

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

GHEISE MINATTI

**BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BTX DE EFLUENTE
PETROQUÍMICO SINTÉTICO**

**Florianópolis - SC
Julho de 2009**

GHEISE MINATTI

**BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BTX DE EFLUENTE
PETROQUÍMICO SINTÉTICO**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador:

Prof.^o. Dr.^o. Antônio Augusto Ulson de Souza

Co-orientadora:

Prof.^a. Dr.^a. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza

**Florianópolis – SC
Julho de 2009**

GHEISE MINATTI

**BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BTX DE EFLUENTE
PETROQUÍMICO SINTÉTICO**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Florianópolis, ____ de Julho de 2009.

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson
de Souza
Orientador

Selene M. A. Guelli Ulson de
Souza
Co-Orientadora

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Profa. Dra. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Prof. Dr. Renato Wendhausen Jr.

*“Jamais se desespere em meio as mais sombrias aflições
de sua vida, pois das nuvens mais negras
cai água límpida e fecunda”.*

Provérbio Chinês

*Aos meus pais, Gonzaga e Salete e à
minha irmã Myrcia, por todo amor
que nos sustenta como família.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta oportunidade de enriquecimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, Gonzaga Minatti e Salete Maria Andreghe-toni Minatti e a minha irmã, Myrcia Minatti, pelo apoio, paciência e amor incondicional, além do grande esforço em me tornar uma pessoa cada vez mais vitoriosa.

Ao meu orientador, Professor Antônio Augusto Ulson de Souza e a Professora Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza, pela paciência, conhecimentos transmitidos e oportunidade de realizar este trabalho.

À Josiane Maria Muneron de Mello a quem respeito e tenho grande admiração. Pessoa maravilhosa que tive a oportunidade de conhecer e conviver. Obrigada por sua amizade, carinho, apoio e incentivo.

À Heloisa de Lima Brandão pelo apoio e pelas ilustres idéias para que o trabalho fosse desenvolvido. Um exemplo de dignidade e postura que seguirei em toda a minha vida.

Ao meu namorado Gustavo que “indiretamente” e “diretamente” sempre me apoiou no mestrado.

Ao Programa de Recursos Humanos da ANP, através do PRH 09/MECPETRO, que financiou e forneceu todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do LABSIN-LABMASSA pelo companheirismo nos bons e maus momentos e agradável convívio que me proporcionaram a amizade compartilhada.

Aos amigos Maykon, Karin, Fernanda Batista, Maria Rita, Solange, Fernanda Ferreira, Andressa, Adriana, Cristiane, Ronny, Maria Luiza, Mariana, Pâmela, Sara e Suzy, pela amizade, incentivo, colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pelas muitas risadas que compartilhamos.

Aos amigos, familiares e colegas que entenderam as minhas ausências, animaram-me em muitos momentos e tentaram me ajudar sempre.

Enfim, a todos aqueles que, embora não mencionados, mas que estive-m por trás dos “bastidores”, de uma forma ou de outra contribuíram e participaram para a execução desse trabalho.

RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno e xilenos, coletivamente conhecidos como BTX 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. Portanto, 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, o desempenho de diversos modelos não-estruturados de crescimento microbiano, baseado na cinética no nível da população, foi avaliado utilizando-se dados experimentais obtidos em laboratório. Foram aplicados 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, incompetitiva e não-competitiva. Os parâmetros cinéticos dos modelos de único e múltiplos substratos foram obtidos utilizando o software STATISTICA 7.0, que possibilitou realizar a regressão não linear dos dados. A biodegradação individual dos substratos BTX foi adequadamente representada pelos modelos de Andrews e Monod. A cinética de biodegradação dos compostos BTX, comprova-se que a biodegradação do tolueno é a mais rápida seguida do benzeno e o-xileno, respectivamente. Na biodegradação da mistura binária BT e BX o modelo de Inibição Acompetitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais. Para a biodegradação binária TB e TX prevaleceu como melhor modelo Inibição Competitiva. Na concentração inicial de 50 mg/L de o-Xileno na presença de benzeno houve Inibição Não Competitiva e o mesmo comportamento se deu com o tolueno. Na biodegradação tricomponente BTX em diferentes concentrações o modelo de Inibição Não Competitiva, Acompetitiva e Competitiva foram verificados. De forma geral, tanto para a biodegradação de um único substrato, quanto para múltiplos substratos, o comportamento cinético será diferente para cada caso, concordando com o fato de que, a mistura de culturas microbianas utilizada na biodegradação, pode apresentar múltiplos caminhos para a biodegradação dos compostos BTX.

Palavras-chave: BTX; Biodegradação; Meio ambiente.

ABSTRACT

The aromatics hydrocarbons usually known as BTX (benzene, toluene and xylenes isomers) are toxic compounds presented in many petroleum products, such as gasoline, and are also widely used in chemical and petrochemical industries. When these compounds are released in the environment a contamination of the soil and the groundwater took place. As a result, the use of the aquifers becomes impossible. Groundwaters nowadays represent an alternative potable water source in many countries. Therefore, it's crucially important to study the biodegradation process, in particular when multiple substrates are presented in the system. In this work, the kinetics of BTX biodegradation was studied, individually and as in mixture. Hence, the performance of the different microbial growth unstructured models, based on the population level kinetics were investigated by using experimental data from laboratory. We apply the Monod and Andrews models to describe an individual substrates biodegradation kinetics. Similarly, the applied equations describing mixture substrates biodegradation kinetics were solved by using the competitive, noncompetitive and uncompetitive inhibitions models. The kinetic parameters to the models of single and multiple substrates have been obtained using the STATISTICA 7.0 software, which allows performing the nonlinear regression of data. The BTX individual biodegradation substrates was adequately represented by the models of Monod and Andrews. The kinetics of biodegradation of BTX compounds, shows that the biodegradation of toluene is faster than benzene and o-xylene, respectively. Binary mixture in the biodegradation of BT and BX Acompetitiva Inhibition of the model was presented the best agreement with the experimental results. To biodegradation and binary TB TX prevailed as the best competitive inhibition model. In initial concentration of 50 mg / L of o-xylene in the presence of benzene inhibition was not competitive and the same behavior occurred with toluene. Tricomponente BTX biodegradation in different concentrations in the model uncompetitive inhibition, and competitive Acompetitiva were verified. In general, both biodegradation of a single substrate, and for multiple substrates, the kinetic behavior is different in each case, agreeing with the fact that mixture microbial cultures used in biodegradation, can submit multiple pathways for biodegradation of BTX compounds.

Keyword: BTX; Biodegradation; Environment.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 – Estrutura química dos compostos BTX	28
Figura 2.2 – Modelo de curva de crescimento: (1) Fase de aclimação, (2) Fase exponencial, (3) Fase estacionária e (4) Fase de declínio	40
Figura 2.3 - Principais processos envolvidos na formação de um biofilme.	45
Figura 2.4 - Acumulação de biofilme ao longo do tempo (Pereira, 2001).....	46

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 – (a) Biomassa na ETE; (b) Amostra coletada em um frasco de 5L.....	70
Figura 4.2 – Biorreatores utilizados nos ensaios para obtenção das cinéticas.....	70
Figura 4.3 - Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência – HPLC (LABMASSA, EQA/UFSC).	72
Figura 4.4 - <i>Shaker</i> /Banho Maria Dubnoff.	74
Figura 4.5 - Aparato experimental utilizado para realização das cinéticas binárias de biodegradação dos compostos BTX.	78
Figura 4.6 - Aparato experimental utilizado para realização das cinéticas ternárias de biodegradação dos compostos BTX.	79

CAPÍTULO 5

Figura 5.1 - Micrografias do carvão ativado vegetal de casca de coco.82	
Figura 5.2 - Espectro da amostra de carvão ativado vegetal de casca de coco	83
Figura 5.3 – Microscopia do efluente sintético petroquímico	86
Figura 5.4 - Curva de degradação do benzeno em relação ao tempo ...	87
Figura 5.5 - Curva de degradação do tolueno em relação ao tempo	88
Figura 5.6 - Curva de degradação do o-xileno em relação ao tempo ...	88

Figura 5.7 - Ajuste da cinética de Monod obtida para o benzeno na concentração de 50mg/L.	91
Figura 5.8 - Ajuste da cinética de Monod obtida para o tolueno na concentração de 50mg/L.	91
Figura 5.9 - Ajuste da cinética de Monod obtida para o o-xileno na concentração de 50mg/L.	92
Figura 5.10 - Cinética de biodegradação do benzeno na mistura bicomponente com tolueno avaliando as diferentes concentrações de tolueno.	95
Figura 5.11 - Cinética de biodegradação do benzeno na mistura bicomponente com o-xileno avaliando as diferentes concentrações de o-xileno.	96
Figura 5.12 - Cinética de biodegradação do tolueno na mistura bicomponente com benzeno avaliando as diferentes concentrações do benzeno.	98
Figura 5.13 - Cinética de biodegradação do tolueno na mistura bicomponente com o-xileno avaliando as diferentes concentrações de o-xileno.	99
Figura 5.14 - Cinética de biodegradação do o-xileno na mistura bicomponente com benzeno avaliando as diferentes concentrações do benzeno.	100
Figura 5.15 - Cinética de biodegradação do o-xileno na mistura bicomponente com tolueno avaliando as diferentes concentrações do tolueno.	102
Figura 5.16 - Cinética de biodegradação da mistura tricomponente dos compostos BTX, avaliando as diferentes concentrações iniciais de benzeno.	103
Figura 5.17 - Cinética de biodegradação da mistura tricomponente dos compostos BTX, avaliando as diferentes concentrações iniciais de tolueno.	104
Figura 5.18 - Cinética de biodegradação da mistura tricomponente dos compostos BTX, avaliando as diferentes concentrações iniciais de o-xileno.	106

ANEXO B

Figura B.1 – Curva de calibração do benzeno.	129
Figura B.2 – Curva de calibração do tolueno.	130
Figura B.3 – Curva de calibração do o - xileno.	131

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas dos compostos BTX presentes no petróleo 29

Tabela 3.1 – Modelos cinéticos não-estruturados para único substrato 63

Tabela 3.2 – Modelos cinéticos não-estruturados para múltiplos substratos 64

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 – Composição do meio mineral para desenvolvimento dos microrganismos 69

Tabela 4.2 – Adaptação dos biorreatores mono componente e multicomponente. 76

Tabela 4.3 - Combinações binárias para cinéticas de biodegradação dos compostos BTX..... 77

Tabela 4.4 - Combinações ternárias para cinéticas de biodegradação dos compostos BTX..... 78

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1 – Resultados do teste de toxicidade aguda 84

Tabela 5.2 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação dos compostos BTX individualmente - Modelo de Monod. 90

Tabela 5.3 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente BT 96

Tabela 5.4 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente BX..... 97

Tabela 5.5 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente TB. 98

Tabela 5.6 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente TX.....	100
Tabela 5.7 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente XB.	101
Tabela 5.8 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente XT.....	102
Tabela 5.9 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, tricomponente B (B/T/X).....	104
Tabela 5.10 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, tricomponente T (T/B/X).....	105
Tabela 5.11 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, tricomponente X (X/B/T).....	106

ANEXO B

Tabela B.1 – Dados para construção da curva de calibração do benzeno	129
Tabela B.2 – Dados para construção da curva de calibração do tolueno	130
Tabela B.3 – Dados para construção da curva de calibração do o – xileno.....	131

SIMBOLOGIA

BTX	Benzeno, tolueno e xileno	
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno	
I_{ij}	Grau de inibição do substrato i sobre o substrato j	
K_i	Constante de inibição	(mg L ⁻¹)
K_s	Constante de saturação	(mg L ⁻¹)
S_i	Concentração do substrato i	(mg L ⁻¹)
TOD	Caminho metabólico - enzima tolueno dioxigenase	
TOL	Caminho metabólico - enzima mono-oxigenase	
X	Concentração celular	(mg L ⁻¹)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão para células	(mg mg ⁻¹)

Letras Gregas

λ	Comprimento de onda	Mm
μ_x	Velocidade de crescimento específico	(h ⁻¹)
$\mu_{máx}$	Velocidade máxima de crescimento específico	(h ⁻¹)
μ_{x_i}	Velocidade de crescimento específico no substrato i	(h ⁻¹)

Índices Superiores

n	Contador
---	----------

SUMÁRIO

CAPITULO I

INTRODUÇÃO.....	23
------------------------	-----------

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Efluentes em Refinarias de Petróleo e o Meio Ambiente.....	26
2.3 Compostos BTX.....	27
2.4 Tratamentos dos efluentes.....	30
2.4.1 Processo biotecnológico e a biodegradação	31
2.4.2 Fontes de energia e carbono para as células microbianas	33
2.4.3 Requisitos nutricionais	34
2.4.4 Microorganismos utilizados na biodegradação de compostos tóxicos	36
2.5 Biofilmes	41
2.5.1 Composição dos biofilmes	42
2.5.2 Importância do estudo dos biofilmes.....	43
2.5.3 Formação de biofilmes	44
2.6 Biorreatores	48
2.6.1 Biorreatores com Biomassa Aderida.....	51
2.6.2 Biorreatores com Biomassa em Suspensão	51

CAPÍTULO III

MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	52
3.1 Avaliação da biodegradação dos compostos BTX	52
3.2 Modelos cinéticos de crescimento microbiano.....	60
3.2.1 Classificação dos modelos cinéticos	60
3.2.2 Velocidade de crescimento específico.....	61
3.2.3 Modelo para único substrato	62
Limitação pelo substrato	63
3.3 Balanços de massa.....	66
3.3.1. Operação em batelada	66

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1 Material	67
4.1.1 Compostos orgânicos utilizados	67

4.1.2 Material suporte para Imobilização da biomassa – carvão ativado	67
4.1.3 Solventes	68
4.1.4 Composição mineral do meio de cultura.....	68
4.1.5 Inóculo	69
4.1.6 Reatores.....	70
4.2 Métodos analíticos	70
4.2.1 Concentração de oxigênio	70
4.2.2 pH.....	71
4.2.3 Análise de DQO.....	71
4.2.4 Caracterização Morfológica	71
4.2.5 Análises Cromatográficas	72
4.3 Procedimento experimental.....	74
4.3.1 Imobilização e adaptação da biomassa no suporte.....	74
4.3.2 Obtenção da cinética de degradação	76
4.3.3 Teste de adsorção.....	79
4.3.4 Teste de toxicidade.....	79

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 Resultados experimentais.....	81
5.1.1 Caracterização morfológica	82
5.1.2 Teste de toxicidade aguda com Daphnia Magna.....	83
5.1.3 Microscopia.....	85
5.1.4 Cinéticas de biodegradação dos compostos BTX	86

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	110
Apêndice A - História do petróleo	125
Apêndice B - Curvas de calibração dos compostos BTX	129
Apêndice C - Valores experimentais da DQO e teste de adsorção	132
Apêndice D - Cromatograma dos compostos BTX.....	136
Apêndice E - Parâmetros de degradação bicomponentes e tricomponentes.....	137

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

Hoje não só no Brasil, mas, no mundo todo, as indústrias petroquímicas são responsáveis pela geração de grandes quantidades de efluentes líquidos que são formados durante as etapas de produção, transporte e refino.

