, 2002).

Sem sombra de dúvida, entre os compostos BTX, benzeno é o mais tóxico. O risco de câncer para o benzeno é geralmente mais elevado quando comparado com os outros compostos presentes, além disso o benzeno é comprovadamente carcinogênico (podendo causar leucemia, ou seja, câncer dos tecidos que formam os linfócitos do sangue). Uma exposição aguda (altas concentrações em curtos períodos) por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte de uma pessoa (Farhadian *et al.*, 2008). A adoção de ações corretivas para a descontaminação de áreas contaminadas é necessário. Uma série de estudos anteriores relataram a presença de benzeno ou misturas benzeno em diferentes concentrações em diferentes ambientes ocupacionais. Na China, as concentrações variaram de 40 mg/m<sup>3</sup> - 4.500 mg/m<sup>3</sup> (124,8 mg.m<sup>-3</sup> para produtos de couro, 98,7 mg.m<sup>-3</sup> para dispositivos eletrônicos, 75,4 mg/m<sup>3</sup> para máquinas, 50,4 mg/m<sup>3</sup> para calçados, e 50,3 mg/m<sup>3</sup> de fabricação de material de escritório e equipamentos esportivos) (WANG *et al.*, 2006).

Quando hidrocarbonetos aromáticos são incorporados pela flora e fauna, ligam-se às moléculas proteicas e ao tecido gorduroso, sendo transferidos através da cadeia alimentar sem alterações da estrutura. Muitos seres expõem-se à contaminação por hidrocarbonetos derivados do petróleo por ingestão de cadáveres, ou de outros animais ou plantas

que tenham acumulado hidrocarbonetos no seu organismo, em quantidades insuficientes para causar lesão. Isto traz sérias implicações para a pesca e a saúde pública (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

A contaminação de águas subterrâneas por compostos orgânicos deste tipo representa também sérios problemas à saúde pública. As espécies benzeno, tolueno e xileno (BTX) são frequentemente encontrados em águas subterrâneas, por causa de vazamentos em tanques de estocagem (MOHAMMED & ALLAYLA, 1997; COSTURA & ALVAREZ, 2000; apud TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Os compostos BTEX são considerados substâncias perigosas aos seres humanos principalmente por serem depressores do sistema nervoso central, além de causarem danos ao sistema respiratório, gastrointestinal, reprodutivo e outros efeitos, além disso, mesmo em pequenas concentrações podem levar a lesões do sistema nervoso central (TRIGUEROS, 2008).

Em função destes fatores a legislação tem se tornado cada vez mais restritiva. A agência de proteção ambiental norte-americana (EPA), por exemplo, estabelece os limites máximos para a concentração de benzeno em 5µg/L em água potável. No Brasil, a portaria N° 518, de 25 de março de 2004, determina que os limites máximos permitidos para benzeno, tolueno e xilenos são de 5, 170 e 300µg/L, respectivamente, para que a água seja considerada potável, como pode ser verificado na Tabela 2.3 (TRIGUEROS, 2008).

Tabela 2.3 - Valores de intervenção para os BTX, de acordo com a portaria N° 518, de 25 de março de 2004.

Substância	Valor de intervenção (µg/L) Água
Benzeno	5
Tolueno	170
Xileno	300

Com relação à inalação de tolueno ou xilenos esta pode induzir distúrbios no modo de falar, na visão, audição, no controle dos músculos e outros, além de sugerirem a associação entre benzeno e xilenos e o surgimento de tumores cerebrais (TIBURTIUS, 2004).

Com respeito aos efeitos tóxicos das marés negras sobre a fauna marinha, fizeram menção aos efeitos danosos do benzeno, tolueno e xilenos ao organismo humano e de outros seres vivos. As doses tóxicas são de 10 a 90 mg/L para o benzeno e 4 a 5 mg/L para o naftaleno. Estes poluentes influenciam sistemas endócrinos e enzimáticos, além de que

hidrocarbonetos ingeridos por organismos marinhos passam através da parede intestinal e se tornam parte da reserva lipídica. Quando dissolvidos no tecido adiposo, os hidrocarbonetos são preservados, porque estão protegidos do ataque microbiano, podendo ser transferidos da presa para o predador e, eventualmente, ao homem. A exposição prolongada a concentrações sub-letais de poluentes pode tornar o organismo mais susceptível às doenças. Aparecimento de tumores, alterações genéticas e leucemias são algumas consequências clínicas da intoxicação por hidrocarbonetos (TRIGUEROS, 2008).

Dessa forma, é importante ressaltar e alertar que derivados do petróleo como os BTEX são classificados no grupo dos compostos mais perigosos ao meio ambiente pela sua ampla habilidade de migração e toxicidade segundo Coates *et al.* (2002), apud Farhadian *et al.* (2008).

## 2.4 Requisitos nutricionais dos biofilmes

As bactérias se caracterizam por seu crescimento rápido, sua versatilidade metabólica, plasticidade genética e capacidade de adaptação rápida as variações ambientais. Como todos os seres vivos, as células bacterianas necessitam basicamente de energia, carbono e nutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, etc.). De uma maneira simplificada, os micro-organismos crescem e se reproduzem às custas da energia liberada por meio da degradação do substrato (catabolismo). A energia armazenada em forma química nos compostos orgânicos (substratos) é liberada, sendo convertida na formação do material celular (anabolismo) (MINATTI, 2009).

Os micro-organismos retiram do meio ambiente todas as substâncias necessárias para a síntese de material celular e de obtenção de energia. As necessidades nutricionais dos micro-organismos variam muito. Organismos autotróficos podem sintetizar todos os metabólitos necessários pela célula a partir de compostos inorgânicos; os heterotróficos requerem um ou mais nutrientes orgânicos. Essas diferenças nutricionais refletem diferenças na habilidade de síntese dos micro-organismos. A habilidade em usar diferentes compostos como fonte de energia e de sintetizar proteínas e compostos do citoplasma a partir de compostos inorgânicos depende da presença de uma série de enzimas, sem as quais as células tornam-se mais exigentes nutricionalmente. A formação dessas enzimas é diretamente controlada pela genética da célula (MINATTI, 2009).

Aproximadamente 80% da célula bacteriana é composta de água que é essencial para a absorção dos nutrientes e remoção de

produtos indesejáveis. Os 20% restante na célula são matéria seca. Desta matéria seca, em torno de 90% é orgânica e 10% é inorgânica (GRADY, *et al.*, 1999).

Além da água, as principais substâncias que devem estar contidas no meio são (PELCZAR *et al.*, 1997)

**Carbono:** representa de 45 a 50% da massa seca celular (TORTORA *et al.*, 2000 apud MARTINS, 2004). É o componente básico para a biossíntese, fazendo parte de todos os compostos sintetizados pela célula. Geralmente a mesma fonte de carbono serve como fonte de energia. As fontes de carbono mais comuns são os açúcares e os glicídios (pentoses, hexoses, polissacarídeos). Outras fontes de carbono menos comuns abrangem uma ampla faixa de compostos, indo desde às mais simples como metano e metanol, às mais complexas celulose e hemicelulose (METCALF & EDDY, 1991, apud MARTINS, 2004).

**Nitrogênio:** consiste de 10 a 15% da massa seca das células. É o componente básico na formação de aminoácidos que formam as proteínas. É assimilado sob forma amoniacal. Fontes de nitrogênio em outras formas que não a amoniacal são primeiro transformadas em íons amônio dentro da célula (CARMOUZE, 1994), apud MARTINS, (2004). Ao contrário das células eucarióticas, algumas bactérias podem utilizar nitrogênio atmosférico para a síntese celular (fixação de nitrogênio). Porém, nem todas as espécies são capazes de realizar este processo (PELCZAR *et al.*, 1997).

a) fontes inorgânicas de nitrogênio:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{N}_2$ , etc.

b) fontes orgânicas de nitrogênio: aminoácidos e hidrolisados de proteínas naturais, peptídeos, ureia, purinas e pirimidinas.

O nitrato é a forma oxidada mais estável do nitrogênio em solução aquosa. É regenerado por via bacteriana (nitrificação) a partir do nitrogênio orgânico. A produção de nitrato resulta da oxidação bacteriana do amônio, tendo o  $\text{NO}_2^-$  como intermediário.

O nitrogênio é considerado um macronutriente (nutriente necessário em grandes quantidades) além de ser nutriente limitante para o crescimento da comunidade microbiana.

**Fósforo:** em águas naturais, o fósforo encontra-se predominantemente na forma de fosfatos em solução (orto, ou íons do ácido ortofosfato), em partículas ou detritos (fósforo particulado orgânico ou inorgânico). Pode

também estar incorporado à estrutura de organismos aquáticos (BAUMGARTEN & POZZA, 2001, apud MARTINS, 2004). É assimilado somente na forma de di-hidrogênio fosfato (ortofosfato)  $H_2PO_4$ . É importante na regulação do metabolismo celular, a síntese de ácidos nucleicos, fosfolipídios da membrana celular e no fornecimento de fosfatos para a geração de energia (ATP) (PELCZAR *et al.*, 1997). A concentração intracelular de  $PO_4^{3-}$  regula a síntese de lipídeos e carboidratos (ALEXANDER, 1994, apud MARTINS, 2004). Geralmente este nutriente é pouco abundante na maioria dos ambientes por não ser abundante na crosta terrestre e não existir na forma gasosa e pela sua tendência de adsorção às partículas do sedimento. Por outro lado, muitas atividades humanas resultam em aumento nos níveis de fósforo nos ambientes, como o uso de fertilizantes na agricultura.

**Enxofre:** Representa 1 a 2% da massa seca celular e entra na constituição dos aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína. As fontes inorgânicas de enxofre são tipicamente  $K_2SO_4$  ou mais comumente  $(NH_4)_2SO_4$ . A formação de pontes de dissulfeto é importante para a atividade de proteínas. O enxofre é encontrado em certas vitaminas tais como biotina e tiamina (PELCZAR *et al.*, 1997).

**Elementos minerais:** são necessários em concentrações da ordem de miligramas por litro. Dentre os minerais destacam-se (PELCZAR *et al.*, 1996):

**Potássio:** apresenta as seguintes funções:

- a) regulador da pressão osmótica (para cada íon metálico divalente absorvido, o dobro da quantidade de  $K^+$  é excretada);
- b) estimula a fermentação e respiração em pH reduzido;
- c) é o cofator de várias enzimas.

**Magnésio:** é o cofator de várias enzimas. Participa na ativação das enzimas glicolíticas, estimula a síntese de ácidos graxos essenciais, regula os níveis iônicos celulares, a ativação de ATPases na membrana e a absorção de fosfato juntamente com  $K^+$ . A concentração de  $Mg^{++}$  afeta a associação dos ribossomos.

**Cálcio:** estimula o crescimento celular pela incorporação na parede celular e membrana plasmática.

**Ferro:** é necessário para a síntese dos citocromos e de certos pigmentos.

Na literatura, são encontrados outros íons como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{CO}^{2+}$  na composição elementar de muitos micro-organismos e estão envolvidos em importantes etapas do metabolismo.

Fonte de oxigênio: É importante ressaltar que, por exemplo, a biodegradação aeróbia do benzeno a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  requer aproximadamente 3 mg de oxigênio para cada mg de benzeno degradado. Em condições ambientais, a água contém apenas 8-12 mg/L de oxigênio dissolvido, o que é suficiente para a degradação de apenas 3-4 mg/L de BTEX, a não ser que existam outras fontes de oxigênio (SHIM and YANG, 1999).

A adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como fonte de oxigênio suplementar, em água, tem sido sugerido para suplementar problemas de oxigenação (FIORENZA and WARD, 1997 apud SHIM and YANG, 1999).

Como estudado por Shim *et al.* (2002), utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como fonte de oxigênio as taxas de biodegradação do benzeno foram duas vezes mais elevadas do que aquelas sem a utilização de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dessa forma, a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1g/L) se tornou uma fonte de suplemento de oxigênio para o processo aeróbio. A baixa solubilidade do oxigênio na água pode ser parcialmente diminuída utilizando-se  $\text{H}_2\text{O}_2$  como fonte de oxigênio, que com o auxílio da catalase presente em micro-organismos aeróbios dissocia o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ .

Como estudado por Fiorenza e Ward (1997), que observaram a atividade enzimática, a quantidade de proteínas e o número de micro-organismos em três colunas, cada uma submetida a diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para adaptação dos micro-organismos. Pode – se verificar os resultados expressos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Proteína, atividade enzimática e micro-organismos heterotróficos três colunas submetidas a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FIORENZA e WARD, 1997).

	Amostra coluna	Máxima dose de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
		0.1 mg/L	10 mg/L	500 mg/L
<b>Proteína<sup>a</sup></b>	Interno	0,102	0,102	0,33
	Meio	0,055	0,065	0,081
	externo	0,094	0,0036	0,092
<b>Catalase<sup>b</sup></b>	Interno	20,7	14,9	582
	Meio	15,6	10,7	97,7
	Externo	7,29	11,0	120
<b>Peroxidase<sup>b</sup></b>	Interno	0,099	0,05116	0,0481
	Meio	ND	0,0282	0,0611
	Externo	ND	ND	0,0420
<b>Heterotrófico<sup>c</sup></b>	Interno	12,6	2,12	519
	Meio	2,65	0,89	25,9
	Externo	0,968	1,09	16,3

<sup>a</sup>Concentração, µg/µL

<sup>b</sup>Atividade específica. Unidade/mg proteína

<sup>c</sup>Número de UFC X 10<sup>6</sup>/g do material aquífero massa seca.

ND, não determinado.

## 2.5 Biofilmes

### 2.5.1 Definição

Os biofilmes são tipicamente constituídos por água, micro-organismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas (MINATTI, 2009).

Os biofilmes são comunidades de micro-organismos aderidos a superfícies diversas, que segundo Shi e Zhu (2009) apud Telles (2011), são a forma prevalente de crescimento dos micro-organismos na natureza. Também podem ser definidos como células microbianas agrupadas sobre superfície, dentro das substâncias poliméricas extracelulares, como polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácidos teicóicos e ácidos nucléicos.

Segundo Davey *et al.* (2000), biofilmes são aglomerados de população de células simples ou mistas envoltos em uma matriz extracelular, que é encontrada frequentemente ligada a bióticos ou

substratos abióticos no ambiente. Biofilmes encontrados na natureza são compostos de muitas espécies de bactérias, fungos, algas e protozoários (SINGH *et al*, 2006). Estes biofilmes estão associados e incorporados à uma superfície formando uma matriz extracelular polimérica.

Em termos gerais, um biofilme pode ser entendido como uma comunidade estruturada de bactérias dentro de uma matriz polimérica e aderidos em uma superfície inerte ou biológica, com taxa de crescimento e nível de transcrição diferente das bactérias livres (COSTERTON *et al*, 1999).

### **2.5.2 Composição e formação dos biofilmes**

De acordo com Fleming, (2000), apud Donlan, (2002), biofilmes são compostos primeiramente por células microbianas e por substâncias poliméricas extracelulares. Substâncias poliméricas extracelulares podem conter de 50 a 90% de um total de carbono orgânico total do biofilme, estas substâncias poliméricas extracelulares podem ser consideradas a primeira matriz de material no biofilme. As substâncias poliméricas extracelulares podem variar em propriedades físicas e químicas, no entanto elas são primeiramente compostas por polissacarídeos.

Dentre os micro-organismos frequentemente encontrados em um biofilme, as bactérias são o grupo predominante. As elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares, são as principais características que as fazem organismos com grandes capacidades de produção de biofilmes (NITSCHKE, 2006).

O início da formação do biofilme ocorre quando bactérias livres ou planctônicas reconhecem uma superfície e aderem a ela firmemente, crescem e sobrevivem a ambientes hostis como dentes, epitélios, plásticos, aço inoxidável, entre outros (JOSEPH; OTTA; KARUNASAGAR, 2001, apud TELLES, 2011).

Alguns estágios na formação do biofilme compreendem agregação de células microbianas à superfície, a maturação, o desapego e a retorno ao estado planctônico (Davey *et al*. 2000).

Biofilme também pode se desenvolver em diferentes tipos de reatores usando diferentes materiais suporte, como carvão ativado, poliuretano, caulim, poliestireno, materiais cerâmicos, madeira, terra,



areia, cloreto de polivinil e polietileno (GUERIN, 2002 apud FARHADIAN *et al.*, 2008).

Materiais não celulares como os cristais minerais, partículas de corrosão, componentes do sangue, dependendo do ambiente e de como o biofilme é desenvolvido podem funcionar como uma boa matriz para o biofilme. Biofilmes diferem de células em suspensão com respeito aos genes transferidos. Biofilmes podem se formar em uma variedade de superfícies, incluindo os tecidos vivos, habitando dispositivos médicos, sistema de tubulação industrial ou de água potável, ou sistemas aquáticos naturais (DONLAN, 2002).

A imobilização de células em suportes formando os biofilmes pode ser alcançada por diferentes métodos: o acoplamento covalente, aprisionamento físico, e o processo natural de aderência. O método de acoplamento covalente envolve ligação covalente de células para o apoio, permitindo que uma adesão estável e, muitas vezes permanentes. No entanto, devido a natureza tóxica dos produtos químicos de acoplamento utilizado neste método, ele tende a ser tóxico, resultando em uma perda de viabilidade e atividade biocatalítica das células (KOZIARZ, 1998). O método de aprisionamento físico permite uma alta concentração de células, mas apresentam limitações difusionais, devido aos materiais utilizados como apoio, tais como redes de gel (KOZIARZ, 1998). O método de aderência natural tem como principais vantagens viabilidade celular e atividade bioquímica máxima devido ao biofilme formado após a adesão. A principal desvantagem da imobilização pela adesão natural é que as células são perdidas devido as forças de cisalhamento (KOZIARZ, 1998).

As células assim aderidas crescem, reproduzem-se e geram polissacarídeos que, frequentemente, formam uma matriz de fibras sobre a qual novas células se aderem, formando uma estrutura porosa chamada biofilme, de acordo com Characklis & Marshall (1990), apud Maiorano *et al.*, (2005). Esta estrutura permite o fluxo de meio líquido através de canais e, conseqüentemente, as limitações para difusão de oxigênio criam zonas propícias para o cultivo de micro-organismos aeróbios e anaeróbios. O biofilme é, portanto, um ambiente heterogêneo, com presença de processos fermentativos aeróbios e anaeróbios, o que o distingue de outros sistemas microbiológicos.

Pode-se distinguir pelo menos 5 ambientes diferentes no sistema de biofilme: substrato, base e superfície do biofilme, meio líquido e fase gasosa. A interação entre eles ocorre por processos de transferência interfaciais ou transporte. Biorreatores com micro-organismos imobilizados apresentam altas taxas de conversão e

processos mais estáveis (HAMED *et al.*, 2003, apud MAIORANO, 2005).

### 2.5.3 Benefícios da associação de biofilmes para as células

Biofilmes apresentam vários efeitos benéficos sobre os seus arredores. Várias são as aplicações de biofilmes, como efeito deletério do biofilme em implantes médicos (DAVEY *et al.*, 2000), placas dentárias, sistema de refrigeração de água, aplicações em biorremediação de depósitos de resíduos perigosos, tratamento de águas residuais e ácidos de mineração ou metais, de acordo com Singh e Paul (2006).

Aplicações de biofilmes na biorremediação são de interesse recente, porque eles apresentam uma melhor atividade metabólica de acordo com Kirchman e Mitchell, (1982), apud Arutchelvi *et al.*, (2011), a sobrevivência, e a taxa de transferência de genes, especialmente durante o estresse, quando em comparação com células planctônicas.

É de se destacar que biofilmes estabelecidos podem tolerar agentes antimicrobianos em concentrações de 10 - 100 vezes superiores a necessária para matar as bactérias planctônicas geneticamente equivalentes, tornando-os extremamente difícil de erradicar (JEFFERSON, 2004).

O uso de células imobilizadas ou micro-organismos em reatores oferece muitas vantagens sobre os sistemas de células em suspensão, como a facilidade separação, maior flexibilidade operacional e maior densidade de células, resultando em maiores taxas de biodegradação por unidade de volume do reator, de acordo com Parameswarappa *et al.* (2008). Também foi relatado que células imobilizadas estão protegidas de condições ambientais adversas, tornando-se mais tolerantes a altas concentrações de substâncias e compostos tóxicos, segundo (CHEN *et al.*, 2007). Neste sentido, há uma busca contínua por mais eficiência, maior facilidade de manuseio e menor custo.

As maiores aplicações de biofilmes estão na remoção de partículas e contaminantes dissolvidos em águas naturais em estações de tratamento de água e esgoto, por intermédio de vários tipos de processos como filtros biológicos, bio-discos e reatores de leito fluidizado (MAIORANO, 2001).

Com relação à transferência de genes, os biofilmes proporcionam um nicho ideal para as trocas de plasmídeos. A conjugação (o mecanismo de transferência de plasmídeos) ocorre em

uma alta taxa entre células em biofilmes maior do que entre células em suspensão (HAUSNER, 1999 apud DONLAN, 2002).

## 2.6 Identificação bacteriana

Entre as técnicas de estudo dos micro-organismos com potencial uso em processos de biodegradação, encontram-se as técnicas tradicionais de cultivo, isolamento e caracterização fisiológica, morfológica e bioquímica, e as técnicas de Biologia Molecular. As técnicas tradicionais de cultivo apresentam uma grande limitação: apenas uma pequena porcentagem de micro-organismos presentes no ambiente é capaz de crescer sob condições laboratoriais. Enquanto que as técnicas moleculares, em que se baseiam na especificidade das sequências dos ácidos nucleicos (DNA ou RNA), extraído diretamente das amostras, têm servido como ótima ferramenta no estudo da estrutura e diversidade microbiana, permitindo assim grandes avanços no estudo da ecologia microbiana (MELLO, 2012).

Os ácidos nucleicos apresentam-se como moléculas de grande importância biológica, estando presentes em todos os seres vivos sob dois tipos: ácido desoxirribonucleico ou DNA e ácido ribonucleico ou RNA. Durante a síntese proteica, que ocorre no interior das células, a informação genética encontra-se armazenada em sequências nucleotídicas componentes das moléculas do DNA genômico. O DNA constitui o depósito da informação genética que é copiada ou transcrita em moléculas de RNA mensageiro (RNAm), cujas sequências de nucleotídeos contêm o código (sequência dos aminoácidos) posteriormente traduzido em proteínas. As estruturas no interior da célula onde se processa a tradução e síntese proteica, encontram-se combinadas com proteínas e outras moléculas de RNA (denominada RNA ribossomal ou RNAr) as quais constituem partículas densas, chamadas ribossomos (FERNANDES, 2009).

Os métodos para a análise comparativa de sequências de rDNA incluem, geralmente, etapas de extração de DNA da amostra e amplificação das sequências de interesse pela reação em cadeia polimerase (PCR), utilizando iniciadores com a especificidade desejada. As sequências amplificadas podem ser clonadas e sequenciadas ou analisadas com base em seus perfis eletroforéticos. Por sua vez, um dos principais métodos usados para a obtenção de perfis eletroforéticos relacionados com a filogenia é a DGGE/TGGE (*Denaturing or*

*temperature gradient gel electrophoresis*), que fornece informações sobre a variação na sequência em uma mistura de fragmentos de PCR de comprimento idêntico com base na mobilidade diferencial em um gel de acrilamida com gradiente de desnaturante crescente ou de temperatura crescente (EICHNER et al., 1999).

Técnicas moleculares que têm como alvo de estudo genes relacionados com metabolismo específico dos micro-organismos têm sido muito utilizadas, juntamente com os testes de biodegradação laboratoriais, para determinação do potencial catabólico microbiano. Cavalca et al. (2000) apud Mello, (2012) estudaram populações de micro-organismos potencialmente degradadores de BTEX em solos contaminados por esses compostos. Esses autores isolaram quinze linhagens de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Alcaligenes*, cujo DNA extraído foi submetido à PCR visando à amplificação de genes-chave no processo de biodegradação por diferentes vias catabólicas.

## 2.7 Biodegradação

A biodegradação é definida como o processo que está relacionado à quebra ou degradação de compostos orgânicos através do metabolismo de micro-organismos vivos (MELLO, 2007). A biodegradação pode ser dividida em três categorias: (a) mineralização, onde os compostos químicos orgânicos são transformados a compostos químicos inorgânicos como dióxido de carbono, água e amônia; (b) biotransformação, onde os compostos químicos orgânicos são transformados em estruturas menores e (c) co-metabolismo, onde outro composto é metabolizado primeiramente ou simultaneamente a um composto específico (DALTON *et al.*, 1982, apud MELLO, 2007).

O processo de biodegradação baseia-se em reações de oxido-redução biológica, por meio de micro-organismos, em presença de um acceptor de elétrons e nutrientes, capazes de decompor a matéria orgânica em substâncias simples. A transferência de elétrons é essencial para a respiração celular e libera a energia (ATP) necessária para funções vitais aos micro-organismos. As bactérias aeróbicas utilizam oxigênio como acceptor de elétrons, produzindo gás carbônico e água, e as bactérias anaeróbicas utilizam outros compostos, como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), íon Fe (III) e sulfato ( $\text{SO}_4$ ), produzindo metano e água (TRIGUEROS, 2008).

O metabolismo aeróbico corresponde ao mecanismo mais favorecido energeticamente pelos micro-organismos que oxidam compostos orgânicos. Consequentemente, o oxigênio é preferencialmente utilizado sobre os aceptores de elétrons anaeróbicos,

pois proporciona mais energia à comunidade microbiana, resultando em taxas mais rápidas de degradação do poluente. Com respeito ao metabolismo anaeróbico, entre os aceptores de elétrons, o nitrato é um dos íons mais encontrados em águas naturais, ocorrendo geralmente em baixos teores nas águas superficiais, mas podendo atingir altas concentrações em águas subterrâneas (BORDEN *et al.*, 1995).

Por muitos anos, processos biológicos têm sido propostos e utilizados como tecnologias eficazes para a remediação de locais contaminados, de acordo com Thayer (1991), apud Ortíz (2011), e *Pseudomonas putida* tem sido um dos principais micro-organismos empregados nesses processos. Timmis (2002) afirma que *P. putida* é capaz de usar e metabolizar diferentes hidrocarbonetos como fontes de carbono e que não é patogênico para animais ou plantas. Portanto, essas características fazem *P. putida* um micro-organismo valioso no processo de biorremediação.

A utilização de culturas microbianas é importante não somente para produção de combustíveis a partir de biomassa e produção de metabólitos secundários em aplicações farmacêuticas, mas também na biodegradação de produtos químicos perigosos. Desta forma, os processos biotecnológicos têm sido largamente utilizados na biodegradação de compostos tóxicos, como no tratamento de efluentes municipais, industriais e tratamento de águas subterrâneas, revelando-se como uma tecnologia de tratamento relativamente econômica, se comparada aos processos físico-químicos, além de apresentar alta eficiência e menor efeito adverso ao ambiente (METCALF and EDDY, 1991 apud RODRIGUES, 2006).

A biodegradação em biorreatores proporciona menores tempos de tratamento, devido a maiores contatos entre os micro-organismos, nutrientes e compostos tóxicos. Além disso, todos os parâmetros do processo podem ser controlados e otimizados, reduzindo ou eliminando as limitações de transferência de massa. O crescimento de micro-organismos em um reator biológico ocorre a partir do fornecimento de nutrientes adequados e substratos, como fonte de carbono e energia, na presença de condições favoráveis (MINATTI, 2009).

Segundo Arinbasarov *et al.* (1997), apud Minatti (2009), cerca de 20 espécies de micro-organismos foram isolados e são capazes de degradar os componentes do petróleo, sendo que mais de 70% pertencem ao gênero *Pseudomonas*. O restante pertence aos gêneros *Rhodococcus* e *Xanthomonas*. Geralmente, são as bactérias que possuem papel central na biorremediação, entretanto, outros micro-organismos

como fungos e protozoários também podem contribuir (WATANABE, 2001).

Portanto, o termo biodegradativo pode ser definido como um processo metabólico que envolve a quebra completa de um composto orgânico em seus componentes inorgânicos, referido comumente como mineralização. A biotransformação, por sua vez, consiste na alteração química da estrutura molecular do composto orgânico ou inorgânico, resultando em uma molécula com características diferentes da original, em geral pela perda de uma propriedade específica, porém com a complexidade inicial (MONTENEGRO, 2001).

A biodegradação dos compostos BTX tem sido extensamente estudada por diversos pesquisadores (ALVAREZ and VOGEL, 1991; BIELEFELDT and STENSEL, 1999; DEEB and ALVAREZ-COHEN, 2000; CHANG *et al.*, 2001; SHIM *et al.*, 2002; SILVA and ALVAREZ, 2004; OTÊNIO *et al.*, 2005) com a finalidade de identificar as interações presentes na degradação de misturas de substratos. As principais razões que levam aos efeitos de interação (sinérgicos e/ou antagônicos) durante a biodegradação dos compostos BTX podem ser atribuídas à inibição competitiva (BIELEFELDT and STENSEL, 1999), toxicidade e formação de intermediários tóxicos por enzimas não específicas (WANG and LOH, 2000), além de indução enzimática (DEEB *et al.*, 2001).

Bielefeldt and Stensel (1999) avaliaram quantitativamente a biodegradação dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno, *o*-xileno e *p*-xileno. Os experimentos foram conduzidos com mistura de culturas em testes em batelada para determinar como a presença de múltiplos substratos poderia afetar a fisiologia microbiana, e conseqüentemente a taxa de biodegradação quando comparada às taxas de biodegradação dos substratos individuais. Os autores concluíram que possivelmente efeitos de inibição competitiva na mistura dos cinco substratos estiveram presentes. Os resultados das taxas de biodegradação mostraram que a cultura degradou os compostos mais rapidamente quando estiveram presentes sozinhos do que quando estiveram presentes em misturas.

Otênio *et al.* (2005) estudaram a biodegradação dos compostos BTX por *Pseudomonas putida* CCM1 852 e constataram que a cultura foi capaz de metabolizar tolueno e *p*-xileno, mas não benzeno. O tolueno foi degradado a uma velocidade duas vezes maior do que a do *p*-xileno. Na mistura binária dos componentes, o tolueno foi utilizado a uma velocidade 73% e 37% menor na presença de benzeno e xileno, respectivamente. A velocidade de degradação do xileno também diminuiu 53% na presença de benzeno e 15% na presença do tolueno.

Na mistura BTX, o benzeno não foi metabolizado também e a velocidade de degradação do tolueno e xileno decresceu cerca de 50% comparada com soluções contendo apenas tolueno ou *p*-xileno. Diferentemente do trabalho apresentado por Chang et al. (1993), onde os autores relatam que o benzeno não afetou a taxa de degradação do tolueno e *p*-xileno, neste trabalho foi demonstrado que a presença do benzeno inibiu a degradação do tolueno e do *p*-xileno.

Alvarez and Vogel (1991) mediram as taxas de biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e *p*-xileno, individualmente e em misturas binárias e ternárias, utilizando duas culturas puras de bactérias (*Pseudomonas* sp. cepa CFS-215 e *Arthrobacter* sp. cepa HCB), e uma mistura de culturas, e observaram casos de não-interação, inibição competitiva e cometabolismo. Na mistura de culturas, a presença do tolueno intensificou a taxa de degradação do *p*-xileno, porém, diminuiu drasticamente quando o tolueno foi completamente degradado. Este fenômeno é explicado pelo processo de degradação cometabólica do *p*-xileno. Quando utilizaram *Pseudomonas*, a presença do tolueno foi fundamental para a degradação do *p*-xileno e intensificou a degradação do benzeno. Logo, o crescimento de *Pseudomonas* sp. CFS-215 é melhor em tolueno, e sua presença ajuda na proliferação da bactéria, levando a um maior número de micro-organismos capazes de degradar o benzeno e o *p*-xileno. A degradação do tolueno ocorreu mais rapidamente quando esteve sozinho do que quando esteve junto com benzeno e/ou *p*-xileno, sugerindo a hipótese de que estes substratos utilizam-se da mesma rota metabólica, e assim ocorram efeitos de inibição competitiva. Por outro lado, *Arthrobacter* foi incapaz de degradar o tolueno e *p*-xileno, individualmente e em misturas. A degradação destes compostos somente ocorreu na presença do benzeno, sugerindo que o cometabolismo seja responsável por este efeito benéfico. Já a degradação do benzeno foi afetada negativamente pela presença do tolueno e/ou *p*-xileno, sugerindo que efeitos de inibição competitiva tenham ocorrido.

Deeb and Alvarez-Cohen (2000) quantificaram o impacto que interações entre os substratos BTEX provocam em suas velocidades de biodegradação, e avaliaram, além disso, os efeitos da presença do éter metil *terc*-butílico, MTBE. Utilizaram duas culturas puras identificadas como *Rhodococcus rhodochrous* e *Rhodococcus bronchialis*; essas culturas são oriundas de um aquífero contaminado por gasolina. As culturas foram capazes de biotransformar completamente os compostos BTEX individualmente e em mistura. Durante a biodegradação das

misturas binárias dos compostos BTEX, a presença do etilbenzeno provocou um efeito inibitório nas biodegradações do benzeno, tolueno e xilenos. Os autores sugerem que o tolueno e o etilbenzeno são degradados pelo mesmo caminho metabólico. Os autores investigaram a mineralização dos compostos BTEX. Apesar da presença do etilbenzeno afetar negativamente a biodegradação dos compostos BTX, isso não ocorreu durante a mineralização. Os autores concluíram que a mistura de culturas é mais eficiente do que as culturas puras na mineralização dos compostos BTEX, e isto pode ser atribuído à presença de diferentes espécies microbianas, possibilitando a utilização de diversos caminhos metabólicos. Quanto à presença do MTBE, nenhuma das culturas foi capaz de crescer na presença do MTBE, e este não afetou as taxas de biodegradação dos compostos BTEX.

De acordo com Farhadian *et al.* (2008), vários outros autores estudaram a biodegradação dos compostos BTEX utilizando culturas de micro-organismos, como pode ser observado na Tabela 2.5. É possível notar que o gênero *Pseudomonas* está associado a diferentes trabalhos encontrados na literatura.



Tabela 2.5 – Micro-organismos envolvidos na biodegradação de poluentes monoaromáticos.

Organismo	Poluentes	Referência
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	BTEX	Deed and Alvarez-Cohen (1999)
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 55595	BT(p-)X	Collins and Daugulis (1999)
<i>Pseudomonas putida</i>	BTE(o-)X	Shim and Yang (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Rhodococcus</i> sp. RR1 and RR2	BTE(m-/p-)X	Deed and Alvarez-Cohen (1999)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	BTE, TCE	Parales <i>et al.</i> (2000)
<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	T	
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	T	
<i>Pseudomonas putida</i>	BTEX	Attaway and Schmidt (2002)
<i>Cladophialohora</i> sp. strain T1	BTEX	Prenafeta-Boldu <i>et al.</i> (2008)
<i>Blastochloris sulfovirdis</i> ToP1	T	Van Hamme <i>et al.</i> (2003)
Bactérias de desnitrificação	T	
<i>Azoarcus</i> sp. strain EB1	E	
<i>Azoarcus</i> sp. strain T	T(m-)X	
<i>Azoarcus toluolyticus</i> Td15	T(m-)X	
<i>Azoarcus toluolyticus</i> To14	T	
<i>Dechloromonas</i> sp. strain JJ	BT	
<i>Dechloromonas</i> sp. strain RCB	BT	
<i>Thauera aromatic</i> K172	T	
<i>Thauera aromatic</i> T1	T	
Fe(III)-bactérias redutoras		
<i>Geobacter grbiciae</i> TACP-2T	T	
<i>Geobacter grbiciae</i> TACP-5	T	
<i>Geobacter metallireducens</i> GS15	T	
Bactérias sulfato redutoras		
<i>Desulfobacula toluolica</i> To12	T	
<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	T	
<i>Pseudomonas putida</i>	BTEX	Shim <i>et al.</i> (2002)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B	Kim <i>et al.</i> (2003)
<i>Rhodococcus piridinovorans</i> PYJ-1	BT(m-)X	Jung and Park (2004)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	BTEX	Nielsen <i>et al.</i> (2006)

### 2.7.1 Processos aeróbios

Este tipo de processo fundamenta-se na utilização de bactérias e fungos que requerem oxigênio molecular. As suas formas mais comuns de aplicação industrial estão representadas pelas lagoas aeradas e pelos sistemas de lodos ativados.

Nas lagoas aeradas, os efluentes são submetidos à ação de consórcios de organismos, muitas vezes de composição desconhecida, durante vários dias. Neste tipo de tratamento, a toxicidade aguda (efeitos adversos que ocorrem em um curto período de tempo, geralmente até 14 dias, após a exposição de um organismo a única dose da substância (poluente) ou depois de múltiplas doses em até 24 horas) é removida com relativa facilidade. No entanto, outros parâmetros importantes, como cor e toxicidade crônica (efeitos adversos que ocorrem em um organismo durante a maior parte do seu ciclo de vida), não são eficientemente reduzidos. Além disto, alguns problemas associados com perdas de substratos tóxicos por volatilização e contaminação de lençóis freáticos por percolação (infiltração), são críticos. O tratamento por lodos ativados talvez seja o sistema de biorremediação mais versátil e eficiente. Este sistema opera com pouco substrato auxiliar e é capaz de remover a toxicidade crônica e aguda, com um menor tempo de aeração. No lodo existe um grande número de espécies bacterianas, além de fungos, protozoários e outros micro-organismos, que podem favorecer a redução de um grande número de compostos. Este tipo de processo, desenvolvido na Inglaterra no início do século XX, vem sendo utilizado nos mais diversos tipos de efluentes, inclusive no tratamento de esgotos sanitários (FREIRE *et al.*, 2000).

Um dos graves problemas associados ao tratamento aeróbio de efluentes corresponde a perdas de substratos tóxicos por volatilização. Para contornar este inconveniente, pesquisadores têm desenvolvido sistemas de biorreatores que operam com membranas. Sistemas deste tipo têm sido utilizados com sucesso no tratamento de efluentes contendo dicloroetano, clorofenóis, tricloroetileno, pentaclorofenol, cloroguaicóis, tetracloreto de carbono, diclorofenol e clorobenzeno (FREIRE *et al.*, 2000).