Os compostos tóxicos antropogênicos têm se tornado contaminantes ubíquos de solos e águas, devido ao resultado do desconhecimento humano na utilização segura de produtos químicos, descuido da manufatura de compostos sintéticos, acidentes ocasionais e disposição inadequada de resíduos químicos (GUSMÃO, 2005).

As refinarias são grandes consumidoras de água, gerando assim, grandes quantidades de despejos líquidos, sendo alguns de difícil tratamento (MELLO, 2006). Piras (1993), citado por Marino (2005), ressalta que os efluentes hídricos gerados nas refinarias variam grandemente em quantidade e em qualidade, em função do tipo de petróleo processado, das unidades de processamento que compõem a refinaria, e da forma de operação dessas unidades.

Reduzir e controlar a poluição têm sido um desafio para a indústria, especialmente porque o impacto ambiental e os acidentes ecológicos são dois fatores ainda não totalmente dominados.

Os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, também conhecidos por BTEX, gerados nas refinarias, apresentam um potencial de poluição maior pelo fato de serem compostos mais hidrossolúveis do petróleo (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

O benzeno atua no sistema reprodutivo podendo causar deformações no feto, infertilidade e aborto. Mas o principal prejuízo deste composto tóxico para o ser humano é sua comprovada carcinogenicidade. O tolueno está associado com as disfunções hepáticas e gastrointestinais sendo, também, teratogênico. O etilbenzeno causa prejuízo ao sistema respiratório, além de provocar irritação aos olhos e desmaios. Os distúrbios mais comuns observados com a exposição crônica aos vapores de xilenos são fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, fraqueza, perda de memória, sonolência, distúrbio de humor e do equilíbrio, zumbido, náuseas e perda de apetite. Em concentrações elevadas pode levar a inconsciência e morte, por depressão do sistema nervoso central (RIBEIRO, 2005).

Considerando estes aspectos, estudos estão sendo realizados para

desenvolver unidades de tratamento mais compactas que operem com maior flexibilidade e com um bom desempenho na remoção dos compostos BTEX.

A degradação biológica está sendo o principal mecanismo para a minimização das características tóxicas de poluentes. A opção de desenvolvimento de tecnologia de regeneração de efluentes por degradação biológica se deve ao fato desta não necessitar de adição de produtos químicos. Esta técnica fundamenta-se em um processo através do qual microrganismos degradam contaminantes a produtos simples para obter a energia necessária à sua sobrevivência. As pesquisas confirmam também que os compostos BTEX podem ser biodegradados sob condições aeróbias e anaeróbias (MELLO, 2007).

Biorreatores com biofilme aderido apresentam como vantagens: maior concentração de biomassa retida com uma atividade metabólica mais elevada, maior eficiência na remoção de DBO, aplicação de maior carga orgânica; apresentam grande área de transferência de massa entre as fases, a não colmatagem e instalações mais compactas (BRANDÃO, 2002; GUELLI U. SOUZA *et al.*, 2008). Para que seja possível conhecer a concentração de um determinado substrato é necessário que se tenham equações cinéticas apropriadas para prever a velocidade de reação em diferentes sistemas, que considerem as variáveis que afetam significativamente a velocidade de biodegradação (BRANDÃO, 2002).

As cinéticas de degradação de compostos químicos tóxicos são de extrema importância porque possibilitam estimar a persistência dos contaminantes no ambiente, prever suas concentrações em um dado tempo, de modo a determinar a possibilidade de completa degradação destes compostos.

Este trabalho tem como objetivo geral a avaliação do desempenho de modelos cinéticos de crescimento microbiano em descrever a biodegradação dos compostos BTX, individualmente e em mistura, presentes em efluentes líquidos da Indústria Petroquímica, utilizando biofilmes. Os objetivos específicos consistem no teste de adsorção, teste de toxicidade, caracterização morfológica e a microscopia óptica. A modelagem matemática que melhor descreve a cinética de biodegradação será determinada pelo ajuste dos dados experimentais obtidos em um biorreator em batelada agitado, utilizando carvão ativado como suporte para a biomassa.

O presente trabalho de dissertação é composto por seis capítulos. No Capítulo 2 é efetuada uma revisão bibliográfica a respeito do estado da arte no tema da pesquisa. No Capítulo 3 são apresentados os modelos cinéticos de biodegradação. No Capítulo 4 são relatados os materiais

utilizados e metodologias adotadas. No Capítulo 5 são apresentados os principais resultados obtidos e a análise dos resultados. No Capítulo 6 são apresentadas as conclusões do trabalho desenvolvido e sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO II

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 à Indústria Petroquímica, bem como à geração de efluentes e à toxicidade dos compostos BTX. No Apêndice A é apresentada a história do petróleo, a história do petróleo no Brasil e uma breve introdução sobre o refino.

2.1 Efluentes em Refinarias de Petróleo e o Meio Ambiente

O tratamento dado às questões ambientais nas últimas décadas vem evoluindo de forma bem coerente a partir da percepção de que o aumento do número de indústrias e a conseqüente carga poluidora gerada levaram à saturação dos meios receptores. Recentemente, as questões ambientais passaram a ser, portanto, mais um aspecto na busca da qualidade total e o conceito de gerenciamento ambiental adquiriram uma nova definição em que as questões administrativas se agregam à multidisciplinaridade da questão ambiental. A busca e desenvolvimento de soluções tecnológicas que atendam à legislação ambiental vigente e que, ao mesmo tempo, sejam compatíveis com seu porte, localização, condições econômicas, operacionais, etc., se fazem primordiais.

As águas residuárias geradas pelas indústrias petroquímicas apresentam os mesmos constituintes tóxicos e de difícil degradação (recalcitrantes) que o petróleo e seus derivados, fazendo com que o lançamento dos resíduos, ou o derramamento de combustíveis, nos corpos d'água receptores ou no solo venham causando graves contaminações. Por este motivo, a contaminação do solo e das águas por estes produtos tem sido alvo de extensas pesquisas nos últimos anos.

De acordo com Mota (2003), a poluição hídrica tem diversas conseqüências negativas para o meio ambiente. Estas conseqüências podem ser de caráter sanitário, ecológico, social ou econômico.

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 (MARINO, 2005).

Segundo World Bank Group (1998), para cada tonelada de petróleo processado, uma refinaria emite aproximadamente: 0,1 kg a 3 kg de substância particulada; 1,3 kg de SO_x; 0,06 kg a 0,5 kg de NO_x e 0,75 g a 6 g de BTX.

A quantidade de efluentes líquidos gerados é diretamente proporcional às quantidades de óleo refinado, e no caso do Brasil, as refinarias do sistema Petrobrás geram entre 0,40 e 1,60 m³ de efluente por m³ de óleo refinado (MARINO, 2005).

Devido à variabilidade dos efluentes gerados ao longo do tempo nos diversos processos produtivos de uma refinaria, torna-se difícil estabelecer sua composição típica. Entretanto, pode-se afirmar que o contaminante característico dos despejos da indústria é o óleo (petróleo). O volume e as características dos efluentes produzidos e descartados pelas refinarias dependem de parâmetros como as propriedades do petróleo refinado, tipo de unidades de processo, *mix* final de produtos, o método de tratamento utilizado e sua disposição.

Os efluentes líquidos gerados pela indústria petroquímica podem ser classificados em não contaminados e orgânicos, de acordo com as suas características físico-químicas. O sistema de efluentes não contaminados recebem correntes com características inorgânicas. Já o sistema orgânico coleta efluentes contaminados com compostos orgânicos. Com relação ao regime de fluxo, os efluentes são classificados como contínuos – são permanentemente gerados – e os intermitentes – gerados apenas durante alguma operação especial não contínua ou manutenção em equipamentos e sistemas (MUSTAFA, 1998 citado por MELLO, 2007).

2.3 Compostos BTX

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 (PHELPS & YOUNG, 2001; RIBEIRO, 2005).

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. Na Figura 2.1 são apresentadas as estruturas químicas dos compostos BTX.

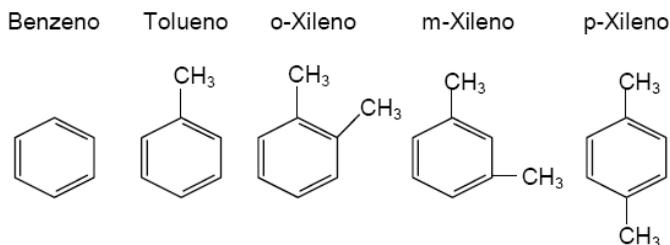


Figura 2.1 – Estrutura química dos compostos BTX

Os compostos benzeno, tolueno e xilenos presentes nos fluentes das refinarias, apresentam um potencial de poluição elevado, representando um sério risco ao meio ambiente e ao ser humano. São consideradas 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.

O benzeno é comprovadamente o composto mais tóxico de todos os BTX, pois se trata de uma substância carcinogênica e mutagênica (BONO *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2002), podendo causar leucemia, se ingerida mesmo em baixas concentrações durante períodos não muito longos de tempo. Uma exposição à altas concentrações em curtos períodos, por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte (MENDES, 1993).

O tolueno é um contaminante ambiental comum, encontrado em muitos locais de despejo de resíduos. Este é um depressor do sistema nervoso central e, mesmo em baixas concentrações, produz fadiga, fraqueza e confusão mental (PEDROZO *et al.*, 2002; TIBURTIUS *et al.*, 2004).

A exposição ao xileno resulta no aparecimento de cefaléia, 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 (PEDROZO *et al.*, 2002; TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Os riscos à saúde, devido à exposição aguda ao etilbenzeno, são tonteiras, delírios, dores de cabeça e vômito, convulsões, coma e/ou morte. Também pode irritar os olhos, nariz e garganta. Os efeitos podem ocorrer algum tempo após a exposição ao etilbenzeno e podem permanecer por meses ou anos. A exposição repetida pode causar riscos à vida (PEDROZO *et al.*, 2002).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece critérios de lançamento de efluentes de qualquer fonte poluidora em corpos d'água receptores. Estes padrões de lançamento são definidos pela RESOLUÇÃO N° 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005). As concentrações máximas de BTX permitidos para que a água seja considerada potável é de 5 µg L⁻¹ para o benzeno, 170 µg L⁻¹ para o tolueno e 300 µg L⁻¹ para os xilenos.

Segundo Corseuil e Fernandes (1996), a solubilidade efetiva em água desses compostos orgânicos particulares presentes em um combustível ou em uma mistura de líquidos de fase não aquosa (NAPL) pode ser estimada conhecendo-se a solubilidade do composto puro e sua fração no combustível. Esta solubilidade poderá aumentar se a este combustível forem misturados compostos oxigenados, tais como alcoóis e éteres.

A solubilidade é um dos principais parâmetros que afetam a distribuição e transporte de compostos químicos no ambiente. Na Tabela 2.1 são apresentados os dados de solubilidade e propriedades físico-químicas de interesse dos compostos BTX estudados neste trabalho.

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

Composto	N° Carbonos	Massa Molecular (g/gmol)	Ponto de Ebulição (°C)	Solubilidade em água (mg/L)	Pressão de vapor (bar)	Massa específica (g/mL)
Benzeno	6	78,11	80,1	178,0	0,1	0,874
Tolueno	7	92,1	110,8	515	0,029	0,880
o-Xileno	8	106,17	144,4	175	0,0079	0,870

Fonte: Merck Index (1989).

De acordo com a Lei de Raoult, a partir da solubilidade em água

do componente puro e da fração deste componente no combustível, pode-se calcular a concentração dos constituintes na fase aquosa (CORSEUIL e FERNANDES, 1996).

2.4 Tratamentos dos efluentes

Os hidrocarbonetos aromáticos conhecidos coletivamente como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto-meta-para-xileno*), presentes em produtos derivados de petróleo são extremamente tóxicos e freqüentemente contaminam o meio ambiente em consequência de descargas industriais e derramamentos de combustíveis.

Atualmente o aumento da preocupação com as questões ambientais é crescente, e principalmente a busca por tecnologias que minimizem os impactos causados pela presença de compostos tóxicos no meio ambiente.

Segundo Lin e Huang (1999), existem várias tecnologias de tratamentos para remoção desses compostos orgânicos presentes em efluentes aquosos, tais como: processos biológicos, incineração, oxidação e adsorção.

Dentre as tecnologias utilizadas na remediação e tratamento de áreas impactadas por combustíveis derivados de petróleo, a biodegradação vem despontando como uma técnica bastante eficaz, podendo ser utilizada como complemento às tecnologias convencionais. A biodegradação de poluentes depende da atividade de microorganismos aeróbios e anaeróbios capazes de metabolizá-los e a utilização destes microorganismos em reatores, visando o tratamento dos mais diferentes tipos de águas residuárias, vem se tornando uma nova estratégia.

A realização de pesquisas que relatem a biodegradação de compostos tóxicos, como o BTX, com o objetivo de restaurar a qualidade de águas bem como o maior rigor da legislação no despejo dos contaminantes (BTX) em corpos receptores, têm incentivado a busca por novas tecnologias para o tratamento de efluentes industriais que contenham tais contaminantes.

Para isso, o conhecimento da cinética de biodegradação é fundamental para a predição da taxa de remoção dos poluentes e alcance de tecnologias mais eficientes.

A vantagem do tratamento biológico é que a mineralização promove a destruição permanente dos resíduos e elimina os riscos de futuras contaminações, aumentando o nível de aceitação por parte da opinião pública (PEDROZO *et al.*, 2002). Além disto, os processos

biológicos podem ser combinados a outros processos para o aumento da eficiência global do tratamento.

2.4.1 Processo biotecnológico e a biodegradação

A grande maioria dos processos biotecnológicos divide-se em reações de crescimento microbiano (reações microbiológicas) e as reações catalisadas por enzimas (reações bioquímicas). A utilização de microorganismos e/ou enzimas, capazes de sintetizar compostos químicos tais como proteínas, antibióticos e álcool, além de produzir biomassa e inúmeros alimentos é uma tecnologia antiga.

Atualmente os processos biotecnológicos tornaram-se fundamentais também na produção de energia, como o biogás e o etanol. 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 & EDDY, 1991 citado por RODRIGUES, 2006).

A biodegradação em biorreatores proporciona menores tempos de tratamento, devido ao maior contato entre os microorganismos, 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 microorganismos 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.

Os microorganismos precisam de macronutrientes para síntese de componentes celulares, tais como nitrogênio para síntese de aminoácidos e enzimas, fósforo para síntese de ATP e DNA, enxofre para síntese de algumas co-enzimas, cálcio para estabilização da parede celular e magnésio para estabilização dos ribossomos. Também necessitam de micronutrientes, como traços de ferro, níquel, cobalto, molibdênio e zinco, para a realização de funções metabólicas. Além disso, o controle das condições favoráveis de temperatura, pH, aeração e

agitação são fundamentais, pois estas variáveis também influenciam fortemente na atividade microbiana.

O processo de biodegradação baseia-se em reações de oxido-redução biológica, por meio de microorganismos, em presença de um aceptor de elétrons e nutrientes, capazes de decompor a matéria orgânica em substâncias mais simples.

A biodegradação pode ser dividida em três categorias: (a) mineralização, onde as substâncias químicas orgânicas são transformados em 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, 1982).

A biodegradação de um substrato orgânico particular pode ser obtida por microorganismos que estão: a) crescendo diretamente em função do substrato específico como única fonte de energia; b) crescendo sobre outro nutriente orgânico como fonte de carbono e energia, assim metabolizando o substrato de interesse ou não utilizando o substrato para o crescimento celular (ALEXANDER, 1994).

Segundo Arinbasarov *et al.* (1997), cerca de 20 espécies de microorganismos 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 microorganismos como fungos e protozoários também podem contribuir (WATANABE, 2001).

A transferência de elétrons é essencial para a respiração celular e libera a energia (ATP) necessária para funções vitais aos microorganismos. As bactérias aeróbicas utilizam oxigênio como aceptor de elétrons, produzindo gás carbônico e água, e as bactérias anaeróbicas utilizam outros compostos, como nitrato (NO_3^-), íon Fe^{3+} e sulfato (SO_4^{2-}), produzindo metano e água.

As características físico-químicas e estruturais da molécula contaminante, bem como as características físico-químicas do meio, tais como pH, temperatura, disponibilidade de água, luz e aceptores de elétrons, apresentam significativa influência na transformação e/ou quebra de um determinado composto.

A maioria dos microorganismos desenvolve-se melhor em uma estreita faixa de *pH*, nos valores próximos da neutralidade, isto é, de 6 a 8. A temperatura do meio é, também, outro importante fator para o crescimento e atividade dos microorganismos, pois o metabolismo da

população subterrânea acelera com o aumento da temperatura até um valor ótimo onde o crescimento é máximo. Muitas das bactérias presentes no meio subterrâneo operam mais eficientemente na faixa de 20 a 40°C e esta é a faixa de temperatura de muitos ambientes naturais (CHAPELLE, 1992, citado por CORDAZZO, 2000).

Portanto, o termo biodegradação 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 (WALTER & CRAWFORD, 1997 citado por MONTENEGRO, 2001).

2.4.2 Fontes de energia e carbono para as células microbianas

As bactérias se caracterizam por seu crescimento rápido, sua versatilidade metabólica, plasticidade genética e capacidade de adaptação rápida as variações ambientais. Como todos seres vivos, as células bacterianas necessitam basicamente de energia, carbono e nutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, etc). De uma maneira simplificada, os microorganismos 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). Dois tipos de catabolismo foram enfocados nesse trabalho, o catabolismo oxidativo (oxidação da matéria orgânica) e o catabolismo fermentativo (fermentação da matéria orgânica). No catabolismo oxidativo, ocorrem reações redox, na qual a matéria orgânica é oxidada por um agente oxidante (oxigênio, nitrato ou sulfato). Já no catabolismo fermentativo não há um oxidante, o processo ocorre devido ao rearranjo dos elétrons na molécula fermentada, de modo que são formados no mínimo dois produtos (VON SPERLING, 1996, GRADY *et al*, 1999).

2.4.3 Requisitos nutricionais

Os microorganismos retiram do meio ambiente todas as substâncias necessárias para a síntese de material celular e de obtenção de energia. As necessidades nutricionais dos microorganismos 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 microorganismos. 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.

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. Fórmulas amplamente utilizadas para caracterizar a fração orgânica das células bacterianas são (METCALF & EDDY, 1991, 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% do peso seco celular. 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 como a celulose e hemicelulose (METCALF & EDDY, 1991).

Nitrogênio: consiste de 10 a 15% do peso seco 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). 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).

Muitas substâncias servem como fonte de nitrogênio

(ALEXANDER, 1994):

a) fontes inorgânicas de nitrogênio: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , N_2 , etc.

b) fontes orgânicas de nitrogênio: aminoácidos e hidrolizados de proteínas naturais, peptídeos, uréia, 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 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). 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, fosfolípidos da membrana celular e no fornecimento de fosfatos para a geração de energia (ATP) (PELCZAR et al., 1997). 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 a adsorção à 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% do peso seco celular e entra na constituição dos aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína. As fontes inorgânicas de enxofre são tipicamente K_2SO_4 ou mais comumente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 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., 1997):

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 co-fator de várias enzimas.

Magnésio: é o co-fator 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 Cl^- , Na^+ , Ba_2^+ , Zn_2^+ , Mn_2^+ , CO_2^+ na composição elementar de muitos microorganismos e estão envolvidos em importantes etapas do metabolismo.

2.4.4 Microorganismos utilizados na biodegradação de compostos tóxicos

A habilidade de alguns microorganismos em utilizar compostos BTEX, como única fonte de carbono, foi estabelecida em 1908 quando STORMER isolou a bactéria *Bacillus hexavarbovorum* e verificou sua capacidade de crescer aerobicamente em tolueno e xileno (GIBSON & SUBRAMANIAN (1984) citado por ALVAREZ & HUNT, 2002). A capacidade de bactérias do solo metabolizar compostos aromáticos sob condições aeróbicas foi demonstrada em 1928 por GRAY & THORNTON, os quais relataram que em 146 das 245 amostras de solo contaminado, as bactérias foram capazes de metabolizar naftaleno, fenol e cresol.

Segundo DEL'ARCO (1999), produtos importados, constituídos por microorganismos liofilizados têm sido utilizados no Brasil para solucionar problemas causados por derramamentos de petróleo e derivados, com uma eficiência nem sempre satisfatória. A falta de especificidade destes microorganismos e a ausência de adaptação a fatores como temperatura, nutrientes e microbiota, são as causas da ineficiência. Logo, existe a necessidade de obter culturas microbianas capazes de degradar compostos tóxicos, sob condições físico-químicas e biológicas específicas, implementando processos que minimizem os impactos provocados pelos mesmos.

Inúmeros microorganismos são citados na literatura como sendo capazes de utilizar hidrocarbonetos aromáticos em seu metabolismo. A maioria é constituída por bactérias (DOURADO, 1998; MEYSAMI & BAHERI, 2003; NICHOLSON & FATHEPURE, 2004; SHIM *et al.*, 2005), havendo, também, actinomicetos, fungos e leveduras (YADAV & REDDY, 1993; PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2002; SANTOS &

LINARDI, 2004; RODRIGUES, 2006).

2.4.4.1 Utilização de cultura pura

Inúmeras culturas bacterianas puras têm sido relatadas por crescerem aerobicamente em compostos BTEX, como única fonte de carbono, incluindo gêneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Norcardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Ralstonia*, dentre outros. Estudos recentes também têm mostrado a habilidade de culturas puras, conhecidas como UC1 e PM1, ambos pertencentes ao grupo β -proteobacteria, em utilizar compostos tóxicos como BTEX, MTBE e TBA (DEEB *et al.*, 2001; PRUDEN, 2002).

O gênero *Acinetobacter* está amplamente citado na literatura como potencial assimilador de hidrocarbonetos de petróleo (CHAÎNEAU, *et al.*, 1999; GALLEGO *et al.*, 2001). DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) relataram a habilidade de *Rhodococcus rhodochrous* na biodegradação dos seis compostos BTEX.

Posteriormente, DEEB & ALVAREZ-COHEN (2000) isolaram *Rhodococcus sp.* RR1 e RR2 a partir de uma mistura de culturas, e as utilizaram na biodegradação dos compostos BTEX, observando a mineralização de cinco dos seis compostos BTEX em um amplo intervalo de concentrações. Mais adiante, JUNG & PARK (2004) mostraram a capacidade de *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 em degradar misturas de benzeno, tolueno e *m*-xileno, bem como os compostos individuais.

Gusmão (2005) identificou a presença de diferentes microorganismos, envolvidos com o processo de remoção do BTEX, presentes em biofilme em reator anaeróbico horizontal de leito fixo, entre os quais estão membros do gênero *Paracoccus*, *Bacteroides* e *Pseudomonas*. Os membros do gênero *Pseudomonas* são caracterizados por degradar centenas de compostos orgânicos diferentes, como hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas, inseticidas, herbicidas e plásticos. Além disso, diferentes espécies de *Pseudomonas*, tais como *aeruginosa*, *oleovorans*, *boropolis*, *putida*, foram utilizadas na investigação da cinética de crescimento microbiano em presença de BTEX (REARDON *et al.*, 2002; ABUHAMED *et al.*, 2004), nas interações entre os substratos BTEX (HAMED *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2007) e em estudos sobre a dinâmica da comunidade microbiana na presença de BTEX (SHIM & YANG, 1999).

A grande motivação de pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação é a busca por microorganismos versáteis capazes de degradarem, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional. Esforços relativos à modificação genética de bactérias (BERTONI *et al.*, 1996; APPLGATE *et al.*, 1998) têm sido desenvolvidos a fim de encontrarem microorganismos que incorporem caminhos metabólicos para mineralizar todos os seis compostos BTEX e suas misturas. A completa mineralização da mistura dos compostos BTX por *P. putida* é possível a partir modificações genéticas que combinam os caminhos TOD e TOL (LEE *et al.*, 1995a; LEE *et al.*, 1995b; OH & BARTHA, 1997).

Portanto, os avanços na engenharia genética têm proporcionado o direcionamento dos caminhos metabólicos, por meio do isolamento de genes de diferentes microorganismos, com a finalidade de construir microorganismos recombinantes capazes de codificar a degradação de uma variedade de compostos tóxicos com grande eficiência.

2.4.4.2. Utilização de mistura de culturas

Tendo em vista que uma única espécie microbiana dificilmente será capaz de realizar a mineralização de uma variedade de compostos tóxicos, metabolizando apenas frações restritas de substratos, a biodegradação de misturas complexas de hidrocarbonetos torna-se mais efetiva quando envolve a ação de culturas mistas capazes de catabolizar uma variedade de reações.

O crescimento de microrganismos em cultura pura é substancialmente diferente do crescimento em uma mistura de culturas, devido às diversas interações existentes entre as espécies. Estas interações podem intensificar (interações sinérgicas) ou inibir (interações antagônicas) a proliferação dos microorganismos (JO *et al.*, 2007). Em processos fermentativos, as interações antagônicas representam um mecanismo de controle de microorganismos patogênicos. Já em processos de biodegradação, as interações sinérgicas intensificam as taxas de degradação de compostos tóxicos.

Quando uma associação microbiana cresce em mistura de substratos, qualquer um dos substratos pode ser utilizado como fonte de carbono e energia, e portanto, vários caminhos metabólicos podem ser observados.

DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999, 2000) conduziram experimentos para testar a biodegradação dos compostos BTEX

utilizando-se uma associação microbiana originária de um aquífero contaminado por gasolina, no qual *Rhodococcus sp.* foi identificada como uma das culturas presentes no meio.

SHIM & YANG (1999) e SHIM *et al.* (2002) verificaram a biodegradação dos compostos BTEX por uma mistura de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* em um biorreator com leito de fibras. Esta mistura também foi utilizada por SHIM *et al.* (2005) com o objetivo de estudar a cinética de biodegradação dos compostos BTEX em condições aeróbicas, utilizando-se peróxido de hidrogênio, e em condições anaeróbicas com a utilização de nitrato.

REARDON *et al.* (2002) investigaram a habilidade da mistura de cultura *P. putida* F1 e *Burkholderia sp.* J150 em degradar os hidrocarbonetos aromáticos, benzeno, tolueno e fenol, individualmente e em mistura binária. Os autores concluíram que interações entre as duas espécies tiveram um impacto significativo na cinética de degradação dos substratos.

Recentemente, HEKMAT *et al.* (2006) desenvolveram uma modelagem matemática para representar a biodegradação de compostos orgânicos voláteis, utilizando múltiplos substratos e múltiplas espécies, no qual competição foram identificados como interações entre as espécies.

2.4.4.3 Curva de crescimento bacteriano

O termo crescimento bacteriano aplica-se ao aumento do número de microorganismos. O principal modo de reprodução das bactérias é por fissão binária, isto é, quando a célula atinge um determinado tamanho, divide-se em duas células, as quais irão posteriormente gerar quatro novas células, e assim por diante. Assim, após n divisões o número formado de células é 2^n . O tempo de geração bacteriano (tempo necessário para uma célula formar duas outras prontas para também se dividirem) varia entre os organismos e também depende das condições ambientais.

Na maioria das espécies dura entre 1 e 3 horas, porém podem ocorrer em 24 horas ou em apenas 20 minutos. Assim, ao se inocular um volume de líquido com certa quantidade inicial de células e uma quantidade limitada de substrato e nutriente, o número de bactérias progredirá segundo uma curva típica de crescimento bacteriano, ilustrada na Figura 2.3 (TORTORA *et al.*, 2000).

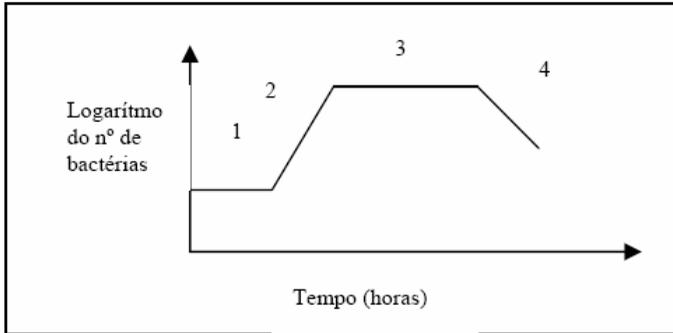


Figura 2.2 – Modelo de curva de crescimento: (1) Fase de aclimação, (2) Fase exponencial, (3) Fase estacionária e (4) Fase de declínio.

(Fonte: TORTORA *et al.*, 2000).

Fase de aclimação (1): (LAG) esta fase é um período de adaptação enzimática e não ocorre aumento do número de microrganismos. Na fase de aclimação ou fase “lag” a concentração dos microrganismos permanece constante, entendendo-se que o microrganismo está rearranjando seu sistema enzimático, a fim de dar início à metabolização do substrato proposto. Esta fase, não apresenta interesse do ponto de vista prático, pois tem sua duração dependente do meio e condições de cultivo empregadas para o preparo do inóculo. Desta forma, quanto mais aclimatado estiver o microrganismo às condições de cultivo que se pretende impor, menor será o tempo de duração desta fase.