### **2.7.2 Processos anaeróbios**

Os processos anaeróbios de tratamento de efluentes industriais e domésticos, no Brasil, tem sido responsáveis pela grande mudança nas condições de controle de poluição industrial, pois são tecnologias de baixo custo econômico e energético, e de resposta satisfatória, tanto do ponto de vista empresarial, como dos órgãos de fiscalização e de pesquisa. A operação destes reatores depende de um controle rigoroso das condições ambientais do processo fermentativo, bem como do desenho do equipamento. A biomassa anaeróbia, responsável pela degradação da matéria orgânica das águas residuárias, não é constantemente avaliada em sua capacidade de depuração. As bactérias anaeróbias são de difícil isolamento e identificação, e vários processos e métodos têm sido propostos para quantificar tais bactérias, bem como para medir a sua atividade (POETSCH and KOETZ, 1998).

### **2.7.3 Sistemas combinados anaeróbio-aeróbios**

Os flocos do lodo ativado são constituídos, principalmente, de bactérias. Estima-se que existam mais de 300 espécies de bactérias no lodo que são responsáveis pela oxidação da matéria orgânica. Com a diminuição do nível de oxigênio no floco, que ocorre na fase de sedimentação, a atividade das bactérias aeróbias decresce. Como a região interna do floco é relativamente grande, a difusão do oxigênio é pequena, o que favorece o desenvolvimento de bactérias anaeróbias como as metanogênicas. Assim, o processo por lodo ativado pode desenvolver um tratamento mais apurado, combinando reações aeróbias e anaeróbias (FREIRE *et al.*, 2000).

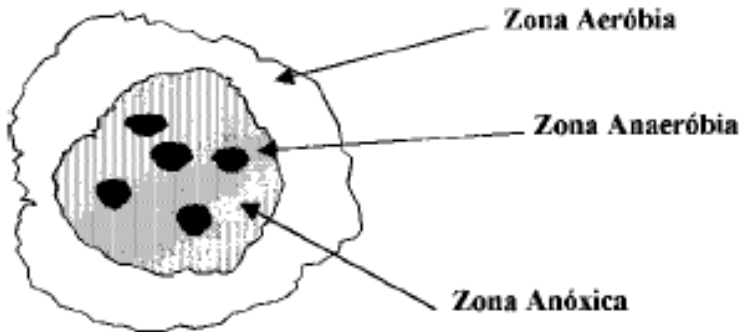


Figura 2.2 - Distribuição de oxigênio em um floco de lodo ativado (FREIRE et al., 2000).

## 2.8 Induções apropriadas das enzimas biodegradativas

Este processo envolve a ativação específica da região do genoma das bactérias. Quando alguns poluentes estão presentes, estes iniciam a cascata de reações bioquímicas que resultam na transcrição de códigos genéticos necessários para a síntese de enzimas degradativas. Para que a reação de degradação dos BTEX tenha início, muitas enzimas requerem que a substância indutora, como por exemplo, o tolueno, deva estar presente em concentração maior do que o mínimo necessário para a indução, segundo Linkfield (1989), apud Silva (2002). De forma geral, esta concentração é baixa e a indução da enzima raramente é um fator limitante na biorremediação dos BTEX (CHAPELLE, 1993 apud SILVA, 2002).

A presença de substratos que são facilmente degradados pode exercer efeito inibidor (utilização preferencial de substrato) o qual retardaria a indução das enzimas em degradar BTEX. No Brasil, isto é um fator importante, pois a gasolina contém 24% de etanol, um substrato facilmente degradado. Neste caso, um retardo no período pode ser observado durante o qual o etanol é degradado sem que haja nenhuma degradação significativa de BTEX (CORSEUIL *et al.*, 1996, apud SILVA, 2002).

A indução de enzimas degradativas envolve a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano, conforme a teoria *operon lac* de Jacob-Monod. As enzimas que iniciam a utilização dos compostos BTEX são geralmente induzíveis. Tais enzimas somente são produzidas

quando um indutor, como por exemplo, o tolueno, está presente em uma concentração mais elevada do que a concentração inicial mínima para a indução (LINKFIELD *et al.*, 1989 apud ALVAREZ and HUNT, 2002). Geralmente esta concentração é muito baixa, na ordem de alguns microgramas por litro (ROBERTSON and BUTTON, 1987 apud ALVAREZ and HUNT, 2002).

## 2.9 Biorreatores

São sistemas que podem apresentar diversas configurações e arranjos. Estes sistemas são compostos por micro-organismos e possivelmente outros agentes catalíticos, que agem cooperativamente com os micro-organismos. Para estimular o crescimento destes organismos, nutrientes são adicionados ao meio. Nestes sistemas, a biomassa pode crescer em suspensão ou aderidos a uma matriz (MINATTI, 2009).

Os biorreatores com biomassa em suspensão são aqueles em que os micro-organismos se encontram dispersos no meio. De acordo com Brandão (2002), é necessário no final do processo que os micro-organismos sejam separados da fase líquida, estes podendo, ou não, voltar ao biorreator. Exemplos típicos deste processo são: lagoa aerada agitada (tanque agitado), lodos ativados (tanque agitado com reciclo de biomassa), reatores biológicos com membranas com módulo interno ou externo.

No entanto, os biorreatores com biomassa aderida são reatores biológicos em que a biomassa, ou seja, o conjunto de células microbiana constituídas em biofilmes juntamente com as substâncias poliméricas por elas excretadas, encontra-se fixada a suportes sólidos. Os substratos e nutrientes (inclusive o oxigênio) são transportados por mecanismo difusivo ao longo do biofilme (COSTERTON *et al.*, 1995; BRANDÃO, 2002).

O meio suporte, no qual os micro-organismos ficam aderidos, pode ser fixo ou móvel. Nos processos com suporte fixo, os micro-organismos ficam imobilizados em suportes imóveis, que formam um leito permeável através do qual o efluente percola (filtro biológico de percolação) ou circula (biofiltros ou filtros submersos). Os processos com leito móvel são aqueles em que os micro-organismos são imobilizados em suportes que podem ser movidos mecanicamente (discos biológicos – “*rotating biological contactor*”) ou por ação hidráulica (biorreatores de leito expandido, fluidizado e “*airlift*”) (BRANDÃO, 2002).

A aplicação de processos com biomassa fixa (biofilme) na área de tratamento de efluentes está se tornando cada vez mais comum, devido às suas vantagens com relação aos processos tradicionais: alta concentração de biomassa, o que possibilita operar com maior carga; a redução de dimensões das instalações de tratamento; excelente eficiência de remoção de compostos orgânicos; e a eliminação das etapas de separação e reciclo de sólidos, segundo Lazarova & Manem, (1994). Pelo fato da biomassa estar fixa, este tipo de biorreator pressupõe uma menor exigência de operações de separação de sólidos a jusante do reator, bem como maior estabilidade do reator em face de variações das condições ambientais como: choque orgânico, choque hidráulico, choque térmico, presença de substâncias tóxicas, etc. (BRANDÃO, 2002).

### **2.9.1 Biorreatores com Biomassa Aderida**

Pelo fato da biomassa estar fixa, este tipo de biorreator pressupõe uma menor exigência de operações de separação de sólidos a jusante do reator, bem como maior estabilidade do reator face às variações das condições ambientais como: choque orgânico, choque hidráulico, choque térmico, presença de substâncias tóxicas, etc. (BRANDÃO, 2002).

A seguir estão apresentados alguns biorreatores com biomassa aderida.

- Filtros Biológicos (“*Tricking Filters*”);
- Biodiscos ou Reatores Biológicos de Contato Rotativo;
- “*AIRLIFT*”;
- Biorreatores de Leito Fluidizado;
- Biorreator de Leito Fixo.

### **2.9.2 Biorreatores com Biomassa em Suspensão**

De acordo com Minatti, (2009), como já visto anteriormente, o princípio desses processos consiste em que a atividade microbiana ocorra com culturas em suspensão. Esses processos utilizam tanques de sedimentação para separação das fases e reciclam uma parte da biomassa. Dentre os processos com biomassa em suspensão, os mais comumente utilizados para tratamento de efluentes são:

- Processo de Lodos Ativados;
- Lagoas Aeradas Agitadas e Anaeróbias;
- Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo
- “*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*” (UASB).

## 2.10 Modelos cinéticos de biodegradação

### 2.10.1 Classificação dos modelos cinéticos

Como citado por Trigueros (2008), os modelos cinéticos de processos biotecnológicos, em geral, podem ser classificados, quanto ao número de componentes usados na representação celular, em modelos não-estruturados e modelos estruturados. Os modelos não-estruturados avaliam o comportamento cinético do processo, admitindo que o material celular seja representado por uma única variável, e não existem variações de componentes intracelulares. Já os modelos estruturados permitem descrever o estado das células com maiores detalhes, considerando os componentes intracelulares.

Quanto à heterogeneidade da população microbiana, os modelos cinéticos também são classificados em duas categorias. Neste caso, existem os modelos não segregados que admitem uma população homogênea, nos quais todas as células apresentam o mesmo comportamento; e os modelos segregados, que consideram uma população heterogênea, nos quais as células possuem distribuição de idade, tamanho, dentre outras propriedades.

### 2.10.2 Taxa de crescimento específico

A equação cinética para um substrato “i” descreve a influência de sua concentração e de outros compostos (inibidores ou ativadores) na taxa de crescimento específico  $\mu_{xi}$ . A taxa de crescimento específico pode ser afetada pela presença de inibidores no meio de cultura, como alguns substratos, intermediários e produtos formados.

A expressão para a taxa de crescimento específico é função do modelo cinético, além do micro-organismo. Quando a biodegradação ocorre na presença de múltiplos substratos, a taxa de crescimento específico celular pode ser apresentada por meio da forma aditiva (equação 2.1) e da forma multiplicativa (equação 2.2):

$$SGR = \sum \mu_{xi} \quad (2.1)$$

$$SGR = \prod_{i=1}^n \mu_{xi} \quad (2.2)$$

Dentre os modelos cinéticos não-estruturados tem-se o clássico modelo de MONOD (1942) apud Littlejohns and Daugulis *et al.* (2008), a partir do qual surgiram diversos outros modelos que descrevem o consumo de substratos, formação dos produtos e crescimento da biomassa. Além disso, alguns também incorporam a influência de componentes tais como, inibidores e ativadores. As Tabelas 2.6 e 2.7 apresentam alguns modelos não-estruturados para o crescimento celular em único substrato e múltiplos substratos, respectivamente.

### 2.10.3 Modelos para único substrato

#### 2.10.3.1 Modelo de Monod

O trabalho fenomenológico mais importante sobre cinética de crescimento microbiano foi desenvolvido em 1942 por MONOD. O modelo de Monod aplica-se para a população microbiana e representa características cinéticas integrais da biomassa. Este fato é crucial para entender a fisiologia microbiana no nível da população e acelerou o desenvolvimento de outros modelos cinéticos, tais como Tessier, Moser e Contois (BAILEY and OLLIS, 1986).

Monod admite que todos os componentes do meio de cultura, menos um, estão presentes em altas concentrações balanceadas, tal que mudanças nestas condições não afetam significativamente a taxa de crescimento celular. Assim, um simples componente torna-se limitante (substrato), e somente as variações na concentração deste componente causariam alterações no comportamento do meio de cultura.

A equação de Monod, conforme a Tabela 2.6, relaciona a taxa de crescimento em função da concentração do substrato. A constante de Monod  $K_s$ , denominada constante de saturação, representa o valor da concentração de substrato  $S$  no qual a taxa de crescimento específico é igual à metade do seu valor máximo, e indica especialmente a afinidade do micro-organismo ao substrato como citado por Trigueros (2008).



$$\mu_x = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{K_s + S} \quad (2.3)$$

Os balanços individuais para os compostos tolueno, e orto-xileno são expressos pelas equações 2.4 e 2.5, respectivamente:

$$\frac{dS_T(t)}{dt} = \frac{\mu_{\text{máx}_T} S_T(t) X(t)}{K_{S_T} + S_T(t) Y_{X/S_T}} \quad (2.4)$$

$$\frac{dS_X(t)}{dt} = \frac{\mu_{\text{máx}_X} S_X(t) X(t)}{K_{S_X} + S_X(t) Y_{X/S_X}} \quad (2.5)$$

Tabela 2.6 – Modelos cinéticos biodegradativos para único substrato

Modelo	Equação	Referência
Limitação e inibição pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{\left(\frac{S}{K_i}\right)^n + 1 + \frac{K_s}{S}}$	WU <i>et al.</i> (1988) apud LIMA <i>et al.</i> (2001)
Limitação pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_s + S}$ $\mu_x = \mu_{m\acute{a}x}(1 - e^{-ks})$ $\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_s + S}$ $\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{S + XK_m}$	<p>MONOD (1942) apud REARDON <i>et al.</i> (2000)</p> <p>TESSIER (1942) apud BAILEY and OLLIS (1986)</p> <p>MOSER (1958) apud BAILEY and OLLIS (1986)</p> <p>CONTOIS (1959) apud BAILEY &amp; OLLIS (1986)</p>
Inibição pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S\left(1 + \frac{S}{K}\right)}{S + K_s + \frac{S^2}{K_i}}$ $\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_i}\right)\left(1 + \frac{S}{K}\right)}$ $\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{\mu_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$ $\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S\left(\frac{-S}{K_i}\right)}{K_s + S}$ $\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \left[ e^{\left(\frac{-S}{K_i}\right)} - e^{\left(\frac{-S}{K_s}\right)} \right]$	<p>WEEB (1963) apud TRIGUEROS (2008)</p> <p>YANO <i>et al.</i>, (1966) apud NUHOGLU and YALCIN (2005)</p> <p>ANDREWS (1968) apud REARDON <i>et al.</i> (2000)</p> <p>AIBA (1968) apud NUHOGLU and YALCIN (2005)</p> <p>EDWARDS (1970) apud NUHOGLU and YALCIN (2005)</p>

### 2.10.3.2 Modelo de Andrews

A resposta de uma população microbiana a presença de um substrato exterior é geralmente modelada usando a cinética de Monod. No entanto, diferentes padrões de dependência em concentrações de substrato já foram descritas na literatura, estas diferentes respostas são geralmente modeladas utilizando variantes da cinética de Monod. Inibição de substrato é um fenômeno frequentemente observado na literatura e várias modificações na cinética de Monod surgiram pela sua descrição (LUONG, 1987; MERIC *et al.*, 2002; HAN and LEVENSPIEL, 1988; apud GUIADOLA *et al.*, 2006). A modificação de Andrews é provavelmente, o modelo de inibição mais frequentemente usado.

Devido à natureza tóxica do BTEX e a possibilidade de inibição pelo substrato, um modelo modificado de Monod, o modelo de Andrews, como mostrado na Tabela 2.6 pode proporcionar um melhor ajuste aos dados experimentais obtidos a partir de experiências individuais de substrato (LITTLEJOHNS and Daugulis, 2008).

$$\mu_x = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{\mu_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.6)$$

Os balanços individuais para os compostos tolueno e orto-xileno são expressos pelas equações 2.7 e 2.8 respectivamente:

$$\frac{dS_T(t)}{dt} = \frac{\mu_{\text{máx}_T} S_T(t) X(t)}{K_{S_T} + S_T(t) + \frac{S_T^2(t)}{K_{i_T}} Y_{x/s_T}} \quad (2.7)$$

$$\frac{dS_X(t)}{dt} = \frac{\mu_{\text{máx}_X} S_T(t) X(t)}{K_{S_X} + S_X(t) + \frac{S_X^2(t)}{K_{i_X}} Y_{x/s_X}} \quad (2.8)$$

### 2.10.4 Modelos para múltiplos substratos

A modelagem matemática da cinética microbiana em múltiplos substratos é bastante complexa. Os micro-organismos crescidos em múltiplos substratos mostram preferência por muitos dos compostos presentes no meio, favorecendo suas biodegradações (PATNAIK, 2000) em detrimento da biodegradação dos compostos preteridos. Vários fenômenos devem ser considerados quando micro-organismos utilizam muitos substratos, tais como a repressão catabólica, os quais promovem a utilização sequencial ou simultânea dos substratos. A Tabela 2.7 apresenta alguns dos modelos não estruturados adequados para sistemas com múltiplos substratos.

Tabela 2.7 – Modelos cinéticos biodegradativos para múltiplos substratos

Modelo	Equação	Referência
Limitação por múltiplos substratos	$\mu_x = \frac{\mu_{\max} S_1 S_2}{(S_1 + K_{S_1})(S_2 + K_{S_2})}$ (utilização simultânea de $S_1$ e $S_2$ )  $\mu_x = \left( \mu_0 + \frac{\mu_{\max_1} S_1}{S_1 + K_{S_1}} + \frac{\mu_{\max_2} S_2}{K_{S_2} + S_2} \right) \left( \frac{S_3}{K_{S_3} + S_3} \right)$ (utilização simultânea de $S_1$ e $S_2$ )	MEGEE <i>et al.</i> (1972) apud LIMA <i>et al.</i> (2001)  TSAO and HANSON (1975) apud LIMA <i>et al.</i> (2001)
Inibição não competitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left( K_{S_i} + S_i + S_j \left( \frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) + \frac{S_i S_j}{K_{S_j}} \right)}$	SEGEL (1975) apud REARDON <i>et al.</i> (2000)
Inibição acompetitiva	$\mu_{x_i} = \frac{S_i \mu_{\max_i}}{\left( K_{S_i} + S_i + \frac{S_i S_j}{K_{S_j}} \right)}$	
Inibição competitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left( K_{S_i} + S_i + S_j \left( \frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) \right)}$	YOON <i>et al.</i> (1977) apud REARDON <i>et al.</i> (2000)
SKIP	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left( K_{S_i} + S_i + S_j I_{ji} \right)}$	

### 2.10.4.1 Modelo de inibição competitiva

A utilização simultânea, observada durante a utilização simultânea, observada durante a biodegradação de mistura de substratos, suporta a hipótese de que estes substratos são utilizados pela mesma rota metabólica, o que sugere a presença de inibição competitiva entre os substratos.

O modelo de inibição competitiva descreve os processos em que o inibidor (um dos compostos) e o substrato, que geralmente possuem estrutura química semelhante, competem pelo sítio ativo da mesma enzima, responsável pela metabolização de compostos (TRIGUEROS, 2010b).

Este modelo de inibição competitiva, proposto por YOON *et al.* (1977) apud REARDON *et al.* (2000) e TRIGUEROS (2008), representa a taxa de crescimento específico do substrato “i” na presença de um substrato “j”. O modelo pode ser facilmente estendido para vários substratos presentes no sistema, como apresentado na equação 2.9:

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left( K_{S_i} + S_i + S_j \left( \frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) \right)} \quad (2.9)$$

As taxas de crescimento específico no tolueno e o-xileno são dadas pelas equações (2.10) e (2.11), respectivamente, para a mistura dos compostos TX:

$$\mu_{x_T} = \frac{\mu_{\max_T} S_T}{\left( K_{S_T} + S_T + S_X \left( \frac{K_{S_T}}{K_{S_X}} \right) \right)} \quad (2.10)$$

$$\mu_{x_X} = \frac{\mu_{\max_X} S_X}{\left( K_{S_X} + S_X + S_T \left( \frac{K_{S_X}}{K_{S_T}} \right) \right)} \quad (2.11)$$

### 2.10.4.2 Modelo de inibição não competitiva

O modelo de inibição não competitiva representa processos onde o inibidor liga-se tanto ao complexo enzima-substrato, quanto a enzima livre inativando-os (TRIGUEROS, 2010b). O modelo apresentado na Tabela 2.7, representa a taxa de crescimento específico no substrato “i” na presença de um substrato “j”. Também pode ser representada pela equação 2.12, quando mais substratos estão envolvidos no processo.

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{máx_i} S_i}{\left( K_{S_i} + S_i + S_j \left( \frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) + \frac{S_i S_j}{K_{S_j}} \right)} \quad (2.12)$$

As taxas de crescimento específico no tolueno e o-xileno são dadas pelas equações (2.13) e (2.14), respectivamente, para os compostos TX

$$\mu_{x_T} = \frac{\mu_{máx_T} S_T}{\left( K_{S_T} + S_T + S_X \left( \frac{K_{S_T}}{K_{S_X}} \right) + \frac{S_T S_X}{K_{S_X}} \right)} \quad (2.13)$$

$$\mu_{x_X} = \frac{\mu_{máx_X} S_X}{\left( K_{S_X} + S_X + S_T \left( \frac{K_{S_X}}{K_{S_T}} \right) + \frac{S_X S_T}{K_{S_T}} \right)} \quad (2.14)$$

### 2.10.4.3 Modelo de inibição incompetitiva

O modelo de inibição incompetitiva pode ser utilizado quando o substrato inibidor se liga ao complexo enzima-substrato inativando-o, e não a enzima livre (TRIGUEROS, 2010b). A taxa de crescimento específico dada pela inibição incompetitiva entre substratos “i” e “j” é apresentada na Tabela 2.7, para o substrato “i”. Estendendo o modelo para mais do que dois substratos presentes no processo, à taxa de crescimento específico no substrato “i” pode ser representado pela equação 2.15.

$$\mu_{x_i} = \frac{S_i \mu_{\max_i}}{\left( K_{S_i} + S_i + \frac{S_i S_j}{K_{S_j}} \right)} \quad (2.15)$$

As taxas de crescimento específico no tolueno, o xileno são dadas pelas equações (2.16) e (2.17), respectivamente, para a mistura dos compostos TX:

$$\mu_{x_T} = \frac{\mu_{\max_T} S_T}{\left( K_{S_T} + S_T + \frac{S_T S_X}{K_{S_X}} \right)} \quad (2.16)$$

$$\mu_{x_X} = \frac{\mu_{\max_X} S_X}{\left( K_{S_X} + S_X + \frac{S_X S_T}{K_{S_T}} \right)} \quad (2.17)$$

#### 2.10.4.4 Modelo SKIP

Quando as interações entre os substratos não correspondem à inibição enzimática, então um modelo alternativo pode ser utilizado, conhecido como modelo SKIP (*sum kinetics interaction parameters*) (TRIGUEROS, 2010b). Este modelo foi proposto por YOON *et al.* (1977) apud REARDON *et al.* (2000), sendo adequado para ajustar interações não-específicas entre dois substratos, pela incorporação do parâmetro de interação  $I_{ji}$ , que indica o grau que o substrato “j” afeta a biodegradação do substrato “i”. Neste caso, a taxa de crescimento específico para o substrato “i” pode ser apresentada pela equação, dada na Tabela 2.7. O modelo também pode ser estendido para vários substratos presentes no sistema, como apresentado na equação 2.18:

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left( K_{S_i} + S_i + S_j I_{ji} \right)} \quad (2.18)$$

As taxas de crescimento específico no tolueno, e o-xileno são dadas pelas equações (2.19) e (2.20), respectivamente, para a mistura dos compostos TX:

$$\mu_{x_T} = \frac{\mu_{\text{máx}_T} S_T}{(K_{S_T} + S_T + S_X I_{XT})} \quad (2.19)$$

$$\mu_{x_X} = \frac{\mu_{\text{máx}_X} S_X}{(K_{S_X} + S_X + S_T I_{TX})} \quad (2.20)$$

## 2.11 Procedimento para estimativa dos parâmetros

### 2.11.1 Otimização por Enxame de Partículas

A otimização por enxame de partículas (*Particle Swarm Optimization* – PSO) é um método de busca global, criado em 1995 por Kennedy e Eberhart (2001), baseado na simulação do comportamento social de animais, tais como pássaros, abelhas, peixes etc. Assim, cada indivíduo da população, denominado de partícula do enxame, sofre alterações aparentemente desorganizadas em sua posição no decorrer do tempo, em busca de melhores alimentos, proteção etc. Contudo, as alterações nas posições das partículas são globalmente organizadas, visto que os movimentos ocorrem sob dois aspectos principais: a memória e a cooperação. Assim, as partículas exploram o espaço de busca multidimensional, ajustando a sua posição e velocidade baseado em suas próprias experiências e na experiência do enxame, encontrando a sua melhor posição e a melhor posição do grupo. Portanto, o êxito do enxame de partículas em encontrar o seu objetivo está fundamentado na sua capacidade sócio-cognitiva.

O algoritmo PSO tem apresentado elevada eficiência em resolver diversos problemas de otimização irrestritos tais como em processos de biodegradação, adsorção e bioacumulação (ESPINOZA-QUIÑONES *et al.*, 2009; TRIGUEROS *et al.*, 2010a; TRIGUEROS *et al.*, 2010b; TRIGUEROS *et al.*, 2010c; FIORENTIN *et al.*, 2010; MÓDENES *et al.*, 2011; MÓDENES *et al.*, 2012). Além disso, o algoritmo tem sido aperfeiçoado para resolver problemas de otimização restritos, tais como NLP/MINLP propostos para síntese de redes de



reúso de água em processos industriais (TRIGUEROS, 2011; TRIGUEROS *et al.*, 2012).

Os resultados alcançados neste trabalho foram obtidos utilizando o algoritmo PSO, codificado no *software* Maple 14<sup>®</sup>, executado no *Windows* 7, utilizando-se um microcomputador Intel<sup>®</sup> Core™ i7-930, 2.8 GHz, 8 GB de memória RAM.

### 2.11.2 Implementação do algoritmo

Comparando-o com outras metaheurísticas, o algoritmo PSO é simples, de fácil implementação e possui poucos parâmetros ajustáveis ao problema de otimização. Ele pode ser descrito basicamente da seguinte maneira.

Primeiramente, uma população de partículas, denominada enxame, é inicializada uniformemente em um espaço de busca restrito pelos limites inferior e superior previamente definidos para cada variável de decisão do problema de otimização, conforme descrito pela equação 2.21. No espaço de busca, cuja dimensão é igual ao número de variáveis de decisão do problema de otimização ( $NV$ ), cada partícula do enxame, de densidade igual ao número de partículas pré-definido ( $NP$ ), representa uma solução potencial.

Conforme descrito pelas equações (2.22 e 2.23), o movimento das partículas é conduzido a partir de três influências: posição atual da partícula ( $\mathbf{X}_i^{(k)}$ ), melhor posição visitada pela partícula ( $\mathbf{X}_{i_{melhor}}^{(k)}$ ) e melhor posição visitada pelo enxame ( $\mathbf{X}_{g_{melhor}}^{(k)}$ ). Então, começando entre os limites inferior e superior do enxame, cada caminho da partícula é calculada de forma aleatória, obtendo assim um vetor nova posição atualizada da partícula ( $\mathbf{X}_i^{(k+1)}$ ) de uma forma iterativa, de acordo com a equação (2.24). Para manter as partículas dentro do espaço de busca, as equações (2.25) e (2.26) devem ser satisfeitas.

$$\mathbf{X}_i^{(k)} = \mathbf{X}_{\min} + \lambda(\mathbf{X}_{\max} - \mathbf{X}_{\min}) \quad (2.21)$$

$$\mathbf{V}_i^{(k+1)} = \omega^{(k)}\mathbf{V}_i^{(k)} + c_1\lambda_1(\mathbf{X}_{i_{melhor}}^{(k)} - \mathbf{X}_i^{(k)}) + c_2\lambda_2(\mathbf{X}_{g_{melhor}}^{(k)} - \mathbf{X}_i^{(k)}) \quad (2.22)$$

$$\omega^{(k)} = \omega_{inicial} + (\omega_{final} - \omega_{inicial})\left(\frac{k-1}{K-1}\right) \quad (2.23)$$

$$\mathbf{X}_i^{(k+1)} = \mathbf{X}_i^{(k)} + \mathbf{V}_i^{(k+1)} \quad (2.24)$$

$$\text{If } \mathbf{X}_i^{(k+1)} > \mathbf{X}_{\max} \text{ then } \mathbf{X}_i^{(k+1)} = \mathbf{X}_{\max} \quad (2.25)$$

$$\text{If } \mathbf{X}_i^{(k+1)} < \mathbf{X}_{\min} \text{ then } \mathbf{X}_i^{(k+1)} = \mathbf{X}_{\min} \quad (2.26)$$

Portanto, em um movimento aparentemente desordenado, a posição e a velocidade de cada partícula, cinematicamente descritas pelas equações (2.22-2.24), são iterativamente atualizadas, conforme a equação (2.24), com base em poucos parâmetros que correspondem à inércia do enxame, ao movimento de cada partícula e ao movimento do enxame neste espaço geograficamente restrito.

Assim, com base nas equações (2.22-2.24), um novo vetor de velocidade das partículas ( $\mathbf{V}_i^{(k+1)}$ ) também é iterativamente atualizado pela geração de duas variáveis randômicas ( $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ ) e um fator inercial ( $\omega$ ) iterativamente fracionado, bem como a introdução de dois parâmetros de restrição física, o coeficiente cognitivo ( $c_1$ ) e o coeficiente social ( $c_2$ ), responsáveis por refinar a busca da solução local e global, respectivamente. A Figura 2.3 mostra a trajetória de uma partícula do PSO.

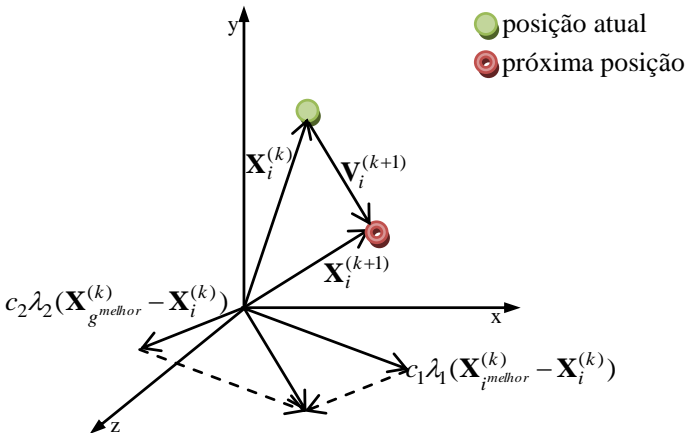


Figura 2.3: Trajetória de uma partícula do algoritmo PSO

A função do fator de inércia ( $\omega$ ) é muito importante no comportamento da convergência do PSO, sendo empregado para controlar o efeito das velocidades anteriores sobre as velocidades atualizadas. Quanto maior for a concentração de partículas, maior será o fator de inércia do grupo, ou seja, uma maior população de partículas segue a uma tendência social, induzindo à busca global. Por outro lado,

um menor fator de inércia induz a população buscar em uma região de baixa densidade, isto é, regiões de soluções ótimas locais. Assim, um valor grande para o fator de inércia facilita a exploração global, enquanto um pequeno valor tende a facilitar a exploração local. Portanto, é necessário definir um valor que implique equilíbrio entre a capacidade de exploração global e local, e conseqüentemente resulte em eficiente convergência do algoritmo PSO. Segundo SHI e EBERHART (1998), esse equilíbrio pode estar no decaimento linear do fator de inércia a cada iteração, conforme descrito pela equação (2.23).

Comparando-se com a posição anteriormente atribuída para o enxame, a posição atualizada de cada partícula ( $\mathbf{X}_i^{(k+1)}$ ) é avaliada, a fim de identificar a melhor posição entre um número previamente definido de iterações ( $K$ ). Desta forma, este valor é armazenado como melhor posição visitada pela partícula, ou seja, a melhor solução individual ou local ( $\mathbf{X}_{i,melhor}^{(k)}$ ).

O melhor resultado encontrado pelo enxame ( $\mathbf{X}_{g,melhor}^{(k)}$ ), ou seja, a solução global, é determinado entre todas as melhores posições visitadas pelas partículas que também foram encontradas iterativamente entre o número de partículas pré-definidas.

O desempenho de cada partícula está relacionado com uma função de aptidão (*fitness*), denominada de função objetivo, a qual está relacionada com o critério de otimização a ser atingido. Quando o número de iterações previamente definido é atingido, o algoritmo PSO fornece a melhor solução encontrada como um conjunto de valores ótimos de variáveis de decisão do problema. Entre todas as posições visitadas pelo enxame de partículas, a solução na qual a função objetivo forneceu o valor mínimo (ou máximo), é chamada de melhor solução global. A Figura 2.4 apresenta o algoritmo PSO original.

Como critério de otimização utilizou-se como função objetivo a minimização da Equação (2.27).

$$F.O. = \sum_{i=1} \left( \frac{X_i^{\text{exp}} - X_i^{\text{pred}}}{X_i^{\text{exp}*}} \right)^2 \quad (\text{Eq.2.27})$$

$X_i^{\text{exp}}$  – valor experimental;  $X_i^{\text{exp}*}$  – máximo valor experimental;  
 $X_i^{\text{pred}}$  – valor predito pelo modelo.

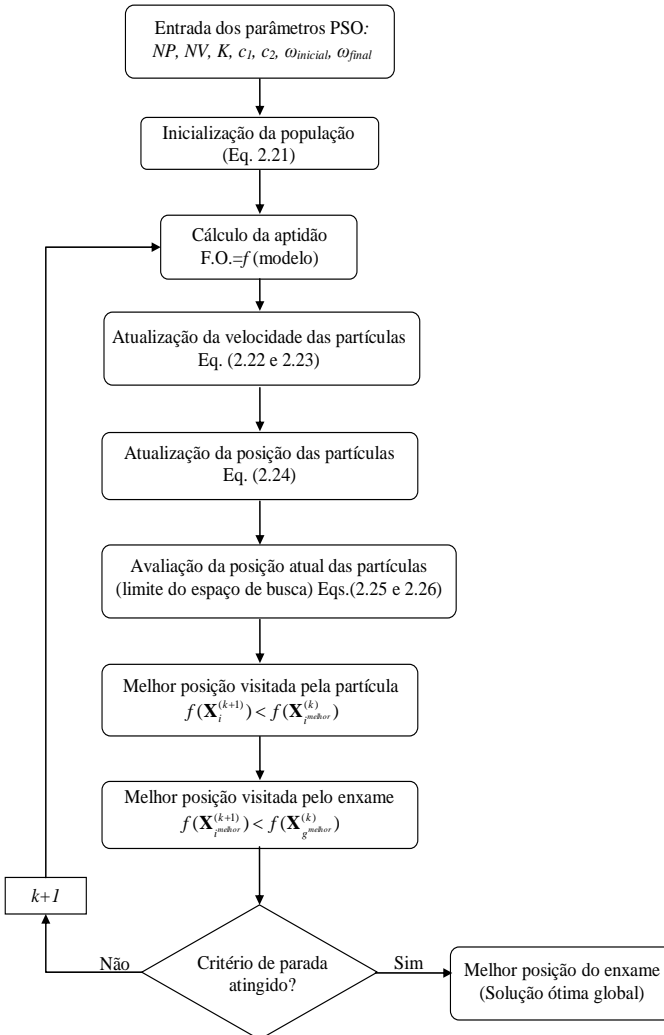


Figura 2.4: Algoritmo PSO

Sendo:

NP: número de partículas

NV: número de variáveis

K: número de iterações

C1: constante de aceleração local do enxame de partículas

C2: constante de aceleração global do enxame de partículas

W: fator de inércia do enxame

ENTRADA DE DADOS DO PSO (para resolver os modelos de biodegradação)

C1=1.5

C2=1.5

W<sub>inicial</sub>=0.9

W<sub>final</sub>=0.4

NV=f (modelo de degradação utilizado)

NP=f (número de parâmetros do modelo); f(K)

- **Modelos Monocomponente**

NV=4 (modelo Monod -  $m_{i\max}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$  e  $X_0$ ) → NP=1000

NV=5 (modelo Andrews -  $m_{i\max}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $K_i$  e  $X_0$ ) → NP=1250

- **Modelos Bicomponente**

NV=7 (modelos de inibição -  $m_{i\max}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$  para cada comp. "i";  $X_0$ ) → NP=1750

NV=9 (modelo SKIP -  $m_{i\max}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$  para cada comp. "i";  $X_0$ ) → NP=2250

- **Modelos Tricomponente**

NV=10 (modelos de inibição -  $m_{i\max}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$  para cada comp. "i";  $X_0$ ) → NP=2500

NV=16 (modelos SKIP -  $m_{i\max}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$ , I para cada comp. "i";  $X_0$ ) → NP=4000

Através da utilização do método de PSO é possível obter os parâmetros cinéticos dos modelos de biodegradação dos compostos BTX, da mesma forma como foi obtida por Trigueros (2008), Trigueros *et al.* (2010) e Mello (2012)



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Neste capítulo serão descritos os equipamentos e materiais utilizados, bem como as principais metodologias empregadas no desenvolvimento dos experimentos laboratoriais realizados. Os procedimentos experimentais adotados para a obtenção dos parâmetros cinéticos da biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e o-xileno, os BTX, do efluente sintético envolvem as etapas: caracterização do adsorvente, métodos adotados para a análise das amostras e a quantificação dos micro-organismos.

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA – do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1 Compostos orgânicos utilizados**

Entre os principais contaminantes representativos nos efluentes da indústria petroquímica estão os compostos aromáticos, especialmente os hidrocarbonetos monoaromáticos denominados BTX (Benzeno, Tolueno e o-Xileno) os quais foram selecionados para o presente trabalho.

Para a realização do trabalho foram utilizado efluente sintético com os seguintes compostos com suas respectivas marcas: Benzeno (marca FLUKA) para HPLC 99,5%, Tolueno (marca VETEC) UV/HPLC – Espectroscópico e o-Xileno (marca ALDRICH) para HPLC 98%.

##### **3.1.2 Material suporte para Imobilização da biomassa – carvão Ativado**

Como material suporte para imobilização da biomassa, foram utilizadas partículas de carvão ativado do tipo “Carbono 119”, de origem vegetal, produzido a partir de casca de coco, obtido pelo processo físico de ativação número 119, sendo esse carvão utilizado em trabalhos anteriores como Mello (2007) e Minatti (2007). Esse carvão ativado é dotado de elevada dureza e densidade, facilitando os processos que

necessitam de regenerações sucessivas. Este carvão foi desenvolvido para ser utilizado em leitos fixos e móveis, no tratamento e purificação de diversos fluidos (CARBOMAFRA, 2008).

A determinação do tamanho da partícula foi feita pela análise granulométrica através de peneiramento em peneiras da marca BRONZINOX, as quais são mecanicamente agitadas por no mínimo 15 min. O agitador de peneiras utilizado é da marca MINOR ENDECOTTS.

A granulometria utilizada foi de 10 e 14 mesh (17 cm) e a massa de carvão ativado foi de 9,0 g e de 7 e 10 mesh (24 cm) e a massa de carvão também foi de 9,0 g.

### **3.1.3 Solventes**

Os solventes utilizados foram:

- Água destilada, com o objetivo de preparar a solução de nutrientes dos compostos BTX;

- água MiliQ e Metanol para HPLC (marca J. T. BAKER), com 99,98% de pureza, para o uso no HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).

### **3.1.4 Composição mineral do meio de cultura**

Entre os principais componentes de um meio de cultura estão as fontes de carbono e energia como os açúcares, as fontes de nitrogênio, fósforo e sais minerais.

Para o desenvolvimento dos micro-organismos foi preciso alimentar os biorreatores com um meio de cultura, cuja composição foi baseada na informação de Shim and Yang (1999) e descrita na Tabela 3.1.

A solução designada meio mineral foi composta por todos os micro e macro nutrientes, pelos tampões, fonte de nitrogênio e água destilada. Todos os reagentes foram pesados em uma balança analítica da marca SHIMADZU modelo AW 220. As fontes de oxigênio e de carbono foram adicionadas separadamente, ambas medidas com pipetas de precisão (Eppendorf, de 20, 100, 1000 e 5000 µL). O pH da solução de meio mineral é de 7,0.



Tabela 3.1 – Composição do meio mineral para desenvolvimento dos Micro-organismos.

	Composto Químico	Concentração moles/L
Macronutrientes	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$5,03 \times 10^{-5}$
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,87 \times 10^{-3}$
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$5,9 \times 10^{-5}$
	$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4,28 \times 10^{-5}$
Micronutriente	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$6,96 \times 10^{-6}$
Tampão	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$3,67 \times 10^{-3}$
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$2,87 \times 10^{-3}$
Fonte de nitrogênio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$3,78 \times 10^{-3}$
Fonte de oxigênio	$\text{H}_2\text{O}_2$ (30%)	$5,76 \times 10^{-4}$
Fonte de carbono		
	Benzeno	$1,824 \times 10^{-4}$
	Tolueno	$1,5465 \times 10^{-4}$
	o-Xileno	$1,3423 \times 10^{-4}$
	Glicose	$5,55062 \times 10^{-3}$
		$5,55062 \times 10^{-2}$

Fonte: Adaptado de Mello (2007).

### 3.1.5 Inóculo

A biomassa utilizada como inóculo neste trabalho é procedente da Estação de Tratamento de Esgoto de Florianópolis, do bairro Lagoa da Conceição – Santa Catarina (CASAN). A biomassa foi coletada em um frasco de 5 L e armazenada em geladeira até a montagem dos biorreatores. As Figuras 3.1 (a) e (b) mostram a biomassa na ETE e a amostra coletada para os ensaios em laboratório.



Figura 3. 1 – (a) Biomassa na ETE; (b) Amostra coletada em um frasco de 5 L.

### 3.1.6 Reatores

#### 3.1.6.1 Reatores batelada

Os ensaios para obtenção da cinética de degradação dos compostos BTX foram realizados utilizando-se biorreatores em batelada, escala de bancada, constituídos por Erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 285 mL. Os biorreatores foram fechados com tampa de teflon, para evitar a volatilização dos compostos para o meio, conforme mostra a Figura 3.2. Cada biorreator foi destinado e adaptado a biodegradar determinado(s) composto(s) associado monocomponente, bicomponente e tricompente a temperatura de 23°C e agitação de 150 rotações por minuto.



Figura 3.2 – Biorreatores usados para biodegradação de BTX

### 3.1.6.2 Reator em fluxo contínuo

Os ensaios para obtenção da cinética de degradação dos compostos tolueno e o-xileno, TX, em fluxo contínuo foram realizados utilizando-se uma coluna de leito fixo, de 50 cm de comprimento e diâmetro de aproximadamente 3 cm com carvão ativado, associada a uma bomba (marca GILSON, modelo Miniplus 3). O sistema continha um reservatório de efluentes e um agitador magnético (marca DIST, modelo DL-03), como representado pela Figura 3.3. Os compostos a ser analisados eram colocados no reservatório sendo agitados pelo agitador magnético e bombeados para a coluna através de uma bomba (marca Gilson, modelo MINIPLUS 3). Na coluna eram retiradas amostras em pontos predeterminados ao longo do comprimento do reator, dessa forma obtinha-se um perfil de concentração ao longo do comprimento. Esta metodologia foi adotada com base no trabalho Mello (2012), que estudou cinéticas em fluxo contínuo utilizando uma coluna de biodegradação.



Figura 3.3 – Aparato experimental para determinação da concentração de tolueno e o-xileno em fluxo contínuo.

## 3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 3.2.1 Concentração de oxigênio

A concentração de oxigênio dissolvido foi medida por meio de um oxímetro digital (WTW - modelo OXI 340i/SET).

### 3.2.2 pH

Para a medida do pH, foi utilizado um pHmetro (QUIMIS – modelo Q-400M2).

### 3.2.3 Análise de DQO

A DQO baseia-se na oxidação química da matéria orgânica por dicromato de potássio a temperaturas elevadas e em meio ácido contendo catalisador. As determinações foram feitas de acordo com o procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1995). As análises foram realizadas no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Em frascos de digestão foram adicionados 2,5 mL de amostra, 1,5 mL de solução digestora contendo dicromato de potássio, ácido sulfúrico e sulfato de mercúrio, e 3,5 mL de solução catalítica de sulfato de prata em ácido sulfúrico. A mistura foi aquecida a 140 °C durante 2 h, empregando-se como digestor um reator marca HACH. Após 2 h os tubos foram retirados e deixou-se esfriar a temperatura ambiente. Após resfriamento, a leitura da absorbância foi realizada a 600 nm num fotômetro PF-11 marca Macherey-Nagel.

A DQO da amostra foi obtida pela interpolação dos dados obtidos na curva de calibração, realizada com solução padrão de biftalato de potássio. Foram preparados padrões da DQO de 0 a 1000 mg O<sub>2</sub>/L, como pode ser observado no Anexo D.

### 3.2.4 Caracterização Morfológica do carvão ativado e da biopartícula

Foram coletadas amostras no reator contínuo e em batelada, e amostras do carvão virgem, e estas foram examinadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC – utilizando-se um microscópio de varredura convencional Philips modelo XL 30, com filamento de tungstênio, com magnificação de 100x a 300000x, com resolução alta tensão de 3 nm e baixa tensão de 4 nm, equipado de EDS (Sistema de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X).

As amostras foram preparadas segundo metodologia proposta por Nation (1983) e adaptada para biofilmes microbianos por Araujo (1995), que é o método de secagem por hexametildisilazana (HMDS) descrito a seguir.

Primeiramente, foi realizada a fixação das amostras com uma solução de glutaraldeído 2,5% em Tampão Fosfato 0,1 M, pH 7,3, gelado. A solução Tampão de Fosfato 0,1 M pH 7,3 foi obtida pela mistura de 19,2 mL da solução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (1,2 g/100 mL) com 80,8 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M (1,42 g/100 mL). Para o preparo da solução (Tampão Fosfato 0,1 M (pH 7,3) mais solução 2,5% de glutaraldeído) foi adicionado 2,5 mL de glutaraldeído em solução 0,1 M de Tampão Fosfato até completar 100 mL em balão volumétrico.

As amostras foram colocadas por 12 h à temperatura de 4 °C em solução Tampão Fosfato 0,1 M pH 7,3 + glutaraldeído. Decorrido esse período, procedeu-se à lavagem das amostras por 3 vezes, com Tampão Fosfato 0,1 M, pH 7,3, sendo 10 min a duração de cada lavagem.

Em seguida, as amostras foram desidratadas gradualmente em álcool etílico nas concentrações de 50, 70, 80, 90, 95% e, por último, lavadas 3 vezes em álcool etílico 100% (Grau PA). Cada operação de desidratação teve a duração de 10 min. Após a desidratação, as amostras foram imersas duas vezes em hexametildisilazano por 30 s cada, e por fim, as amostras foram aderidas aos suportes de MEV e transferidas para a estufa, a uma temperatura de 30 °C, por 2 h para, posteriormente, serem submetidas ao recobrimento com ouro utilizando o aparelho Sputter Coater SCD 005 da BAL-TEC também do LCME.

### 3.2.5 Análises Cromatográficas

A determinação das concentrações dos compostos benzeno, tolueno e o-xileno foram realizados através de cromatografia líquida. As análises foram realizadas em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência, HPLC, da marca CG composto de uma bomba modelo CG 480-E, conectado a um detector UV/visível modelo CG 437-B e coluna Nucleosil C18 fase reversa de 250 mm, diâmetro interno de 4,6 mm.

Junto ao sistema, está acoplado um microcomputador que monitora a resposta de saída da coluna cromatográfica através de um programa de aquisição de dados. A Figura 3.4 apresenta o cromatógrafo empregado no estudo.



Figura 3.4 – Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado nos experimentos.

Dentre as suas propriedades, a fase móvel deve possuir alta pureza, compatibilidade com o detector e baixa viscosidade, dentre outras. Os eluentes utilizados nas corridas experimentais foram o metanol para HPLC (marca J. T. BAKER) e água MiliQ. Estocados individualmente em recipientes de vidro com capacidade de 1 L, os eluentes foram previamente filtrados em membranas de nylon (metanol) e de acetato de celulose (água MiliQ), com diâmetro de 47 mm e poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . A fase móvel (eluente) foi preparada diariamente, nas proporções de 80:20 (metanol/água) e então desaeradas em ultrassom (marca UNIQUE E MODELO 1800-A) por aproximadamente 40 min, para evitar a formação de bolhas de ar no cabeçote da bomba ou na saída do detector. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min.

A injeção das amostras foi realizada através de uma válvula de duas posições (INJECT e LOAD). A amostra coletada em uma seringa de vidro foi previamente filtrada em uma unidade filtrante em poliéster, com carcaça em polipropileno, com diâmetro de 25 mm e poro de 0,20

$\mu\text{m}$ , sendo transferida para um *loop*, em posição “LOAD”. Através da ação manual da válvula para a posição “INJECT”, o *loop* conectava-se à corrente que conduzia a fase móvel à coluna. A quantidade de amostra que o “INJECT” carregava foi de 20  $\mu\text{L}$ .

O detector utilizado identificava as amostras pelo comprimento de onda, podendo ser operado nas regiões ultravioleta e visível. Os compostos BTX foram identificados na região ultravioleta em um comprimento de onda de  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . Um microcomputador, modelo AMD 586, apresentando os terminais específicos para o sistema cromatográfico fazia a aquisição dos dados através do programa DDS 1000 (*Dani Data Station*). O programa é amplamente utilizado para aplicação em cromatografia líquida e gasosa, pois permite processar análises de picos cromatográficos.

Para obtenção das curvas de calibração dos compostos BTX, foram realizadas leituras com variação na concentração de 0 a 150 mg/L para o benzeno e de 0 a 100 mg/L para o tolueno e o-xileno. Para cada ponto obteve-se a leitura da área correspondente à concentração da amostra. Com os valores obtidos, elaborou-se um gráfico da área *versus* a concentração do composto, obtendo-se a curva de calibração para cada um dos compostos estudados. De posse da curva de calibração, a concentração do composto de cada alíquota pode ser facilmente determinada. As curvas de calibração estão apresentadas no Anexo C.

### 3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Imobilização e adaptação da biomassa no suporte para o processo batelada

Para a imobilização e adaptação da biomassa, foram adicionados aos biorreatores 9,0 g de carvão ativado, 250 mL do meio mineral, 30 mL do lodo ativado, totalizando um volume de 285 mL, igual ao volume útil do biorreator.

Durante 30 dias os biorreatores foram alimentados diariamente com solução de meio mineral (retirado 100 ml e adicionado 100 ml), peróxido de hidrogênio (marca LAFAN, peróxido de hidrogênio 130 V) em 12 em 12 h ( $1,44 \times 10^{-4}$  moles/L ao dia) e com glicose (cada reator com sua quantidade específica de glicose) como fonte de carbono, tendo

como objetivo a fixação da biomassa no suporte. Neste período foram realizadas análises de DQO para se certificar que os micro-organismos estavam se adaptando ao meio. A concentração de oxigênio dissolvido no meio foi monitorada diariamente, com o auxílio do oxímetro, a fim de garantir que a concentração do mesmo não ficasse abaixo de 2 mg/L.

Durante o início do processo adaptativo, os reatores foram divididos em dois tipos de acordo com a concentração de glicose: os que foram adaptados à concentração constante de 1000 mg/L ( $5,55062 \times 10^{-3}$  moles/L) de glicose e os demais com concentrações menores.

No primeiro caso, a concentração de alimentação de glicose se manteve constante até o final do processo adaptativo. Assim, durante as primeiras três semanas, alimentou-se os biorreatores somente com glicose na concentração de 1000 mg/L, e aos poucos foi se adicionando tolueno ao meio de cultura. A cada cinco dias aumentava-se em 10 mg/L a concentração de tolueno até se atingir 50 mg/L. A partir desse momento, iniciou-se também o acréscimo de xileno, do mesmo modo, iniciando com 10 mg/L e a cada cinco dias aumentando na mesma quantidade até atingir 50 mg/L. A adição da fonte de carbono ao meio de cultura era realizada a cada 48 h. Foram necessários 71 dias de cultivo para os reatores estarem totalmente adaptados.

Com relação ao segundo caso, os reatores iniciaram sua alimentação com concentração de glicose de 500 mg/L ( $2,7753 \times 10^{-3}$  moles/L), sendo esta a única fonte de carbono durante três semanas. A partir deste período, a glicose começou a ser substituída aos poucos por tolueno. Adicionou-se 10 mg/L de tolueno e a cada 5 dias diminuía-se a concentração de glicose em 100 mg/L e aumentava-se a de tolueno em 10 mg/L até a concentração do meio atingir 100 mg/L de glicose ( $5,55062 \times 10^{-4}$  moles/L) e 50 mg/L de tolueno. A partir deste ponto, novamente os reatores foram divididos em dois tipos: os que receberam xileno em proporções de 10 mg/L a cada 5 dias até atingir 50 mg/L, e mantiveram constante a concentração de glicose em 100 mg/L, e os que substituíram toda sua glicose restante por xileno, onde a cada 5 dias diminuía-se 20 mg/L de glicose e aumentava-se 10 mg/L de xileno. Este processo adaptativo para ambos os casos teve também duração de 71 dias.

Dessa forma, com respeito à concentração de glicose restaram três tipos de reatores: a) 1000 mg/L glicose mais TX, 100 mg/L glicose mais TX e ausência de glicose mais TX.

Após a realização dos experimentos com os reatores de concentração de 1000 mg/L de glicose, estes foram “readaptados”, nesse processo toda a glicose foi substituída por benzeno até concentração de



50 mg/L e novos experimentos foram realizados. A cada 7 dias substituíam-se 200 mg/L de glicose por 10 mg/L de benzeno até uma concentração de 50 mg/L de benzeno. Este processo de “readaptação” levou 35 dias.

Todos os biorreatores foram agitados em um *Shaker*/Banho Maria Dubnoff (NOVA ÉTICA – modelo 304) como mostra a Figura 3.5, à temperatura ambiente de 23 °C e agitação de 150 rpm, durante todo o experimento, com o objetivo de melhor homogeneizar o meio, evitando gradientes de concentração no interior do biorreator.



Figura 3.5 – Shaker utilizado para agitação dos biorreatores em batelada.

Este procedimento de adaptação se faz necessário, devido ao fato dos compostos BTX apresentarem elevada toxicidade para grande parte da microbiota. Com o objetivo de evitar um choque, e eventual morte ou inibição das células, optou-se por uma adaptação gradativa da biomassa aos compostos se iniciando com adição de tolueno, como verificado em trabalhos na literatura (MINATTI, 2009; MELLO, 2007).

Todos os biorreatores foram alimentados com fonte de carbono a cada 48 h retirando-se 100 mL da solução presente no biorreator e adicionando-se 100 mL da solução de meio mineral e sendo adicionado a cada 12 h 50 µL de peróxido de hidrogênio ( $2,88 \times 10^{-4}$  moles/L ao dia) ao respectivo biorreator. A concentração de oxigênio solúvel no meio foi monitorada diariamente, e as análises da concentração dos compostos foram realizadas no cromatógrafo em fase líquida (HPLC).

Os processos adaptativos podem ser melhor observados de acordo com as Figura 3.6 para a concentração de glicose de 1000 mg/L e figura 3.7 para concentrações de glicose de 100 mg/L e ausência de glicose.

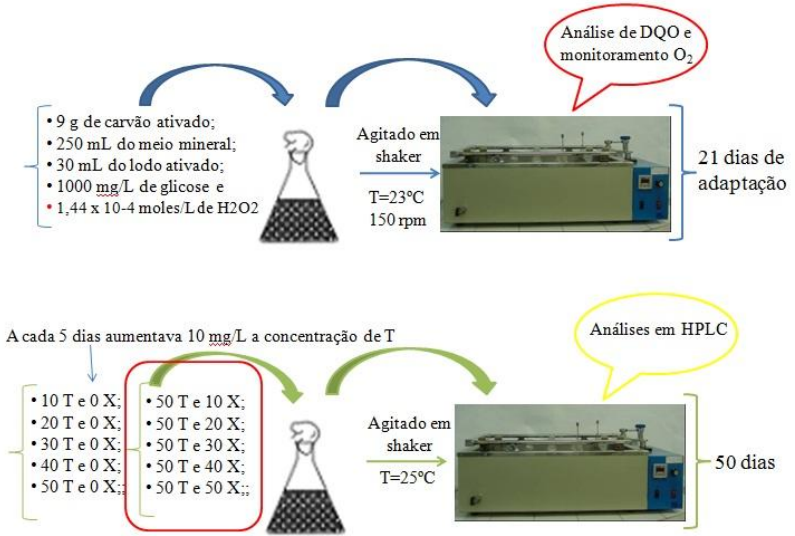


Figura 3.6 – Esquema representativo do processo adaptativo dos biorreatores na concentração de 1000 mg/L de glicose.

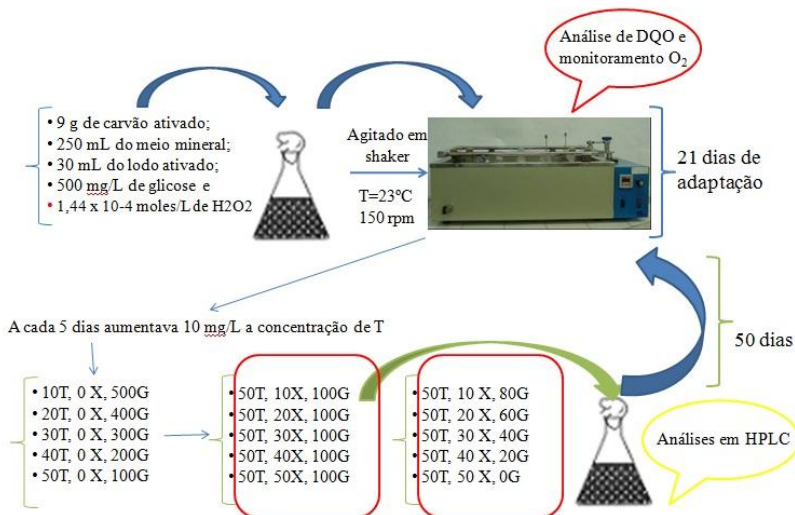


Figura 3.7 – Esquema representativo do processo adaptativo dos biorreatores na concentração de 100 mg/L de glicose e ausência de glicose.

### 3.3.2 Adaptação da biomassa em biorreator tipo coluna

Os biorreatores receberam um processo adaptativo com substituição completa de glicose pelos compostos BTX, seguindo o mesmo procedimento descrito na secção 3.3.1 pelos reatores que não continham glicose. Após isto, as biopartículas (biofilme mais carvão) foram colocadas em uma coluna de biodegradação e passaram por um segundo processo adaptativo para se adaptar ao novo sistema, onde foram alimentados com concentrações de até 50 mg/L de cada BTX, por um período de 30 dias, para então se iniciarem os experimentos em fluxo contínuo.

### 3.3.3 Obtenção da cinética de degradação

#### 3.3.3.1 Cinéticas para o processo batelada

Para a obtenção das cinéticas de biodegradação dos compostos BTX, os suportes com as células aderidas contidos nos biorreatores foram submetidos a peneiramento, para eliminação do lodo não aderido ao meio suporte. Após o peneiramento, foram colocados em erlenmeyers: 18,0 g de suporte com o biofilme aderido (base úmida, equivalente a aproximadamente 9,0 g de carvão seco), e 30 mL de solução de meio mineral, sendo adicionados 50  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio ( $1,44 \times 10^{-4}$  moles/L) e a concentração de estudo de glicose. Em separado, foram medidos 250 mL da solução de meio mineral, sendo nesta adicionado os compostos BTX em estudo, esta solução foi colocada sob intensa agitação, para que houvesse uma adequada solubilização destes compostos, após misturou-se a solução contendo os compostos BTX solubilizados ao reator que continha glicose, peróxido e carvão ativo, ficando com um volume de líquido de 285 mL e, conseqüentemente, um pequeno volume de *headspace* (volume da superfície do líquido até a tampa do biorreator).

Em intervalos regulares de tempo eram retiradas alíquotas (volume de 0,40 mL por amostra) da solução em cada reator e injetadas para ser analisadas no HPLC.

Durante os ensaios, a temperatura foi mantida em torno de 23 °C, e a agitação foi ajustada a aproximadamente 150 rpm, procedimento semelhante a estudo anteriores como Mello (2007) e Minatti(2009). Todos os ensaios foram feitos em triplicata para garantir a confiança dos resultados.

As curvas cinéticas monocomponentes, bicomponentes e tricomponentes foram determinadas na concentração inicial de aproximadamente 50 mg/L (durante a realização das cinéticas foi adicionado 55 mg/L dos substratos BTX, se optou por uma concentração um pouco mais alta pois para a leitura do primeiro ponto era necessário um tempo de aproximadamente cinco min para completa solubilização dos substratos) para cada composto BTX em estudo, já a concentração de glicose variava de acordo a cada experimento, como pode ser observado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Combinações monocomponentes, bicomponentes e tricombinantes para as cinéticas de biodegradação dos compostos BTX.

Diâmetro de partícula do carvão			
17 cm		24 cm	
Glicose (mg/L)	Composto	Glicose (mg/L)	Composto
0	T	0	T
0	X	0	X
0	TX	0	TX
100	T	100	T
100	X	100	X
100	TX	100	TX
1000	T	1000	T
1000	X	1000	X
1000	TX	1000	TX
0	BTX	0	BTX

A Figura 3.8 mostra o aparato experimental utilizado para realização das cinéticas biodegradativas dos compostos BTX.



Figura 3.8 - Aparato experimental utilizado para realização das cinéticas de biodegradação dos compostos BTX.

### 3.3.3.2 Cinéticas em fluxo contínuo

Para obtenção das cinéticas em fluxo contínuo foi utilizado uma coluna de 50 cm de comprimento e diâmetro de aproximadamente 3 cm. Os compostos tolueno e o-xileno eram adicionados ao tanque estoque e conduzidos por uma mangueira de teflon com ajuda de uma bomba (marca GILSON, modelo MINIPLUS 3) até a coluna. Quando a solução chegava à coluna era realizada a leitura da concentração inicial, no ponto zero, sendo que foi definido uma concentração de 50 mg/L de cada composto. Esperava-se completar a coluna com solução e após isto

se aguardava mais uma hora, para ocorrer uma estabilização, para então iniciar os experimentos. Assim, as leituras da coluna foram realizadas em HPLC seguindo o mesmo procedimento do processo em batelada.

O procedimento adotado para realização do experimento na coluna foi de “cima para baixo”, ou seja, do maior comprimento para o menor comprimento, iniciando a retirada da amostra no ponto 7, após ponto 6 e assim sucessivamente até o ponto 0, dessa forma não havia interferência dos pontos superiores para os pontos inferiores, o que garante uma maior confiabilidade dos resultados.

A coluna dispunha de 7 pontos mais o ponto inicial (ponto zero, que representa a concentração que esta entrando na coluna), como pode ser visto na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Pontos de leitura da coluna de biodegradação ao longo de seu comprimento

<b>Ponto</b>	<b>Comprimento da coluna (cm)</b>
7	50
6	44,5
5	37,5
4	30,5
3	22,5
2	15,5
1	8,5
0	0

A leitura dos pontos era realizada da mesma forma como os reatores batelada, retirando-se uma pequena quantidade de amostra com uso de uma seringa de vidro e “imediatamente” injetando essa amostra no HPLC.

A Figura 3.9 mostra a coluna de biodegradação utilizada para degradação dos compostos BTX.



Figura 3.9 – Reator em fluxo contínuo (coluna) usada para biodegradação dos compostos BTX.

### 3.3.4 Teste de adsorção

Como o carvão ativado é utilizado, também, como material adsorvente, o objetivo deste experimento foi verificar se estava havendo adsorção dos compostos no carvão ao invés de biodegradação.

No reator destinado a degradar os componentes TX foi adicionado 50 mg/L de cada um dos compostos (TX) e foi analisada o decréscimo dos mesmos através da curva de degradação. Com isso, obteve-se o tempo que leva para que todo o composto seja consumido. Quando os compostos TX eram consumidos, adicionou-se novamente a mesma concentração, sendo acompanhado o decréscimo dos mesmos. Esse procedimento foi realizado por 5 vezes consecutivas e para todos os reatores. As amostras coletadas foram analisadas no HPLC.

Observou-se que a curva de decaimento dos compostos foi semelhante nas 5 repetições e se assemelhando à curva de biodegradação dos compostos, o que leva à conclusão de que os efeitos da adsorção no interior do suporte de carvão podem ser desprezados, além disso, o tempo necessário para degradação dos compostos foi maior quando comparado às cinéticas de adsorção que podem ser visualizadas no Anexo A.

### 3.3.5 Cinética de Adsorção

Inicialmente pesava-se uma massa de aproximadamente 9,0 g de carvão ativado, massa aproximadamente igual da cinética biodegradativa. Em seguida, se colocava este carvão em contato com um volume de 30 mL da solução de sais durante um período de 1 h aproximadamente e adicionava-se peróxido de hidrogênio ( $1,44 \times 10^{-4}$  moles/L). Em separado se preparava uma nova solução com os compostos TX para uma concentração de 50 mg/L de cada composto (levando em conta um volume de 280 mL), essa nova solução passava por intensa agitação para então entrar em contato com a solução que continha carvão ativado e peróxido. Em seguida, o reator era completamente vedado e submetido a uma agitação de 150 rpm e temperatura de 23 °C. Após este procedimento se iniciavam as leituras em HPLC (da mesma forma como feita para as cinéticas biodegradativas em batelada), para construção das curvas da cinética de degradação. Esse procedimento foi realizado para ambos os tamanhos de partícula e avaliando os compostos TX bicomponente somente.

Foi avaliado qual o comportamento cinético dos compostos que melhor se ajustava aos modelos de pseudo-primeira ordem ou pseudo-segunda ordem.

### 3.3.6 Isoterma de adsorção

Pelos ensaios de cinética de adsorção foi avaliado o tempo para garantir o equilíbrio do sistema em estudo, sendo este tempo utilizado para realizar as isotermas de adsorção. Para execução destas, foi realizada outra metodologia que se mostrou bastante eficiente. Foram utilizadas ampolas de vidro com volume de aproximadamente 20 mL. Nestes frascos foi adicionado uma massa de carvão que variava de (0,01 gramas a 1,1 gramas), após era acrescentado 5 mL de solução mineral em contato com o carvão, então se aguardava o tempo de aproximadamente uma hora para o sistema entrar em equilíbrio.

Em separado, era preparada uma solução de 250 mL em um Erlenmeyer, onde se adicionava uma determinada quantidade de T ou X, essa solução era submetida a uma intensa agitação para completa solubilização dos compostos e depois era adicionada à ampola que continha o carvão, até atingir o volume de aproximadamente 18 mL. A determinação da concentração dos compostos T ou X desta solução era realizada antes da mistura às ampolas.



Realizado este preparo, as ampolas eram colocadas sob agitação (150 rpm) da mesma forma que os reatores nas cinéticas de biodegradação e de adsorção aguardando-se o mesmo intervalo de tempo obtido como resultado nas cinéticas de adsorção, para então se realizar a leitura da concentração das amostras em HPLC.

Nas isotermas de adsorção foram avaliados os modelos de Freundlich e Langmuir, sendo que para construção das curvas foi utilizado o software *Statistica 7,0*.

### **3.3.7 Quantificação da biomassa**

A biomassa aderida ao carvão (quantificada de modo a se obter a massa de biomassa por massa de partícula de carvão) e a biomassa livre (em suspensão) no reator foram analisadas em termos de concentração de proteínas, através do método de Lowry, conforme metodologia proposta por Bergamasco (1996) (descrito no Apêndice B), e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) para a biomassa em suspensão.

As leituras das análises de proteínas foram realizadas em um Espectrofotômetro (Marca SHIMADZU – modelo UV mini 1240). A agitação das amostras se procedeu com Ultrassom (UNIQUE – modelo USC 1450).

### **3.3.8 Caracterização microbiológica**

#### **3.3.8.1 Identificação dos micro-organismos – Análises de Biologia Molecular**

Com o objetivo de identificar os micro-organismos presentes no biofilme utilizado no processo de biodegradação dos compostos BTX, fez-se uso da técnica de análise de biologia molecular, a partir de fragmentos do gene RNAr 16S, por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a realização desta análise, coletou-se uma amostra do lodo utilizado para o processo de adaptação, proveniente na Estação de Tratamento de Esgotos Domésticos de Florianópolis – CASAN, antes do processo de adaptação dos micro-organismos aos compostos BTX, ou seja, lodo *in natura*, designada Amostra 1; uma amostra do biofilme presente no biorreator, sendo operado no processo contínuo, Amostra 2; e uma outra amostra do biofilme presente nos biorreatores em batelada, Amostra 3.

As análises de biologia molecular foram realizadas com a colaboração do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFSC – no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos – LABEFLU – Campus Universitário – Trindade, visando à identificação das bactérias presentes nas amostras, seguindo as seguintes etapas: extração do DNA (Ácido Desoxirribonucleico) genômico, reação em cadeia polimerase (PCR), separação dos segmentos amplificados no PCR usando eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), purificação do produto de PCR e posterior sequenciamento do produto de PCR pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. A metodologia utilizada encontra-se no Apêndice D.

As sequências obtidas foram editadas no programa BioEdit 7.05. Após as sequências de cada amostra foram submetidas à comparação com o banco de dados da coleção nucleotídica do National Center for Biotechnology Information – NCBI – <[www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)> onde se utilizou a ferramenta Blast (ferramenta para comparação de genes e proteínas sequências em relação a outras) - <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> - para relacionar as bactérias das amostras.

### **3.3.9 Teste de Toxicidade**

Para avaliar a toxicidade causada por um contaminante a um organismo, através dos testes toxicológicos, é necessária a definição do organismo teste adequado, do número de organismos, da resposta biológica esperada, do período de exposição e da dose ou série de doses. O resultado será expresso em termos da dose administrada, mas também em curvas de dose-resposta que são obtidas quando os resultados se enquadram numa relação matemática consistente. Os valores mais importantes dados pela curva dose-resposta são o NOEL (maior dose em que não se observa nenhum efeito no organismo) e o LOEL (menor dose na qual se observa qualquer efeito no organismo). Estes valores são mais expressivos que a letalidade na avaliação de risco ecológico, pois demonstram os níveis em que efeitos na reprodução, fisiologia e comportamento poderiam ocorrer. Efeitos deste gênero podem causar desestruturação da comunidade e do ecossistema (MELLO, 2007).

O método utilizado para a avaliação da toxicidade aguda com *Daphnia magna* foi realizado de acordo com a Norma DIN 38412 (DIN, 1989). Os testes foram realizados pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), no Departamento de Engenharia Sanitária e

Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina.

Este teste consiste em expor indivíduos jovens do microcrustáceo *Daphnia magna* a várias diluições do agente-teste por um período de 48 h, onde o efeito tóxico agudo é determinado através da perda de movimento dos organismos.

Com o objetivo de se determinar se o(s) produto(s) gerado(s) da biodegradação dos compostos BTX é (são) tóxico(s), foram recolhidas as amostras do líquido presente nos biorreatores quando não havia mais vestígios dos compostos BTX. A toxicidade aguda destas soluções foi determinada mediante a elaboração de testes padronizados, cujos resultados são expressos em Fator de Diluição (FD). O Fator de Diluição (FD) representa a primeira de uma série de diluições de uma amostra na qual não mais se observa o efeito tóxico agudo aos organismos teste (FATMA, 2002). De acordo com a portaria n° 017/02 da FATMA – Fundação do Meio Ambiente, o limite máximo do fator de diluição para efluentes de origem química com atividade petroquímica é dois (FATMA, 2002).

As amostras de 1 a 4 recolhidas para análise de toxicidade são de solução presente no biorreator em batelada no qual foi alimentado com os compostos:

- Amostras 1 = benzeno;
- Amostras 2 = tolueno;
- Amostra 3 = o-xileno;
- Amostra 4 = BTX; e
- Amostra 5 = amostra da solução presente no biorreator em processo contínuo, no qual foi alimentado com os compostos BTX na vazão de 3 mL/min.

Cabe salientar que as amostras só foram coletadas após o consumo completo dos compostos BTX avaliados.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos experimentalmente. Serão apresentados os resultados da caracterização do carvão ativado com biofilme, bem como a avaliação dos modelos cinéticos não estruturados de crescimento microbiano para a biodegradação de um único e múltiplo substrato, identificação das bactérias presentes no lodo aeróbio adaptado aos compostos BTX e não adaptado e análise da significância das variáveis diâmetro de partícula, concentração de glicose e tipo de substrato (BTX) no tempo de degradação, através da tabela de ANOVA e dos gráficos dos efeitos.

O trabalho experimental desenvolvido teve como objetivo a determinação dos parâmetros cinéticos da biodegradação dos compostos BTX e verificação dos efeitos do diâmetro de partícula, concentração de glicose e substrato utilizado na degradação dos compostos BTX. Também foi avaliado o comportamento cinético da biodegradação de compostos TX em fluxo contínuo (resultados apresentados no Apêndice B).

Os parâmetros cinéticos foram obtidos em reatores em batelada com biomassa aderida em carvão ativado, para as associações monocomponente e bicomponente de tolueno e o-xileno e associação tricompente de benzeno-tolueno-o-xileno.

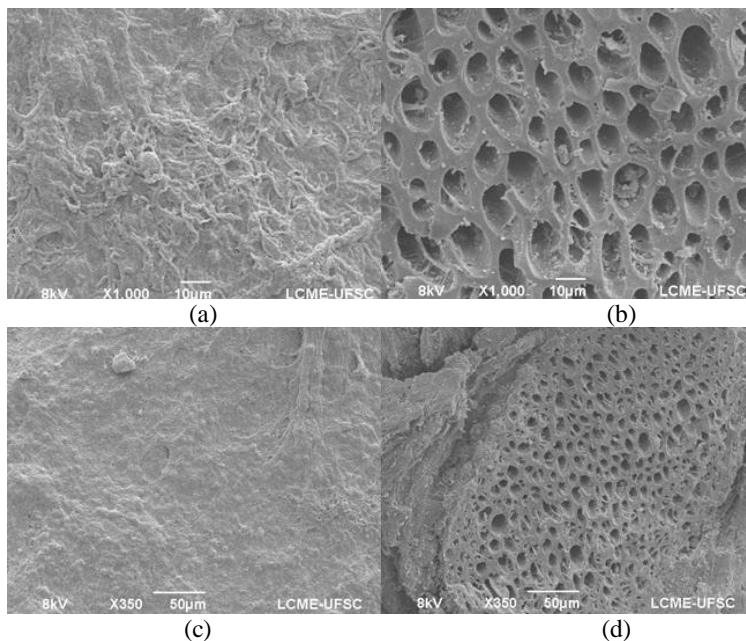
Inicialmente análises de DQO foram realizadas para se certificar que os micro-organismos estavam consumindo a glicose (fonte de carbono inicial); quando parte da glicose havia sido substituída pelo tolueno e os micro-organismos estavam se adaptando aos compostos BTX, as análises passaram a ser realizadas em HPLC. O peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) numa concentração de 30% em massa foi adicionado ao meio ( $1,44 \times 10^{-4}$  moles/L, em um período de 12 em 12 h), para garantir que o meio continha oxigênio suficiente para os micro-organismos consumirem toda a matéria orgânica presente no biorreator. A quantidade de peróxido foi escolhida após testes de processos adaptativos experimentais realizados neste trabalho e em trabalhos anteriores no laboratório de transferência de massa (LABMASSA), onde se observou que essa concentração de oxigênio se mantinha em valor suficiente para garantir a degradação dos compostos, e, além disso, não se mostrava tóxica e/ou prejudicial ao desenvolvimento do biofilme no biorreator. Vários trabalhos desenvolvidos na literatura (MASSOL-DEYÁ *et al.*, 1995; SHIM and YANG, 1999; SHIM *et al.*, 2002; SHIM and YANG, 2006) estudaram a biodegradação de compostos voláteis com a adição de peróxido de hidrogênio como fonte de oxigênio. Este

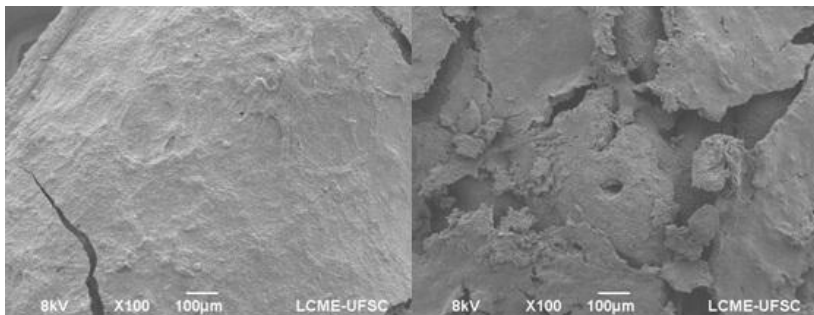
tipo de oxigenação não convencional foi escolhido para evitar a volatilização e conseqüentemente a perda de BTX para o ambiente, ao borbulhar ar no meio aquoso, e dessa forma optou-se por este tipo de aeração para este trabalho.

#### 4.1 Microscopia eletrônica de varredura e microscopia ótica de contraste de fundo escuro

##### 4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

As imagens da superfície do carvão ativado foram obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de acordo com o método descrito no item 3.2.4, onde as amostras foram preparadas segundo metodologia proposta por Nation (1983) e adaptada para biofilmes microbianos por Araujo *et al.* (1995). As amostras sofreram ampliação de 1000 vezes (amostras a e b), 350 vezes (amostras c e d) e de 100 vezes (amostras e e f), como pode ser observado na Figura 4.1.





(e)

(f)

Carvão ativado vegetal:

- (a) com biofilme, micrografia aumentada 1000 vezes.
- (b) micrografia aumentada 1000 vezes.
- (c) com biofilme, micrografia aumentada 350 vezes.
- (d) micrografia aumenta 350 vezes.
- (e) com biofilme, micrografia aumentada 100 vezes.
- (f) micrografia aumentada 100 vezes.