Fase de aceleração (1-2): (LOG) nesta fase inicia-se o crescimento microbiano, inicia o consumo de substrato. A velocidade de crescimento aumenta com o tempo.

Fase exponencial (2): frente às condições adequadas de vida (substrato abundante). Os microrganismos crescem em velocidade máxima. Também chamada fase log. Neste as células se dividem numa taxa logarítmica constante, pois há excesso de substrato no meio. Nesta fase os microrganismos são particularmente sensíveis às mudanças ambientais.

Fase de desaceleração (2-3): a velocidade de crescimento passa a diminuir, uma vez que o substrato disponível começa a ficar escasso ou ainda pode ocorrer um acúmulo mais intenso de produtos que interfiram negativamente no crescimento.

Fase estacionária (3): a velocidade de crescimento dos microrganismos volta a ser nula, devido ao esgotamento dos substratos

ou ao acúmulo de substâncias tóxicas em níveis incompatíveis ao microorganismo. A população permanece constante por este período como resultado da completa cessação das divisões binárias ou por equilíbrio entre a taxa de reprodução e de mortalidade. (PELCZAR, 1996).

Fase de declínio (4): ocorre a diminuição do número de microrganismos (velocidade de crescimento negativa) causada pela sua morte. A redução da concentração celular pode ser em virtude do consumo das reservas alimentares intracelulares, ou mesmo em virtude de lise celular, com a conseqüente redução do número de células presentes. Vários fatores podem contribuir para a mortalidade bacteriana, mas os principais são falta de nutrientes essenciais e acúmulo de substâncias inibidoras (como ácidos).

2.5 Biofilmes

A definição mais usual de biofilme é o de uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido, constituída essencialmente por microrganismos, pelas substâncias poliméricas extracelulares que estes excretam e por água.

As células microbianas aderem firmemente a quase todas as superfícies imersas em solução aquosa. Estas células aderidas crescem, reproduzem-se e produzem substâncias poliméricas extracelulares, que se estendem para além da superfície das células, formando um emaranhado polimérico que envolve toda a biomassa aderida, assumindo o conjunto a designação de biofilme (CHARACKLIS E COOSEY, 1983; CHARACKLIS E WILDERER, 1989). Os biofilmes não são necessariamente uniformes quer no tempo quer no espaço, podendo englobar partículas sólidas (argilas, areias, produtos de corrosão e partículas orgânicas) provenientes do meio aquoso onde estão imersos (CHARACKLIS E MARSHALL, 1990; WIMPENNEY *et al.*, 1993).

Costerton *et al.* (1995) definiram biofilme como sendo uma população de bactérias aderidas umas às outras ou a uma superfície ou interface. Incluem-se nesta definição agregados ou flocos microbianos e populações aderidas a meios suportes.

De acordo com Xavier *et al.* (2003), citado por MELLO, 2007, biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos imobilizados conjuntamente numa matriz de substâncias poliméricas

extracelulares de origem microbiana; representam a parte majoritária de toda a vida microbiana, tanto em quantidade como em termos de atividade. Um biofilme forma-se em qualquer superfície sólida em contato com água não esterilizada.

2.5.1 Composição dos biofilmes

Os biofilmes são tipicamente constituídos por água, microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas.

A água é a fração mais significativa da massa total do biofilme, podendo variar entre 70 a 95% da massa total do biofilme (FLEMMING, 1993). Outros autores (CHRISTENSEN E CHARACKLIS, 1990; NEU, 1994; AZEREDO E OLIVEIRA, 2000), referem que a razão massa de água/massa de biofilme pode ser até próximo de 99% ou mesmo atingir valores superiores.

Os microrganismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume do biofilme, geralmente menos de 10%, embora estes excretem as substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca do biofilme. Segundo Flemming (1993), as substâncias poliméricas representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme.

Os biofilmes possuem uma enorme diversidade de espécies microbianas, em que os microrganismos freqüentemente encontrados são microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus (CHARACKLIS *et al.*, 1990), sendo, no entanto, devido à sua maior versatilidade e resistência, as bactérias os microrganismos predominantes. As bactérias devido às suas características como tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são de entre todos os microrganismos, consideradas como excelentes produtoras de biofilme (CHARACKLIS *et al.*, 1990).

A composição química das substâncias poliméricas extracelulares que constituem a matriz é muito complexa e heterogênea, sendo majoritariamente composta por polissacáridos (até 65%) (HORAN e ECCLES, 1986). No entanto, é responsável pela morfologia, estrutura, coesão, integridade funcional dos biofilmes, e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (FLEMMING e WINGENDER, 1999).

Os biofilmes que se encontram em ambientes naturais são de um

modo geral heterogêneos contendo mais do que um microambiente distinto. No mesmo biofilme podem ser encontrados estratos aeróbios e estratos anaeróbios (CHARACKLIS, 1990).

Os primeiros situam-se nas zonas mais superficiais do biofilme e os segundos nas mais profundas, junto ao suporte sobre o qual o biofilme se desenvolve. Esta estratificação deve-se à dificuldade de difusão do oxigênio presente na água através do biofilme, conjugado com o fato do oxigênio disponível ser logo consumido pelos microrganismos que compõem as camadas mais superficiais.

A espessura dos biofilmes varia com as condições do meio, composição química e hidrodinâmica, podendo encontrar-se desde películas muito finas (5 a 10 μm) em sistemas de águas purificadas, até algumas bastante espessas (5 a 10 mm) como nos circuitos de “águas brancas” da indústria do papel e da pasta de papel.

Assim, o modo de desenvolvimento em biofilme proporciona, aos microrganismos que o constituem, importantes benefícios, tais como:

- Aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme uma vez que a matriz polimérica favorece a adsorção de moléculas de nutrientes;
- Proteção contra fatores ambientais agressivos, como flutuações de pH, concentrações de sais, desidratação, forças de tensão de corte, substâncias químicas agressivas, bactericidas, antibióticos, predadores, bactérias líticas e metais pesados;
- Possibilidade de troca de material genético devido aos longos tempos de retenção dos microrganismos;
- Facilidade de desenvolvimento de microconsórcios que permitem o estabelecimento de relações de simbiose bem como a utilização de substratos de difícil degradação;
- Capacidade de estabelecer e colonizar nichos ecológicos (FLEMMING, 1991).

2.5.2 Importância do estudo dos biofilmes

Os biofilmes desempenham um papel importante na natureza e em processos tecnológicos. Do ponto de vista do interesse do homem podem ser benéficos ou prejudiciais, onde resulta a necessidade do seu estudo para poder desenvolver estratégias no sentido de melhorar as suas características, caso ele seja benéfico, ou para o eliminar ou inibir a sua formação, quando a sua ação é prejudicial.

Como exemplo de biofilmes benéficos temos aqueles que se

acumulam em ambientes naturais nos depósitos dos rios, lagos ou ambientes marinhos, e que se desenvolvem em associação com as raízes de algumas plantas fornecendo-lhes alguns nutrientes. São também biofilmes benéficos aqueles que são utilizados em biotecnologia ambiental com grande sucesso no tratamento de efluentes, removendo poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas. Na indústria alimentar os biofilmes apresentam inúmeras vantagens, podendo ser utilizados na produção de alimentos fermentados, como por exemplo, a produção de vinagre.

Infelizmente, nem sempre as potencialidades dos biofilmes constituem vantagens para o homem. Na maioria das situações, a adesão de microrganismos a superfícies sólidas é indesejável, pois, de uma maneira geral, está associada à deterioração das superfícies e/ou ambiente circundante. Nas ciências médicas, os biofilmes apresentam-se geralmente com um caráter nocivo uma vez que estão associados a um grande número de problemas de saúde, tais como infecções em tecidos, infecções do trato urinário, infecções e conseqüente rejeição de próteses e implantes e infecções da placa dentária, entre outras (COSTERTON *et al.*, 1995).

Na indústria, além de originar problemas de higiene, a acumulação de biofilmes pode provocar perdas de eficiência em permutadores de calor, perda de carga nas tubulações e aceleração da deterioração dos materiais (BRANDÃO, 2002).

Nos sistemas de distribuição de água potável, a formação de biofilme, e principalmente o seu desprendimento, constitui um fator de diminuição da qualidade da água (LECHEVALLIER E MCFETERS, 1985).

2.5.3 Formação de biofilmes

Os principais processos envolvidos na formação de um biofilme sobre uma superfície sólida em contato com um meio líquido são (Figura 2.4):

- (1) Adsorção de substâncias orgânicas dissolvidas a uma superfície sólida em contacto com um meio aquoso, formando-se um “filme condicionador”;
- (2) Transporte de microrganismos e outras partículas do meio aquoso para a superfície sólida condicionada;
- (3) Adesão firme dos microrganismos à superfície;

- (4) Transporte de nutrientes da fase líquida para a interface líquido-biofilme, bem como no interior do filme microbiano;
- (5) Produção de biofilme devido ao consumo dos nutrientes, conseqüente crescimento e reprodução dos microrganismos aderidos e síntese de polímeros extracelulares;
- (6) Transporte de subprodutos do biofilme para o exterior;
- (7) Desprendimento de porções de biofilme devido a fenômenos de erosão superficial ou descolamento súbito (“sloughing off”).

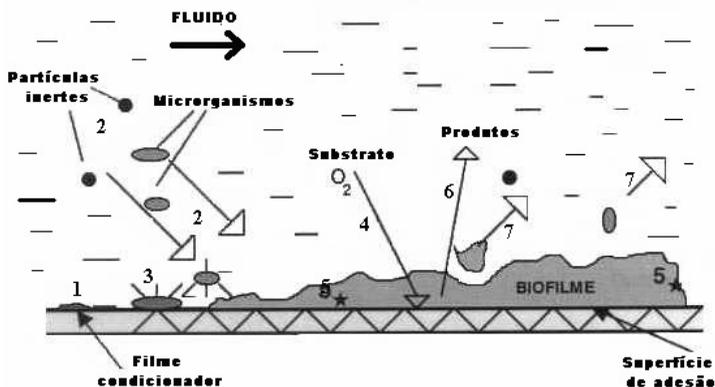


Figura 2.3 - Principais processos envolvidos na formação de um biofilme.

Cada um dos processos referidos contribui para o aumento (processos de deposição ou ganho) ou para a diminuição (processos de remoção, desprendimento ou perda) da quantidade de biomassa acumulada numa determinada superfície sólida, sendo o desenvolvimento de biofilme intimamente dependente, em cada instante do balanço entre os ganhos e as perdas de biomassa (GJALTEMA, 1996).

Entre os processos que mais contribuem para o aumento da quantidade de biofilme tem-se a adesão de células microbianas à superfície sólida, o seu crescimento e reprodução e a adesão de células suspensas ao biofilme (BRYERS, 1983). O desprendimento de biofilme, a respiração endógena, a morte celular, a lise celular e o ataque por predadores são os principais fenômenos responsáveis pela diminuição da quantidade de biofilme.

De acordo com Bott (1993), a acumulação de biofilme é um processo natural, que ocorre segundo um padrão sigmoidal (Figura 2.5), como resultado de um balanço entre vários processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem em simultâneo.

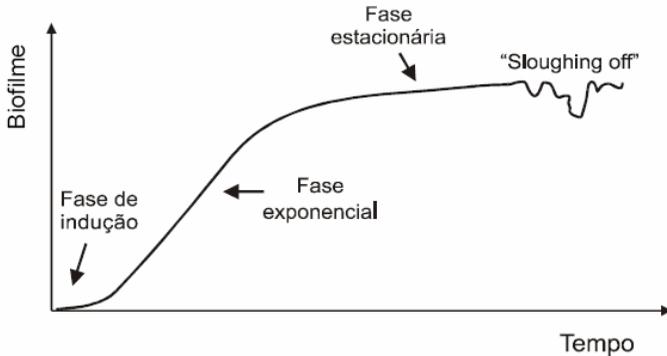


Figura 2.4 - Acumulação de biofilme ao longo do tempo (Pereira, 2001).

A adesão de microrganismos a superfícies depende das propriedades superficiais dos suportes de adesão e dos microrganismos envolvidos na adesão (potencial zeta e hidrofobicidade), das propriedades microbiológicas dos microrganismos (exopolímeros ou estruturas extracelulares) e das propriedades do meio aquoso (presença de substâncias que podem condicionar as superfícies, pH, temperatura, velocidade de escoamento, tempo de exposição, concentração de microrganismos, potencial zeta e força iônica do meio) (BERGAMASCO, 1996; BRANDÃO, 2002; XAVIER *et al.*, 2003). Fatores como densidade, rugosidade, porosidade, tamanho dos poros e forma da superfície também afetam a estrutura do biofilme e a velocidade de colonização microbiana no suporte (BERGAMASCO, 1996; ORTEGA *et al.*, 2001; VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1995, citado em BRANDÃO (2002).

A porosidade da superfície sólida contribui para o aumento da adesão devido à maior área superficial disponível (XAVIER *et al.*, 2003). Van Loodrecht *et al.* (1995), citado por BRANDÃO (2002), consideram a rugosidade o mais importante, porque ela aumenta a superfície de fixação e protege do desprendimento provocado por cisalhamento, de modo a manter os microrganismos na superfície o tempo necessário para ocorrer a adesão irreversível, possibilitando a formação do biofilme.

A biomassa de uma população bacteriana tem sido reconhecida como um importante parâmetro em relação à ecologia microbiana, cinéticas e estimativas de taxas respiratórias ou energéticas. A contagem destes microrganismos é frequentemente requerida quando se deseja estimar a produtividade de um sistema, a produção da biomassa ou o

potencial de utilização do substrato. Uma técnica que está sendo muito utilizado na contagem da biomassa é a quantificação de proteínas.

Existem vários métodos para quantificação de proteínas: método do Biureto, método *Bradford*, método *BCA* (método usando ácido bicinonínico) e o método de *Lowry*. No geral, os métodos de determinação de concentração de proteínas baseiam-se em métodos calorimétricos, ou seja, a concentração de proteína é estimada através da leitura espectrofotométrica de um produto corado (MELLO,2007).