Figura 4.1 - Micrografias do carvão ativado vegetal de casca de coco com e sem biofilme aderido.

Ao se analisar as imagens obtidas através do MEV, pode-se observar que o carvão apresenta boa característica morfológica para a imobilização dos micro-organismos, devido à formação uniforme dos poros e da grande quantidade destes. A Figura 4.1 (b) e (d) e (f) apresentam a micrografia do carvão ativado vegetal sem a formação do biofilme, ou seja, *in natura* onde pode se destacar a presença de poros que facilitam o processo de formação dos biofilmes microbianos. Este carvão apenas passou pelo processo de lavagem para retirada das cinzas e seco a temperatura ambiente. Entretanto, as amostras (a), (c) e (e) representam a micrografia do carvão vegetal ativado com biofilme aderido, onde se pode observar que este biofilme acaba preenchendo a superfície e consequentemente a superfície do carvão.

De acordo com Minatti, (2009) que realizou a medida do tamanho dos poros, pode-se dizer que os poros do carvão ativado de casca de coco 119 podem variar desde 47,9  $\mu\text{m}$  até 233  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

#### 4.1.2 Microscopia ótica de contraste de fundo escuro

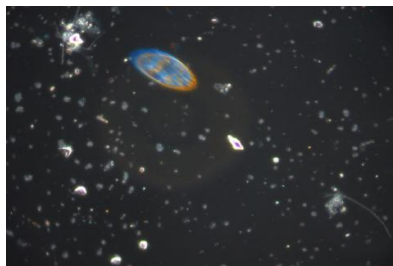
O monitoramento da biomassa foi feito através de microscopia ótica de contraste de fundo escuro, sendo esta uma boa ferramenta de análise, pois indica abundância microbiana de espécies no lodo, que estão diretamente relacionadas com o processo de formação do biofilme. Assim, a alta atividade microbiana e a variedade de micro-organismos existentes proporcionam uma adequada formação do biofilme e conseqüentemente um bom consumo de carbono. A Figura 4.2 representa as fotos de microscopia ótica de contraste de fundo escuro retiradas com a objetiva de 40x (que representa um aumento de 400 vezes) das amostras de lodo *in natura*, lodo adaptado à glicose e lodo que utilizava somente os compostos BTX como fonte de carbono. Essas microscopias foram realizadas no Laboratório do BEG da UFSC - FLUORBEG.



(a)



(b)



(c)

Microscopia ótica do lodo:

- (a) *in natura*, aumento de 400 vezes.
- (b) adaptado à glicose, aumento de 400 vezes.
- (c) adaptado somente aos BTX, aumento de 400 vezes.



Figura 4.2 – Microscopia ótica de contraste de fundo escuro dos lodos *in natura* e adaptados

Nas imagens se pode observar uma grande densidade de micro-organismos, de vários tipos e que apresentavam movimento nas três etapas de adaptação verificadas. Pode se observar ainda que as bactérias estão presentes na maioria dos processos aeróbios, a presença destas contribui para uma boa eficiência do processo, pois possuem uma alta capacidade de consumir a matéria orgânica e dessa forma produzir um efluente final de boa qualidade.

## 4.2 Análises de biologia molecular

A identificação das bactérias presentes no lodo foi realizada por técnica de biologia molecular (PCR-DGGE), onde se efetuou a extração do DNA de três amostras, sendo elas:

- Amostra 1: Lodo da Casan *in natura*;
- Amostra 2: Biofilme do biorreator operado em processo contínuo;
- Amostra 3: Biofilme do biorreator em batelada.

A Figura 4.3 apresenta o gel de DGGE para o Domínio *Bacteria* representando as três amostras.

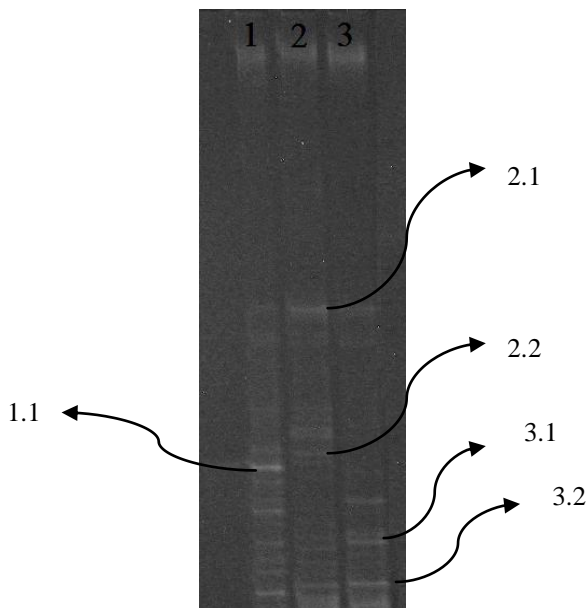


Figura 4.3 – Gel do DGGE para as três amostras analisadas, sendo que a Banda 1 corresponde a Amostra 1; Banda 2: Amostra 2 e; Banda 3: Amostra3.

Através da fotografia do gel, representado pela Figura 4.3, pode se observar as bandas visíveis das amostras 1, 2 e 3, dessa forma ocorreu uma adequada extração do DNA. O gel mostra ainda que as amostras 2 e 3 modificaram sua composição bacteriana, diferenciando-se do inoculo, amostra 1, pois a banda 1.1, que estava presente no inoculo, não foi mais encontrada nos biorreatores, indicando que esta população de bactérias desapareceu após o processo de adaptação com os compostos BTX. Com relação às bandas 2.1 e 2.2 e 3.1 e 3.2 da amostra 3 (e as demais não enumeradas), foi observado que estas bandas apareceram durante a adaptação, dessa forma não existiam no inóculo ou existiam em uma quantidade muito pequena, mostrando que o contato das bactérias com os compostos BTX modifica a composição química do micro-organismos.

Para a identificação das bactérias detectadas nas bandas, após o isolamento do DNA genômico, as amostras foram amplificadas e encaminhadas para o sequenciamento. Para a identificação das bactérias presentes através do método do DGGE, todas as bandas selecionadas que apresentaram amplificação foram sequenciadas. Os cromatogramas

obtidos foram examinados, para verificação da qualidade das seqüências (o cromatograma de uma amostra pode ser observado pela Figura 4.4), através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor e então comparadas às seqüências depositadas no banco de dados público GeneBank do NCBI. Sempre se procurou avaliar o histórico de cada bactéria, onde muitas haviam sido identificadas em ambientes aquáticos.

A Figura 4.4 representa o cromatograma de um DNA de uma espécie de bactéria presente na Amostra 1. Observa-se que os picos apresentam-se bem definidos, assim a amostra apresenta pouca possibilidade de erros do código genético (ACDG).

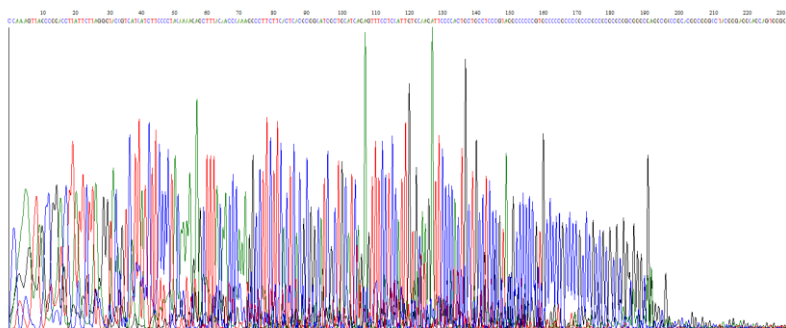


Figura 4.4 – Cromatograma obtido no sequenciamento de uma bactéria.

As Tabelas 4.1 e 4.2 e 4.3, mostram os resultados obtidos através do sequenciamento das bandas do gel de DGGE do domínio *Bacteria*, para a amostra 1, amostra 2 e amostra 3, respectivamente. Em cada seqüência se identificou o organismo cuja seqüência do rRNA 16S é mais próximo no GenBank. Contudo, para se obter uma maior segurança quanto ao grau de similaridade na comparação de seqüências com as depositadas em banco de dados observou-se o histórico das mesmas para associar-se ao ambiente do isolamento, sendo que também se considerou somente amostras com similaridade de  $\geq 90\%$ .

Tabela 4.1 – Percentual de similaridade baseado no alinhamento do gene RNAr 16S do Domínio *Bacteria* do lodo obtido da Casan – Inóculo

Nº de acesso	Micro-organismo	Similaridade de (%)	Referência
025761.1	<i>Soehngenia saccharolytica</i> strain BOR-Y	91	Parshina <i>et al.</i> (2003)
044365.1	<i>Micrococcus endophyticus</i> strain YIM 56238	90	Chen <i>et al.</i> (2009)
044624.1	<i>Clostridium cellulosi</i>	91	Rainey <i>et al.</i> (1993)
043766.1	<i>Runella defluvii</i> strain EMB13	90	Lu <i>et al.</i> (2007)
024735.1	<i>Tetrasphaera elongata</i> strain Lp2	93	Hanada <i>et al.</i> (2002)
024975.1	<i>Tetrasphaera australiensis</i> strain 109	93	Maszenan <i>et al.</i> (2000)

Para a amostra coletada da Casan que foi a biomassa *in natura* e que foi submetida à adaptação para biodegradar os compostos BTX, foram identificados dentro do percentual de similaridade descrito na Tabela 4.1, um total de 6 espécies de bactérias presentes (com similaridade maior ou igual a 90%).

A Tabela 4.2 indica o percentual de similaridade para a amostra de lodo aeróbio adaptado em processo contínuo.

Tabela 4.2 – Percentual de similaridade baseado no alinhamento do gene RNAr 16S do Domínio *Bacteria* da amostra de biofilme presente na coluna.

Nº de acesso	Micro-organismo	Similaridade de (%)	Referência
024570.1	<i>Escherichia coli</i> strain U 5/41	90	Cilia <i>et al.</i> (1996)
036794.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104	92	Ludwig <i>et al.</i> (1995)
GU32991 6.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain OSBH4	100	Maity <i>et al.</i> (2010)
041715.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 = LMG 11199 strain ATCC 17588	91	Galdzicka <i>et al.</i> (2011)

Muitos componentes aromáticos simples, entre eles os BTX, ácido benzoico, ácido fenil acético e ácido fenilpropionico, são degradados por bactérias aeróbias, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (Gram negativas), *Rhodococcus* (Gram positivas), e também por *Escherichia coli* (Gram negativa) como descrito por (BUGG and WINFIELD, 1998).

Pela Tabela 4.2, pode-se observar a presença de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (gram negativas), estas geralmente utilizam um número elevado de compostos orgânicos como fontes de carbono, por isso, desempenham um papel importante na degradação de compostos orgânicos solúveis derivados da decomposição de plantas e animais, como de xenobióticos (exemplos, pesticidas derivados do petróleo, inseticidas, etc.).

A Tabela 4.3 representa o percentual de similaridade das bactérias presentes na amostra de biofilme presente no biorreator em batelada.

Tabela 4.3 – Percentual de similaridade baseado no alinhamento do gene RNAr 16S do Domínio *Bacteria* da amostra de biofilme presente no biorreator em batelada.

Nº de acesso	Micro-organismo	Similaridade (%)	Referência
EU74458 7.1	<i>Streptomyces</i> sp. A00005	95	Wu <i>et al.</i> (2009)
JQ336981 .1	<i>Pseudomonas veronii</i> strain MML1963	96	Ramprasath <i>et al.</i> (2011)
044293.1	<i>Pseudoxanthomonas sacheonensis</i> strain BD-c54	90	Lee <i>et al.</i> (2008)

De acordo com a literatura as bactérias do gênero *Pseudomonas* também são encontradas em sistemas de tratamento de esgotos domésticos. De acordo com Akindé e Obire (2008), são as espécies bacterianas mais predominantes e a sua prevalência pode ser atribuída à sua versatilidade metabólica e à sua distribuição ubíqua na natureza. No entanto, pode se destacar que no inóculo, amostra 1, não foi identificado o gênero *Pseudomonas*, o que pode ser explicado pela baixa quantidade deste tipo de bactéria, sendo talvez estas desconsideradas no momento de escolha das bandas do gel de DGGE da amostra 1. Contudo, após a realização do processo adaptativo, os biorreatores tanto em fluxo contínuo quanto em batelada apresentaram este gênero, sugerindo, dessa

forma, que houve um crescimento do gênero *Pseudomonas* devido a maior afinidade com os compostos BTX que os demais gêneros listados na Tabela 4.1.

Ridgway *et al.* (1991) mostraram que 87% das estirpes de um conjunto de 300 isoladas a partir de um aquífero contaminado e que degradavam gasolina foram identificadas como *Pseudomonas* spp. Shim *et al.* (2005) também relatam que *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* podem efetivamente degradar benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos. Também pode se destacar que os micro-organismos identificados no inóculo, amostra 1, não foram identificados nas amostras 2 e 3 (após o processo adaptativo). Isto pode ser explicado pelo fato destas bactérias se apresentarem numa quantidade pequena e dessa forma, podem ter sido desconsideradas no momento de escolhas das bandas do Gel de DGGE, ou mesmo, elas podem não ter sobrevivido ao processo de adaptação, devido aos compostos BTX apresentarem elevada toxicidade para muitos tipos de micro-organismos.

### 4.3 Teste de toxicidade

Criada em 24 de abril de 2002 pela FATMA (Fundação do Meio Ambiente), a portaria 17, estabeleceu os limites do fator de diluição (FD) de diferentes efluentes para a *Daphnia magna*. Para os efluentes de origem de atividade química e subcategoria de atividade petroquímicos, o fator de diluição deve ser de 2 para não ser evidenciado nenhum efeito tóxico (imobilidade), nos organismos expostos.

De acordo com o CONAMA (Resolução nº 357 de 17 de março de 2005) é estabelecido que os teores máximos para os compostos benzeno, tolueno e etilbenzeno em águas salobras de 0,700 mg/L, 0,215 mg/L e 0,025 mg/L, respectivamente. Para água potável, é estabelecido os teores máximos de 0,005 mg/L, 0,002 mg/L e 0,300 mg/L, para o benzeno, tolueno e xilenos, respectivamente.

Os ensaios foram realizados em 48 horas de exposição. Os resultados obtidos pelos testes de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*, para as amostras analisadas, podem ser apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Resultados do teste de toxicidade aguda

Amostra	pH	FD*	FD (Limite máximo Portaria 017/02)
Amostra 1 – Benzeno	6,23	2	2
Amostra 2 – Tolueno	6,31	2	2
Amostra 3 – o-Xileno	6,32	8	2
Amostra 4 – BTX (batelada)	6,53	4	
Amostra 5 – BTX (contínuo)	7,34	1	2

FD\* Fator de diluição sem efeito.

É importante ressaltar que os testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* não foram realizados com os compostos antes de seu tratamento, pois seriam necessárias muitas diluições para que os mesmos não apresentassem toxicidade ao microcrustáceo.

Pode ser observado pela Tabela 4.5 que as amostras da solução após a biodegradação individual do benzeno e do tolueno, para o processo em batelada, e da amostra 5 (vazão de 3 mL/min e solução de BTX), para biodegradação dos compostos BTX no biorreator contínuo, atendem ao limite estabelecido pela Portaria 017/02 FATMA a qual estabelece um FD limite máximo igual a 2. Enquanto que as amostras 3 e 4 não atendem o limite da portaria 017/02 FATMA, dessa forma, apresentam toxicidade aguda acima do limite máximo permitido (LMP). Os produtos da biodegradação do o-xileno foram os que apresentaram maior toxicidade, sendo que este resultado é coerente, visto que este composto apresenta maior dificuldade em ser biodegradado, quando comparado aos demais (MALIYEKKAL *et al.* 2004, OTENIO *et al.* 2005). Levando-se em conta a mistura BTX em batelada, se sugere a mesma situação, em função do o-xileno estar presente, este apresentou FD superior ao permitido.

No entanto, os valores 8 e 4 de FD, para o-Xileno e o BTX nos processos em batelada, respectivamente, apesar de estarem acima do LMP, apresentam baixa toxicidade aguda, se forem consideradas as diluições necessárias para enquadrá-los nos limites impostos pela Resolução 357 de 17 de março de 2005 do CONAMA, comparativamente à situação de dos mesmos não tratados, onde seriam necessárias várias diluições para serem enquadrados dentro da

legislação, dessa forma é notável que houve redução da toxicidade após o tratamento biológico.

Também cabe ressaltar que apenas o teste exclusivo com *Daphnia magna*, não é o suficiente para concluir se uma amostra apresenta ou não toxicidade, para isso seriam necessários outros testes com outros seres vivos, no entanto, este não é o objetivo deste trabalho. Dessa forma, esse teste serviu como um indício de que um tratamento (batelada) e/ou um processo (utilização de uma coluna em fluxo contínuo) é uma boa alternativa para diminuir a toxicidade dos efluentes.

#### 4.4 Cinéticas de biodegradação dos compostos BTX

Os testes cinéticos em batelada foram realizados com o objetivo de se determinar o tempo necessário para degradação dos compostos BTX (benzeno, tolueno e xileno respectivamente) e os parâmetros cinéticos de cada ensaio. Foram realizados testes com avaliação individual dos compostos T e X aplicando-se o modelo de Monod e o modelo de Andrews, onde se obteve os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Descrição e símbolo dos parâmetros cinéticos avaliados pelos modelos de Monod e Andrews.

Descrição	Símbolo
Velocidade máxima de crescimento específico	$\mu_{\max}$
Constante de meia saturação	$K_s$
Conversão de substrato em células	$Y_{x/s}$
Constante de inibição	$K_i$

Além disso, também foi avaliada a interação entre múltiplos substratos (associação de tolueno-xileno e benzeno-tolueno-xileno), nesses casos, aplicando os modelos de Inibição Competitiva, Não competitiva, Acompetitiva e SKIP (Apêndice A).

Os parâmetros cinéticos dos modelos foram estimados utilizando o método de enxame de partículas, *Particle Swarm Optimization* (PSO), este método de otimização global foi implementado no *software* Maple<sup>®</sup>, se mostrando muito eficiente na identificação dos parâmetros.



Para o estudo cinético de biodegradação dos compostos T e X, monocomponente, a concentração inicial para o composto em estudo foi de 50 mg/L, variando-se a concentração de glicose em cada ensaio. Para os testes bicomponentes e tricomialentes a concentração inicial foi também de 50 mg/L para cada composto BTX em estudo, variando-se também a concentração de glicose em estudo, a temperatura foi fixada em 23 °C e agitação em 150 rpm, condições similares aos trabalhos desenvolvidos por Mello (2007) e Minatti (2009). Os mesmos experimentos foram repetidos para dois diâmetros de partícula de carvão ativado diferentes (17 e 24 cm), onde também foi avaliada a influência do tamanho de partícula de carvão ativado de casca de coco 119.

#### **4.4.1 Cinéticas de biodegradação monocomponente**

No estudo da biodegradação de único substrato (T ou X), foram avaliados os modelos de Monod e de Andrews, sendo estes modelos fundamentais e podem servir de base para modelos mais sofisticados. Esta etapa mostra que estes modelos simples também podem ser utilizados com sucesso na representação de dados experimentais, facilitando dessa forma, a avaliação da cinética de crescimento microbiano e o projeto de biorreatores (TRIGUEROS, 2008).

#### **4.4.2 Avaliação dos modelos cinéticos para biodegradação individual dos substratos TX**

Os parâmetros cinéticos e estequiométricos dos modelos de Monod e Andrews utilizados nas simulações são apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8, respectivamente. A busca pelos valores dos parâmetros utilizando o método PSO foi guiada pelo significado microbiológico de cada parâmetro que serviu de base às variações do limite de busca, na qual a tendência dos melhores valores foi preservada (TRIGUEROS, 2008).

A Tabela 4.6 demonstra os parâmetros cinéticos ( $\mu_{\text{máx}}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$  e função objetivo) e o tempo das cinéticas monocomponente para o tolueno e o xileno de acordo como o Modelo de Monod. A concentração de glicose é variável, onde se avaliou a ausência de glicose e duas concentrações diferentes (0, 100 e 1000 mg/L) nos dois diâmetros de partícula estudados.

Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos e tempo para as cinéticas monocomponente do tolueno e xileno com variação na concentração de glicose diâmetro de partícula para o modelo de Monod.

Ausência de glicose						
Diâmetro (cm)	Composto	$\mu_{\text{máx}}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	Função objetivo	Tempo (h)
17	Tolueno	0,00533	199,9375	0,8911	0,03297	$\cong 10 \pm 0,8$
	Xileno	0,00325	245,6574	0,4673	0,03495	$\cong 10 \pm 0,7$
24	Tolueno	0,00658	199,5140	0,4689	0,03273	$\cong 15 \pm 1,2$
	Xileno	0,00582	299,8023	0,0959	0,05648	$\cong 15,8 \pm 0,6$
Concentração 100 mg/L de glicose						
Diâmetro (cm)	Composto	$\mu_{\text{máx}}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	Função objetivo	Tempo (h)
17	tolueno	0,00277	349,2036	0,1080	0,0289	$\cong 10 \pm 0,6$
	xileno	0,00252	349,8913	0,3004	0,0283	$\cong 10,8 \pm 0,6$
24	tolueno	0,00387	500	0,1368	0,0582	$\cong 15,8 \pm 0,8$
	xileno	0,00319	732,119	0,1679	0,0529	$\cong 16,3 \pm 0,5$
Concentração 1000 mg/L de glicose						
Diâmetro (cm)	Composto	$\mu_{\text{máx}}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	Função objetivo	Tempo (min)
17	Tolueno	0,01065	687,8230	0,6450	0,02862	$\cong 11,3 \pm 0,5$
	Xileno	0,01195	299,9944	0,9237	0,01710	$\cong 12 \pm 0,6$
24	Tolueno	0,00672	214,7819	0,8927	0,04282	$\cong 16,6 \pm 0,5$
	Xileno	0,00557	724,3967	0,5756	0,04318	$\cong 18,3 \pm 1,2$

Utilizando-se o modelo de Monod pode verificar-se que a taxa máxima de crescimento específico mostrou-se similar para os compostos tolueno e xileno em todas as condições. Para as concentrações de glicose de 0 e 100 mg/L o menor valor de  $K_s$  foi para o composto tolueno, o que indica que a cultura microbiana apresentou maior afinidade a este composto, resultando em maiores velocidades de crescimento e maior rendimento na conversão de substrato em células para o tolueno nessas duas condições. Apenas para o diâmetro de 17 cm e concentração de glicose de 1000 mg/L o xileno apresentou maior valor de  $\mu_{\text{máx}}$  e menor valor de  $K_s$  em relação ao tolueno.

Pela avaliação da concentração de glicose, pode-se destacar que esta não provocou interferência na obtenção dos parâmetros cinéticos do modelo de Monod, pois não houve variação dos parâmetros cinéticos avaliando a ausência de glicose e as concentrações de 100 e 1000 mg/L. Shim *et al.* (2002) utilizaram glicose na concentração de 1000 mg/L como co-substrato na biodegradação do benzeno (150 mg/L). Foi verificado que a glicose e o benzeno foram simultaneamente

degradados, dessa forma, a presença de glicose não parece ter qualquer efeito sobre a biodegradação do benzeno. No trabalho de Shim *et al.* (2002), a taxa de biodegradação do benzeno individual foi semelhante à taxa de biodegradação do benzeno associado à glicose na concentração de 1000 mg/L.

Pode-se observar pelos gráficos A.1 à A.12, localizados no Apêndice A, um ótimo ajuste entre as simulações do modelo de Monod e os dados experimentais. Verifica-se que o modelo de Monod prediz satisfatoriamente a cinética de biodegradação individual dos compostos TX, principalmente em baixas concentrações (CHANG *et al.*, 1993).

A Tabela 4.7 representa os parâmetros cinéticos ( $\mu_{\text{máx}}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $K_i$  e função objetivo) e o tempo das cinéticas monocomponentes para o tolueno e o xileno de acordo com o Modelo de Andrews. A concentração de glicose é variável, onde se avaliou duas concentrações diferentes (100 e 1000 mg/L) em ambos os dois diâmetros de partícula estudados.

Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos para as cinéticas monocomponente para tolueno e xileno com variação na concentração de glicose e diâmetro de partícula (D) para o modelo de Andrews.

Concentração 100 mg/L de glicose						
D (cm)		$\mu_{\text{máx}}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$K_i$	F. obj
17	T	0,00307	340	0,1847	500	0,030
	X	0,01018	345	1,1557	500	0,0292
24	T	0,0087	499,4769	0,4433	500	0,0591
	X	0,0070	716,8982	0,4322	500	0,0537
Concentração 1000 mg/L de glicose						
D (cm)		$\mu_{\text{máx}}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$K_i$	F.obj
17	T	0,01623	340	1,0158	549,7 1	0,0290
	X	0,00418	294,49	0,3181	500	0,0175
24	T	0,00419	210	0,7999	499,7 4	0,0449
	X	0,02932	719	1,9957	500	0,0443

T- tolueno; X- xileno; F. obj.-função objetivo; Diâm – Diâmetro de partícula.

Avaliando o modelo de Andrews, pode-se notar uma pequena variação nos parâmetros cinéticos, quando comparado ao modelo de Monod, onde o o-xileno apresentou maiores velocidades de crescimento em duas condições, apresentando nas mesmas maiores coeficientes de

rendimento. Para o tolueno duas condições também apresentaram maiores velocidades de crescimento resultando em maiores coeficientes de rendimento. No entanto, o que se pode destacar para o tolueno é a constante de meia saturação, que apresentou menor valor em três condições das quatro estudadas, o que pode indicar uma maior afinidade da cultura ao substrato tolueno.

De acordo com Maliyekkal *et al.* (2004), o valor mais elevado de  $K_i$  significa que a cultura é menos sensível a inibição pelo substrato e valores menores indicam que a cultura é mais sensível à inibição pelo substrato. Dessa forma, pode-se perceber que para os experimentos realizados a 100 mg/L de glicose e 1000 mg/L de glicose não houve grande variação das constantes de inibição, dessa forma, é possível dizer pela avaliação dos parâmetros cinéticos que a cultura não é sensível à inibição pela glicose.

A constante de saturação  $K_s$  do modelo de Monod é definida como a concentração de substrato na qual  $\mu_x$  é igual à metade de  $\mu_{\text{máx}}$ . Quanto menor o valor de  $K_s$ , maior será a afinidade entre o micro-organismo e o substrato. Entretanto, se o substrato é inibitório não é possível observar um  $\mu_{\text{máx}}$  “real” e desta forma,  $K_s$  assume um significado hipotético. Dos três parâmetros cinéticos do modelo de Andrews a constante  $K_i$  representa o efeito inibitório do substrato, mas quando este valor é muito elevado, a equação de Andrews assume a forma da equação de Monod (TRIGUEROS, 2008).

Como pode ser observado, o modelo de Andrews também se ajustou bem aos dados experimentais, como pode ser visto nos gráficos A.13 à A.20 do Apêndice A. Logo, o modelo de inibição pelo substrato também pode representar os dados experimentais. De acordo com Shim *et al.* (2005), concentrações iniciais acima de 40 mg/L favorecem o ajuste dos dados experimentais pelo modelo de Andrews, pois fornecem informações sobre o sistema que apresenta efeitos inibitórios, quando a concentração dos substratos encontra-se perto de valores tóxicos ao crescimento celular. Além disso, se o número de dados experimentais é maior que o número de parâmetros do modelo, o modelo que apresenta a maior quantidade de parâmetros também se torna privilegiado durante o ajuste aos dados experimentais.

Através da análise das Tabelas 4.6 e 4.7, é possível a comparação entre os modelos de Monod e Andrews através do resíduo mínimo obtido (função objetivo) durante a estimativa dos parâmetros pelo método PSO. É notável que ambos os modelos apresentaram valores de função objetivo similares para os compostos tolueno e o-xileno nas três concentrações de glicose e dois diâmetros de partícula

estudados. No entanto, não foi possível a avaliação do sistema com relação ao crescimento de micro-organismos, por falta de dados experimentais, contudo, os valores dos coeficientes de rendimento estimados se mostram coerentes com diversos valores extraídos da literatura, como pode ser observado na Tabela 4.9.

A taxa máxima de crescimento específico “real” em substratos inibitórios pode ser determinada estimando-se o ponto crítico da primeira derivada da equação de Andrews. Assim, determina-se a concentração crítica de substrato e a taxa máxima de crescimento específico do micro-organismo, a partir das equações 4.1 e 4.2 (TRIGUEROS, 2008).

$$S^* = \sqrt{K_s K_i} \quad (4.1)$$

$$\mu^* = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{1 + 2\sqrt{\frac{K_s}{K_i}}} \quad (4.2)$$

Desta forma, a intensidade da inibição pelo substrato pode ser medida pela razão entre as constantes de saturação e inibição, e não somente pelo valor de  $K_i$ .

As razões de  $K_s/K_i$  determinadas utilizando os valores apresentados na Tabela 4.7 (que representa apenas o Modelo de Andrews) podem ser observados na Tabela 4.8, juntamente com a concentração crítica de substrato e a taxa máxima de crescimento específico para as condições avaliadas no modelo de Andrews. É possível notar que das quatro condições estudadas o xileno apresentou maior efeito inibitório (maiores valores de  $K_s/K_i$ ) em três, o que indica que ele apresentou o maior efeito inibitório.

Tabela 4.8 – Razão entre as constantes  $K_s/K_i$ , taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica de substrato.

Concentração 100 mg/L de glicose				
Diâmetro (m)	Substrato	$K_s/K_i$	$S^*$	$\mu^*$
17 cm	T	0,68	412,311	0,001827
	X	0,69	415,331	0,006023
	T	0,99	499,738	0,004352
	X	1,43	598,706	0,002876
Concentração 1000 mg/L de glicose				
Diâmetro (m)	Substrato	$K_s/K_i$	$S^*$	$\mu^*$
24 cm	T	0,61	432,321	0,010027
	X	0,58	383,725	0,002630
	T	0,42	323,953	0,002950
	X	1,43	599,583	0,012026

Um dos grandes problemas encontrados no estudo da cinética microbiana é a grande variabilidade dos parâmetros cinéticos. Por exemplo, Lin *et al.* (2007), estudando a biodegradação dos compostos BTEX individualmente e aplicando o modelo de Andrews, obtiveram valores de  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,0194; 0,0064; 0,0340 e 0,0060  $\text{h}^{-1}$  e valores de  $K_s$  de 8,349, 9,851, 211,791, 1,427 mg/L, para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, respectivamente. Avaliando o MTBE na presença de BTEX, os parâmetros cinéticos variaram drasticamente. Por exemplo, a taxa de crescimento específica ( $\mu_{\text{máx}}$ ) variou no intervalo de 0,0031 – 0,3208  $\text{h}^{-1}$ , enquanto a constante de meia saturação ( $K_s$ ) variou de 0,562 – 23.576 mg/L.

Bielefeldt e Stensel (1999) também obtiveram valores de velocidade de crescimento similares às encontradas neste trabalho, onde os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  encontrados foram 0,0475; 0,0827; 0,0200; 0,0058 e 0,0097 e os valores de  $Y_{x/s}$  foram 0,95; 0,95; 0,62; 0,23 e 0,32 para benzeno, tolueno, etilbenzeno, orto-xileno e para-xileno, respectivamente, utilizando uma mistura de culturas e um intervalo de concentração de 1,40 – 15,60 mg/L para cada substrato utilizado.

Nakhla (2003), utilizando uma mistura de culturas, obteve os parâmetros cinéticos  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $K_s$  e  $Y_{x/s}$  de 0,0058 - 0,0144  $\text{h}^{-1}$ , 5,54 - 10,16 mg/L e 0,50 - 1,02 mg/mg para o benzeno, 0,0052 - 0,0127  $\text{h}^{-1}$ , 6,32 - 10,47 mg/L, 0,48 - 1,02 mg/mg para o tolueno, 0,0052 - 0,0114  $\text{h}^{-1}$ , 6,78 - 10,81 mg/L e 0,52 - 1,02 mg/mg para o o-xileno.

Kermanshahi *et al.* (2006), utilizando uma mistura de culturas obtiveram os parâmetros cinéticos para o p-xileno de 0,0047  $\text{h}^{-1}$ , 10 mg/L e 0,05 mg/mg para o  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $K_s$  e  $Y_{x/s}$ , respectivamente.

Kelly *et al.* (1996) também utilizando uma mistura de culturas, obtiveram valores de taxa máxima de crescimento específico ( $\mu_{\max}$ ) de 0,049, 0,046 e 0,383  $\text{h}^{-1}$  para o benzeno, tolueno e xileno, respectivamente.

Yeom *et al.* (1997) obtiveram para o benzeno e tolueno os valores de 0,58 e 0,52  $\text{h}^{-1}$  para a taxa máxima de crescimento específico ( $\mu_{\max}$ ) e 33,54 e 33,84 mg/L para a constante de meia saturação do substrato ( $K_s$ ).

Shim and Yang (2006) verificaram as velocidades específicas de degradação para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e p-xileno com e sem a presença de peróxido  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtendo 0,0330, 0,0349, 0,0327, 0,0124  $\text{h}^{-1}$  sem a presença de peróxido de hidrogênio e 0,0406, 0,0368, 0,0350 e 0,0164  $\text{h}^{-1}$  com a presença de peróxido para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e p-xileno respectivamente.

Abuhamed *et al.* (2004) aplicaram o modelo de Andrews para único substrato, utilizaram uma cultura pura, *Pseudomonas putida* F1e obtiveram para os parâmetros cinéticos  $\mu_{\max}$ ,  $k_s$ ,  $K_i$  e  $Y_{x/s}$  os valores de 0,62 e 0,61  $\text{h}^{-1}$ ; 1,65 e 6,47 mg/L; 180 e 88  $\text{h}^{-1}$  e 0,75 e 0,58 g/g para o benzeno e tolueno, respectivamente.

Com relação à ordem na biodegradação dos compostos tolueno e xileno, vários autores na literatura relatam que o tolueno foi consumido primeiramente quando comparado ao xileno, como Maliyekkal *et al.* (2004), que utilizando uma mistura de culturas, tolueno foi degradado mais rapidamente, seguido pelo benzeno e pelo xileno. Trigueros *et al.* (2010b) também constataram ao aplicar o modelo de Andrews que a taxa máxima de crescimento específico era maior para o tolueno (os dados experimentais indicam que este tenha sido consumido mais rapidamente), enquanto o xileno tem sido utilizado mais lentamente. Além disso, o valor de  $K_s$  estimado para o tolueno sugeriu uma afinidade mais elevada para a cultura com esse composto. Jean *et al.* (2008) estudaram o efeito de diferentes nutrientes inorgânicos na biodegradação dos compostos BTX, utilizando *Pseudomonas* spp obtiveram para o tolueno maiores taxas de degradação em quase todas as condições testadas, apenas na condição onde a concentração de sulfato era de 20 mg/L a degradação do benzeno foi mais rápida que a do tolueno.

De acordo com Otenio *et al.* (2005), que estudaram a degradação de BTX utilizando *Pseudomonas putida* CCMI 852, o tolueno foi degradado a uma taxa duas vezes maior que o o-xileno e a concentração de benzeno permaneceu inalterada. Quando foi realizada a mistura de dois componentes, o tolueno foi biodegradado a uma taxa

73% inferior na presença de benzeno e, a uma taxa 37% inferior na presença de xileno. A utilização de o-xileno pelos micro-organismos também diminuiu 53% na presença de benzeno e 15% na presença de tolueno e a concentração de benzeno permaneceu inalterada. Quando associados os três componentes da mistura, a taxa de degradação específica do tolueno reduziu (57%) e do xileno (49%). Na presença de substratos individuais, o tempo necessário para a degradação foi de 19 h; já na associação de dois e três componentes da mistura, os tempos de degradação variaram entre 16,5 e 26 h.

A Tabela 4.9 descrita abaixo é uma revisão da literatura, onde são apresentados diversos trabalhos de biodegradação envolvendo os compostos BTEX. Pode-se destacar uma série de valores de velocidade máxima de crescimento específico ( $\mu_{\text{máx}}$ ), constante de meia saturação ( $K_s$ ), constante de inibição ( $K_i$ ) e fator de conversão em substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), pode-se notar que os mesmos parâmetros cinéticos encontrados neste trabalho condizem com diversos valores encontrados na literatura e inclusive utilizando mistura de culturas.

Como já dito, um dos maiores inconvenientes encontrados na cinética de biodegradação é a grande variabilidade registrada dos parâmetros cinéticos, é importante destacar que a obtenção desses parâmetros dependem de vários fatores, como: micro-organismo utilizado, aeração do meio de cultura, concentração do composto, associação de compostos, agitação, *software* usado no tratamento de dados, temperatura, pH, entre outros.

Tabela 4.9 – Resumo da cinética de crescimento bacteriano obtida em vários estudos de biodegradação dos compostos benzeno (B), tolueno (T), etilbenzeno (E), xileno (X) e fenol (F).

Ref.	Comp.	Conc.	Parâmetros				Micro-organismo
			$\mu_{\text{máx}}$ [h <sup>-1</sup> ]	$K_s$ [mg/L]	$Y_{x/s}$ [mg/mg]	$K_i$ [mg/L]	
Abuhamed <i>et al.</i> (2004)	B	3,00 –	0,620	1,65	0,75	180	<i>P. putida</i> F1 ATCC700007
	T	187,70	0,610	6,47	0,58	88	
	F	2,76 – 160,30 10 – 200	0,051	18,00	0,44	430	
Reardon <i>et al.</i> (2000)	B	≤43	0,73 ± 0,03	0,12±	1,20±0,05	-	<i>P. putida</i> F1
	T	≤43	0,86±0,01	0,02	1,28±0,13	-	
	F	≤43	0,11±0,01	13,80 ±0,90 32,00 ±2,40	0,80±0,07	-	



Chang <i>et al.</i> (1993)	B T T p-X	≤10 ≤10 ≤10 ≤10	0,335±0,12 9 0,543±0,07 6 0,452±0,11 5 0,130	3,17± 0,82 1,96± 0,91 1,88± 1,26 16,00	1,04±0,09 1,22±0,10 0,99±0,25 *	- - - -	<i>p. fragi</i> B1 <i>P. fragi</i> B1 <i>P. sp.</i> X1 <i>P. sp.</i> X1
Nakhla (2003)	B T o-X	10 – 50 10 – 50 10 - 50	0,0058 – 0,0144 – 0,0052- 0,0127 – 0,0052- 0,0114	5,54 – 10,16 6,32 – 10,47 6,78 – 10,81	0,50 – 1,02 0,48 – 1,02 0,52 – 1,02	- - -	Mistura de culturas
Oh <i>et al.</i> (1994)	B T	≤70 ≤70	0,44 0,72	3,36 15,07	0,65 0,64	- 44,43	<i>P. putida</i> O1
Lin <i>et al.</i> (2007)	B T E X	* * * *	0,0194 0,0064 0,0340 0,0060	8,349 9,851 211,7 91 1,427	0,53 0,34 0,32 0,75	191,89 48,48 310,56 153,55	<i>P. aeruginosa</i>
Bielefeldt and stensel (1999)	B T E o-X p-X	1,40 – 15,60 1,40 – 15,60 1,40 – 15,60 1,40 – 15,60	0,0475 0,0827 0,0200 0,0058 0,0097	0,51 0,47 0,23 0,16 0,23	0,95 0,95 0,62 0,23 0,32	- - - - -	Mistura de culturas
Reardon <i>et al.</i> (2002)	T F	* *	0,39 ± 0,01 0,31 ± 0,03	1,01± 0,28 0,51± 0,38	1,030±0,09 0 0,880±0,00 5	- -	<i>Burkholderia</i> <i>sp.</i> JS150
Mirpuri <i>et al.</i> (1997)	T	≤50	0,42±0,05	3,98± 0,78	0,90±0,13	42,78	<i>P. putida</i> 54G
Kermanshani <i>et al.</i> (2006)	p-X	13,60- 67,50	0,0047	10	0,05	-	Mistura de culturas
Kelly <i>et al.</i> (1996)	X	*	0,3830	13,27 25	*	-	Mistura de culturas
Schirmer <i>et al.</i> (1999)	m-X	4,70- 37,30	0,172	0,790	0,520	91,700	Mistura de culturas
Otenio <i>et al.</i> (2005)	B T X	100 100 100	0 0,0532 0,0255	- - -	- - -	-	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> CCMI 852

Yeom <i>et al.</i> (1997)	B T	- -	0,58 0,52	33,54 33,84	- -	-	<i>Alcaligenes xylooxidans</i> Y234
Shim and Yang (1999)	B T E o-X	- - - -	- - - -	600 462 236 80	- - - -	2500 1450 429 184	<i>Pseudomonas putida</i> and <i>P. fluorescens</i>
Shim & yang (2006)	B T E p-X	- - - -	0.0330 0.0349 0.0327 0.0124	- - - -	- - - -	- - - -	<i>Pseudomonas putida</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Maliyekal <i>et al.</i> (2004)	B  T  X		0,0427- 0,0574  0,0797- 0,0966  0,0420- 0,0486	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -	Mistura de culturas
Maliyekkal <i>et al.</i> (2004)	Andrews B  T  X Levenspiel's B T X	50-500	0,0629- 0,0973  0,1117- 0,1311  0,0811- 0,0976  0,0684- 0,0953  0,1166- 0,1624  0,0743- 0,0865	30,3- 64,3  49,2- 72,3  51,1- 58,2  70,9- 88  77,4- 125  40,3- 85	- - - - - - - - - - -	142,1- 211,8  29,4- 269,5  134,3- 175,6  536,2- 561,7  570- 636,6  536,2- 561,7	Mistura de culturas
Trigueros <i>et al.</i> (2010b)	B T E X  Andrews B T X	20 mg/L	0,30 0,33 0,27 0,24  0,22 0,46 0,19	1,25 0,64 0,85 0,58  0,92 0,65 2,55	9,73 0,82 0,81 0,95  0,48 0,95 0,15	- - - -  150 45 5	<i>Pseudomonas putida</i> F1

Ref. – referência, Comp. – Composto, Conc. – Concentração

#### 4.4.3 Análise estatística dos substratos monocomponentes

Com respeito à resposta tempo de degradação dos substratos tolueno e xileno, estes valores foram avaliados no software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2001). O estudo foi realizado através da análise de variância, utilizando o quadro de ANOVA apresentado na Tabela 4.10 e pelos gráficos de efeitos das figuras 4.5 a 4.9.

Tabela 4.10 - Quadro de ANOVA para a resposta tempo na biodegradação monocomponente.

Fatores	$\Sigma Q$	GL	QM	T-F	p
Diâmetro	111,935	1	111,935	184,114	0,000171
Composto	4,072	1	4,072	6,671	0,005679
Glicose	1,347	2	0,674	0,698	0,567822
DC	1,327	1	1,327	9,681	0,035823
GC	0,014	2	0,007	0,01159	0,9885
GD	0,202	2	0,101	0,305	0,757704
Erro	6,879	14	0,4913		

Através da análise da Tabela 4.10, pode-se observar o efeito das variáveis principais: diâmetro (D), Composto (T ou X) e glicose (G), sendo que o diâmetro foi o que apresentou maior significância na resposta, seguido pelo composto e pela glicose, que não apresentou significância. Com respeito às interações diâmetro e composto (DC), glicose e composto (GC) e glicose e diâmetro (GD), apenas a DC apresentou significância ao nível de 95% (valores de p menores que 0,05) enquanto GC e GD não apresentaram significância na resposta. Uma melhor visualização dos efeitos pode ser observada nas figuras 4.5 a 4.9.

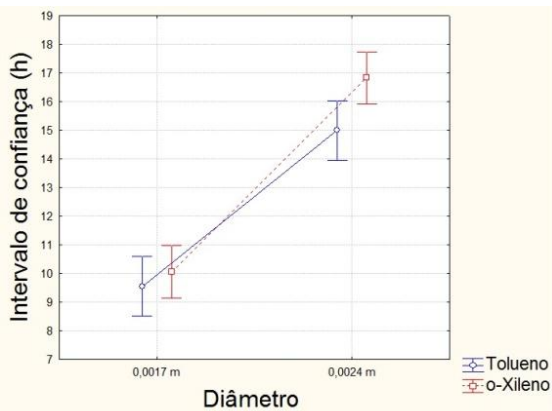


Figura 4.5 – Efeito do diâmetro nos compostos tolueno e xileno.

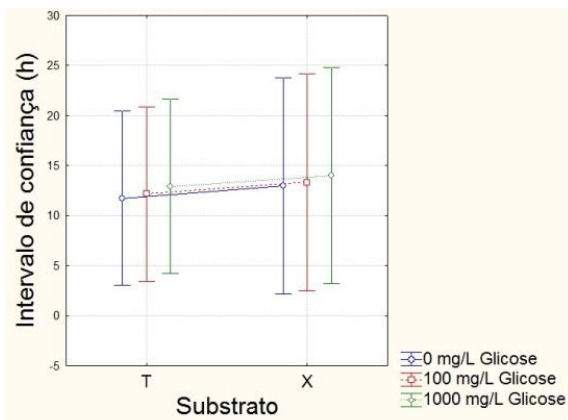


Figura 4.6 – Efeito do composto em diferentes níveis de glicose.

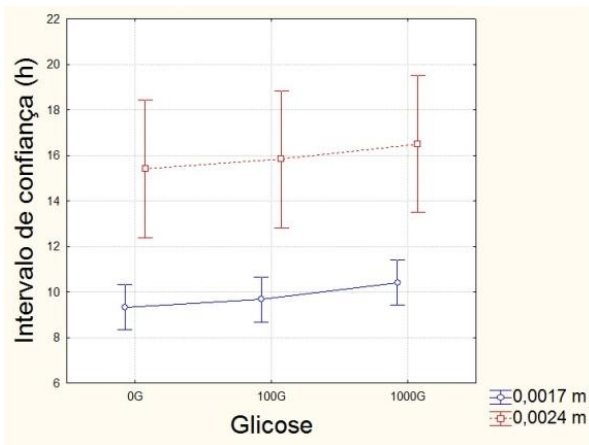


Figura 4.7 – Efeito da glicose nos diâmetros.

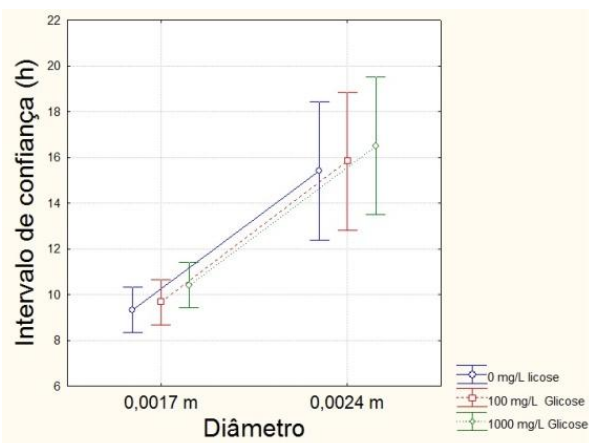


Figura 4.8 – Efeito do diâmetro na glicose.

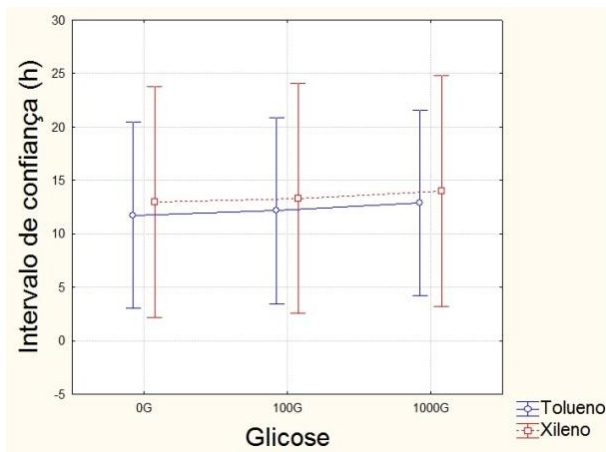


Figura 4.9 – Efeito da glicose nos compostos

Nos figuras apresentadas as barras verticais indicam o intervalo de confiança dos efeitos apresentados. Percebe-se através da figura 4.5 que existe uma grande diferença no tempo de degradação dos compostos (tolueno e xileno) quando se varia o diâmetro de partícula, o que evidencia que o diâmetro de partícula de carvão ativado apresenta diferença significativa ao nível de 95% na resposta. Destaca-se ainda que o menor diâmetro apresentou tempos menores de degradação. Isto pode ter ocorrido devido à maior área de contato que o menor diâmetro de partícula proporciona, visto que existe mais área para formação de biofilme quando comparado à partícula de maior tamanho. Neste mesmo gráfico ainda se pode destacar, com menos evidência, a degradação mais rápida do composto tolueno com relação ao o-xileno.

Avaliando-se o figura 4.6 se observa claramente que as concentrações de glicose estudadas (0, 100 e 1000 mg/L) não apresentaram diferença significativa nem para o tolueno e nem para o xileno, como também verificado por Shim *et al.* (2002), que não obtiveram a influência da glicose como co-substrato na biodegradação do benzeno; nesse mesmo trabalho a concentração de glicose estudada também foi de 1000 mg/L.

As figuras 4.7 e 4.8 evidenciam novamente a maior influência do diâmetro com relação à glicose. A figura 4.9 apenas ressalta novamente a menor influência da glicose na degradação e mostra um tempo maior de degradação para o xileno quando comparado ao tolueno, o que esta em conformidade com diversos autores já citados.

#### **4.4.4 Avaliação dos modelos cinéticos em multi-substratos**

A literatura ainda é escassa de artigos que abordem a modelagem matemática da cinética do sistema em múltiplos substratos. Neste trabalho, o desempenho de modelos cinéticos não estruturados foi avaliado, assumindo que a biodegradação da mistura dos compostos TX e BTX possa ser representada pelos modelos de inibição competitiva, inibição não competitiva, inibição acompetitiva e pelo modelo SKIP.

##### **4.4.4.1 Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura tolueno e o-xileno**

Os gráficos A.21 a A.52 encontradas no Apêndice A apresentam as simulações dos modelos de inibição e do modelo SKIP aplicados na biodegradação dos compostos TX e BTX em mistura, juntamente com os dados experimentais obtidos em estudo em batelada.

Neste estudo envolvendo a mistura dos compostos BTX a dificuldade em encontrar o valor ótimo global e o esforço computacional foram maiores, devido ao maior número de parâmetros a serem estimados.

Através da Tabela 4.11, pode-se observar a análise do resíduo mínimo obtido para cada modelo (função objetivo), dessa forma, além da análise visual das simulações (Apêndice A) é também possível determinar o modelo que melhor descreve os dados experimentais da biodegradação das misturas através dos resíduos mínimos.

Tabela 4.11 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação dos compostos TX.

Experimento	Modelo	Função objetivo
Ausência de glicose, TX, 17 cm	SKIP	0,09027
	Inibição Competitiva	0,10323
	Inibição Não-Competitiva	0,10559
	Inibição Acompetitiva	0,09247
100 mg/L glicose, TX, 17 cm	SKIP	0,05687
	Inibição Competitiva	0,06868
	Inibição Não-Competitiva	0,075046
	Inibição Acompetitiva	0,066146
1000 mg/L glicose, TX, 17 cm	SKIP	0,07986
	Inibição Competitiva	0,09281
	Inibição Não-Competitiva	0,09766
	Inibição Acompetitiva	0,08076
Ausência de glicose, TX, 24 cm	SKIP	0,08329
	Inibição competitiva	0,09338
	Inibição Não-Competitiva	0,10631
	Inibição Acompetitiva	0,08531
100 mg/L glicose, TX, 24 cm	SKIP	0,13398
	Inibição Competitiva	0,15239
	Inibição Não-Competitiva	0,15080
	Inibição Acompetitiva	0,13777
1000 mg/L glicose, TX, 24 cm	SKIP	0,09909
	Inibição Competitiva	0,11614
	Inibição Não-Competitiva	0,12244
	Inibição Acompetitiva	0,09975

De acordo com os modelos apresentados, o modelo SKIP apresentou os valores mais baixos de função objetivo, representado dessa forma, melhor os dados experimentais, o mesmo modelo também se mostrou melhor para Trigueros *et al.* (2010b). No Apêndice A pode-se observar uma ótima relação entre as simulações do modelo e os dados experimentais, sugerindo um bom ajuste ao método PSO.

A boa representação dos resultados experimentais pelo modelo SKIP reforça a hipótese de que esteja ocorrendo interações cruzadas



entre os compostos TX, contudo, essas interações não podem ser especificadas pelo modelo. Uma possível explicação para o comportamento observado para a presença simultânea dos substratos TX, observada durante a biodegradação, é que o processo esteja ocorrendo com a indução não específica de enzimas para degradação dos substratos similares, ou à convergência de rotas metabólicas para utilização de múltiplos substratos. Contudo, ainda tem que se levar em conta que mesmo os compostos sendo degradados simultaneamente, algumas vezes estes não são utilizados pela mesma rota metabólica, sendo necessário, portanto, estudos futuros para determinar outros mecanismos de regulação gênica que podem estar envolvidos na biodegradação (TRIGUEROS, 2008).

Na Tabela 4.12 são apresentados os parâmetros cinéticos do modelo SKIP para os compostos tolueno e o-xileno, nos dois diâmetros de partícula e nas três concentrações de glicose.

Tabela 4.12 - Valores dos parâmetros cinéticos estimados para os compostos TX aplicando o modelo SKIP.

<b>Substrato</b>	<b><math>\mu_{\text{máx}}</math> (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b><math>K_s</math> (mg/L)</b>	<b><math>Y_{x/s}</math> (mg/mg)</b>
Ausência de glicose, Tolueno-Xileno, 17 cm			
Tolueno	0,002851	499,96	0,2370
Xileno	0,01930	500	1,570
100 mg/L glicose, Tolueno-Xileno, 17 cm			
Tolueno	0,01200	555	0,95
Xileno	0,00780	594,83	0,6184
1000 mg/L glicose, Tolueno-Xileno, 17 cm			
Tolueno	0,00555	500	0,2930
Xileno	0,01097	500	0,6556
0 mg/L glicose, Tolueno-Xileno, 24 cm			
Tolueno	0,095	555	1,2122
Xileno	0,00716	595	0,6265
100 mg/L glicose, Tolueno-Xileno, 24 cm			
Tolueno	0,001410	500	0,14025
Xileno	0,004163	500	0,45309
1000 mg/L glicose, Tolueno-Xileno, 24 cm			
Tolueno	0,01777	555	1,95
Xileno	0,02236	595	2,90

O método de estimativa de parâmetros, aplicado neste trabalho se mostrou muito eficiente na predição da cinética de biodegradação dos compostos BTX e, por isso, pode ser bastante útil na modelagem destes

processos, principalmente em processos complexos onde múltiplos substratos estão envolvidos. Na Tabela 4.13 são apresentados os parâmetros interativos estimados para as diferentes condições.

Tabela 4.13 – Valores dos parâmetros interativos estimados para os compostos TX aplicando o Modelo SKIP.

<b>Condição experimental</b>	<b><math>I_{XT}</math></b>	<b><math>I_{TX}</math></b>
Ausência de glicose, TX, 17 cm	1e-10	1e-10
100 mg/L glicose, TX, 17 cm	0,000063	1e-10
1000 mg/L glicose, TX, 17 cm	0,4455	0,006346
Ausência de glicose, TX, 24 cm	1e-10	0,00005
100 mg/L glicose, TX, 24 cm	0,000025	0,00005
1000 mg/L glicose, TX, 24 cm	0,000025	0,000005

Os parâmetros cinéticos estimados neste trabalho podem ser comparados com valores encontrados na literatura, apresentados na Tabela 4.14, para os modelos de inibição e SKIP utilizando os substratos BTEX.

A associação microbiana utilizada neste trabalho apresenta diversas espécies de micro-organismos, as quais provavelmente possuem múltiplos caminhos metabólicos para a biodegradação dos compostos TX. Conseqüentemente, efeitos de mistura de diferentes inibições entre os substratos são esperados.

Além disso, não podemos descartar nenhum dos modelos avaliados neste trabalho, pois o valor da função objetivo de todos os modelos foram muito similares, sendo que o modelo SKIP apresentou valores um pouco menores e por isso a sua escolha. Dessa forma, é possível que também tenha ocorrido diferentes tipos de inibição durante a biodegradação dos compostos TX.

Tabela 4.14 – Resumo da cinética de crescimento bacteriano obtida em vários estudos de biodegradação dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, para modelos de inibição competitiva e SKIP.

Composto	Modelo	Parâmetros	Micro-organismo	Autores
BT	SKIP	$I_{T,B} = 5 \pm 0,3$ $I_{B,T} = 0,01 \pm 0,003$	<i>P. putida</i> F1	Reardon <i>et al.</i> (2000)
BTEX	Inib. Comp.	$K_{S,B} = 0,08 \pm 0,003$ mg/L $K_{S,T} = 0,20 \pm 0,14$ mg/L $K_{S,E} = 0,21 \pm 0,13$ mg/L $K_{S,X} = 0,18 \pm 0,18$ mg/L	Mistura de culturas	Bielefeldt e Stensel (1999)
BT	Inib. Comp.	$\mu_{\max,B} = 0,34 \text{ h}^{-1}$ $K_{S,B} = 3,17 \pm 0,82$ mg/L $Y_{X/S,B} = 1,04 \pm 0,09$ g/g $\mu_{\max,T} = 0,54 \pm \text{h}^{-1}$ $K_{S,T} = 1,96 \pm 0,91$ mg/L $Y_{X/S,T} = 1,22 \pm 0,1$ g/g $K_{I,B} = 3,10 \pm 0,12$ mg/L $K_{I,T} = 1,71$ mg/L	<i>Pseudomonas fragi</i>	Chang <i>et al.</i> (1993)
Tp-X	Cometabolismo do p-xileno	$T_g^c = 0,45$ mg/mg	<i>Pseudomonas fragi</i>	Chang <i>et al.</i> (1993)
BTEo-X	SKIP, Cometabolismo	$\mu_{\max,B} = 0,44 \text{ h}^{-1}$ $K_{S,B} = 27,57$ mg/L $Y_{X/S,B} = 1,35$ g/g $\mu_{\max,T} = 0,60 \text{ h}^{-1}$ $K_{S,T} = 34,12$ mg/L $Y_{X/S,T} = 1,25$ g/g $\mu_{\max,E} = 0,13 \text{ h}^{-1}$ $K_{S,E} = 0,36$ mg/L $Y_{X/S,E} = 0,85$ g/g $I_{T,B} = 2$ $I_{B,T} = -0,4$ $I_{E,B} = 4$ $I_{X,B} = -0,7$ $T_g^c = 0,5$ $T_g^c = 0,5$	Mistura de culturas	Littlejohns & Daugulis (2008)

BTEo-X	SKIP	$\mu_{\text{máx},B}=0,41\text{h}^{-1}$ $\mu_{\text{máx},T}=0,42\text{h}^{-1}$ $\mu_{\text{máx},E}=0,45\text{h}^{-1}$ $\mu_{\text{máx},X}=0,05\text{h}^{-1}$ $K_{S,B}=1,1\text{mg/L}$ $K_{S,T}=1,24\text{mg/L}$ $K_{S,E}=1,75\text{mg/L}$ $K_{S,X}=20\text{mg/L}$ $Y_{X/S,B}=0,30$ mg/mg $Y_{X/S,T}=0,18$ mg/mg $Y_{X/S,E}=0,32$ mg/mg $I_{T,B}=1$ , $IE,B=10$ $I_{X,B}=0,007$ $I_{B,T}=0,0023$ $I_{E,T}=4,5$ $I_{X,T}=0,0005$ $I_{B,E}=0,175$ $I_{T,E}=0,025$ $I_{X,E}=0,01$ $I_{B,X}=1,10$ $I_{T,X}=1,7136$ $I_{E,X}=7,075$	<i>Pseudomonas putida</i> F1	Trigueros <i>et al.</i> (2010b)
--------	------	--	------------------------------	---------------------------------

#### 4.4.4.2 Análise de significância dos substratos bicomponentes (tolueno e o-xileno)

O tempo de degradação dos substratos tolueno e o-xileno associados foram avaliados pelo software *Statistica 7.0* (STATSOFT, 2001). O estudo foi realizado através da análise de variância, utilizando o quadro de ANOVA apresentado na Tabela 4.15 e pelos gráficos de efeitos das figuras 4.10 a 4.14.

Tabela 4.15 - Quadro de ANOVA para a resposta tempo na biodegradação bicomponente.

Fatores	$\Sigma Q$	GL	QM	T-F	p
Diâmetro	225,47	1	225,47	68,36	0,000321
Composto	29,047	1	29,047	133,265	0,001163
Glicose	12,763	2	6,382	0,6463	0,58425
GD	0,389	2	0,195	0,089	0,917142
GC	0,575	2	0,287	0,13141	0,882
DC	6,264	1	6,264	28,739	0,005843
Erro	32,712	14	2,3365		

Através da análise da Tabela 4.15, pode-se observar o efeito das variáveis principais: diâmetro (D), Composto (T ou X) e glicose (G), sendo que, assim como nos experimentos monocomponente, no bicomponente o diâmetro foi o que apresentou maior significância na resposta, seguido pelo composto e pela glicose que não apresentou significância. Com respeito às interações diâmetro e composto (DC), glicose e composto (GC) e glicose e diâmetro (GD), apenas a DC apresentou significância ao nível de 95% (valores de p menores que 0,05) enquanto GC e GD não apresentaram significância na resposta. Uma melhor visualização dos efeitos pode ser observada nos figuras 4.9 a 4.13.

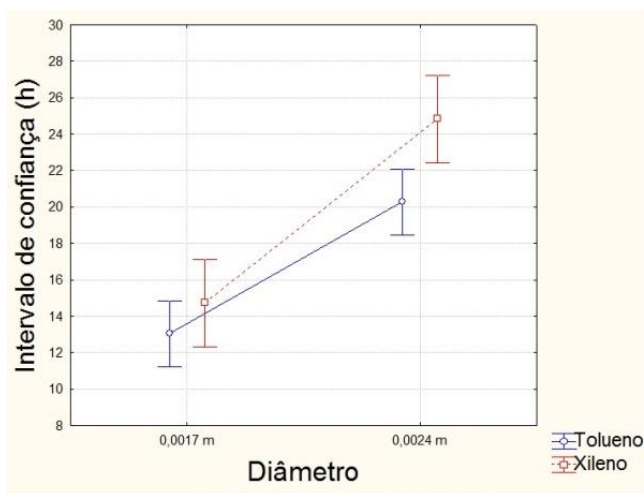


Figura 4.10 – Efeito do diâmetro nos compostos tolueno e xileno.

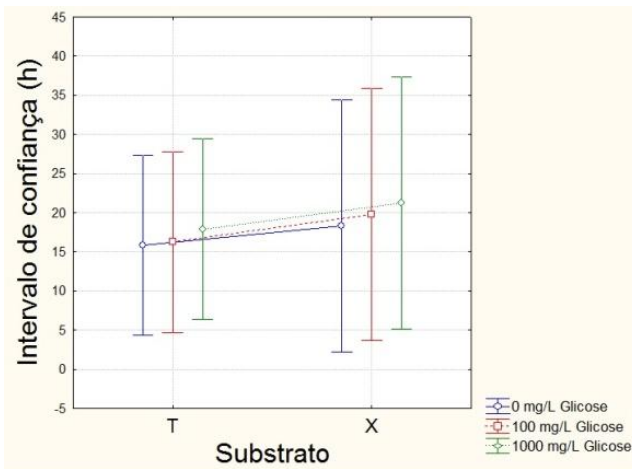


Figura 4.11 - Efeito do composto em diferentes níveis de glicose.

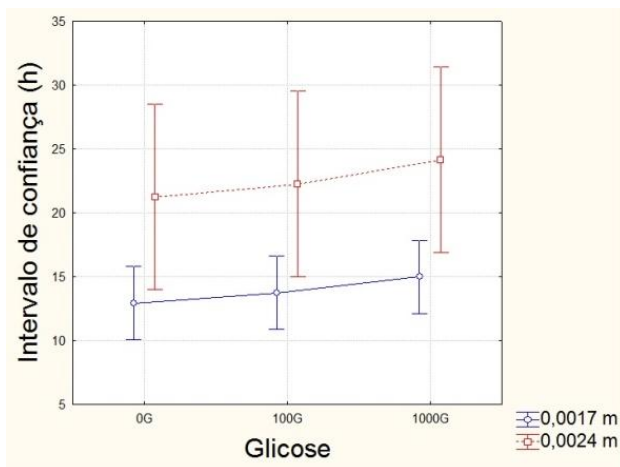


Figura 4.12 – Efeito da glicose nos diâmetros.

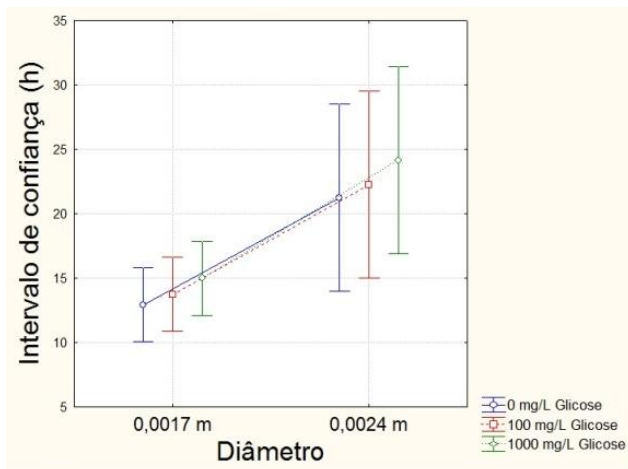


Figura 4.13 – Efeito do diâmetro na glicose.

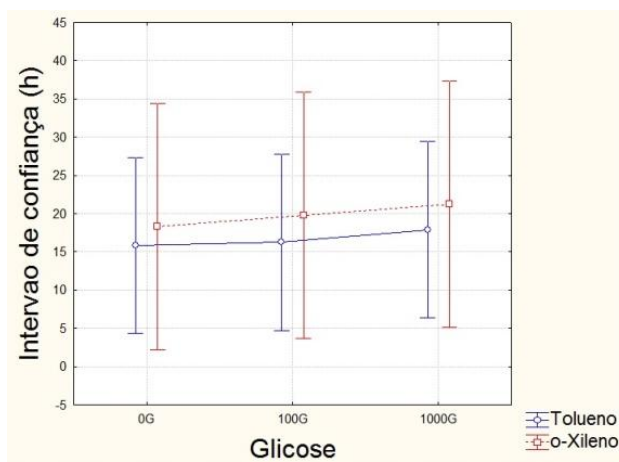


Figura 4.14 – Efeito da glicose no substrato.

Pela análise das figuras que representam os efeitos para as associações bicomponentes, podem-se perceber resultados muito similares às associações monocomponentes. Contudo, cabe ressaltar um aumento na significância da variável composto, e isto se torna perceptível nos gráficos dos efeitos onde o o-xileno apresenta notadamente maior tempo de degradação que o tolueno. Este maior

tempo de degradação do o-xileno pode ser explicado pelo fato de tolueno e o-xileno estarem associados em solução.

Afigura 4.10 apresenta o efeito do diâmetro para o tolueno e xileno, afigura 4.11 representa o consequência do composto em diferentes níveis de glicose as figuras 4.12 e 4.13 destacam novamente o maior significância do diâmetro com respeito à glicose e a figura 4.14 a variação da biodegradação de tolueno e xileno em diferentes níveis de glicose.

#### 4.4.4.3 Avaliação dos modelos cinéticos na mistura dos substratos Benzeno, Tolueno e o-Xileno

A Tabela 4.16 apresenta os valores de função objetivo dos modelos SKIP, inibição competitiva, incompetitiva e não competitiva para a associação tricomponente do benzeno, tolueno e o-xileno.

Tabela 4.16 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação dos compostos BTX.

Experimento	Modelo	Função objetivo
Ausência de glicose, BTX, 17 cm	SKIP	0,1179
	Inibição Competitiva	0,1695
	Inibição Não-Competitiva	0,1147
	Inibição Acompetitiva	0,0913
Ausência de glicose, BTX, 24 cm	SKIP	0,1925
	Inibição Competitiva	0,2117
	Inibição Não-Competitiva	0,2163
	Inibição Acompetitiva	0,1666

Pela avaliação dos modelos, pode-se observar que os valores de função objetivo são muito semelhantes para todos os modelos estudados, sendo o modelo de inibição incompetitiva o que apresentou menores valores de função objetivo; no entanto, não se pode descartar nenhum dos modelos avaliados. O menor valor de função objetivo pode, nesse caso, apenas apontar a tendência do modelo que está mais adequado dentro dos avaliados.



Tabela 4.17 - Valores dos parâmetros cinéticos estimados para os compostos BTX aplicando o modelo de inibição acompetitiva.

Substrato	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$K_s$ (mg/L)	$Y_{x/s}$ (mg/mg)
Ausência de glicose, Benzeno, Tolueno, o-Xileno, 17 cm			
Benzeno	0,051	540	6,17
Tolueno	0,012	491,25	1,40
o-Xileno	0,049	525,78	5,69
Ausência de glicose, Benzeno Tolueno, o-Xileno, 24 cm			
Benzeno	0,025	545	3,22
Tolueno	0,051	579,81	5,50
o-Xileno	0,025	535	3,70

Pode-se verificar que os parâmetros cinéticos da associação tricomponente (benzeno, tolueno e o-xileno) são muito semelhantes aos parâmetros bicomponentes (tolueno e o-xileno). Através dos Gráficos A.45 à A.52 situados no Apêndice A pode-se observar o ótimo ajuste dos modelos tricomponentes aos dados experimentais.

Quando se avaliam os parâmetros cinéticos de inibição (Tabelas A.7 e A.8 do Apêndice A), nota-se que, para o modelo de inibição acompetitiva, os parâmetros de inibição entre os substratos são nulos, sendo que o modelo SKIP apresenta parâmetros um pouco mais elevados, mas também muito baixos. Isto pode evidenciar uma associação entre efeitos biodegradativos e efeitos de adsorção nas cinéticas.

#### 4.4.4.4 Análise de significância dos substratos tricomponentes (benzeno, tolueno e o-xileno)

O tempo de degradação dos substratos tolueno e o-xileno associados foram avaliados pelo software *Statistica* 7.0 (STATSOFT, 2001). O estudo foi realizado através da análise de variância, utilizando o quadro de ANOVA apresentado na Tabela 4.18 e pelo Gráfico dos efeitos na figura 4.15.

Tabela 4.18 - Quadro de ANOVA para a resposta tempo na biodegradação tricompente.

Fatores	$\Sigma Q$	GL	QM	T-F	P
Diâmetro	161,5	1	161,5	-	-
Composto	37,1	2	18,6	-	-
DC	6,5	2	3,4	-	-
Erro	0	0	0		

Através da avaliação da Tabela 4.18 pode-se observar que os efeitos Diâmetro, Composto e associação dos dois (DC) apresentaram diferença significativa ao nível de 95%, como pode ser também observado na figura 4.15.

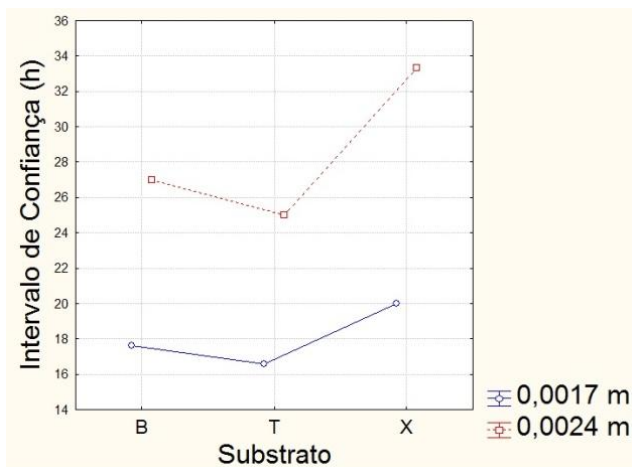


Figura 4.15 – Efeito dos substratos no diâmetro.

#### 4.5 Cinéticas em fluxo contínuo

Os resultados foram obtidos utilizando-se uma coluna de 50 cm de comprimento, com diâmetro de aproximadamente 3 cm, dividida em 7 pontos, como pode ser observado através da Tabela 4.19.

Tabela 4.19– Pontos da coluna de biodegradação e seus respectivos comprimentos.

Pontos	Comprimento (cm)
0	0
1	8,5
2	15,5
3	22,5
4	30,5
5	37,5
6	44,5
7	50

A determinação da concentração dos compostos TX foi realizada ao longo do comprimento da coluna, sendo estudados 5 vazões de alimentação diferentes da coluna (1, 3, 5, 10 e 20 mL/min), totalizando 15 experimentos.

Os gráficos 4.1, 4.2 e 4.3 representam o comportamento do composto tolueno, o-xileno e a associação de ambos para diferentes vazões de alimentação ao longo do comprimento da coluna.

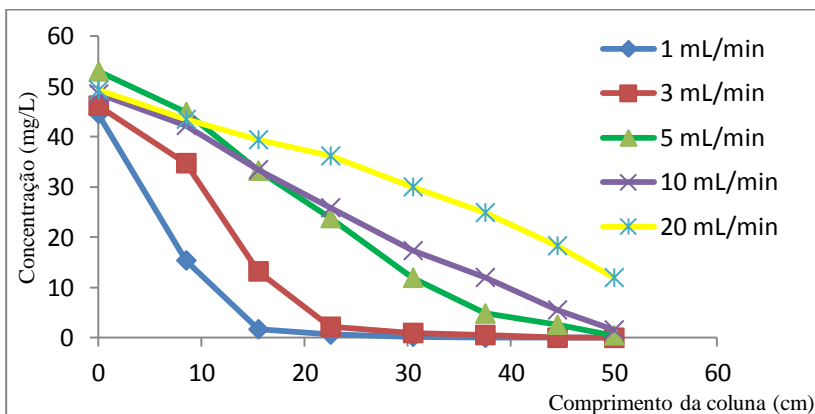


Gráfico 4.1 – Comportamento do composto tolueno ao longo do comprimento da coluna em diferentes vazões.

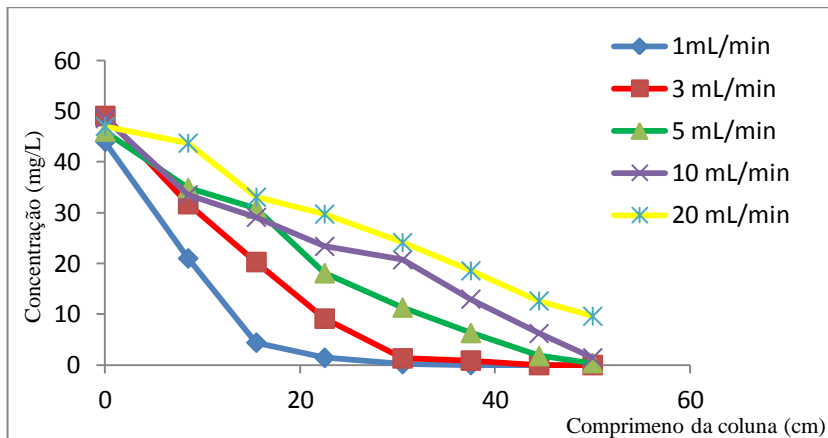


Gráfico 4.2 – Comportamento do composto o-xileno ao longo do comprimento da coluna em diferentes vazões.

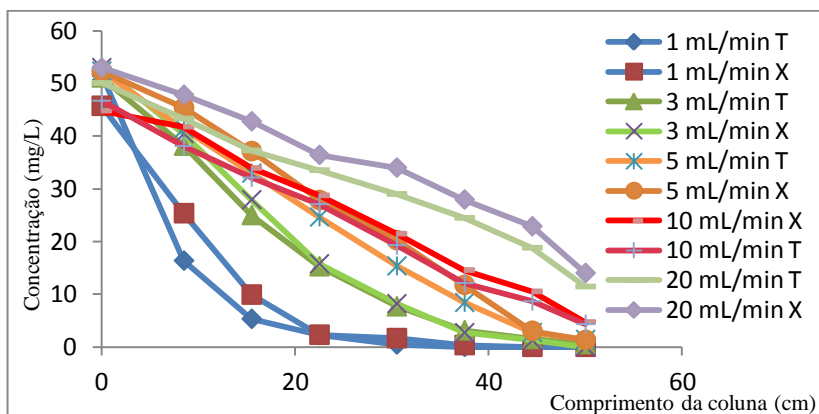


Gráfico 4.3 – Comportamento dos compostos tolueno e o-xileno ao longo do comprimento da coluna em diferentes vazões.

Pode-se observar que de forma lógica pelos gráficos que a taxa de consumo dos substratos tolueno e o-xileno foi inversamente proporcional à vazão aplicada, assim, quanto maior a vazão menor o consumo dos compostos pelos microrganismos, resultando em uma maior concentração de compostos deixando a coluna.