O método de *Bradford* baseia-se no fato de, em condições ácidas, o pico de absorção do azul de Coomassie G-250 passar de $\lambda=465$ nm para $\lambda=595$ nm quando este corante se liga tanto a grupos hidrófobos como iônicos dos resíduos de aminoácidos das cadeias polipeptídicas (BRADFORD, 1976). Por outro lado, o método *BCA* baseia-se no fato de, em condições alcalinas, o Cu(II) ser reduzido a Cu(I) em presença das cadeias polipeptídicas e de ácido bicinonínico (*BCA*, de *bicinchoninic acid*). O método do Biureto corresponde à reação das ligações peptídicas com o íon Cu^{2+} em condições alcalinas. *Lowry et al.* (1951) melhoram o método do Biureto, adicionando uma segunda reação: a reação do reagente de Folin-Ciocalteu, o qual contém, na sua composição, ácido molibdato-tungstênico. Este complexo iônico é reduzido pelas cadeias polipeptídicas contendo resíduos de triptofano e tirosina, dando lugar à formação de um produto corado e cuja concentração pode ser estimada espectrofotometricamente a um comprimento de onda (λ) igual a 750 nm.

Herzberg et al. (2005) avaliaram a atividade biológica de biofilmes aderidos em partículas de carvão ativado e não ativado em reatores de leito fluidizado. A concentração de proteínas foi determinada pelo Método de *Bradford*, para quantificar a biomassa presente nas partículas de carvão.

Bertin et al. (2004) investigaram o desempenho e as características microbiológicas de um reator de leito fixo usado para tratar efluente de uma fábrica de azeitonas. O suporte utilizado para imobilizar a biomassa foi partículas de carvão ativado. Quantificaram a biomassa através do Método de *Lowry*.

Bergamasco (1996) estudou três tipos suportes poliméricos na adesão microbiana, para tratamento aeróbio de efluente sintético em um reator de leito fluidizado trifásico. Os suportes passaram por um tratamento ácido para melhorar a adesão microbiana e o desempenho do processo de tratamento biológico. Para quantificar a biomassa presente no suporte, foi utilizado o Método de *Lowry*.

Bertin *et al.* (2004) e Bergamasco (1996) realizaram a extração da proteína do biofilme com hidróxido de sódio para posteriormente quantificá-la.

2.6 Biorreatores

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

Os biorreatores com biomassa em suspensão são aqueles em que os microrganismos se encontram dispersos no meio. De acordo com Brandão (2002), é necessário no final do processo que os microrganismos 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 microrganismos ficam aderidos, pode ser fixo ou móvel. Nos processos com suporte fixo, os microrganismos 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 microrganismos 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 identificação dos microrganismos do biofilme é de suma importância para o aprimoramento de reatores. Conhecendo-se estes microrganismos, pode-se obter importantes informações a respeito dos

aspectos ecológicos, fisiológicos e genéticos ligados a biodegradação, que vão auxiliar para o alcance de melhores eficiências dos processos de remoção nos reatores.

De acordo com Cohen (2001), na degradação de poluentes, os reatores biológicos com biomassa imobilizada apresentam inúmeras vantagens frente aos reatores operados com biomassa suspensa devido à elevada concentração de biomassa, elevada atividade metabólica atribuída à alta concentração de nutrientes aderidos ao biofilme e às diferentes interações entre espécies microbianas, e resistência à toxicidade, principalmente, devido ao efeito protetor da matriz extracelular (barreira de difusão) que pode reduzir a concentração de substâncias tóxicas no biofilme.

Segundo Odegaard *et al.* (1994), os sistemas com biomassa imobilizada apresentam as seguintes vantagens sobre os processos com lodo ativado em suspensão: a planta para o tratamento pode ser mais compacta devido à disponibilidade de maior área de superfície específica; não é necessário retornar o lodo ao reator biológico; coexistência da atividade metabólica anóxica e aeróbia dentro do mesmo ecossistema de biomassa; e menor sensibilidade aos efeitos de envenenamento (tóxicos), bem como a outras condições.

A configuração do reator anaeróbio horizontal de leito fixo, com biomassa imobilizada em matriz de poliuretano, foi estudada e proposta por Zaiat *et al.* (1997). Os autores verificaram que esta configuração apresentava bom desempenho com grande estabilidade do processo devido à capacidade de trabalhar com elevados tempos de retenção celular quando operados com baixos tempos de detenção hidráulica.

A partir deste estudo, outros trabalhos foram realizados nesta configuração de reator, especialmente relacionados com o tratamento de compostos tóxicos como o BTEX (RIBEIRO, 2005).

Os estudos desenvolvidos por Ribeiro (2005) demonstraram a viabilidade técnica da aplicação do RAHLF sob condições metanogênicas. O autor verificou remoção de 99% da matéria orgânica e em torno de 95% dos BTX, as quais foram verificadas as seguintes concentrações no efluente (benzeno - $0,62 \pm 0,41$ mg/L; tolueno - $0,71 \pm 0,46$ mg/L; meta-xileno - $0,28 \pm 0,19$ mg/L). O autor também verificou que os valores estimados para as constantes cinéticas, considerando modelo cinético de primeira ordem, com residual para a remoção dos BTX, foram muitos superiores, cerca de cem vezes maiores do que os encontrados na literatura.

Jou & Huang (2003) estudaram a degradação de efluentes de uma refinaria de petróleo usando um biorreator com biomassa fixa. O

biorreator foi empacotado com espuma de poliuretano altamente porosa para o crescimento microbiano. O sistema foi mantido aerado para fornecer oxigênio necessário ao crescimento. Os autores compararam a degradação com lodo ativado e concluíram que a degradação dos resíduos foi maior para o sistema com biofilme. Com lodo ativado, a remoção de 50 a 60% se dava em 25 horas, enquanto que com biofilme, em 8 horas, a remoção foi de 85 a 90%. O resultado também mostrou que mais de 85 % da DQO foi degradada em 2 horas.

Nardi *et al.* (2002) analisaram o desempenho na degradação de BTEX na presença de etanol e LAS (*linear alkylbenzene sulphonate*) em um biorreator anaeróbio com biomassa imobilizada com fluxo horizontal. O reator foi empacotado com espuma de poliuretano para crescimento da biomassa. Foi avaliada também, a capacidade de adsorção de BTEX na espuma de poliuretano, apresentando valores baixos, o que permitiu concluir que a biodegradação foi o principal fenômeno responsável pelo bom desempenho do reator, que obteve a quase completa biodegradação dos compostos BTEX na presença de um co-solvente.

Voice *et al.* (1992) citado por MELLO 2007, compararam a remoção dos compostos BTX em três sistemas de reatores de leito fluidizado: remoção apenas por adsorção, remoção por adsorção e biodegradação e apenas biodegradação. Usaram como suporte e material adsorvente partículas de carvão ativado e não ativado para o caso onde ocorre apenas a biodegradação. Através da análise de microscopia de varredura, os autores observaram que envolto na partícula do carvão ativado havia uma completa e espessa camada de biofilme. Obtiveram como resultado que o processo combinado (adsorção mais biodegradação) foi o que apresentou melhor resultado na remoção dos compostos BTX, apresentando maior estabilidade no sistema.

Shim & Yang (1999) desenvolveram um biorreator contendo biomassa imobilizada em uma matriz fibrosa em condições hipóxicas, para degradar os compostos BTEX. As cinéticas de biodegradação foram obtidas em batelada com células em suspensão e posteriormente no biorreator de leito fibroso. Os autores mostraram que a taxa de biodegradação é de 9 a 75 vezes mais alta para as células imobilizadas; quando comparada com a de células em suspensão, aquelas toleram concentrações mais altas dos compostos BTEX. O resultado foi a completa degradação dos compostos sobre baixa quantidade de oxigênio.

Vários outros trabalhos foram publicados com o objetivo de mostrar a eficiência do tratamento de efluentes usando reatores com

biomassa aderida. Entre eles pode-se citar brevemente, Gusmão *et al.* (2006) que estudaram a remoção dos compostos BTEX e etanol sob condições desnitrificantes em um biorreator anaeróbio com biomassa imobilizada e fluxo horizontal, utilizaram como suporte espuma de poliuretano e obtiveram bom resultados, com uma eficiência de 99 % para remoção do benzeno e tolueno e 76 % para o m-xileno e etilbenzeno.

2.6.1 Biorreatores com Biomassa Aderida

A aplicação de processos com biomassa fixa (biofilme) na área de tratamento de efluentes está se tornando cada vez mais popular, devido às suas vantagens com relação aos processos tradicionais. 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; NARDI *et al.*, 2005; HSIEN & LIN, 2005).

Abaixo 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.

2.6.2 Biorreatores com Biomassa em Suspensão

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).

CAPÍTULO III

MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADAÇÃO

Neste capítulo será apresentada uma revisão e análise da literatura, abordando os principais trabalhos relacionados à biodegradação de compostos BTX, além de modelos cinéticos de crescimento microbiano adotados para descrever a biodegradação. Também será apresentada a metodologia adotada, além de alguns conceitos fundamentais para a compreensão de processos de biodegradação.

3.1 Avaliação da biodegradação dos compostos BTX

Os estudos sobre a biodegradação de compostos tóxicos vêm sendo realizados intensamente por vários pesquisadores. A biodegradação dos compostos BTX tem sido extensamente estudada, tanto no solo e águas subterrâneas (MORGAN *et al.*, 1993; TSAO *et al.*, 1998; NAKHLA, 2003; MAK *et al.*, 2006), quanto em biorreatores (CHOI *et al.*, 1992; deNARDI, 2002; SHIM *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 2002; PRUDEN *et al.*, 2003; GUSMÃO *et al.*, 2006; deNARDI *et al.*, 2007; MELLO, 2007).

O conhecimento da cinética de crescimento microbiano em compostos tóxicos e das relações entre múltiplos substratos presentes no meio são fundamentais para a otimização e alcance de processos mais eficientes. Além disso, a identificação das interações presentes na degradação de misturas de substratos pode contribuir para o entendimento das razões que levam, por exemplo, um composto BTX resistir à biodegradação, enquanto outros são mais facilmente consumidos.

Os primeiros relatos sobre a biodegradação dos compostos BTX envolviam apenas o benzeno, o tolueno e um dos isômeros do xileno.

ARVIN *et al.* (1989) relataram a biodegradação aeróbica do benzeno, na presença de outros compostos aromáticos, utilizando duas associações microbianas. A biodegradação do benzeno foi estimulada pela presença de ambos os substratos, tolueno e *orto*-xileno, em mistura binária. Entretanto, quando tolueno e *orto*-xileno estiveram juntamente presentes com benzeno, um efeito contrário foi observado. As principais razões que levam a estes efeitos de interação durante a biodegradação

dos compostos BTX podem ser atribuídas a inibição competitiva (CHANG *et al.*, 1993; OH *et al.*, 1994; BIELEFELDT & STENSEL, 1999a,b), toxicidade (HAIGLER *et al.*, 1992) e formação de intermediários tóxicos por enzimas não específicas (WANG & LOH, 1999), além de indução enzimática (DEEB *et al.*, 2001) e repressão catabólica (NARANG, 2006).

ALVAREZ & VOGEL (1991) mediram as taxas de biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e *para*-xileno, individualmente e em misturas binária e ternária, 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. Em mistura de culturas, a presença do tolueno intensificou a taxa de degradação do *para*-xileno, porém, diminuiu drasticamente quando o tolueno foi completamente degradado. Este fenômeno é explicado pelo processo de degradação cometabólica do *para*-xileno. Em *Pseudomonas*, a presença do tolueno foi fundamental para a degradação do *para*-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 microorganismos capazes de degradar o benzeno e *para*-xileno. É possível também que o tolueno tenha provocado uma indução enzimática, sugerindo que *Pseudomonas sp.* cepa CFS-215 pode utilizar a mesma enzima para catalisar a degradação do tolueno e do benzeno. A degradação do tolueno ocorreu mais rapidamente quando esteve sozinho do que quando esteve junto com benzeno e/ou *para*-xileno, sugerindo a hipótese de que estes substratos utilizam-se da mesma enzima, isto é, da mesma rota metabólica, e assim ocorram efeitos de inibição competitiva. Por outro lado, *Arthrobacter* foi incapaz de degradar tolueno e *para*-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 *para*-xileno, sugerindo que efeitos de inibição competitiva tenham ocorrido.

CHANG *et al.* (1993) avaliaram os parâmetros cinéticos de Monod ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_s) na biodegradação do benzeno, tolueno e *para*-xileno, por duas culturas puras de *Pseudomonas* B1 e X1. Os experimentos conduzidos com cada substrato individualmente, possibilitaram a avaliação da cinética de degradação e medição dos parâmetros ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_s). Os resultados mostraram que *Pseudomonas* B1 utiliza o benzeno e

o tolueno, mas não o *para*-xileno, e *Pseudomonas* X1 é capaz de degradar o tolueno e o *para*-xileno, mas não o benzeno, sugerindo que *P. B1* utiliza o caminho TOD (enzima tolueno dioxigenase), enquanto *P. X1* utiliza o caminho TOL (enzima tolueno mono-oxigenase). Os autores realizaram a avaliação da biodegradação, predizendo os efeitos de inibição competitiva (BAILEY & OLLIS, 1986) entre dois substratos. Observaram que a presença do tolueno resultou inibição competitiva do benzeno e degradação cometabólica do *para*-xileno. As taxas de biodegradação da mistura benzeno-tolueno foram muito menores que as respectivas taxas de biodegradação individual. Os valores das constantes de inibição do benzeno (Ki_b) e tolueno (Ki_t) foram determinados pelo ajuste do modelo, onde verificaram serem equivalentes aos valores das constantes de saturação (Ks_b e Ks_t), respectivamente.

$$\frac{dS_b}{dt} = - \frac{\mu_{máx_b} \cdot S_b}{Ks_b + S_b + \frac{Ks_b}{Ki_t} \cdot S_t} \cdot X \cdot Y_{x/sb} \quad (3.1)$$

Sendo:

$\mu_{máx_b}$ velocidade máxima de crescimento específico no benzeno;

Ks_b constante de saturação do benzeno;

Ki_t constante de inibição do tolueno;

$Y_{x/sb}$ fator de conversão de benzeno em células;

X concentração de células;

S_b concentração do benzeno;

S_t concentração do tolueno.

Assim, nas condições experimentais avaliadas por CHANG *et al.* (1993) os parâmetros cinéticos do modelo de inibição competitiva podem ser obtidos a partir de experimentos da biodegradação individual dos substratos.