De acordo com Kelli *et al.* (1996), que avaliaram as taxas de reação em estado estacionário para as reações de biodegradação em colunas de fluxo e avaliadas por uma lei de velocidade com base na

equação de Monod, onde se calculou a constante de velocidade ( $k_1$ ), o consumo de tolueno foi maior seguido por benzeno e xileno, o que condiz com os experimentos realizados, onde o tolueno apresentou maior facilidade de biodegradação quando comparado ao o-xileno, como pode ser observado nas figuras 4.16 à 4.17, onde é registrado a influência da vazão na concentração de saída da coluna dos compostos Tolueno e o-Xileno individuais.

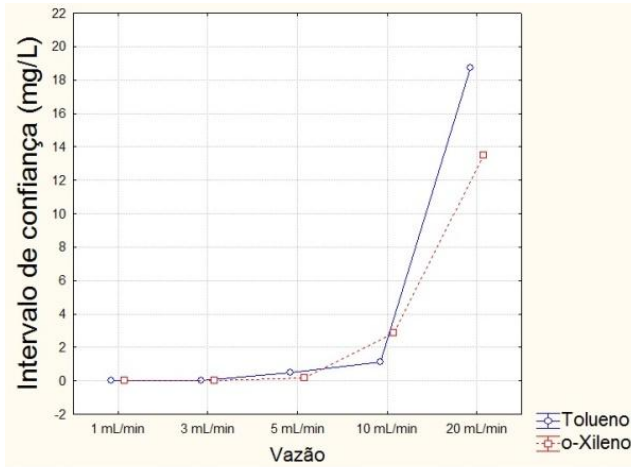


Figura 4.16 – Influência da vazão para cada composto.

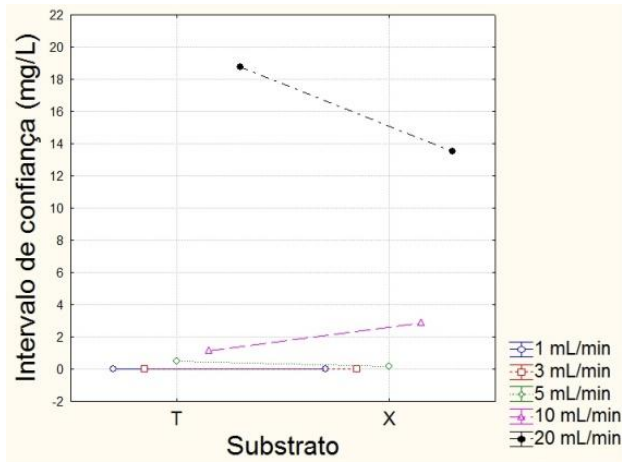


Figura 4.17 – Comportamento de cada substrato de acordo com a vazão aplicada

Como pode se observar, em vazões baixas (1 e 3 mL/min), ambos os compostos apresentaram consumo total (dentro dos limites de detecção do HPLC), no entanto, conforme foi se aumentando a vazão, até ela atingir 10 mL/min a saída de o-xileno era maior que a de tolueno, isso indica uma preferência dos microrganismo na biodegradação do tolueno. No entanto, elevando a vazão para 20 mL/min, observa-se que o efeito principal agora passa a ser a própria vazão de alimentação e não mais a biodegradação dos substratos, dessa forma, o tolueno por apresentar maior solubilidade em água que o o-xileno, acaba deixando a coluna em uma concentração maior.

A partir da figura 4.18 que avalia a concentração de saída dos substratos tolueno e o-xileno apenas nas vazões de 1, 3, 5 e 10 mL/min, excluindo a de 20 mL/min, é possível observar uma maior tendência pela biodegradação do tolueno quando comparado ao xileno.

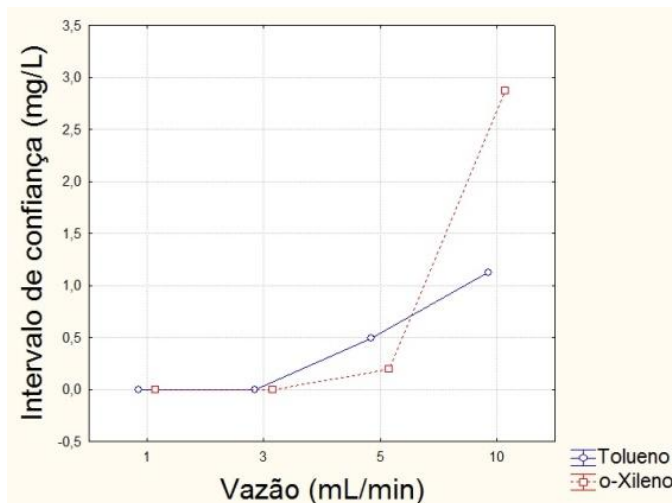


Figura 4.18 – Efeito das vazões de 1, 3, 5 e 10 mL/min sobre o Tolueno e Xileno

Com respeito ao quadro de ANOVA, a Tabela 4.20 mostra que existe diferença significativa ao nível de 95%, para as diferentes vazões de alimentação e para os compostos tolueno e o-xileno associados individualmente.

Tabela 4.20 – Influência dos fatores vazão e composto na biodegradação em fluxo de tolueno e xileno individuais.

Fatores	$\Sigma Q$	GL	QM	T-F	p
Vazão	5,442	3	1,814	---	---
Composto	0,263	1	0,263	---	---
Composto*Vazão	1,293	3	0,431	---	---

Quando se avalia a biodegradação dos substratos tolueno e o-xileno associados, também se observa que os fatores vazão e composto apresentam diferença significativa ao nível de 95%, Tabela 4.21. Com relação à preferência pelo consumo, podemos observar uma preferência no consumo de tolueno em relação ao o-xileno, mesmo que seja pequena como visto na Figura 4.19.

Tabela 4.21 – Influência dos fatores vazão e composto na biodegradação em fluxo contínuo para associação de tolueno e xileno.

Fatores	$\Sigma Q$	GL	QM	T-F	p
Vazão	23,76	3	7,919	---	---
Composto	0,05	1	0,05	---	---
Composto*Vazão	0,12	3	0,04	---	---

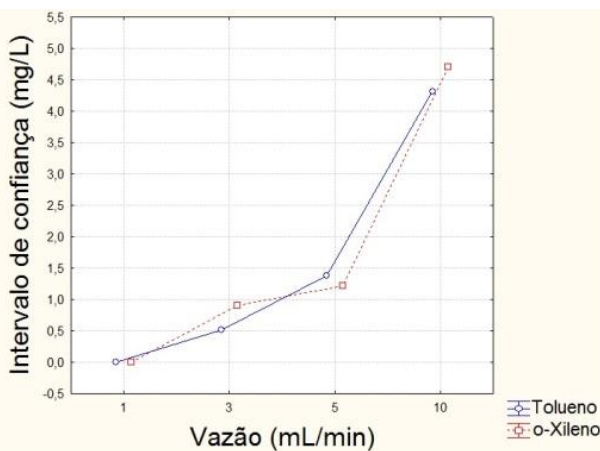


Figura 4.19 – associação tolueno e xileno, efeito da vazão e do composto.





## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Através da avaliação das figuras de microscopia de contraste de fundo escuro e microscopia eletrônica de varredura, foi possível perceber a grande diversidade de micro-organismos presentes no lodo aeróbio proveniente na estação de tratamento e uma adequada utilização do carvão ativado de casca de coco como suporte para formação de biofilme. Além disso, também foi possível perceber que esta diversidade de micro-organismos no lodo pode ser identificada em diferentes etapas do processo adaptativo.

Com respeito à identificação das bactérias, as identificadas no lodo *in natura* não foram identificadas nos lodos adaptados (batelada e fluxo contínuo).. Foi constatado que o gênero *Pseudomonas* presente nos lodos adaptados tem a capacidade de degradar os compostos BTX sugerindo, dessa forma, uma modificação da cultura inicial de bactérias.

Os testes de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* indicaram que o composto o-xileno apresentou toxicidade mais elevada para o microcrustáceo, no entanto, é necessário destacar que apenas este teste não é o suficiente para se avaliar a toxicidade de um contaminante químico, contudo, para os fins desse trabalho esse teste foi suficiente, pois podemos perceber que um processo de descontaminação (batelada e/ou fluxo contínuo) se mostra eficiente na remoção de compostos tóxicos presentes em efluentes petroquímicos.

Com respeito à avaliação dos modelos cinéticos, foram avaliados os modelos cinéticos de crescimento microbiano fundamentados nos dados experimentais da biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e o-xileno, para este procedimento foi implementado no *software* Maple® um método de otimização global, conhecido como Enxame de Partículas ou *Particle Swarm Optimization* (PSO), o qual se mostrou muito eficiente na identificação dos parâmetros cinéticos. Discriminaram-se dois diâmetros de partícula de carvão ativado de casca de coco como suporte para formação do biofilme (17 e 24 cm) e três níveis de concentração de glicose (0, 100 e 1000 mg/L) para se avaliar a significância ao nível de 95% na biodegradação dos substratos individuais e associados.

Os parâmetros cinéticos obtidos através do modelo de Monod se mostraram coerentes com os valores encontrados na literatura, indicando que a cultura apresentou maior afinidade ao substrato tolueno (menores valores de  $K_s$ ). Os resultados experimentais também sugerem um menor tempo de consumo para o substrato tolueno, o que está em conformidade com diversos autores encontrados na literatura. Apenas

pela avaliação dos parâmetros cinéticos não foi possível identificar uma interferência das variáveis diâmetro de partícula e concentração de glicose, para isto foi necessária a aplicação de testes estatísticos (ANOVA) na resposta tempo de consumo dos substratos.

Através da aplicação do modelo de Andrews, foi possível perceber que das quatro condições estudadas, o o-xileno apresentou maior efeito inibitório em três através da relação  $K_s/K_i$ , o que sugere que ele é o substrato com maior efeito inibidor presente. Também através deste modelo, se percebe que o valor da constante  $K_i$  não apresenta grandes variações quando se aumenta a concentração de glicose de 100 para 1000 mg/L, o que sugere que a glicose não apresentou efeito inibitório na degradação dos substratos. Pode-se dizer, dessa forma, que a biodegradação individual dos substratos foi adequadamente descrita pelos modelos de Andrews e Monod para os compostos tolueno e o-xileno.

Com referência à avaliação da cinética em associação de substratos, apesar dos poucos relatos encontrados na literatura referentes aos modelos de inibição e modelo SKIP, pode-se dizer que os valores dos parâmetros estimados se mostraram coerentes, foi possível perceber que o modelo SKIP apresentou uma ótima performance na descrição dos dados experimentais da biodegradação das misturas tolueno-xileno. Contudo, os demais modelos de inibição não puderam ser descartados, pois seria necessária uma metodologia estatística para assegurar a qualidade dos resultados. O modelo SKIP sugere a existência de interações não específicas entre os substratos TX, isto acorda com o acontecimento de que, a utilização de uma mistura de culturas microbianas pode apresentar múltiplos caminhos metabólicos na biodegradação dos compostos TX. Foi possível notar de acordo com os parâmetros iterativos que o o-xileno apresentou maiores efeitos de inibição sobre o tolueno ao passo que o tolueno apresentou menor efeito.

Pela avaliação da associação tricomponente (benzeno-tolueno-o-xileno), percebe-se uma proximidade da função objetivo para os diferentes modelos avaliados, sendo que o modelo de inibição incompetitiva apresentou menor valor, da mesma forma que a avaliação bicomponente, nenhum dos modelos pode ser descartado. Além disso, os parâmetros cinéticos encontrados também foram coerentes com valores encontrados na literatura.

Dessa forma, é possível dizer que uma das maiores dificuldade deste trabalho foi averiguar os reais motivos que influenciaram na estimativa dos parâmetros cinéticos, visto que as interações entre os compostos BTX são bastante complicadas, devido tanto à similaridade

de suas propriedades e estruturas, quanto aos complexos sistemas enzimáticos requeridos para a metabolização destes substratos.

Com relação aos experimentos em fluxo contínuo, as variáveis vazão, composto e associação de ambos apresentam diferença significativa ao nível de 95% e além disso, o aumento da vazão acima de 10 mL/min provoca uma alta solubilização dos substratos tolueno e o-xileno o que prejudica a biodegradação tornando-a um fenômeno secundário. Comparando os substratos destaca-se que o tolueno foi biodegradado em maior quantidade que o o-xileno.

Algumas sugestões para futuras pesquisas são propostas com o intuito de dar continuidade aos estudos iniciados e desenvolvidos neste trabalho:

Utilização de efluente petroquímico real para obtenção das cinéticas de biodegradação em batelada e fluxo contínuo;

Avaliar outros materiais suportes, como xisto, PVC, espuma de poliuretano, polipropileno para determinar o potencial de fixação dos micro-organismos e as cinéticas de biodegradação dos mesmos, além disso também verificar diferentes diâmetros de partícula desses materiais e sua influência;

Identificação e quantificação dos produtos formados pela biodegradação dos compostos BTEX;

Estudar a cinética biodegradativa dos compostos BTX utilizando lodos de diferentes procedências como: lodo de estação de tratamento de esgoto sanitário, tanto aeróbio quanto anaeróbio, lodo de frigorífico de aves, frigorífico de suínos e de refinarias de petróleo.

Desenvolver no estudo de fluxo contínuo um processo de reciclo na coluna e/ou alternar mais de uma coluna e/ou misturar um processo batelada com fluxo contínuo, processos que podem melhorar a remoção dos compostos BTX;

Aprofundar o estudo de toxicidade dos resíduos em batelada e fluxo contínuo gerados, estudando a toxicidade utilizando diferentes micro-organismos e obter dados relevantes. Também seria interessante realizar um estudo comparando a toxicidade dos resíduos gerados nas cinéticas de adsorção e dos gerados nas cinéticas biodegradativas, para comprovar a vantagem de cada processo nesse sentido.

Após a realização dos estudos envolvendo reciclo e/ou associação de colunas de biodegradação e/ou associação de colunas com processo batelada, se torna possível avaliar o estudo em scale-up, utilizando inclusive efluentes reais, visto que estes efluentes apresentam uma concentração menor dos compostos tolueno e o-xileno do que as concentrações estudadas nesse trabalho (50 mg/L), também seria

interessante utilizar o equipamento cromatógrafo gasoso associado a espectrômetro de massa (CG-MS) para leitura das concentrações, no caso de estudo de um efluente real, visto que existe uma infinidade de substratos presentes no efluente o que tornaria o trabalho muito mais rico.

## REFERÊNCIAS

- ABUHAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, T.; MEHMETOGLU, U; Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*, 2004, v. 39, p. 983–988.
- AKINDE, S.B.; OBIRE, O. Aerobic heterotrophic bacteria and petroleum-utilizing bacteria from cow dung and poultry manure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, v. 24, n. 9, p. 1999–2002.
- ALVAREZ, P.J.J.; VOGEL, T.M. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, v.57, n.10, p.2981-2985.
- ALVAREZ, P. J. J.; HUNT, C. S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 2002, v. 44, n. 2, p. 83-104.
- ANP, Agência Nacional do Petróleo, gás natural e bicombustíveis. *Boletim da produção de petróleo e gás natural*. Publicado em primeiro de março de 2011.
- ARAUJO, J.C. Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de Leito Fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo. 1995.
- ARUTCHELVI, J.; JOSEPH, C.; DOBLE, M. Process optimization for the production of rhamnolipid and formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* CPCL on polypropylene. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, v. 56, p. 37–45.
- ATTAWAY, H. H.; SCHMIDT, M .G. Tandem biodegradation of BTEX components by two *Pseudomonas sp.* *Current Microbiology*, 2002, v. 45, p. 30–36.

BAGAJEWICZ, M. J. A review of recent design procedures for water network in refineries and process plants. *Computers & Chemical Engineering*, 2000, v. 24, p. 2093–113.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2ª.ed. New York, McGraw-Hill, 1986.

BERGAMASCO, R. *O uso de partículas poliméricas para adesão microbiana em tratamento biológico de resíduos*. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1996.

BERTIN, L.; COLAO, M.C.; RUZZI, M.; FAVA, F. Performance and microbial features of a granular activated carbon packed bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, v. 48, n. 3, p. 413-423.

BIELEFELDT, A. R.; STENSEL, H. D. Biodegradation of aromatic compounds and TCE by a filamentous bacteria-dominated consortium. *Biodegradation*, 1999, v. 10, p. 1-13.

BORDEN, R. C.; GOMES, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. *Ground Water*, 1995, v. 33, p. 180-189.

BRANDÃO, H. L. Transferência de massa no processo de biodegradação de efluentes líquidos em reatores com biofilme. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

BRIDGMAN, B.; GOMES, V.; TEIXEIRA, A. Threatening to Increase Productivity: Evidence from Brazil's Oil Industry. *World Development*, 2011, v. 39, n. 8, p. 1372–1385.

BUGG, T. D. H.; WINFIELD, C. J. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports.*, 1998, v. 15, p. 513-530.

CARBOMAFRA. “*Boletim Técnico Carvão Ativado 119 Granulado*”, Curitiba, Paraná, 2008.

CAVALCA, L.; GENNARO, P.; COLOMBO, M.; ANDREONI, V.; BERNASCONI, S.; RONCO, I.; BESTETTI, G. Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. **Research in Microbiology**, 2000, v.151, n.10, p.877-887.

CHANG, M.-K.; VOICE T. C.; CRIDDLE C. S. Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, v. 41, p. 1057-1065.

CHEN, H. H.; ZHAO, G. Z.; PARK, D. J.; ZHANG, Y. Q.; XU, L. H.; LEE, J. C.; KIM, C. J.; LI, W. J. *Micrococcus Endophyticus* sp. nov., Isolated from Surface-Sterilized *Aquilaria Sinensis* Roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, v. 59, n. 5, p. 1070-1075.

CHEN, Y. M.; LIN, T. F.; HUANG, C.; LIN, J. C.; HSIEH, F. M. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, v. 148, n. 3, p. 660 – 670.

CILIA, V.; LAFAY, B.; CHRISTEN, R. Sequence Heterogeneities among 16S Ribosomal RNA Sequences, and their Effect on Phylogenetic Analyses at the Species Level. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, v. 13, v. 3, p. 451-461.

COLLINS, L. D.; DAUGULIS, A. J. Benzene/toluene/p-xylene degradation. Part I. Solvent selection and toluene degradation in a two-phase partitioning bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, v. 52, n. 3, p. 354–359.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), Resolução CONAMA n° 357/2005. Brasília, 2005. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/res_conama_357_05.pdf)>. Acesso em: 21 dez.2012.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. *Microbial biofilms*. Annual Review of Microbiology, 1995, v. 49, p. 711-745.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, v. 284, p. 1318-1322.

COUCEIRO, S. R. M.; FORSBERG, B. R.; HAMADA, N.; FERREIRA, R. L. M. Effects of an oil spill and discharge of domestic sewage on the insect fauna of cururu stream Manaus, AM, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, 2006, v. 66, n.1, p. 35-44.

DAVEY, M., E.; O'TOOLE, G., A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, v. 64, p. 847-867.

DEEB, R.A.; ALVAREZ-COHEN, L. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, v. 62, n. 5, p. 526-536.

DEEB, R.A.; ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic Biotransformation of Gasoline Aromatics in Multicomponent Mixtures. *Bioremediation Journal*, 2000, v.4, n.1, p.1-9.

DIN 38412 Teil 30: Determination of the non-acute poisonous effect of waste water to *Daphnia magna* by the dilution limits (L30). *Deutsches Institut Fur Normung*, Bestimmung der nicht akut giftigen wirkung von abwasswe gegenuber uber verdunnungstufen, 1989.

DONLAN, R., M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, v. 8, n. 9, p. 881-890.

EICHNER, C.A.; ERB, R.W.; TIMMIS, K.N.; WAGNER-DOBLER, I. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1999 v.65, n.1, p.102-109.



ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MÓDENES, A. N.; THOMÉ, L. P.; PALÁCIO, S. M.; TRIGUEROS, D. E. G.; OLIVEIRA, A. P.; SZYMANSKI, N. Study of the bioaccumulation kinetic of lead by living aquatic macrophyte *Salvinia Auriculata*. *Chemical Engineering Journal*, 2009, v. 150, p. 316–322.

FARHADIAN, M.; DUCHEZ, D.; VACHELARD, C.; LARROCHE, C. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors—A review. *Water Research*, 2008, v. 42, n. 6–7, p.1325–1341.

FATMA, Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens. PORTARIA Nº 017/02 – 18 abr. 2002.

FERNANDES, M.; BRICKUS, L. S. R.; MOREIRA, J. C.; CARDOSO, J. N. Atmospheric BTX and polyaromatic hydrocarbons in Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*, 2002, v. 47, p. 417-425.

FERNANDES, H. A dinâmica da biota em um sistema de lagoas de estabilização para Tratamento de lixiviado de aterro sanitário. 2009. 186p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós- graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009

FIORENTIN, L. D.; TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; PEREIRA, N. C.; BARROS, S. T. D.; SANTOS, O. A. A. Biosorption of reactive blue 5G dye onto drying orange bagasse in batch system: Kinetic and equilibrium modeling. *Chemical Engineering Journal*, 2010, v. 163, p. 68–77.

FIORENZA, S; WARD, C. H. Microbial adaptation to hydrogen peroxide and biodegradation of aromatic hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, v. 18, p. 140–151.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R. KUBOTA, L. T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, 2000, v. 23, n. 4, p. 504-511.

GALDZICKA M.; PLASSMEYER M. L.; BLAINE L. D.; PIENTA P. A.; GILLEVET P. M. Comparison of Phenetic and Phylogenetic

Classification Systems for the Fluorescent *Pseudomonas*, *não publicado* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 2011.

GRADY, C. P.; DAIGGER, G. T.; LIM, HENRY C. *Biological Wastewater treatment*. 2. ed. New York. Marcel Dekker, 1999.

GUISADOLA, A.; BAEZA, J. A.; CARRERA, J.; SIN, G.; VANROLLEGHEM, P. A.; LAFUENTE, J. The influence of experimental data quality and quantity on parameter estimation accuracy Andrews Inhibition Model as Case Study. *Icheme*, 2006, v. 1, p. 139-145.

GUELLI, U. S. S. M. A.; MELO, A. R.; ULSON, D. S. A. A. Re-utilisation conditions of wastewaters from textiles industries. *Resources, Conservation and Recycling*, 2006, v. 49, p. 1–13.

HANADA, S.; LIU, W.T.; SHINTANI, T.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. *Tetrasphaera elongata* sp. nov., a polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, v. 52, n. 3, p. 883-887.

JEAN, J. S.; LEE, M. K.; WANG, S. M.; CHATTOPADHYAY, P.; MAITY, J. P. Effects of inorganic nutrient levels on the biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) by *Pseudomonas* spp. in a laboratory porous media sand aquifer model. *Bioresource Technology*, 2008, v. 99, p. 7807–7815.

JEFFERSON, K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 2004, v. 236, p. 163–173.

JUNG, I. G.; PARK, C. H. Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, m-xylene (BTX), and their mixtures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, v. 97, n. 6, p. 429–431.

KELLY, W. R.; HORNBERGER, G. M.; HERMAN, J. S.; MILLS, A. L. Kinetics of BTX biodegradation and mineralization in batch and column systems. *Journal of Contaminant Hydrology*, 1996, v. 23, p. 113-132.

KENNEDY, J.; EBERHART, R. Swarm intelligence. *Morgan Kaufmann Publishers*, San Francisco, Ca, 2001.

KERMANSHAHI, POUR, A.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, v. 27, p. 204-211.

KIM, S. B.; PARK, C. H.; KIM, D. J.; JURY, W. A. Kinetics of benzene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*: parameter estimation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, v. 22, n. 5, p. 1038–1045.

KOZIARZ, J. Adhesion and immobilization of bacteria on hydrophobic cloths, M.S. thesis, University Ottawa, Ontario, Canada, 1998.

LAZAROVA, V.; MANEM, J. Advances in biofilm aerobic reactors ensuring effective biofilm activity control. *Water Science Technology*, 1994, v. 29, n. 10-11, p. 319-327.

LEE, D. S.; RYU, S. H.; HWANG, H. W.; KIM, Y. J.; PARK, M.; LEE, J. R.; LEE, S. S.; JEON, C. O. *Pseudoxanthomonas sacheonensis* sp. nov., isolated from BTEX-contaminated soil in Korea, transfer of *Stenotrophomonas dokdonensis* to the genus *Pseudoxanthomonas* as *Pseudoxanthomonas dokdonensis* comb. nov. and emended description of the genus *Pseudoxanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, v. 58, n. 9, p. 2235-2240.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biocologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. 1ed., São Paulo. Editora Edgard Blücher LTDA, 2001, v. 2, p.541.

LIN, C.-W.; CHENG, Y.-W.; TSAI, S.-L. Multisubstrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 2007, v. 8, p. 1211-1217.

LITTLEJOHNS, J. V.; DAUGULIS, A. J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. *Process Biochemistry*, 2008, v. 43, p. 1068–1076.

LU, S.; LEE, J. R.; RYU, S. H.; CHUNG, B. S.; CHOE, W. S.; JEON, C. O. *Runella defluvii* sp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, v. 57, n. 11, p. 2600-2603.

LUDWIG, W.; ROSSELLO-MORA, R.; AZNAR, R.; KLUGBAUER, S.; SPRING, S.; REETZ, K.; BEIMFOHR, C.; BROCKMANN, E.; KIRCHHOF, G.; DORN, S.; BACHLEITNER, M.; KLUGBAUER, N.; SPRINGER, N.; LANE, D.; NIETUPSKY, R.; WEIZENEGGER, M.; SCHLEIFER, K.H. Comparative sequence analysis of 23S rRNA from proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 1995, v. 18, n. 2, p. 164-188.

MAIORANO, A.; FIERI, M. Z.; CARTER, J. M.; COSTA, A. J. M.; LEITE, J. V.; SANCHEZ, C. R.; MAGOSSI, L. R.; ANDRADE, R. J.; TERRA, M. H. Influência das condições de aeração no tratamento de efluentes fenólicos com biofilmes em reator aeróbio. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2005, v. 10, n. 4, p. 285-289.

MAITY, J.P.; LIU, C.-C.; JEAN, J.-S. Geochemical Characterization of mud volcano and hot spring Taiwan, não publicado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 2010.

MALIYEEKKAL, S. M.; RENE, E. R.; PHILIP, L.; SWAMINATHAN, T. Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. *Journal of Hazardous Materials B109*, 2004, p. 201-211.

MARIANO, J. B. Impactos Ambientais do Refino de Petróleo. Dissertação de mestrado (mestre em ciências e planejamento energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MARTINS, B. A. D; Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo. Dissertação de mestrado (mestre em engenharia ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MASSOL-DEYÁ, A. A.; WHALLON, J.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, v. 61, n. 2, p. 769-777.

MASZENAN, A.M.; SEVIOUR, R.J.; PATEL, B.K.; SCHUMANN, P.; BURGHARDT, J.; TOKIWA, Y.; STRATTON, H.M. Three isolates of novel polyphosphate-accumulating gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, v. 50, n.2, p. 593-603.

MELLO, J. M. M.; Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme. Dissertação de mestrado (mestre em engenharia química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MELLO, J. M. M.; Modelagem matemática, simulação numérica e ensaios experimentais da biodegradação dos compostos BTX em um reator com biofilme. Tese de doutorado (doutor em engenharia química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MILANI, E. J.; BRANDÃO, J. A. S. L.; ZALÁN, P. V.; GAMBOA, L. A. P. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. *Brazilian Journal of Geophysics*, 2000, v. 18, n. 3, p. 351-396.

MINATTI, G.; Biodegradação dos compostos BTX de efluente petroquímico sintético. Dissertação de mestrado (mestre em engenharia química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MIRPURI, R.; JONES, W.; BRYERS, J. D. Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, v. 53, p. 535-546.

MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; TRIGUEROS, D. E. G.; LAVARDA, F. L.; COLOMBO, A.; MORA, N. D. Kinetic and equilibrium adsorption of Cu(II) and Cd(II) ions on *Eichhornia crassipes* in single and binary systems. *Chemical Engineering Journal*, 2001, v. 168, p. 44-51.

MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; TRIGUEROS, D. E. G.; PIETROBELLI, J. M. T. A.; LAVARDA, F. L.; RAVAGNANI, M. A. S. S.; BERGAMASCO, R. Binary Adsorption of a Zn(II)-Cu(II) Mixture onto *Eichhornia Crassipes* and *Egeria densa*: Kinetic and Equilibrium Data

Modeling by PSO. *Separation Science and Technology*, 2012, v. 47, p. 875-885.

MONTENEGRO, M. A. P. Avaliação da performance de um reator anaeróbio híbrido (RAH) e da atividade das populações de microorganismos anaeróbios na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP). 222p. Tese (Doutorado) Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

MORAIS, E. B.; Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de bioplihas. Dissertação de mestrado(mestre em microbiologia aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

NAKHLA, G. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds-impact of process variables and scale up implications. *Water Research*, 2003, v. 37, p. 1296-1307.

NATION, J.L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of softtissuis for scanning electron microscopy. **Stain Technology**, v.58, p.347-351, 1983.

NEPC - National Environment Protection Council, **Guideline on Ecological Risk Assessment**, 1999. Disponível em: <[http://www.ephc.gov.au/pdf/cs/cs\\_05\\_era.pdf](http://www.ephc.gov.au/pdf/cs/cs_05_era.pdf)>. Acesso em: 28 nov. 2011.

NIELSEN, D. R.; MCLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A. J. Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylosoxidans* for aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in a bioscrubber. *Biotechnology Letters*, 2006, v. 28, p. 1293–1298.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa. EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

NIVEN, K.; MCLEOD, R. Offshore industry: management of health hazards in the upstream petroleum industry. *Occupational Medicine-Oxford*, 2009, v.59, n. 5, p. 304–309.

NUHOGLU, A.; YALCIN, B. Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*, 2005, v. 40, p. 1233-1239.

OH, Y. S.; SHAREEFDEEN, Z.; BALTZIS, B. C.; BARTHA, R. Interaction between benzene, toluene, and p-Xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, v. 8, p. 44:53.

ORTÍZ, J. R., R.; ARREOLA, D. F. R.; FONSECA, P.; GÓMEZ, C. REYNOSO, O. G.; QUIRARTE, J. R.; NÚÑEZ, R. G. Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, v. 65, p. 539-546.

OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM1 852. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2005, v. 36, p. 258–261.

PARALES, R. E.; DITTY, J. L.; HARWOOD, C. S. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, v. 66, n. 9, p. 4098–4104.

PARAMESWARAPPA, S.; KARIGAR, C.; NAGENAHALLI, M. Degradation of ethylbenzene by free and immobilized *Pseudomonas fluorescens*-CS2. *Biodegradation*, 2008, v. 19, p. 137-144.

PARSHINA S. N.; KLEEREBEZEM, R; SANZ, J. L.; LETTINGA, G.; NOZHEVNIKOVA, A. N.; KOSTRIKINA, N. A.; LYSENKO, A. M.; STAMS, A. J. *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, v. 53, n. 6, p. 1791-1799.

PATNAIK, P. R. Are microbes intelligent beings? An assessment of cybernetic modeling. *Biotechnology Advances*, v.18, p.267-288, 2000.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo. Salvador: Centro de Recursos Ambientais,

Governo da Bahia, Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia, 2002, Salvador, 229p.

PELCZAR, Michael Joseph; CHAN, Eddie Chin Sun; KRIEG, Noel R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, c1997. 2v

POETSCH, P.; KOETZ, P. R. Sistema de determinação da atividade metanogênica específica de lodos anaeróbios. *Revista Brasileira de Agrociência*, 1998, v. 4, n. 3, p. 161-165.

PRENAFETA-BOLDU, F. X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J. T.; VAN GROENESTIJN, J. W. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX). *Water Research*, 2008, p. 1325–1341.

RAINEY F. A.; WARD N. L.; MORGAN H. W.; TOALSTER R.; STACKEBRANDT, E. Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *Journal of Bacteriology*, 1993, v. 175, n. 15, p. 4772-4779.

RAMPRASATH, C.; ABIRAMI, G.; MATHIVANA, N. Molecular diversity of halophilic bacteria isolated from Kelambakkam salpan, tamilnadu, India, não publicado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 2011.

REARDON K. F.; MOSTELLER D. C.; ROGERS, J. B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, v. 69, p. 385–400.

REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. B.; DUTEAU, N. M.; KIM, K.-H. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environmental Health Perspectives*, 2002, v. 110, suppl.6, p. 1005-1011.

RIBEIRO, R. *Recuperação de águas contaminadas com gasolina utilizando reatores de leito fixo*. 186p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.



RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D.; CARL, P. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, v. 46, p. 3565–3575.

RODRIGUES, K. A. *Uso de reatores biológicos com fungos para a remoção de fenol de água residuária sintética*. 2006. 125p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SAIEN, J.; NEJATI, H. Enhanced photocatalytic degradation of pollutants in petroleum refinery wastewater under mild conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, v. 148, p. 491–495.

SANTANELLA, S. T.; JÚNIOR, F. C. G. S.; GEDALHA, D. A. C.; COSTA, K. O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R., C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus Níger*. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2009, v. 14, p. 139-148.

SHI, Y.; EBERHART, R. A modified particle swarm optimizer. In proceedings of the IEEE International Conference on Evolutionary Computation, 69-73, Piscataway, NJ, USA, 1998.

SCHIRMER, M.; BUTLER, B. J.; ROY, J. W.; FRIND, E. O.; BARKER, J. F. A relative-least squares technique to determine unique Monod kinetic parameters of BTEX compounds using batch experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, 1999, v. 37, p. 69-86.

SHIM, H.; YANG, S. -T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrousbed bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 1999, v. 67, p. 99-112.

SHIM, H.; SHIN, E.; YANG, S. T. A continuous fibrous bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Advances in Environmental Research*, 2002, p. 203-216.

SHIM, H.; WANG, B.; LEE, S.; KONG, S. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and

*Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. *Biodegradation*, 2005, v. 16, p. 319–327.

SHIM, H.; YANG, S. T. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Environmental Engineering and Management*, 2006, v. 16, n. 5, p. 309–317.

SILVA, R., L., B., Contaminação de poços rasos no bairro brisamar, itaguai, RJ, por derramamento de gasolina: concentração de btx e avaliação da qualidade da água consumida pela população. Tese da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, título de Doutora em Ciências na área de Saúde Pública. Rio de Janeiro – 2002.

SILVA, M.L.B.; ALVAREZ, P.J.J. Enhanced Anaerobic Biodegradation of Benzene-Toluene-Ethylbenzene-Xylene-Ethanol Mixtures in Bioaugmented Aquifer Columns. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, v.70, n.8, p.4720–4726.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: Implications in bioremediation, *Trends in Microbiology*, 2006, v. 14, p. 389–397.

STEPNOWSKI P.; SIEDLECKA E. M.; BEHREND P.; JASTORFF B. Enhanced photo-degradation of contaminants in petroleum refinery wastewater. *Water Research*, 2002, v. **36**, p. 2167–2172.

TELLES, E. M., A higienização na prevenção e no controle do biofilme: uma revisão. Trabalho de conclusão de curso (especialista em produção, tecnologia e higiene de alimentos de origem animal). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. *Química Nova*, 2004, v. 27, n. 3, p. 441–446.

TIMMIS, K.N. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Journal Environmental Microbiology*, 2002, v. 4, p. 779–781.

TRIGUEROS, D., E., G. Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e

fenol. Dissertação de mestrado (mestre em Engenharia Química), Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo-PR, 2008.

TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; KROUMOV A. D. The evaluation of benzene and phenol biodegradation kinetics by applying non-structured models. *Water Science and Technology*, 2010a, v. 61, p. 1289–1298.

TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; KROUMOV, A. D.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R. Modeling of biodegradation process of BTEX compounds: kinetic parameters estimation by using particle swarm global optimizer. *Process Biochemistry*, 2010b, v. 45, p. 1355–1361.

TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; RAVAGNANI, M. A. S. S. Biodegradation kinetics of benzene and toluene as single and mixed substrate: estimation of biokinetics parameters by applying particle swarm optimization. *Latin American Applied Research*, 2010c, v. 40, p. 219–226.

TRIGUEROS, D. E. G. Reutilização de água em processos industriais: Uma Abordagem Metaheurística. 190p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Maringá, 2011.

TRIGUEIROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; RRAVAGNANI, M. A. S. S.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R. Reuse water network synthesis by modified PSO approach. *Chemical Engineering Journal*, 2012, v. 183, p. 198-211.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, v. 67, n. 4, p.503–549.

VICTÓRIO, S. S., Influência de diferentes concentrações de petróleo nas taxas fotossintéticas da macrófita aquática submersa enraizada *Egeria densa*. Projeto de graduação (bacharel e licenciado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

WAKE, H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2005, v. 62, p. 131–140.

WANG, L.; ZHOU, Y.; LIANG, Y.; WONG, O.; ARMSTRONG, T.; SCHNATTER, A. R.; WU, Q. FANG, J.; YE, X.; FU, H.; IRONS, R.D. Benzene exposure in the shoemaking industry in China, a literature survey, 1978–2004. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2006, v. 46, p. 149–156.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 12, n. 3, p. 237-41, 2001.

WU, Y.; LU C.; QIAN, X.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants. *Current Microbiology*, 2009, v. 59, n. 4, p. 475-482.

YEOM, S. H.; YOUNG, J.Y.; LEE, J. W. The importance of microbial adaption in the degradation of BTX. *Global Environmental Biotechnology*., 1997, v. 66, p. 665–675.

# APÊNDICES

## APÊNDICE A

### CURVAS DE BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BTX E PARÂMETROS CINÉTICOS DOS MODELOS DE INIBIÇÃO

#### A.1 Curvas para o Modelo de Monod

As curvas representam os experimentos realizados para os compostos tolueno e xileno (TX) monocomponentes, com concentração inicial de aproximadamente 50 mg/L do composto em estudo. Foi adicionada uma concentração inicial de 55 mg/L de cada composto, sendo que esta metodologia se faz necessário pois se leva aproximadamente 5 minutos até a leitura de concentração do primeiro ponto. A concentração de glicose varia para cada condição, sendo estudadas três concentrações diferentes (0, 100 e 1000 mg/L). As curvas foram construídas de acordo como o Modelo de Monod.

Para cada gráfico foi adotada uma legenda para identificar o experimento, como por exemplo:

Ausência de glicose, T, 17 cm – representa o experimento isento de glicose, com avaliação do composto tolueno (representado por T) e diâmetro de partícula de 17 centímetros.