A continuação desta linha de pesquisa envolvendo três substratos foi feita por OH *et al.* (1994). Os autores estudaram os efeitos de interação entre benzeno, tolueno e *para*-xileno, utilizando uma associação microbiana e uma cultura pura de *Pseudomonas putida* O1. Além disso, conduziram os experimentos para avaliar as taxas de

biodegradação de cada substrato individualmente e em misturas, a fim de obter a diferença quantitativa da fisiologia microbiana entre os dois casos. Os autores determinaram os valores dos parâmetros de Monod ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_s e $Y_{x/s}$) para a biodegradação do benzeno; utilizaram o modelo de Andrews no ajuste aos dados da biodegradação do tolueno e mostraram que o *para*-xileno não pôde ser utilizado como substrato por nenhuma das culturas. A biodegradação parcial do *para*-xileno ocorreu somente na presença do benzeno ou tolueno, sugerindo o fenômeno de cometabolismo. Os experimentos em misturas de substratos foram realizados com a mistura binária de benzeno-tolueno, e um modelo de inibição (BAILEY & OLLIS, 1986), dado pela equação 3.2, ajustou-se aos dados experimentais, resultando duas constantes de inibição (K_{bt} e K_{tb}). Neste caso, as taxas de biodegradação da mistura de substratos, não puderam ser avaliadas por meio de parâmetros cinéticos da biodegradação dos compostos individuais. Os parâmetros de inibição entre os dois substratos foram determinados a partir de um modelo de regressão não-linear, e os resultados mostraram que K_{bt} e K_{tb} são diferentes das razões $\frac{K_{s_b}}{K_{i_t}}$ e $\frac{K_{s_t}}{K_{i_b}}$ respectivamente. Logo, o modelo de

inibição adotado por Oh *et al.* (1994) é diferente do modelo de inibição utilizado por Chang *et al.* (1993). Portanto, seus parâmetros cinéticos não podem ser obtidos por meio dos experimentos da biodegradação individual dos substratos.

$$\frac{dS_b}{dt} = - \frac{\mu_{m\acute{a}x_b} \cdot S_b}{K_{s_b} + S_b + K_{s_{bt}} \cdot S_t} \cdot \frac{X}{Y_{x/sb}} \quad (3.2)$$

Sendo:

$\mu_{m\acute{a}x_b}$ velocidade máxima de crescimento específico no benzeno;

K_{bt} constante de inibição do benzeno sobre o tolueno;

K_{s_b} constante de saturação do benzeno;

$Y_{x/sb}$ fator de conversão de benzeno em células;

X concentração de células;

S_b concentração do benzeno;

S_t concentração do tolueno.

Bielefeldt & Stensel (1999a) foram os primeiros a relatarem a

avaliação quantitativa da biodegradação de uma mistura de cinco substratos (BTEoXpX). Os experimentos foram conduzidos com mistura de culturas em testes batelada para determinar como a presença de múltiplos substratos poderia afetar a fisiologia microbiana, e consequentemente às taxas de biodegradação quando comparados às taxas de biodegradação dos substratos individuais. Deste modo, a cinética de degradação de compostos individuais foi comparada à cinética de degradação de compostos múltiplos. As taxas de biodegradação dos substratos benzeno, tolueno, etilbenzeno, *orto-para-xilenos* em misturas foram preditas através do modelo de inibição competitiva (BAILEY & OLLIS, 1986), e os autores concluíram que possivelmente efeitos de inibição competitiva na mistura dos cinco substratos estiveram presentes. As taxas de degradação dos compostos individuais foram preditas através do modelo de Monod e os parâmetros cinéticos ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_s) foram determinados para cada composto. Os resultados das taxas de degradação mostraram que a cultura degradou os componentes mais rapidamente quando estiveram presentes sozinhos do que quando estiveram presentes em misturas. Os autores relacionaram o modelo de Monod e o modelo de inibição competitiva determinando um modelo simplificado, assumindo que a constante de inibição de cada substrato é equivalente a sua constante de saturação ($K_i \approx K_s$), e que a concentração inicial do substrato é muito maior que K_s . Este modelo simplificado relaciona a taxa de biodegradação de um componente da mistura com a taxa de biodegradação individual do mesmo, por meio da equação 3.3.

$$\frac{dS_i^{mistura} / dt}{dS_i / dt} = \frac{S_i}{\sum S_{BTEX}} \quad (3.3)$$

Assim, a taxa de biodegradação de um composto na presença de múltiplos substratos, nas condições avaliadas por BIELEFELDT & STENSEL (1999a), pode ser apresentada com parâmetros cinéticos da biodegradação individual dos substratos e na proporção de sua concentração na mistura. O estudo mostra que tanto o modelo simplificado quanto o modelo de inibição competitiva se ajustou bem aos dados experimentais do processo de biodegradação dos compostos BTEX.

Recentemente, Abuhamed *et al.* (2004) investigaram a possibilidade da biodegradação do benzeno, tolueno e fenol, em elevadas concentrações iniciais, e estudaram a cinética de crescimento

de *Pseudomonas putida* F1 (ATCC700007) durante a biodegradação aeróbica individual dos substratos, bem como em misturas, determinando as interações entre os substratos. Para a biodegradação de um único substrato, o modelo de Andrews foi usado para descrever a taxa de crescimento específico, possibilitando a determinação dos parâmetros cinéticos ($\mu_{máx}$, Ks e $Y_{x/s}$). Para as misturas benzeno-tolueno, benzeno-fenol e tolueno-fenol, um modelo de soma cinética, dado pela equação 3.4, similar ao modelo proposto por YOON *et al.* (1977) citado por REARDON *et al.* (2000), foi usado e os parâmetros de interação entre os substratos (I_{ij}) foram determinados.

$$\mu = \frac{\mu_{máx_1} \cdot S_1}{Ks_1 + S_1 + \frac{S_1^2}{Ki_1} + I_{21} \cdot S_2} + \frac{\mu_{máx_2} \cdot S_2}{Ks_2 + S_2 + \frac{S_2^2}{Ki_2} + I_{12} \cdot S_1} \quad (3.4)$$

Sendo:

- μ velocidade de crescimento específico;
- $\mu_{máx1}$, $\mu_{máx2}$ velocidade máxima de crescimento específico nos substratos 1 e 2;
- S_1 , S_2 concentração dos substratos 1 e 2;
- Ks_1 , Ks_2 constante de saturação dos substratos 1 e 2;
- I_{21} grau de inibição do substrato 2 sobre o substrato 1;
- I_{12} grau de inibição do substrato 1 sobre o substrato 2.

O parâmetro I_{ij} indica o grau que o substrato “i” afeta a biodegradação do substrato “j”. Os parâmetros cinéticos ($\mu_{máx}$, Ks e $Y_{x/s}$) utilizados nesta equação são os mesmos obtidos a partir do modelo de Andrews para biodegradação individual do substrato. Os resultados mostraram que o tolueno inibiu a biodegradação do benzeno e o fenol inibiu a biodegradação do tolueno e benzeno. Por outro lado, a presença do benzeno ou tolueno intensificou a biodegradação do fenol. As células de *Pseudomonas putida* F1 foram adaptadas em 30 mg L⁻¹ de tolueno ou benzeno. Observou-se que a biodegradação do benzeno ou tolueno, em concentrações de 15, 30 e 90 mg L⁻¹, ocorreu mais rapidamente em células adaptadas do que em células não adaptadas. O tempo de

biodegradação do benzeno, por exemplo, decresceu de 24 horas para 6 horas. Nenhum efeito significativo foi observado na biodegradação do fenol, utilizando células adaptadas no fenol. Contudo, a utilização de células adaptadas no benzeno ou tolueno diminuiu o tempo de degradação de 50 mg L^{-1} de fenol, de 90 para 18 horas.

Outra linha de pesquisa fundamental para a busca de tecnologias eficientes no tratamento e preservação do meio ambiente consiste na obtenção de informações e compreensão dos efeitos da biodegradação dos compostos tóxicos BTEX na presença de MTBE (metil terc butil éter). A condução de experimentos e o projeto de biorreatores que operam com ambos os compostos (NA *et al.*, 2002; SEDRAN, 2004; LIN *et al.*, 2007) não é uma tarefa fácil devido à complexidade do sistema, mas é crucial para o desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento e tem sido investigado em diversos estudos.

DEEB & ALVAREZ-COHEN (2000) quantificaram o impacto que interações entre os substratos BTEX provocam em suas taxas de biodegradação, investigando, além disso, os efeitos da presença do MTBE. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se uma mistura de cultura derivada de um aquífero contaminado por gasolina, e duas culturas puras identificadas como *Rhodococcus rhodochrous* e *Rhodococcus bronchialis*. As três culturas foram capazes de biotransformar completamente os compostos BTEX individualmente e em misturas, em um grande intervalo de concentrações. Em uma concentração de 40 mg L^{-1} , a biodegradação de cada composto, individualmente, seguiu a ordem: tolueno, benzeno, etilbenzeno, *orto-para-meta*-xileno. Durante a biodegradação das misturas binárias dos compostos BTEX, a presença do etilbenzeno provocou um efeito inibitório nas biodegradações do benzeno, tolueno e xilenos, ao passo que, a presença desses compostos em mistura binária com o etilbenzeno proporcionou efeitos desprezíveis na biodegradação do etilbenzeno (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999). Os autores sugerem que o tolueno e o etilbenzeno são degradados pelo mesmo caminho metabólico, ou seja, *Rhodococcus sp.* RR1 utiliza-se da mesma enzima para metabolizar ambos os substratos; o mesmo resultado encontrado pelos autores em 1999. A biodegradação cometabólica dos xilenos, neste estudo, é consistente com os relatos de ALVAREZ & VOGEL (1991), CHANG *et al.* (1993) e OH *et al.* (1994). Apesar da presença do etilbenzeno afetar negativamente a biodegradação do BTX, isto 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 atribuída à presença de diferentes

espécies microbianas, possibilitando a utilização de diversos caminhos metabólicos, e aos efeitos de interações entre as espécies. Quanto à presença do MTBE, nenhuma das culturas foi capaz de crescer no MTBE. Os autores concluíram que este composto não afetou as taxas de biodegradação dos compostos BTEX.

A biodegradação aeróbica e anaeróbica do BTEX, com relação à presença de etanol, tem sido bastante investigada no Brasil (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996b; CORSEUIL *et al.*, 1998; CORSEUIL & FERNANDES, 1999; LOVANH *et al.*, 2002; KAIPPER, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2005; NUNES & CORSEUIL, 2005).

Os estudos de Corseuil *et al.* (1998) demonstraram que, em condições aeróbicas, o etanol retarda a biodegradação dos compostos BTEX, devido à utilização preferencial de etanol pelos microorganismos. Malamud *et al.* (2005) também observaram que o etanol foi o primeiro contaminante a ser biodegradado e os compostos BTEX apresentaram decréscimo de massa significativo somente após o desaparecimento do etanol, evidenciando a biodegradação preferencial do etanol em relação aos compostos BTEX.

Quando a biodegradação ocorre na presença de múltiplos substratos, a descrição quantitativa dos efeitos biocinéticos de interações devem seguir modelos mais elaborados, como os modelos de inibição incompetitiva, não-competitiva (SEGEL, 1975 citado por REARDON *et al.*, 2000) e competitiva (YOON *et al.*, 1977 citado por REARDON *et al.*, 2000). Yoon *et al.* (1977) também propuseram o modelo *SKIP* (citado por REARDON *et al.*, 2000) que incorpora parâmetros de interação entre os substratos, mas não qualifica o tipo de interação presente. Contudo, estes modelos também falham ao descrever complexos mecanismos de regulação interna.

A avaliação cinética utilizando modelos não-estruturados, como os clássicos modelos de Monod e Andrews e os modelos utilizados para descrever o crescimento microbiano em múltiplos substratos (SEGEL, 1975; YOON *et al.*, 1977), parte da hipótese de que os dados experimentais são baseados somente na fisiologia microbiana, e apesar de serem inadequados para descrever os mecanismos complexos de regulação interna, são fundamentais para o entendimento da cinética no nível da população microbiana.

Segundo Narang (2006), o fenômeno de crescimento microbiano em múltiplos substratos é um exemplo de mecanismos pelos quais as expressões de genes são controladas. Além da presença de substratos concorrentes, também se deve considerar o efeito de intermediários metabólicos produzidos, os quais podem prejudicar a biodegradação dos

contaminantes. Os subprodutos metabólicos podem ser tóxicos aos microorganismos ou podem ser degradados preferencialmente aos contaminantes. Avaliar a relação entre o acúmulo de subprodutos metabólicos e a cinética de biodegradação é muito importante para o melhor entendimento do processo.

Logo, a pesquisa na área da avaliação cinética de utilização de múltiplos substratos é uma tentativa de incorporar o conhecimento sobre caminhos metabólicos aos balanços de componentes mensuráveis no nível da população. Os primeiros modelos não-estruturados, como o modelo de Monod, são tentativas de descrever a fisiologia microbiana no nível da população, quando o substrato é limitante. No ambiente em que existem misturas de vários substratos é fundamental compreender como ocorre a regulação gênica e a adaptação dos microorganismos, as quais promovem uma seqüência de utilização preferencial dos substratos.

Portanto, o mais importante é saber como unificar os processos no nível molecular (controle interno) com processos no nível da população (fisiologia microbiana). Para isso, o futuro da área da modelagem e desenvolvimento de modelos estruturados depende de métodos analíticos disponíveis para determinar os intermediários metabólicos e a atividade enzimática envolvidos nos caminhos metabólicos do processo de biodegradação. Todas estas informações devem ser conhecidas para, então, serem utilizadas na otimização e controle de processos de biodegradação de compostos tóxicos utilizando modelos estruturados.

3.2 Modelos cinéticos de crescimento microbiano

3.2.1 Classificação dos modelos cinéticos

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.

3.2.2 Velocidade de crescimento específico

A equação cinética para um substrato “*i*” descreve a influência de sua concentração e de outros compostos (inibidores ou ativadores) na velocidade de crescimento específico μ_{x_i} . A velocidade 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 velocidade de crescimento específico é função do modelo cinético, além do microorganismo. Quando a biodegradação ocorre na presença de múltiplos substratos, a velocidade de crescimento específico celular pode ser apresentada por meio da forma aditiva (equação 3.5) e da forma multiplicativa (equação 3.6):

$$\mu_x = \sum_{i=1}^n \mu_{x_i} \quad (3.5)$$

$$\mu_x = \prod_{i=1}^n \mu_{x_i} \quad (3.6)$$

Dentre os modelos cinéticos não-estruturados tem-se o clássico modelo de Monod (1942) citado por Reardon *et al.* (2000), 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 3.1 e 3.2 apresentam alguns modelos não-estruturados para o crescimento celular em único substrato e múltiplos substratos, respectivamente.

3.2.3 Modelo para único substrato

3.2.3.1. 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.

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 velocidade 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 3.1, relaciona a velocidade 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 velocidade de crescimento específico é igual à metade do seu valor máximo, e indica especialmente a afinidade do microorganismo ao substrato.

3.2.3.2 Modelos para múltiplos substratos

A modelagem matemática da cinética microbiana em múltiplos substratos é bastante complexa. Os microorganismos 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 microorganismos utilizam muitos substratos, tais como a repressão catabólica, indução e repressão enzimática, os quais promovem a utilização seqüencial ou simultânea dos substratos. A Tabela 3.2 apresenta alguns modelos não-estruturados adequados para sistemas com múltiplos substratos.

Tabela 3.1 – Modelos cinéticos não-estruturados para único substrato

Modelo	Equação	Referência
Limitação e inibição pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_s}{S} + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n}$	Wu <i>et al.</i> (1988) <i>citado por</i> Lima <i>et al.</i> (2001)
Limitação pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_s + S}$	Monod (1942) <i>citado por</i> Reardon <i>et al.</i> (2000)
	$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} (1 - e^{-K_s S})$	Tessier (1942) <i>citado por</i> Bailey & Ollis (1986)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S^n}{K_s + S^n}$	Moser (1958) <i>citado por</i> Bailey & Ollis (1986)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_{sx} \cdot X + S}$	Contois (1959) <i>citado por</i> Bailey & Ollis (1986)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S \left(1 + \frac{S}{K}\right)}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$	Webb (1963) <i>citado por</i> Nuhoglu & Yalcin (2005)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_i}\right) \left(1 + \frac{S}{K}\right)}$	Yano <i>et al.</i> (1966) <i>citado por</i> Nuhoglu & Yalcin (2005)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$	Andrews (1968) <i>citado por</i> Reardon <i>et al.</i> (2000)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_s + S} e^{\left(\frac{-S}{K_i}\right)}$	Aiba (1968) <i>citado por</i> Nuhoglu & Yalcin (2005)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{\left(K_s + S + S \sum_{j=1}^p \left(\frac{S}{K_i}\right)^j\right)}$	Yano & Koga (1969) <i>citado por</i> Shalaby (2003)
	$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \left[e^{\left(\frac{-S}{K_i}\right)} - e^{\left(\frac{-S}{K_s}\right)} \right]$	EDWARDS (1970) <i>citado por</i> NUHOGLU & YALCIN (2005)

Tabela 3.2 – Modelos cinéticos não-estruturados para múltiplos substratos

Modelo	Equação	Referência
Limitação por múltiplos substratos	$\mu_x = \frac{\mu_{\max} \cdot S_1 S_2}{(K_{S_1} + S_1)(K_{S_2} + S_2)}$	Megee <i>et al.</i> (1972) citado por Lima <i>et al.</i> (2001)
	$\mu_x = \left(\mu_0 + \frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_{S_1} + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_{S_2} + S_2} \right) \left(\frac{S_3}{K_{S_3} + S_3} \right)$	Tsao & Hanson (1975) citado por Lima <i>et al.</i> (2001)
Inibição não-competitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} \cdot S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + S_j \left(\frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) + \frac{S_i + S_j}{K_{S_j}} \right)}$	Segel (1975) citado por Reardon <i>et al.</i> (2000)
Inibição acompetitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} \cdot S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + \frac{S_i + S_j}{K_{S_j}} \right)}$	
Inibição competitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} \cdot S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + S_j \left(\frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) \right)}$	Yoon <i>et al.</i> (1977) citado por Reardon <i>et al.</i> (2000)
SKIP	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} \cdot S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + S_j \cdot I_{ji} \right)}$	
Limitação e Inibição por múltiplos substratos	$\mu_x = \frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_{S_1} + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_{S_2} + S_2 + \frac{S_1^2}{K_i}}$	Dunn <i>et al.</i> (1992) citado por Lima <i>et al.</i> (2001)

3.2.3.4. Modelo de Inibição Competitiva

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

Durante a inibição competitiva o inibidor e o substrato, os quais geralmente possuem estrutura química similar, competem pelo mesmo sítio ativo da enzima responsável pela metabolização dos compostos. O modelo de inibição competitiva, proposto por Yoon *et al.* (1977) citado por Reardon *et al.* (2000), apresentado na Tabela 3.2, 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 3.7:

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{máx_i} \cdot S_i}{Ks_i + S_i + \sum_{j \neq i} S_j \left(\frac{Ks_i}{Ks_j} \right)} \quad (3.7)$$

3.2.3.5. Modelo de Inibição Não-Competitiva

O modelo de inibição não-competitiva, proposto por Segel (1975) citado por Reardon *et al.* (2000), pode ser adequado quando o substrato inibidor liga-se tanto ao complexo enzima-substrato, quanto à enzima livre, inativando-os. O modelo, apresentado na Tabela 3.2, representa a velocidade de crescimento específico no substrato “*i*” na presença de um substrato “*j*”. Também pode ser representada pela equação (3.8), quando mais substratos estão envolvidos no processo:

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{máx_i} \cdot S_i}{Ks_i + S_i + \sum_{j \neq i} \left(S_j \cdot \left(\frac{Ks_i}{Ks_j} \right) + \frac{S_i \cdot S_j}{Ks_j} \right)} \quad (3.8)$$

3.2.3.6. Modelo de Inibição Acompetitiva

O modelo de inibição incompetitiva, apresentado por Segel (1975) citado por Reardon *et al.* (2000), pode ser utilizado quando o substrato inibidor se liga ao complexo enzima-substrato, inativando-o, e não a enzima livre. A velocidade de crescimento específico dada pela inibição incompetitiva entre dois substratos “*i*” e “*j*” é apresentada na Tabela 3.2, para o substrato “*i*”. Estendendo o modelo para mais do que dois substratos presentes no processo, a velocidade de crescimento específico no substrato “*i*” pode ser representado pela equação (3.9):

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{m_{x_i}} \cdot S_i}{Ks_i + S_i + \sum_{j \neq i} \left(\frac{S_i \cdot S_j}{Ks_j} \right)} \quad (3.9)$$

3.3 Balanços de massa

3.3.1. Operação em batelada

O cultivo batelada é caracterizado pela vazão volumétrica nula. O balanço de massa para a biomassa e para o substrato “*i*” em um reator batelada pode ser expresso pelas equações (3.11) e (3.12), respectivamente:

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu_x \cdot X(t) = \sum_{i=1}^n \mu_{x_i} \cdot X(t) \quad (3.10)$$

$$\frac{dS_i(t)}{dt} = -\frac{\mu_{x_i}}{Y_{X/S_i}} \cdot X(t) \quad (3.11)$$

CAPÍTULO IV

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 microrganismos.

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.

4.1 Material

4.1.1 Compostos orgânicos utilizados

Entre os principais contaminantes representativos no efluente 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 realização do trabalho foram utilizados 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%.

4.1.2 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. 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 minutos. O agitador de peneiras utilizado é da marca MINOR ENDECOTTS.

A granulometria utilizada foi de 8 e 10 mesh (0,001651 m) e a massa de carvão ativado foi de 14 g, apresentando densidade aparente de 1.312 kg/m^3 .

4.1.3 Solventes

Os solventes utilizados foram água destilada, com o objetivo de preparar a solução de nutrientes dos compostos BTX. Para o uso no HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), foram utilizados: Água MiliQ, obtida no laboratório LIMA na Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC, e Metanol para HPLC, série Gold da Carlo Erba.

4.1.4 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 microrganismos foi preciso alimentar os biorreatores com um meio de cultura, cuja composição foi baseada na informação do Shim e Yang (1999), citado por Mello (2007) e descrita na Tabela 4.1.

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. A fonte de oxigênio e de carbono foi adicionada separadamente, ambos medidos com pipetas de precisão (Ependorf, de 100, 1000 e 5000 μL). O pH da solução de meio mineral é de 7,0.

Tabela 4.1 – Composição do meio mineral para desenvolvimento dos microrganismos

	Composto Químico	Concentração moles/L
Macronutrientes	CaCl ₂ .2H ₂ O	5,03x10 ⁻⁵
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,87x10 ⁻³
Micronutrientes	MnSO ₄ .H ₂ O	5,92x10 ⁻⁵
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	6,96x10 ⁻⁶
	NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ .6H ₂ O	4,28x10 ⁻⁵
Tampão	KH ₂ PO ₄	3,67x10 ⁻³
	K ₂ HPO ₄	2,87x10 ⁻³
Fonte de Nitrogênio	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,78x10 ⁻³
Fonte de Oxigênio	H ₂ O ₂ (30%)	4,12x10 ⁻³
Fonte de Carbono	Benzeno	1,28x10 ⁻⁴ a 1,92x10 ⁻³
	Tolueno	1,09x10 ⁻⁴ a 1,63x10 ⁻³
	o-Xileno	9,42x10 ⁻⁵ a 1,41x10 ⁻³
	Sacarose	2,92x10 ⁻⁵ a 4,38x10 ⁻⁴

Fonte: Adaptação de Mello (2007).

4.1.5 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 5L e armazenada em geladeira até a montagem dos biorreatores. As Figuras 4.1 (a) e (b) mostram a biomassa na ETE e a amostra coletada para os ensaios em laboratório.



Figura 4. 1 – (a) Biomassa na ETE; (b) Amostra coletada em um frasco de 5L.

4.1.6 Reatores

Os ensaios para obtenção da cinética de degradação dos compostos BTX foram realizados utilizando-se biorreatores em batelada, escala de bancada, constituídos por quatro erlenmeyers de 250 mL. Os biorreatores foram fechados com tampa de silicone, para evitar a volatilização dos compostos para o meio, conforme mostra a Figura 4.2. Cada biorreator foi destinado a biodegradar determinado(s) composto(s).



Figura 4. 2 – Biorreatores utilizados nos ensaios para obtenção das cinéticas.

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Concentração de oxigênio

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

4.2.2 pH

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

4.2.3 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 horas, empregando-se como digestor um reator marca HACH. Após 2 horas 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 40 a 1000 mg O₂/L. O resultado da DQO é expresso em mg O₂/L.

4.2.4 Caracterização Morfológica

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura, MEV (Scanning Electron Microscope, SEM) é um equipamento que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas. Um feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra onde, ocorrendo uma interação, parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de BSE (ou ERE) – imagem de elétrons retroespalhados – ou nesta interação a amostra emite o

elétron produzindo a chama imagem de ES (elétrons secundários). Ocorre também a emissão de raios-X que fornece a composição química elementar de um ponto ou região da superfície, possibilitando a identificação de praticamente qualquer elemento presente.

As imagens microscópicas e a composição elementar das amostras foram obtidas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Philips, modelo XL 30 com filamento de tungstênio, equipado de EDAX (Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X) do Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) da UFSC. As amostras foram recobertas com ouro utilizando o aparelho Sputter Coater SCD 005 da BAL-TEC.

4.2.5 Análises Cromatográficas

A determinação das concentrações dos compostos benzeno, tolueno e o-xileno foi realizada 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 4.3 apresenta o cromatógrafo empregado no estudo.



Figura 4. 3 - Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência – HPLC (LABMASSA, EQA/UFSC).

No HPLC, a fase móvel é uma variável de grande importância. 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 Carlo Erba) e água MiliQ (cedida pelo Laboratório Integrado ao Meio Ambiente – LIMA – do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC). Estocados individualmente em recipientes de vidro com capacidade de 1 litro, 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 μm . A fase móvel (eluente) foi preparada diariamente, nas proporções de 80:20 (metanol/água) e então desaeradas em ultrassom por aproximadamente 40 minutos, para evitar a formação de bolhas de ar no cabeçote da bomba ou na saída do detector. A vazão da fase móvel foi de 0,8 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 μm , 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 μL .

O detector utilizado identificava as amostras pelo comprimento de onda, podendo ser operado nas regiões ultravioleta e visível. Os compostos BTEX 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 5 a 150 ppm. 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 Apêndice B.

4.3 Procedimento experimental

4.3.1 Imobilização e adaptação da biomassa no suporte

Para a imobilização e adaptação da biomassa, foram adicionados aos biorreatores 40 g de carvão ativado, 150 mL do meio mineral, 60 mL do lodo ativado, $4,38 \times 10^{-4}$ moles/L de sacarose (fonte de carbono) e $4,13 \times 10^{-3}$ moles/L de peróxido de hidrogênio (fonte de oxigênio). Os biorreatores foram agitados em um *Shaker*/Banho Maria Dubnoff (Nova Ética – modelo 304) como mostra a Figura 4.4, à temperatura ambiente de 25°C, durante todo o experimento, com o objetivo de melhor homogeneizar o meio, evitando gradientes de concentração no interior do biorreator.

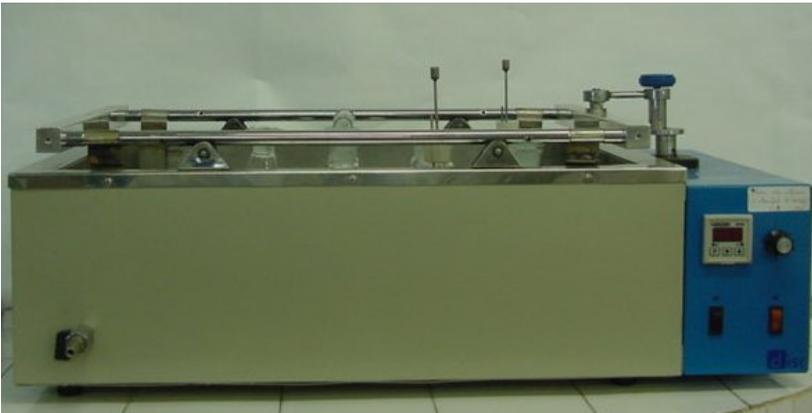


Figura 4. 4 - *Shaker*/Banho Maria Dubnoff.

Durante 30 dias os biorreatores foram alimentados diariamente com solução de meio mineral (retirado 100 ml e adicionado 100 ml), peróxido de hidrogênio em 12 em 12 horas ($4,13 \times 10^{-3}$ moles/L) e com sacarose ($4,38 \times 10^{-4}$ moles/L) como fonte de carbono, tendo como objetivo a fixação da biomassa no suporte. Neste período foram realizadas análises de DQO para certificar de que os microrganismos 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.

Decorrido este período, os biorreatores foram submetidos ao composto tolueno. Para tanto, reduziu-se a concentração de sacarose e

introduziu-se tolueno gradativamente em cada biorreator da seguinte forma: a primeira adição do carbono do tolueno ao meio foi equivalente a 10%, e os outros 90% foram da sacarose. Os biorreatores foram alimentados durante 14 dias com essas proporções. Durante esse período foram feitas análises de DQO e medida a concentração de oxigênio dissolvido no meio. Após aumentou-se a proporção do carbono do tolueno para 20% e o carbono da sacarose passou para 80%, permanecendo nesta proporção por 7 dias. A quantidade de carbono do tolueno foi aumentada de 20 em 20% até atingir 100% no mesmo intervalo de tempo. A alimentação foi feita periodicamente tirando 100 mL da solução do biorreator e adicionando 100 mL da solução de meio mineral, peróxido de oxigênio e a fonte de carbono. O tempo de substituição completa da sacarose foi de aproximadamente 3 meses.

Após 5 dias de alimentação com tolueno, como única fonte de carbono, iniciou-se o processo de adaptação dos microrganismos aos demais compostos: benzeno e o-xileno.