100 mg/L glicose, X, 24 cm – representa o experimento com 100 mg/L de glicose, com avaliação do composto xileno (representado por X) e diâmetro de partícula de 24 centímetros.

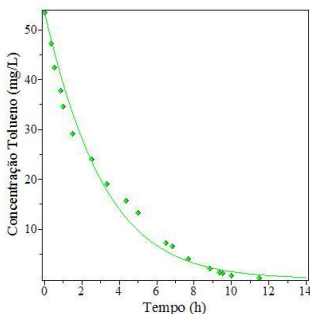


Gráfico A.1 - Ausência de glicose, T, 17 cm

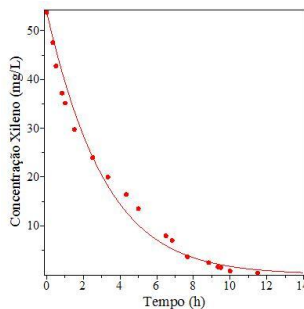


Gráfico A.2 - Ausência de glicose, X, 17 cm

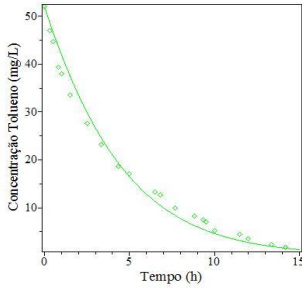


Gráfico A.3 - Ausência de glicose, T, 24 cm

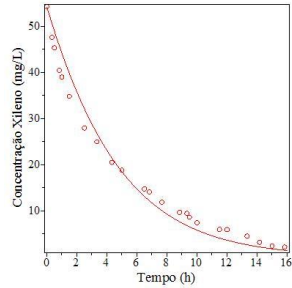


Gráfico A.4 - Ausência de glicose, X, 24 cm

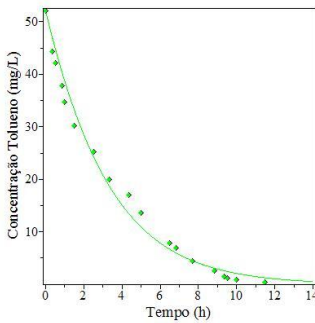


Gráfico A.5 - 100 mg/L glicose, T, 17 cm

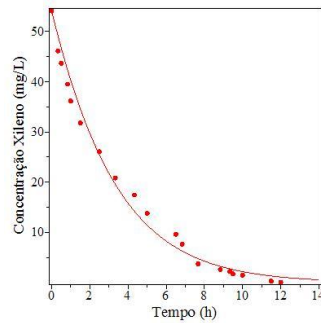


Gráfico A.6 - 100mg/L glicose, X, 17 cm

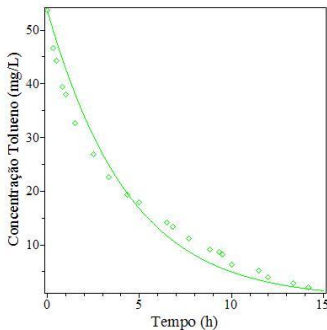


Gráfico A.7 - 100mg/L glicose, T, 24 cm

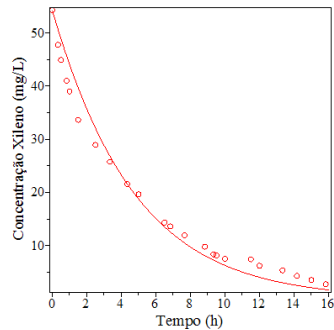


Gráfico A.8 - 100 mg/L glicose, X, 24 cm

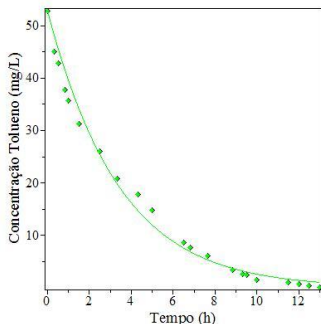


Gráfico A.9 - 1000 mg/L glicose, T, 17 cm

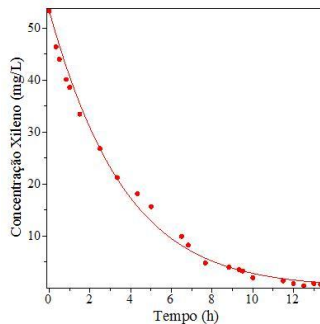


Gráfico A.10 - 1000 mg/L glicose, X, 17 cm

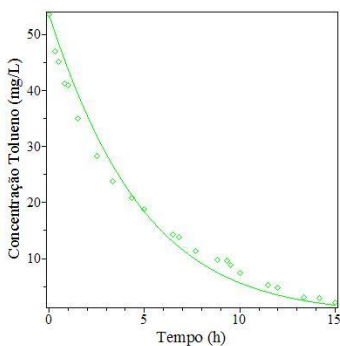


Gráfico A.11 - 1000 mg/L glicose, T, 24 cm

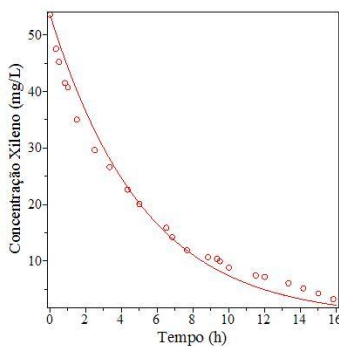


Gráfico A.12 - 1000 mg/L glicose, X, 24 cm

## A.2 Curvas para o Modelo de Andrews

As curvas representam os experimentos realizados para os compostos tolueno e xileno (TX) monocomponentes, com concentração inicial de 50 mg/L do composto em estudo. A concentração de glicose varia para cada condição, sendo estudadas duas concentrações diferentes (100 e 1000 mg/L). Nos gráficos é representado o modelo de Andrews.



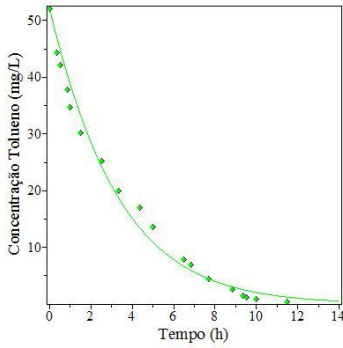


Gráfico A.13 - 100 mg/L glicose, T, 17 cm

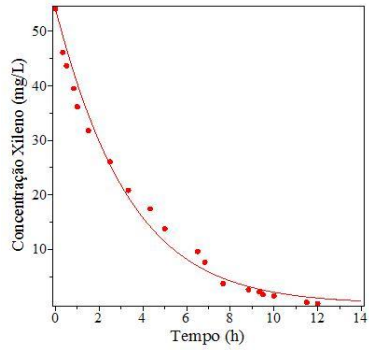


Gráfico A.14 - 100 mg/L glicose, X, 17 cm

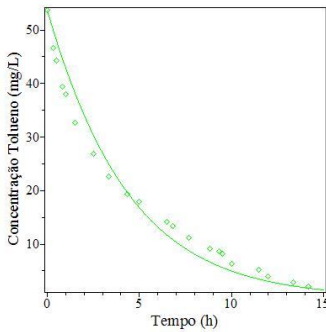


Gráfico A.15 - 100 mg/L, T, 24 cm

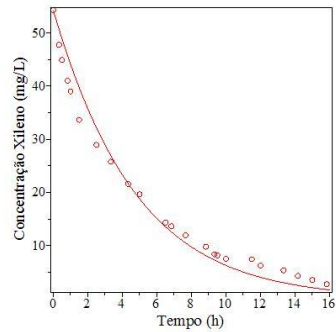


Gráfico A.16 - 100 mg/L, T, 24 cm

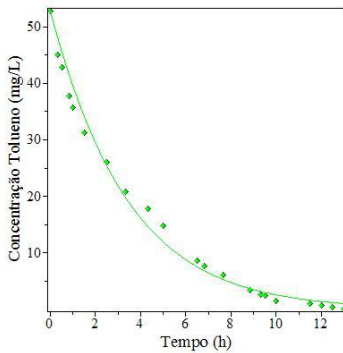


Gráfico A.17 - 10000 mg/L, T, 17 cm

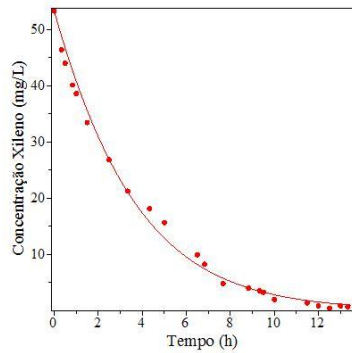


Gráfico A.18 - 10000 mg/L, X, 17 cm

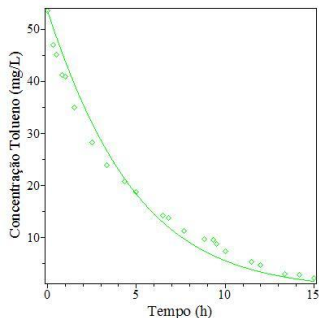


Gráfico A.19 - 1000 mg/L, T, 24 cm

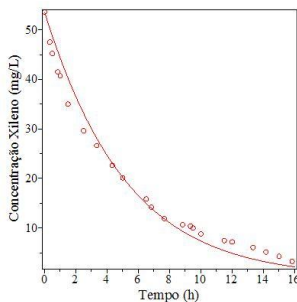


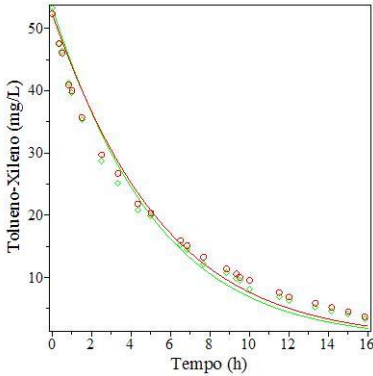
Gráfico A.20 - 1000 mg/L, X, 24 cm

### A.3 Curvas para os modelos de inibição competitiva, incompetitiva, não competitiva e SKIP

As curvas representam os experimentos realizados para os compostos tolueno e o-xileno (TX) bicomponentes, com concentração inicial de 50 mg/L de cada composto. A concentração de glicose varia para cada condição, sendo estudada três concentrações diferentes (0, 100 e 1000 mg/L). Nos gráficos são representados os modelos para cada experimento.

Figuras A.21 à A.24 - Associação de tolueno e o-xileno para a ausência de glicose, para o diâmetro de partícula de 24 cm. Os pontos em marrom representam o o-xileno e os verdes o tolueno.

## Inibição Competitiva

Gráfico A.21 - Ausência de glicose,  
TX, 24 cm

## Inibição Acompetitiva

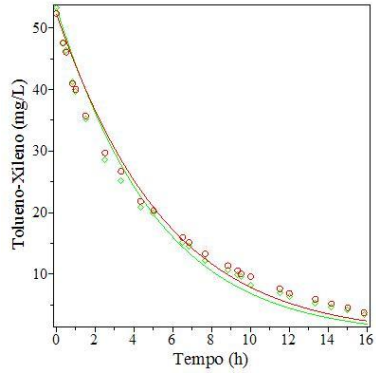
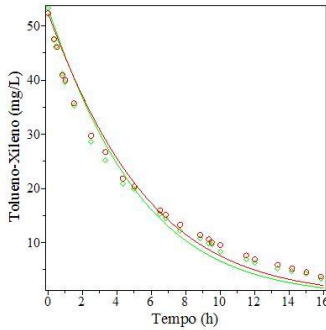
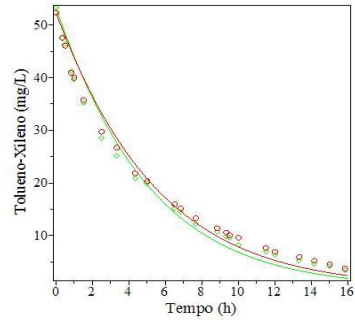


Gráfico A.22 - Ausência de glicose, TX, 24 cm

## Inibição Não Competitiva

Gráfico A.23 - Ausência de glicose,  
TX, 24 cm

## SKIP

Gráfico A.24 - Ausência de glicose,  
TX, 24 cm

Figuras A.25 à A.28 - Associação de tolueno e xileno para a concentração de 100 mg/L de glicose, para o diâmetro de partícula de 24 cm. Os pontos em vermelho representam o-xileno e os verdes o tolueno.

## Inibição Competitiva

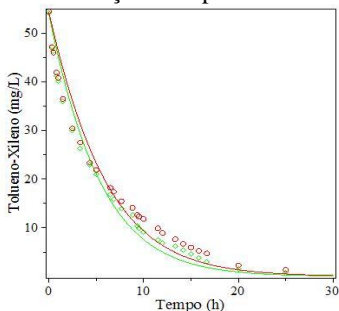


Gráfico A.25 - 100 mg/L glicose, TX, 24 cm

## Inibição Acompetitiva

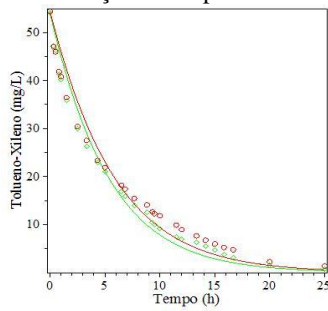


Gráfico A.26 - 100 mg/L glicose, TX, 24 cm

## Inibição Não Competitiva

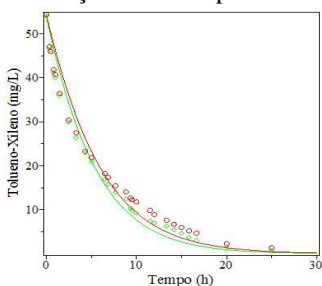


Gráfico A.27 - 100 mg/L glicose, TX, 24 cm

## SKIP

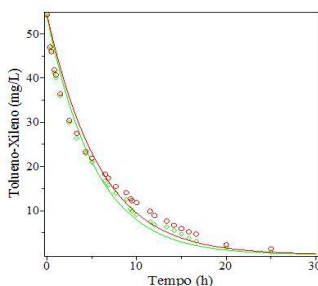
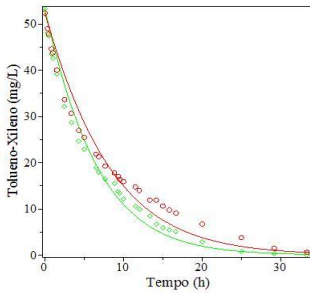


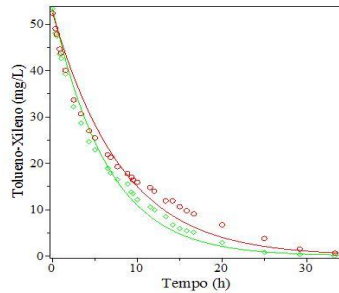
Gráfico A.28 - 100 mg/L glicose, TX, 24 cm

Figuras A.29 à A.32 - Associação de tolueno e xileno para a concentração de 100 mg/L de glicose, para o diâmetro de partícula de 24 cm. Os pontos em vermelho representam o o-xileno e os verdes o tolueno.

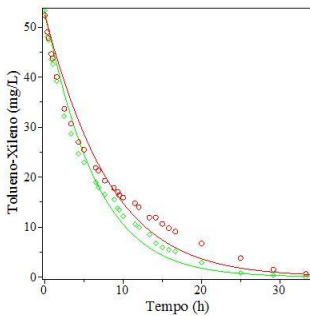
## Inibição Competitiva

Gráfico A.29 - 1000 mg/L glicose,  
TX, 24 cm

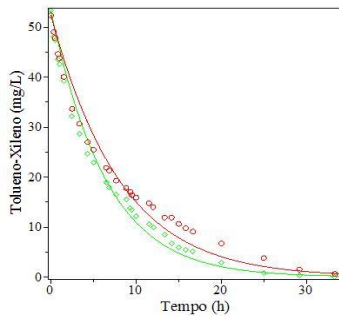
## Inibição Acompetitiva

Gráfico A.30 - 1000 mg/L glicose,  
TX, 24 cm

## Inibição Não Competitiva

Gráfico A.31 - 1000 mg/L glicose,  
TX, 24 cm

## SKIP

Gráfico A.32 - 1000 mg/L glicose,  
TX, 24 cm

Figuras A.33 à A.36 - Associação de tolueno e xileno para a concentração de 0 mg/L de glicose, para o diâmetro de partícula de 17 cm. Os pontos em vermelho representam o o-xileno e os verdes o tolueno.

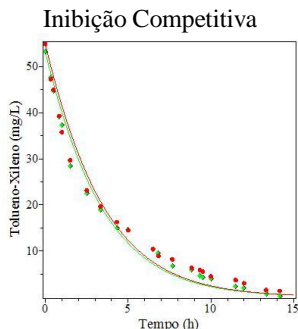


Gráfico A.33 - Ausência de glicose,  
TX, 17 cm

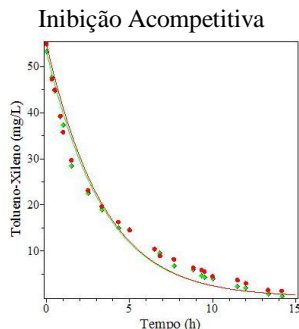


Gráfico A.34 - Ausência de glicose,  
TX, 17 cm

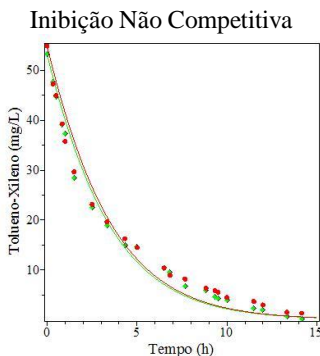


Gráfico A.35 - Ausência de glicose,  
TX, 17 cm

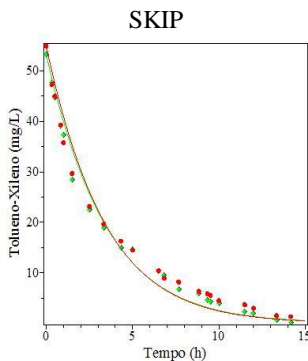


Gráfico A.36 - Ausência de glicose,  
TX, 17 cm

Figuras A.37 à A.40 - Associação de tolueno e xileno para a concentração de 100 mg/L de glicose, para o diâmetro de partícula de 17 cm. Os pontos em vermelhorepresentam o o-xileno e os verdes o tolueno.

### Inibição Competitiva

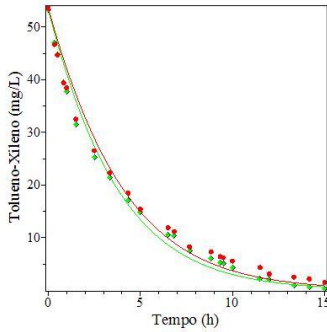


Gráfico A.37 - 100 mg/L glicose,  
TX, 17 cm

### Inibição Acompetitiva

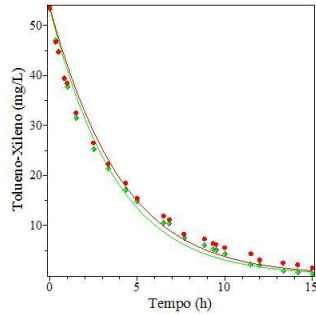


Gráfico A.38 - 100 mg/L glicose,  
TX, 17 cm

### Inibição Não Competitiva

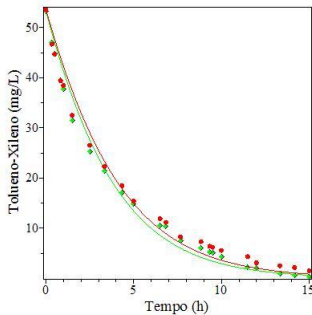


Gráfico A.39 - 100 mg/L glicose,  
TX, 17 cm

### SKIP

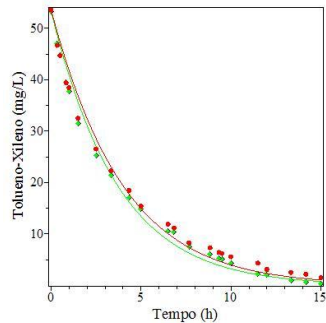


Gráfico A.40 - 100 mg/L glicose,  
TX, 17 cm

Figuras A.41 à A.44 - Associação de tolueno e o-xileno para a concentração de 100 mg/L de glicose, para o diâmetro de partícula de 17 cm. Os pontos em vermelho representam o o-xileno e os verdes o tolueno.

## Inibição Competitiva

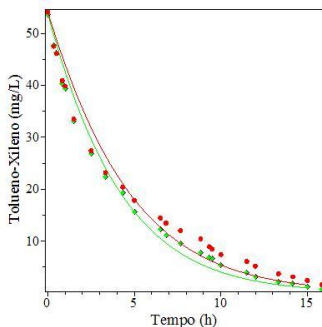


Gráfico A.41 - 1000 mg/L glicose, TX, 17 cm

## Inibição Acompetitiva

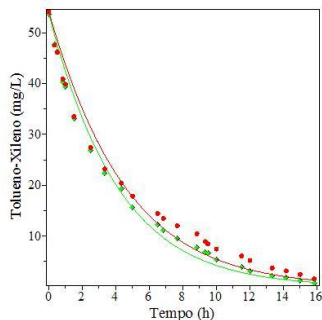


Gráfico A.42 - 1000 mg/L glicose, TX, 17 cm

## Inibição Não Competitiva

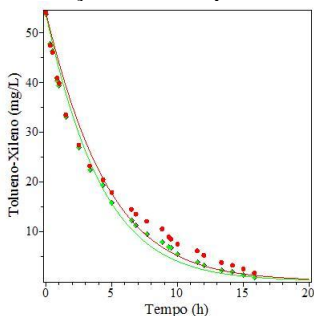


Gráfico A.43 - 1000 mg/L glicose, TX, 17 cm

## SKIP

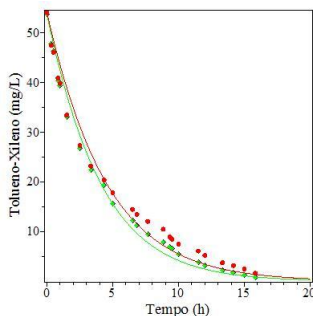
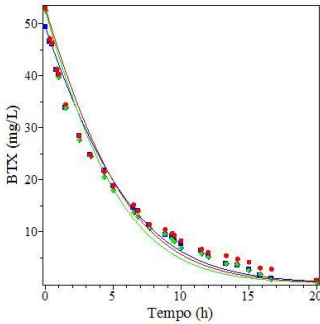


Gráfico A.44 - 1000 mg/L glicose, TX, 17 cm

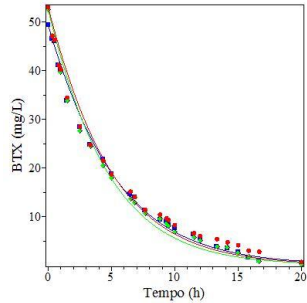
Figuras A.45 à A.48 - Associação de benzeno, tolueno e o-xileno para a concentração de 0 mg/L de glicose, para o diâmetro de partícula de 17 cm. Os pontos em verde representam o tolueno, em vermelho o o-xileno e azul o benzeno.



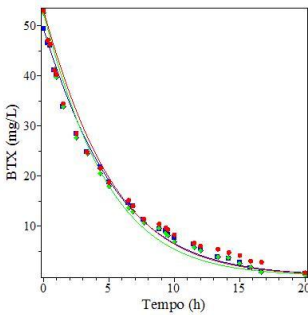
## Inibição Competitiva

Gráfico A.45 - Ausência de glicose,  
BTX, 17 cm

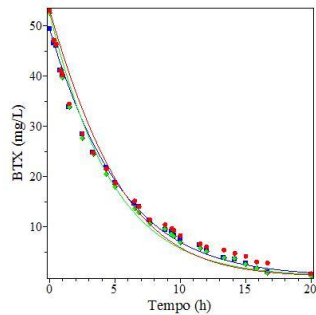
## Inibição Acompetitiva

Gráfico A.46 - Ausência de glicose,  
BTX, 17 cm

## Inibição Não Competitiva

Gráfico A.47 - Ausência de glicose,  
BTX, 17 cm

## SKIP

Gráfico A.48 - Ausência de glicose,  
BTX, 17 cm

Figuras A.49 à A.52 - Associação de benzeno, tolueno e xileno para a concentração de 0 mg/L de glicose, para o diâmetro de partícula de 24 cm. Os pontos em verde representam o tolueno, em vermelho o o-xileno e azul o benzeno.

## Inibição Competitiva

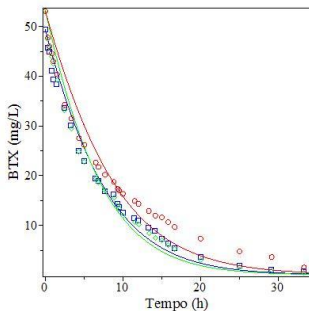


Gráfico A.49 - Ausência de glicose, BTX, 24 cm

## Inibição Acompetitiva

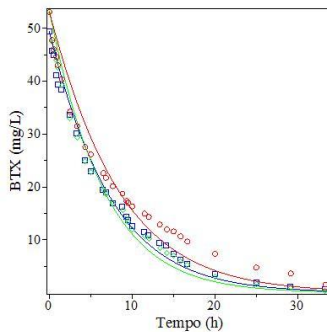


Gráfico A.50 - Ausência de glicose, BTX, 24 cm

## Inibição Não Competitiva

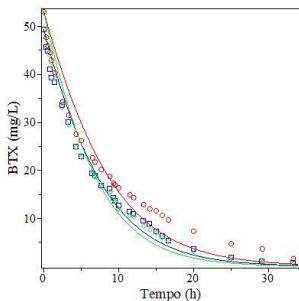


Gráfico A.51 - Ausência de glicose, BTX, 24 cm

## SKIP

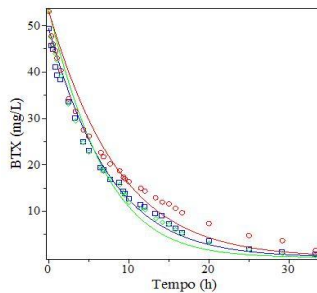


Gráfico A.52 - Ausência de glicose, BTX, 24 cm

Tabela A.1 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 0 mg/L de glicose, Tolueno-o-Xileno e 17 cm

Parâmetros	$\mu_{\max}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$I_{XT}$	$I_{TX}$	F.Objetivo
<b>Inibição Competitiva</b>						
Tolueno	0,00230	495,7422	0,17911	-	-	0,10323
Xileno	0,00454	500	0,35586	-	-	
<b>Inibição Acompetitiva</b>						
Tolueno	0,02828	500	2,3177	-	-	0,09247
Xileno	0,00810	500	0,6598	-	-	
<b>Não Competitiva</b>						
Tolueno	0,04264	495,4322	3,0926	-	-	0,10559
Xileno	0,00806	548,7641	0,5339	-	-	
<b>SKIP</b>						
Tolueno	0,002851	499,96	0,2370	1E-10	-	0,09027
Xileno	0,01930	500	1,570	-	1E-10	

Tabela A.2 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 100 mg/L de glicose, Tolueno-o-Xileno e 17 cm

Parâmetros	$\mu_{\max}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$I_{XT}$	$I_{TX}$	F.Objetivo
<b>Inibição Competitiva</b>						
Tolueno	0,00746	500	0,5668	-	-	0,06868
Xileno	0,00329	500	0,2696	-	-	
<b>Inibição Acompetitiva</b>						
Tolueno	0,16383	500	15	-	-	0,066146
Xileno	0,001936	500	0,20	-	-	
<b>Não Competitiva</b>						
Tolueno	0,1202	500	5,55	-	-	0,075046
Xileno	0,00158	500	0,07840	-	-	
<b>SKIP</b>						
Tolueno	0,01200	555	0,95	0,000063	-	0,05687
Xileno	0,00780	594,83	0,6184	-	1e-10	

Tabela A.3 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 1000 mg/L de glicose, tolueno-o-xileno e 17 cm

Parâmetro s	$\mu_{\max}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$I_{XT}$	$I_{TX}$	F.Objetivo
<b>Inibição Competitiva</b>						
Tolueno	0,04790	500	2,434 5	-	-	0,09281
Xileno	0,00480	495,166 6	0,276 6	-	-	
<b>Inibição Acompetitiva</b>						
Tolueno	0,00818 2	500	0,437 4	-	-	0,08076
Xileno	0,03064	500	1,808 4	-	-	
<b>Não Competitiva</b>						
Tolueno	0,00413 2	500	0,226 6	-	-	0,09766
Xileno	0,09198 7	500	5,559 5	-	-	
<b>SKIP</b>						
Tolueno	0,00555	500	0,293 0	0,445 5	-	0,07986
Xileno	0,01097	500	0,655 6	-	0,00634 6	

Tabela A.4 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 0 mg/L de glicose, tolueno-o-xileno e 24 cm

Parâmetros	$\mu_{\max}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$I_{XT}$	$I_{TX}$	F.Objetivo
<b>Inibição Competitiva</b>						
Tolueno	0,007735	500	0,55000	-	-	0,09338
Xileno	0,001198	500	0,09062	-	-	
<b>Inibição Acompetitiva</b>						
Tolueno	0,03712	495,4115	3,5171	-	-	0,08531
Xileno	0,03289	500	3,3374	-	-	
<b>Não Competitiva</b>						
Tolueno	0,004754	349,9606	0,57315	-	-	0,10631
Xileno	0,000552	350	0,07197	-	-	
<b>SKIP</b>						
Tolueno	0,095	555	8,2122	1e-10	-	0,08329
Xileno	0,00716	595	0,6265	-	0,00005	

Tabela A.5 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 100 mg/L de glicose, tolueno-o-xileno e 24 cm

Parâmetro s	$\mu_{\max}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$I_{XT}$	$I_{TX}$	F.Objetivo o
<b>Inibição Competitiva</b>						
Tolueno	0,003220	499,8410	0,3006	-	-	0,15239
Xileno	0,014401	500	1,4920	-	-	
<b>Inibição Acompetitiva</b>						
Tolueno	0,0037	500	0,3676	-	-	0,13777
Xileno	0,0163	500	1,7764	-	-	
<b>Não Competitiva</b>						
Tolueno	0,01228	550	0,9427	-	-	0,15080
Xileno	0,00485	549,4155	0,4077	-	-	
<b>SKIP</b>						
Tolueno	0,001410	500	0,14025	0,000025	-	0,13398
Xileno	0,004163	500	0,45309	-	0,00005	

Tabela A.6 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 1000 mg/L de glicose, tolueno-o-xileno e 24 cm

Parâmetro s	$\mu_{\max}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$I_{XT}$	$I_{TX}$	F.Objetivo
<b>Inibição Competitiva</b>						
Tolueno	0,01141	479,532 9	0,9525 4	-	-	0,11614
Xileno	0,01770	500	1,7902 3	-	-	
<b>Inibição Acompetitiva</b>						
Tolueno	0,00607 9	500	0,5091	-	-	0,09975
Xileno	0,00114 0	500	0,1202	-	-	
<b>Não Competitiva</b>						
Tolueno	0,02925	386,186 8	4,1948	-	-	0,12244
Xileno	0,00518	549,914 7	0,6676	-	-	
<b>SKIP</b>						
Tolueno	0,01777	555	1,95	0,00002 5	-	0,09909
Xileno	0,02236	595	2,90	-	0,00000 5	

Tabela A.7 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 0 mg/L de glicose, benzeno, tolueno-o-xileno e 17 cm

Parâmetros	$\mu_{\max}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$I_{TB}$	$I_{XB}$	$I_{BT}$	$I_{XT}$	$I_{BX}$	$I_{TX}$	F.Objetivo
<b>Inibição Competitiva</b>										
Benzeno	0,023	115	5,70	-	-	-	-	-	-	0,1695
Tolueno	0,025	500	1,20	-	-	-	-	-	-	
Xileno	0,050	500	2,57	-	-	-	-	-	-	
<b>Inibição Acompetitiva</b>										
Benzeno	0,051	540	6,17	-	-	-	-	-	-	0,0913
Tolueno	0,012	491,25	1,40	-	-	-	-	-	-	
Xileno	0,049	525,78	5,69	-	-	-	-	-	-	
<b>Não Competitiva</b>										
Benzeno	0,018	580	0,99	-	-	-	-	-	-	0,1147
Tolueno	0,006	540	0,31	-	-	-	-	-	-	
Xileno	0,015	443,11	1	-	-	-	-	-	-	
<b>SKIP</b>										
Benzeno	0,055	345	10	1e-10	1e-10	-	-	-	-	0,1179
Tolueno	0,044	497,90	5	-	-	0,001	0,035	-	-	
Xileno	0,0011	555	0,10	-	-	-	-	5	1e-10	

Tabela A.8 - Valores dos parâmetros cinéticos para os modelos avaliados referentes ao experimento 0 mg/L de glicose, benzeno, tolueno-o-xileno e 24 cm

Parâmetros	$\mu_{\max}$	$K_s$	$Y_{x/s}$	$I_{TB}$	$I_{XB}$	$I_{BT}$	$I_{XT}$	$I_{BX}$	$I_{TX}$	F.Objetivo
<b>Inibição Competitiva</b>										
Benzeno	0,0925	504,47	11,04	-	-	-	-	-	-	0,2117
Tolueno	0,0527	585	4,94	-	-	-	-	-	-	
Xileno	0,0032	500	0,44	-	-	-	-	-	-	
<b>Inibição Acompetitiva</b>										
Benzeno	0,025	545	3,2180	-	-	-	-	-	-	0,1666
Tolueno	0,051	579,81	5,50	-	-	-	-	-	-	
Xileno	0,025	535	3,70	-	-	-	-	-	-	
<b>Não Competitiva</b>										
Benzeno	0,055	545	6,3476	-	-	-	-	-	-	0,2163
Tolueno	0,0755	584,47	7,2381	-	-	-	-	-	-	
Xileno	0,0455	535	6,1028	-	-	-	-	-	-	
<b>SKIP</b>										
Benzeno	0,050	545	6,60	1e-10	1e-5	-	-	-	-	0,1925
Tolueno	0,025	137,195	10	-	-	<b>0,010</b>	<b>1e-10</b>	-	-	
Xileno	0,022	535	3,35	-	-	-	-	<b>1e-10</b>	<b>1e-10</b>	





## APENDICE B

### DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

#### B.1 Dosagem de proteínas – Método de Lowry

A quantificação da biomassa existente nos biorreatores e na coluna foi realizada através da análise de proteínas, utilizando o Método de Lowry, conforme metodologia, descrita por Bergamasco (1996).

##### Reativos

- Reativo A: 2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  seco + 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de NaOH 0,1 N.
- Reativo B: 0,5 g de  $\text{CuSO}_4$  + 2 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado em 100 mL de água destilada.
- Solução AB: 50 mL do reativo A + 1 mL do reativo B. Preparar imediatamente antes da dosagem.
- Reativo de Folin: Solução 1 N, conservar ao abrigo da luz.
- Solução Padrão de Soro Albumina Bovina (BSA) 100 mg/L: 10 mg BSA em 100 mL de água destilada, adicionar cuidadosamente água no balão volumétrico para evitar a formação de bolhas. Conservar sob refrigeração (não agitar).

##### Procedimento experimental

##### Em Suspensão

- Extração de Proteínas com NaOH 1 N a 80°C.  
5 mL de solução padrão de BSA ou de amostra, 5 mL de NaOH 1 N. Agitar por 5 min com ultrassom e recobrir com papel alumínio, deixar em banho maria a 80°C por 30 min. Agitar com ultrassom.
- Curva Padrão  
Preparar uma série de amostras de 10 a 100 mL/L de BSA. A partir da solução a 100 mg de BSA/L, conforme indicado na Tabela B.1.

Tabela B.1 – Diluições da Albumina Bovina (BSA) para preparação da curva de calibração

BSA mg/L	V BSA mL	V NaOH mL
0	0,0	1,0
10	0,1	0,9
30	0,3	0,7
50	0,5	0,5
80	0,8	0,2
100	1,0	0,0

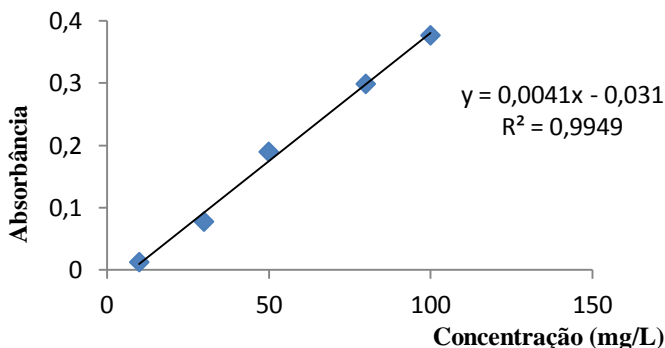
- Dosagem
  - 1 mL de solução de proteína a dosar.
  - 3 mL de solução AB. Cobrir com parafilm.
  - Agitar por 5 min no Ultrassom e esperar por 10 min precisos ao abrigo da luz.
  - Adicionar 0,3 mL de reativo de Folin 1 N. Cobrir com parafilm.
  - Agitar por 5 min no Ultrassom, deixar em repouso por 30 min ao abrigo da luz.
  - Efetuar a medida após os 30 min num comprimento de onda de 760 nm.

No suporte

- Pesar certo número de suporte seco.
- Extrair as proteínas com NaOH 1 N a 80°C:
  - Adicionar 5 mL de NaOH 1 N.
  - Agitar por 5 min com ultrassom e recobrir com papel alumínio, deixar em banho Maria a 80 °C por 30 mi. Após agitar novamente com ultrassom por 5 mi.
- Dosagem: idem a dosagem em suspensão.

## B.2 Curva de calibração da Albumina Bovina

No Gráfico B.1 é apresentada a curva de calibração da albumina Bovina utilizada para obtenção da biomassa na dosagem de proteínas.



**Gráfico B.1** – Curva de calibração da albumina bovina.

### B.3 Resultados da análise de proteínas

Na Tabela B.2 são apresentados os valores da quantidade de proteína em mg/L para o carvão virgem, para o biorreator em batelada, para o processo contínuo e para biomassa em suspensão.

Tabela B.2 – Quantidade de proteína (mg/L) do carvão virgem, para os biorreatores em batelada, contínuo e em suspensão.

Amostra	Carvão virgem (mg/L)	Batelada (17 cm) (mg/L)	Batelada (24 cm) (mg/L)	Coluna (mg/L)	Suspensão (mg/L)
A	9,6832	832,9099	620,3837	673,3843	235,5659
B	10,7592	805,902	681,6826	650,1246	250,3849
C	8,2283	880,2932	669,8529	580,8695	243,5229
Média	9,5569	839,7017	657,3064	634,7928	243,1579

A massa de biopartículas molhada foi coletada na qual se extraiu o biofilme foi de 0,200 g. A quantidade de proteínas por grama de suporte é obtida através da equação B.01, que multiplica a quantidade de proteína por litro pela quantidade de amostra coletada e seu resultado divide-se pela massa de partículas das quais se extraíram as proteínas.

$$Pr\ oteína(mg/g_{suporte}) = \frac{Pr\ oteína(mg/L) * 0,005L}{Massa\ da\ Partícula\ seca\ (g_{suporte})} \quad (B.01)$$

A Tabela B.3 apresenta a quantidade de proteínas por grama de suporte para todas as amostras coletadas.

Tabela B.3 – Quantidade de proteínas por grama de suporte (mg<sub>proteína</sub>/g<sub>suporte</sub>)

Amostra	Carvão virgem	Batelada (17 cm)	Batelada (24 cm)	Coluna
A	0,2420	20,8227	15,5095	16,8346
B	0,2698	20,1475	17,0420	16,2531
C	0,2057	22,0073	16,7463	14,5213
Média	0,2389	20,9925	16,4326	15,8698

#### B.4 Cálculo para obtenção dos Sólidos Suspensos, Sólidos Suspensos Fixos e Sólidos Suspensos Voláteis.

Nesta seção serão apresentadas as equações utilizadas para calcular o valor dos sólidos suspensos, sólidos suspensos fixos e sólidos suspensos voláteis e os valores obtidos experimentalmente.

##### Sólidos Suspensos (SS)

$$SS = \frac{(m_1 - m_2) \times 1000}{V} \quad (\text{B.02})$$

onde:

$m_1$  = massa do cadinho com a amostra (g),

$m_2$  = massa do cadinho vazio seco (g),

$V$  = volume da amostra (mL).

$$SS = \frac{(46,6208 - 46,5879) \times 1000}{20} = 1,645 \text{ g / L}$$

**Sólidos Suspensos Fixos (SSF)**

$$SSF = \frac{(m_3 - m_4) \times 1000}{V} \quad (\text{B.03})$$

onde:

$m_3$  = massa do cadinho com a amostra (g),

$m_4$  = massa do cadinho vazio seco (g),

$V$  = volume da amostra (mL).

$$SSF = \frac{(46,5951 - 46,5879) \times 1000}{20} = 0,36 \text{ g / L}$$

**Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)**

$$SSV = SS - SSF \quad (\text{B.04})$$

$$SSV = 1,645 - 0,36 = 1,285 \text{ g / L} = 1285,0 \text{ mg / L}$$

Para obter a relação proteínas em células, assumiu-se que os micro-organismos presentes no biofilme são os mesmos que estão em suspensão. Com uma amostra da solução contendo biomassa em suspensão, fez-se a análise de proteínas e Sólidos Suspensos Voláteis, obtendo-se a seguinte relação: em cada 243,1579 mg de proteínas/L, tem-se 1285 mg de células/L.

Segundo Bertin *et al.* (2004), pode-se encontrar a quantidade de SSV/L através da relação a seguir para o reator em batelada, com os diâmetros de partícula do carvão de 17 cm e 24 cm, respectivamente.

243,157 mg de proteína/L → 1285 mg células/L  
 20,9925 mg de proteína/g de suporte → X mg célula/g suporte

Então X:  $110,9378 \frac{\text{mg de células}}{\text{g de suporte}}$

243,157 mg de proteína/L → 1285 mg células/L  
 16,4326 mg de proteína/g de suporte → X mg célula/g suporte

Então X:  $86,8405 \frac{\text{mg de células}}{\text{g de suporte}}$



## APENDICE C

### C.1 ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR

O procedimento, descrito por Fernandes (2009), foi utilizado para identificação das bactérias presentes nas amostras de biofilme.

#### C.1.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico, foi realizada utilizando-se o Kit de extração QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) foi utilizada para avaliar o produto resultante da extração do ácido nucleico.

#### C.1.2 “Reação em Cadeia da Polimerase” – PCR

A partir do DNA extraído das amostras, foram obtidos fragmentos de DNA do rRNA 16S, utilizando-se a técnica do PCR, a qual é realizada utilizando-se iniciadores (*primers*) específicos para DGGE, a fim de obter fragmentos do rRNA 16S.

Na reação de amplificação são utilizadas as seguintes soluções:

- 25 µL de tampão PCR 1X (contendo 2X PCR Buffer, 2X albumina sérica bovina - BSA, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub> - Invitrogen<sup>®</sup>, 2,5 U Taq DNA polimerase - Invitrogen<sup>®</sup> e 0,4 mmol/L desoxiribonucleotídeos trifosfatos – dNTPs);
- 1 µL dos iniciadores (358F - 5' CGCCC GCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCAC GGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG3' e 517R - 5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3');
- 1 µL de template (DNA extraído) e,
- 22 µL de água ultrapurificada previamente esterilizada em autoclave (120 °C durante 20 min.), completando um volume final de 50 µL.

As reações de amplificação foram executadas em termociclador (Mastercycler Eppendorf) sob as seguintes condições: 94 °C por 5 min; 35 ciclos (desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 55 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto), extensão final a 72 °C por 10 min e resfriamento a 4 °C.

A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen<sup>®</sup>), corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) (Sigma<sup>®</sup>) em tampão TAE 1X (40 mM Tris; 19 mM ácido acético glacial; 1 mM EDTA) e visualizados

sob luz UV. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com o marcador molecular 1000 pares de base (1kb) separados a cada 100 pares de base (pb) (Cenbiot<sup>®</sup>).

### C.1.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O produto de PCR em gel de agarose foi colocado na cuba de DGGE para a separação dos segmentos amplificados. Após a separação, o DNA contido em cada banda obtida foi recolhido, com o auxílio de uma micropipeta estéril. O conteúdo recolhido foi diluído em 20 µL de água ultrapurificada, previamente esterilizada em autoclave (120 °C por 20 min), e posteriormente utilizado como template no produto de PCR que foi purificado para ser usado nas análises de sequenciamento.

Com a finalidade de separar amostras de 200 a 400 pb, preparou-se um gel de acrilamida/bis acrilamida na concentração de 8% (v/v). Utilizou-se um gradiente de 25 e 55%, a partir de soluções estoques, previamente preparadas, de 0 e 100% (de acordo com o protocolo do fabricante), conforme apresentado na Tabela C.1. As soluções foram esterilizadas por filtração em sistema Milipore e membrana de 0,22 µm, previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min, e armazenadas sob refrigeração em frascos âmbar, com validade das soluções de 30 dias.

Tabela C.1 – Reagentes e volumes utilizados na preparação das soluções desnaturantes.

Reagente	Solução 0 % (v/v)	Solução 100 % (v/v)
Acrilamida/bisacrilamida 40%*	20 mL	20 mL
Tampão TAE 50X	2 MI	2 mL
Formamida	-	40 mL
Uréia	-	42 g
Água ultrapurificada	Para 100 mL	Para 100 mL

\*(m/v)

As soluções desnaturantes de 25 e 55% (v/v) foram preparadas, adicionando-se a cada uma das soluções desnaturantes, persulfato de amônia (APS) 10% (m/v) e tetrametiletenodiamina (TEMED), ambos na concentração de 0,09% (m/v). Após a solidificação do gel



(aproximadamente 1h), as placas eram transferidas para cuba de DGGE. Nesta cuba foram adicionados 7L de TAE 1X. A temperatura de “corrida” do gel era constante (60 °C), voltagem de 130 V, com duração de 4h e 30min. Após o término da “corrida”, o gel foi retirado da cuba e imerso por 20 min em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL em tampão TAE 1X e posteriormente observado em transluminador com lâmpada UV.

Para a amplificação do DNA das bandas separadas por DGGE foi utilizada a técnica de PCR nas mesmas condições citadas anteriormente, porém com alteração da concentração do template, uma vez que o mesmo já estava diluído em água ultrapurificada. Nesta reação de amplificação foram utilizados 15µL de template.

#### **C.1.4 Purificação do produto PCR**

O produto obtido por PCR foi purificado utilizando-se isopropanol (75%). Para avaliar o produto resultante da purificação utiliza-se a técnica de eletroforese em gel de agarose 2 % (m/v). Após esta etapa de purificação a amostra de DNA purificada é enviada para o sequenciamento, possibilitando desta maneira a identificação da diversidade microbiana presente no consórcio bacteriano. O sequenciamento foi realizado no laboratório ACTGene Análises Moleculares, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) utilizando o equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. Todas as sequências de DNA foram comparadas pela similaridade com as espécies presentes no GeneBank pela pesquisa BLAST.

#### **C.1.5 Sequenciamento do produto PCR**

Após a purificação do produto PCR, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento. O sequenciamento foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 358F - 5' CGCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG

GCCTACGGGAGGCAGCAG3' e 517R - 5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3' e 3 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"*; *BioLIMS Project "3100\_Project1"*; *Run Module 1 "StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz"* (texto cedido pela ACTGene Análises Moleculares Ltda, maio de 2012).

# ANEXOS

## ANEXO A

### CINÉTICAS DE ADSORÇÃO

Os gráficos AA.1 e AA.2 representam as cinéticas de adsorção de pseudo-segunda ordem e pseudo-primeira ordem respectivamente, para o carvão ativado de casca de coco de diâmetro de partícula de 17 cm. A cinética é bicomponente para o composto tolueno e xileno associados.

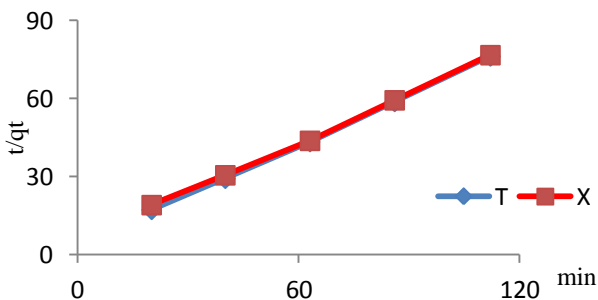


Gráfico AA.1 – Cinética pseudo-segunda ordem do carvão de 17 cm.

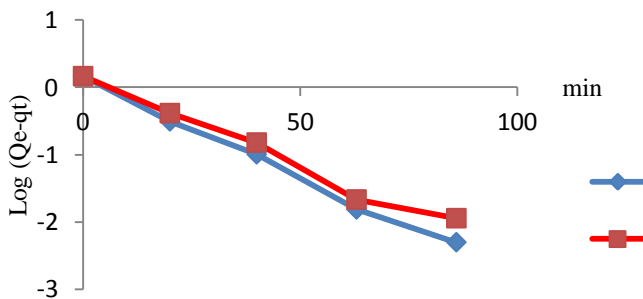


Gráfico AA.2 – Cinética de pseudo-primeira ordem do carvão de 17 cm.

Os gráficos AA.3 e AA.4 representam as cinéticas de adsorção de pseudo-segunda ordem e pseudo-primeira ordem respectivamente, para o carvão ativado de casca de coco de diâmetro de partícula de 24 cm. A cinética é bicomponente, para o tolueno e xileno associados.

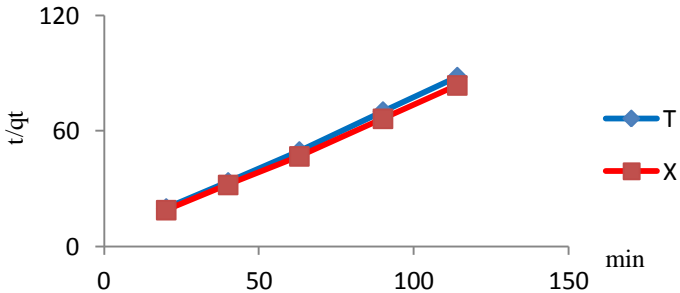


Gráfico AA.3 – Cinética pseudo-segunda ordem do carvão de 24 cm.

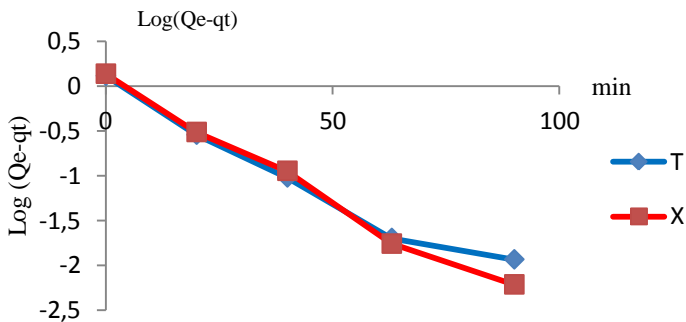


Gráfico AA.4 – Cinética de pseudo-primeira ordem do carvão de 24 cm.

A Tabela AA.1 representa os valores de  $R^2$  dos compostos tolueno e xileno para os modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem, para os dois diâmetros de carvões estudados.

Tabela AA.1 – Valores de  $R^2$  dos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para ambos os diâmetros de partícula.

Diâm. Partícula (cm)	Modelo	Tolueno ( $R^2$ )	Xileno ( $R^2$ )
17	Pseudo-primeira ordem	0,9941	0,9818
	Pseudo-segunda ordem	0,9992	0,9984
24	Pseudo-primeira ordem	0,9634	0,9874
	Pseudo-segunda ordem	0,9994	0,9993

Pode-se observar pela Tabela AA.1 que os modelos de pseudo-primeira e segunda ordem apresentaram boa correlação com os dados experimentais, o que é evidenciado pelo alto valor do coeficiente de correlação dos modelos. Pode-se observar pelos dados que o modelo de pseudo-segunda ordem apresentou valores de correlação um pouco maiores.

## ANEXO B

### Avaliação das amostras de Tolueno e Xileno em CG/MS

Depois do fluxo na coluna de biodegradação já ter sido estabilizado, foram coletados amostras na saída da coluna em uma vazão de 3 mL/min. A identificação dos possíveis compostos formados pela biodegradação dos BTX foram avaliados baseados no sistema CIS/SCAN – Biblioteca NIST – CG/MS 220 – Sistema Varian – Ion Trapp do laboratório Natrium de Joinville - SC. As amostras avaliadas na respectiva vazão foram as seguintes:

Figura AB.1 – efluente de TX coletado na saída da coluna;

Figura AB.2 – efluente de T coletado na saída da coluna;

Figura AB.3 – efluente de X coletado na saída da coluna;

Figura AB.4 – branco dos TX que não entraram em contato coma a coluna.

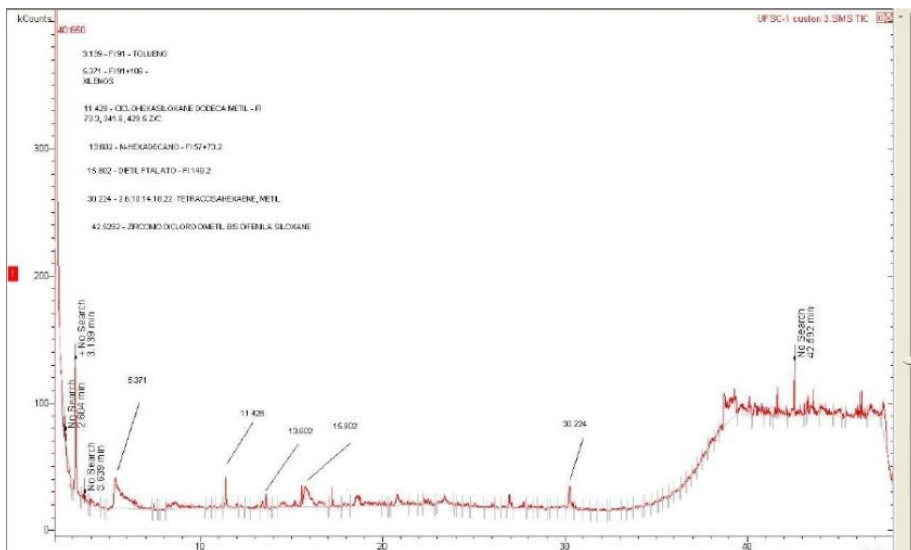


Figura AB.1 – Cromatograma no sistema CIS/SCAN dos efluentes tolueno e xileno coletados na saída da coluna.

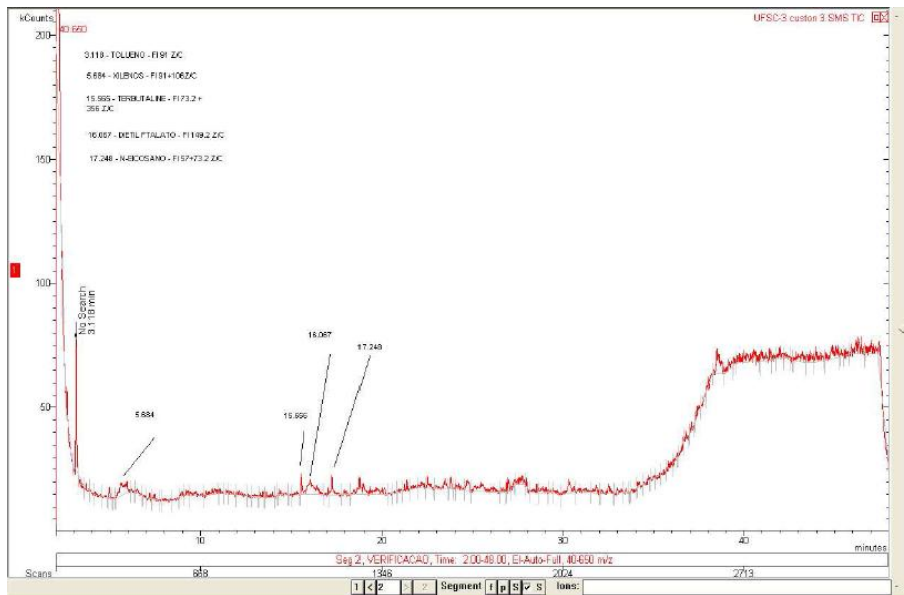


Figura AB.2 – Cromatograma no sistema CIS/SCAN do efluente de tolueno coletado na saída da coluna.



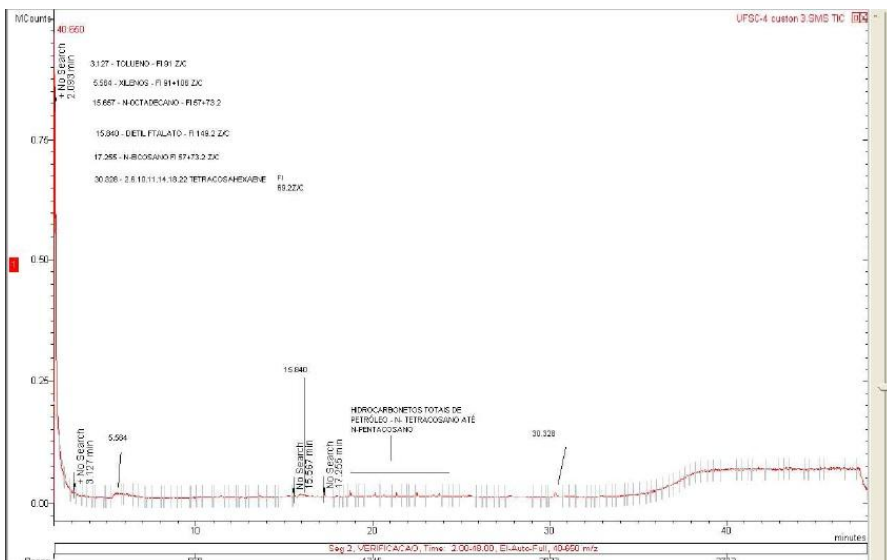


Figura AB.3 – Cromatograma no sistema CIS/SCAN do efluente de xileno coletado na saída da coluna.

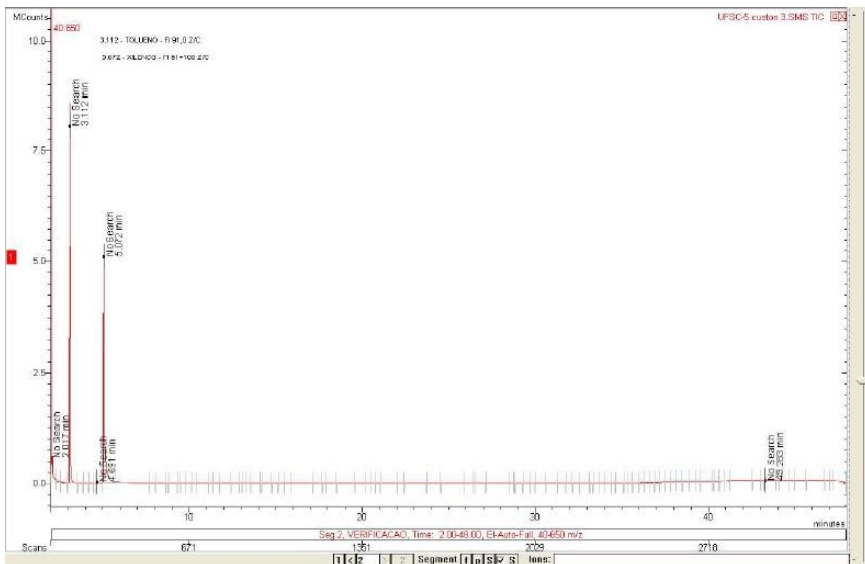


Figura AB.4 – Cromatograma no sistema CIS/SCAN da amostra branco de tolueno e xileno.



## ANEXO C

**Curvas de calibração para o benzeno, tolueno e o-xileno**

Os gráficos AC.1, AC.2 e AC.3 representam as curvas de calibração dos compostos benzeno, tolueno e o-xileno respectivamente e as Tabelas AC.1, AC.2 e AC.3 os pontos pelos quais foram construídas as curvas.

Tabela AC.1– Pontos da curva de calibração do benzeno

Pontos	Concentração (mg/L)	Área (Mv/s)
0	0	0
1	5	3,26
2	10	8,54
3	20	18,87
4	40	39,93
5	60	61,76
6	80	80,32
7	100	101,40
8	120	129,44
9	140	156,08
10	150	166,97

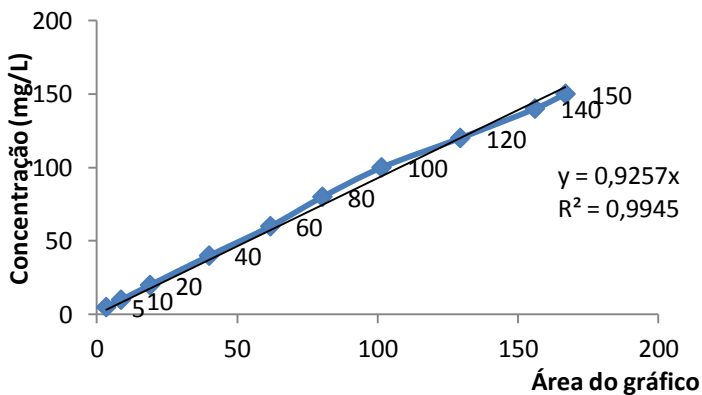


Gráfico AC.1 – Curva de calibração para o benzeno

Tabela AC.2 – Pontos da curva de calibração do tolueno

Pontos	Concentração (mg/L)	Área (Mv/s)
0	0	0
1	5	3,65
2	10	8,28
3	20	23,93
4	40	52,25
5	60	77,58
6	80	105,22
7	100	138,41

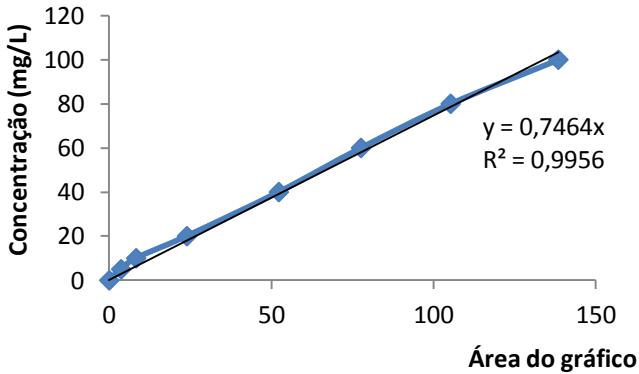


Gráfico AC.2 – Curva de calibração para o tolueno

Tabela AC.3 – Pontos da curva de calibração do o-xileno

Pontos	Concentração (mg/L)	Área (Mv/s)
0	0	0
1	5	4,1
2	10	9,56
3	20	27,95
4	40	55,82
5	60	82,30
6	80	106,40
7	100	133,80

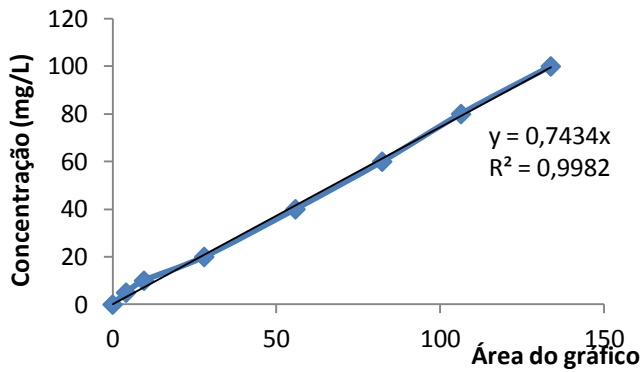


Gráfico AC.3 – Curva de calibração do o-xileno



## ANEXO D Demanda Química de Oxigênio (DQO)

### Curva de calibração

No Gráfico AD.1 é representada a curva de calibração da demanda química de oxigênio (DQO).

Para construção da curva de calibração foi preparado os padrões que seguem na Tabela AD.1.

Tabela AD.1 – Padrões preparados para a curva de calibração

Padrões (mg O <sub>2</sub> /L)	Sol. Digestora	Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	H <sub>2</sub> O (mL)	Sol. Biftalato de Potássio (C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> K)
1000	1,5	3,5	0	2,5
800	1,5	3,5	0,5	2,0
600	1,5	3,5	1,0	1,5
400	1,5	3,5	1,5	1,0
200	1,5	3,5	2,0	0,5
40	1,5	3,5	2,4	0,1
0	1,5	3,5	2,5	0

Preparação das soluções:

#### Solução digestora

- 10,216 gramas de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> em 500 mL de H<sub>2</sub>O
- K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> seco à 103°C por 2 h
- 167 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puro
- 33,3 g de HgSO<sub>4</sub> (sulfato de mercúrio)
- Completar volume a 100 mL.

#### Solução ácido sulfúrico

- 10,12 g Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 1 litro de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### Solução Biftalato de Potássio

- Secar peso constante à temperatura 120 °C

- 950 mg em até 1L de H<sub>2</sub>O  
Comprimento de onda medido com padrão de 600 nm com espectrofotômetro.  
A Tabela AD.2 representa os pontos da curva de calibração.

Tabela AD.2 – Pontos para construção da curva de calibração da Demanda Química de Oxigênio (DQO).

Pontos	Concentração (mg O <sub>2</sub> /L)	Absorbância
1	1000	0,9897
2	800	0,8140
3	600	0,6585
4	400	0,465
5	200	0,2835
6	40	0,095
7	0	0

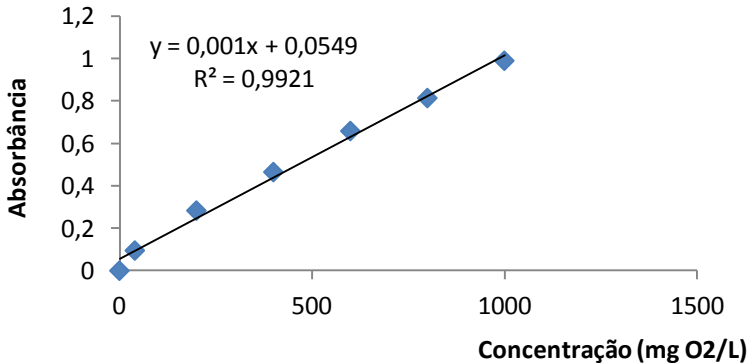


Gráfico AD.1 – Curva de calibração da DQO.

A análise de DQO foi realizada para os reatores em batelada durante os primeiros 21 dias de adaptação. A cada 48 horas eram retiradas as amostras dos dois tipos de reatores, os que estavam sendo adaptados com concentração de glicose de 500 mg/L e os de 1000 mg/L.

É possível observar na Tabela AD.3 os valores de DQO obtidos para ambos os reatores, onde os números ímpares representam a concentração antes da alimentação e os pares a concentração após a



alimentação; além disso, os reatores 1 e 2 foram alimentados com 1000 mg/L e os 3 e 4, com 500 mg/L.

Tabela AD.3 – Valores de DQO (mg O<sub>2</sub>/L) das amostras antes e depois para cada reator.

Reator 1		Reator 2		Reator 3		Reator 4	
Amostras	DQO	Amostras	DQO	Amostras	DQO	Amostras	DQO
1	49,39	1	89,38	1	34,29	1	22,49
2	920,38	2	912,48	2	512,58	2	490,37
3	72,39	3	59,28	3	67,29	3	39,82
4	1012,23	4	978,92	4	508,28	4	479,56
5	85,29	5	37,28	5	43,28	5	34,71
6	957,28	6	898,27	6	489,56	6	503,57
7	32,49	7	56,12	7	38,59	7	59,79
8	1002,74	8	926,29	8	510,48	8	498,10
9	79,47	9	11,93	9	70,48	9	69,66
10	930,47	10	902,47	10	520,47	10	489,40
11	63,18	11	54,29	11	58,91	11	12,58
12	1082,37	12	917,89	12	509,79	12	501,57
13	51,84	13	67,09	13	69,10	13	48,43
14	937,29	14	947,49	14	487,49	14	480,81
15	33,49	15	54,02	15	58,09	15	56,89
16	987,58	16	924,49	16	498,47	16	493,33
17	45,29	17	78,20	17	7,09	17	57,01
18	997,20	18	1000,48	18	476,59	18	478,99
19	70,33	19	92,30	19	30,18	19	34,66
20	910,28	20	1047,82	20	512,89	20	502,88
21	49,29	21	87,32	21	39,84	21	48,91
22	990,48	22	986,38	22	499,30	22	518,29
23	52,49	23	62,47	23	28,47	23	57,91
24	970,48	24	973,10	24	502,47	24	520,89



## ANEXO E

### Isotermas de adsorção

Os Gráficos AE.1, AE.2, AE.3 e AE.4 representam os dados experimentais e os modelos de Langmuir e Freudlich para o tolueno e o-xileno individualmente nos dois diâmetros de partícula avaliados (17 cm e 24 cm).

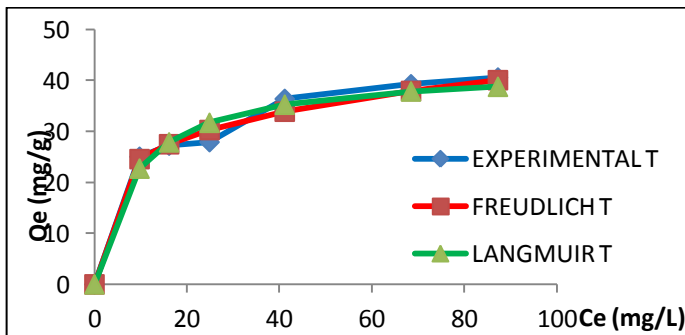


Gráfico AE.1 – Isoterma de adsorção Tolueno, 24 cm.

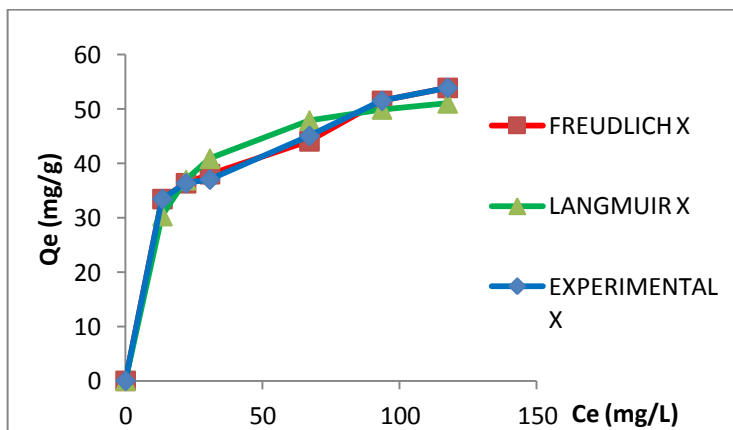


Gráfico AE.2 – Isoterma de adsorção o-Xileno, 24 cm.

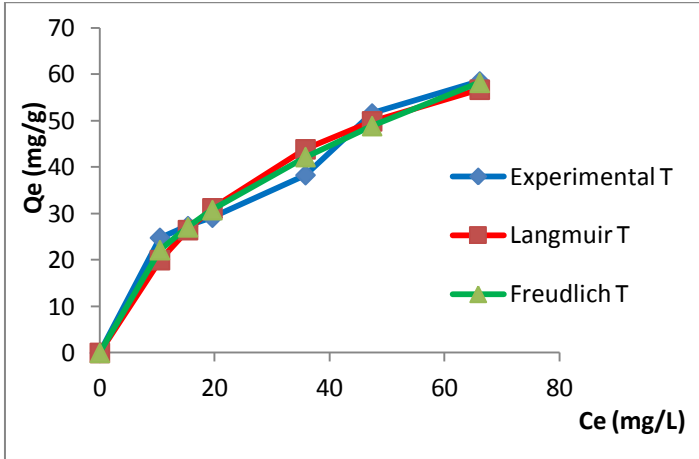


Gráfico AE.3 – Isoterma de adsorção Tolueno, 17 cm.

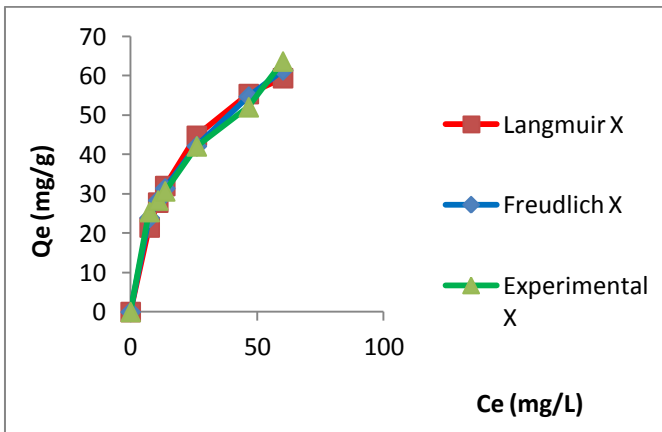


Gráfico AE.4 – Isoterma de adsorção o-Xileno, 17 cm.

Através dos gráficos avaliados é possível observar um ótimo ajuste dos dados experimentais com os modelos de Langmuir e Freundlich.

A Tabela AE.1 apresenta um resumo dos dados experimentais e modelos das isotermas de adsorção dos substratos tolueno e o-xileno.

Tabela AE.1 – Resumo dos dados experimentais e modelos das isotermas de adsorção.

Diâmetro	Substrato	Modelo	R <sup>2</sup>	Qe(mg <sub>subs</sub> /g <sub>carvão</sub> )
17 cm	Tolueno	Langmuir	0,9852	56,67
	Xileno		0,9893	59,38
	Tolueno	Freudlich	0,9927	58,16
	Xileno		0,997	61,38
	Tolueno	Experimental	-	58,45
	Xileno		-	63,61
24 cm	Tolueno	Langmuir	0,9892	38,76
	Xileno		0,9887	51,09
	Tolueno	Freudlich	0,9924	40,05
	Xileno		0,9971	53,06
	Tolueno	Experimental	-	40,56
	Xileno		-	53,93



## ANEXO F

### Procedimento para Avaliação dos Modelos e definição de parâmetros

1. Entrada de dados:
  - a) Entrar com Concentração para cada componente
  - b) Entrar com valor do tempo experimental
  
2. Definir um **procedimento de busca** dos parâmetros:  
Func:=proc(mumaxt,Kst,Yxt,X0)
  - a) Entrada das **condições iniciais**: no caso a concentração inicial do componente
  - b) Entrada do **modelo** de degradação que será avaliado:  
Exemplo: Mod Monod -  $R_{tolueno} = \text{mumaxt} * \text{Stolueno}(t) / (\text{Kst} + \text{Stolueno}(t))$ ;
  - c) **Equação diferencial** para o **consumo** de substrato:  
Exemplo: eq  $\text{Stolueno} := \text{diff}(\text{Stolueno}(t), t) = -R_{tolueno} * X(t) / Y_{xt}$ ;
  - d) **Equação diferencial** para o **crescimento** microbiano:  
Exemplo: eq  $X := \text{diff}(X(t), t) = R_{tolueno} * X(t)$ ;
  
3. Carregar **pacote de resolução de EDOs**: no caso utilizou-se o método de Runge Kutta 4° e 5° ordem (RKF45)
  
4. Entrada do procedimento de minimização da **função objetivo** (F.O): no caso os mínimos quadrados – minimização da diferença entre o valor calculado pelo modelo e dado experimental

$$F.O. = \sum_{i=1} \left( \frac{X_i^{\text{exp}} - X_i^{\text{pred}}}{X_i^{\text{exp}}} \right)^2$$

5. Codificação/implementação do algoritmo PSO
  - a) Entrar com **parâmetros do algoritmo** (c1,c2, wfinal, winicial, n°partículas,n°iterações)
  - b) Definir o **espaço de busca** para cada parâmetro do modelo que está sendo avaliado.  
Ou seja, para o exemplo dado em buscar os parâmetros mumaxt, Kst, Yxt, X0, deve-se definir obrigatoriamente um valor mínimo e máximo para cada um desses.

c) **Implementação do PSO** propriamente dito: conforme explicado na seção 2.11.1.

6) Impressão da resposta: a iteração, o valor da função objetivo e respectivos valores para cada parâmetro do modelo que está sendo avaliado dessa iteração. Quero dizer, essa impressão será feita para cada iteração até atingir o critério de parada, o qual consiste no valor n° iterações especificado anteriormente na entrada dos parâmetros do PSO.

7) Construção do **gráfico de convergência**: (F.O versus iteração) – esse é um dos procedimentos para avaliar se a resposta é satisfatória.

8) Construção **gráfico de degradação do substrato**: (Concentração versus tempo) – esse é outro procedimento para avaliar se a resposta é uma solução ótima.

**OBSERVAÇÃO:** Esse procedimento não é único. São feitas quantas execuções forem necessárias para garantir que o conjunto de valores obtidos para os parâmetros do modelo não apresentem variação significativa a cada execução realizada e, além disso, conservando-se o menor valor obtido para a função objetivo, o que garante maior proximidade entre o perfil do modelo e dados experimentais.