O procedimento de adaptação aos novos compostos foi realizado substituindo a cada 7 dias 10% do tolueno pelo respectivo composto (benzeno e o-xileno). A total substituição procedeu-se no período de 50 dias. Passado esse período, os biorreatores foram alimentados com 150 mg/L no total de BTX, sendo 50 mg/L de Benzeno, 50 mg/L de Tolueno e 50 mg/L de o-Xileno no período de 7 dias.

Este procedimento de adaptação se faz necessário, devido ao fato dos compostos BTX apresentarem elevada toxicidade para grande parte dos seres vivos. Com o objetivo de evitar um choque, e eventual morte ou inibição das células, optou-se por uma adaptação gradativa da biomassa aos compostos.

Como os microrganismos neste período já estavam adaptados ao máximo da concentração escolhida para os estudos, fez-se então a quebra dos reatores que consistiu em separá-los para adaptação para mono componente e multicomponente totalizando em 7 biorreatores. A adaptação de todos os biorreatores nesta etapa deu-se no período de 10 dias e as cinéticas de biodegradação foram obtidas após este período.

Abaixo na Tabela 4.2 é apresentado o processo de adaptação de todos os biorreatores.

Todos os biorreatores foram alimentados diariamente retirando-se 100 mL da solução presente no biorreator e adicionando-se 100 mL da solução de meio mineral, 100 µL de peróxido de hidrogênio e 150 mg/L do composto em estudo 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) descrito na secção 4.2.6.

Tabela 4.2 – Adaptação dos biorreatores mono componente e multicomponente.

Biorreator	Benzeno (mg/L)	Tolueno (mg/L)	o-Xileno (mg/L)
B	150	0	0
T	0	150	0
X	0	0	150
BT	75	75	0
BX	75	0	75
TX	0	75	75
BTX	50	50	50

4.3.2 Obtenção da cinética de degradação

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: 20 g de suporte com o biofilme aderido (base úmida) (equivalente a 14 g de carvão seco), 130 mL da solução contida nos biorreatores antes do peneiramento (deixou-se decantar o lodo em suspensão antes de adicioná-lo ao novo biorreator), 150 mL da solução de meio mineral, 100 µL de peróxido de oxigênio e 150 mg/L no total do composto em estudo ao respectivo biorreator, ficando com um volume de líquido de 280 mL e, conseqüentemente, um pequeno volume de *headspace* (volume da superfície do líquido até a tampa do biorreator). Após 5 dias iniciaram-se as análises para a obtenção das cinéticas de biodegradação em batelada.

Inicialmente foram retirados 100 mL da solução contida nos biorreatores e adicionado 100 mL da solução de meio mineral, 100 µL de peróxido de oxigênio e 150 mg/L no total do composto em estudo ao respectivo biorreator. Em intervalos regulares de tempo eram retiradas alíquotas (volume de 0,60 mL por amostra) da solução em cada reator e diluídas em 0,60 mL de metanol, as quais foram armazenadas em um

tubo de vidro de 1,5 mL sendo analisadas na seqüência no HPLC. As amostras foram diluídas em metanol na proporção 50:50 com o objetivo de aumentar a solubilidade dos compostos e ter uma melhor compatibilidade com a fase móvel quando essa fosse analisada no HPLC. Durante os ensaios, a temperatura foi mantida em torno de 25°C, e a agitação foi ajustada a aproximadamente 150 rpm. Todos os ensaios foram feitos em triplicata para garantir a confiança dos resultados.

Para o estudo multicomponente, a metodologia foi baseada no trabalho de Dou *et al.* (2008), em estudo da biodegradação dos compostos BTEX.

As curvas cinéticas monocomponentes foram determinadas na concentração inicial de 50 mg/L, para os componentes puros.

Nesse trabalho, uma série de experimentos, com todas as possíveis combinações binárias dos compostos BTX, foram realizados. A Tabela 4.3 mostra as combinações binárias para cinéticas de biodegradação dos compostos BTX e a Figura 4.5 mostra o aparato experimental dos biorreatores para as combinações binárias.

Tabela 4.3 - Combinações binárias para cinéticas de biodegradação dos compostos BTX.

Benzeno (mg/L)	Tolueno (mg/L)	Benzeno (mg/L)	o-Xileno (mg/L)	Tolueno (mg/L)	o-Xileno (mg/L)
50 +	0	50 +	0	50 +	0
	25		25		25
	50		50		50
	75		75		75
	100		100		100
Tolueno (mg/L)	Benzeno (mg/L)	o-Xileno (mg/L)	Benzeno (mg/L)	o-Xileno (mg/L)	Tolueno (mg/L)
50 +	0	50 +	0	50 +	0
	25		25		25
	50		50		50
	75		75		75
	100		100		100

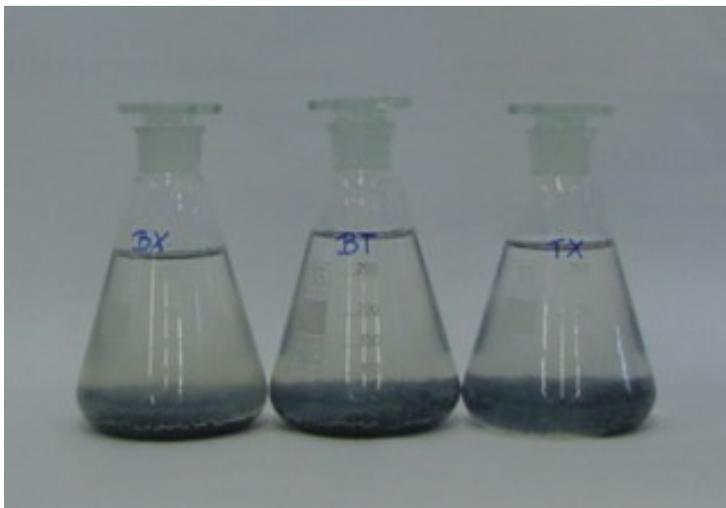


Figura 4.5 - Aparato experimental utilizado para realização das cinéticas binárias de biodegradação dos compostos BTX.

Para a combinação tricomponente, foram empregadas as mesmas condições dos experimentos bicomponentes. A Tabela 4.4 mostra a combinação empregada para o estudo tricomponente e a Figura 4.6 mostra o aparato experimental dos biorreatores para as combinações ternárias.

Tabela 4.4 - Combinações ternárias para cinéticas de biodegradação dos compostos BTX.

Benzeno (mg/L)	Tolueno (mg/L)	o-Xileno (mg/L)
50	25	25
50	75	75
25	50	25
75	50	75
25	25	50
75	75	50
50	50	50



Figura 4.6 - Aparato experimental utilizado para realização das cinéticas ternárias de biodegradação dos compostos BTX.

4.3.3 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 o composto BTX foi adicionado 150 mg/L do composto e foi analisada sua queda através da curva de degradação. Com isso, obteve-se o tempo que leva para que todo o composto seja consumido. Quando todo o composto foi consumido, adicionou-se novamente a mesma concentração, e sua queda foi acompanhada. 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 vezes, o que leva à conclusão de que os efeitos da adsorção no interior do suporte de carvão podem ser desprezados.

4.3.4 Teste de toxicidade

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 horas, 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 era(m) tóxico(s), foram recolhidas as amostras após o período em que não havia mais a presença dos compostos BTX (aproximadamente 7 horas após a alimentação). A toxicidade aguda destas soluções foi determinada mediante a elaboração de testes padronizados, cujos resultados foram 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 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).

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos experimentalmente dos parâmetros cinéticos da biodegradação dos compostos BTX. Serão apresentados os resultados da caracterização do carvão ativado, bem como foram avaliados os modelos cinéticos não-estruturados de crescimento microbiano para a biodegradação de único e múltiplo substrato. Tais parâmetros foram obtidos em reatores em batelada no Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA, EQA/UFSC.

5.1 Resultados experimentais

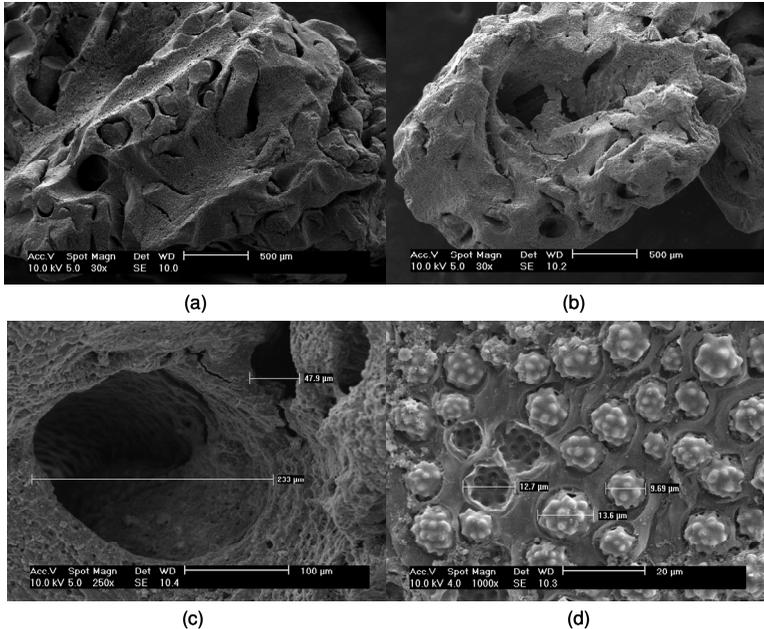
O trabalho experimental desenvolvido teve como objetivo a determinação dos parâmetros cinéticos da biodegradação dos compostos BTX. Tais parâmetros foram obtidos em reatores em batelada com biomassa aderida em carvão ativado para monocomponente (B, T e X), bicomponente (BT, BX, TX, TB, XB e XT) e tricomponente (BTX), todos separados. Antes de se obter as cinéticas de biodegradação, a biomassa de cada reator foi adaptada separadamente. Inicialmente análises de DQO foram realizadas para se certificar de que os microrganismos estavam consumindo a sacarose (fonte de carbono); quando toda a sacarose foi substituída pelo composto, as análises passaram a ser realizadas no HPLC. Quando os microrganismos estavam adaptados aos compostos BTX, iniciaram-se as análises para obtenção das cinéticas de biodegradação.

O peróxido de oxigênio (H_2O_2) numa concentração de 30% em massa foi adicionado ao meio, para garantir que o meio continha oxigênio suficiente para os microrganismos consumirem toda a matéria orgânica presente no biorreator. Esta quantidade foi escolhida após testes experimentais que mostraram que a concentração de oxigênio se mantinha em valor suficiente para garantir a degradação dos compostos. Massol-Deyá *et al.* (1995) e Shim e Yang (1999) 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 por consequência perda de BTEX para o ambiente, ao borbulhar ar no meio aquoso.

5.1.1 Caracterização morfológica

As imagens da superfície do carvão ativado foram obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), na ampliação de 30, 500 e 1000 vezes e são apresentadas na Figura 5.1.



(a)-Carvão ativado vegetal, micrografia com aumento de 30x.

(b)-Carvão ativado vegetal que contém o biofilme, micrografia com aumento de 30x.

(c)-Carvão ativado vegetal que contém o biofilme, micrografia com aumento de 250x.

(d)-Carvão ativado vegetal que contém o biofilme, micrografia com aumento de 1000x.

Figura 5.1 - Micrografias do carvão ativado vegetal de casca de coco.

Ao analisar as imagens obtidas através de MEV, pode-se observar que o carvão apresenta boa característica morfológica para a imobilização dos microrganismos, devido a formação uniforme dos poros.

A Figura 5.1 (a) apresenta a micrografia do carvão ativado vegetal sem a adaptação dos compostos BTX, ou seja, *in natura*. Este carvão apenas passou pelo processo de lavagem para retirada das cinzas

e seco a temperatura ambiente.

As Figuras 5.1 (b), (c) e (d) apresentam o mesmo tipo de carvão, porém adaptado aos compostos BTX em um reator em batelada. Através da Figura 5.4 (c) podemos observar que no carvão existem poros que podem variar desde 47.9 μm até 233 μm .

Já na Figura 5.1 (d) pode-se observar através do aumento de 1000x, que existe uma região superficial com depósitos de sílica. Nesta micrografia pode-se concluir que a sílica é o resíduo predominante da produção de carvão, produto da natureza da casca de coco, podendo afetar principalmente os sítios ativos da superfície, ou seja, os macroporos e parte dos mesoporos.

Através das imagens obtidas pelo MEV, a Figura 5.2 apresenta a análise qualitativa a qual identificou elementos químicos presentes nas amostras de adsorventes analisadas anteriormente.

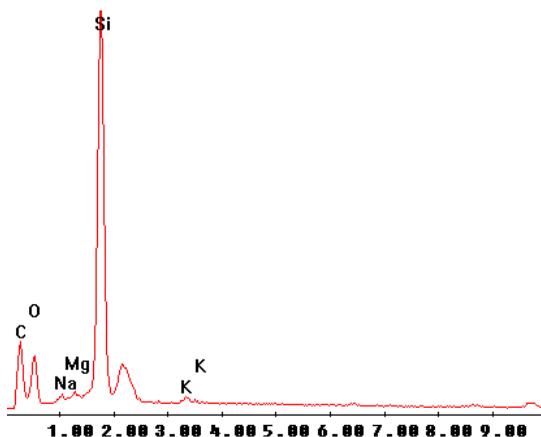


Figura 5.2 - Espectro da amostra de carvão ativado vegetal de casca de coco

É possível perceber na amostra de carvão ativo retirado do reator do processo de biodegradação a presença de elementos como Carbono, Oxigênio, Sódio, Manganês e Potássio além da presença de alto valor de Sílica, conforme Figura 5.1 (d).

5.1.2 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia Magna*

A portaria 17, criada em 24 de abril de 2002, pela FATMA (Fundação do Meio Ambiente) estabeleceu os limites do fator de

diluição (FD) de diferentes efluentes para a *Daphnia magna*. Para os efluentes petroquímicos, o fator de diluição deve ser 2 para que não seja evidenciado nenhum efeito tóxico (imobilidade), nos organismos expostos.

No Brasil, em relação às concentrações máximas de hidrocarbonetos aromáticos que a água potável podem conter, o CONAMA (Resolução nº 357 de 17 de março de 2005) estabelece os teores máximos de 0,005, 0,002, 0,090 e 0,300 mg/L, para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, respectivamente.

Os resultados obtidos dos testes de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Resultados do teste de toxicidade aguda

Amostras	CE (50)*	pH	FD**	FD (Limite máximo Portaria 017/02)
Benzeno	<1,56% (Tóxica)	6,00	>64	2
o-Xileno	24,99%	6,59	32	2
Tolueno	2,06%	6,58	>64	2
Benzeno e Tolueno	20,39%	6,50	16	2
Tolueno e o-Xileno	70,71	6,38	2	2
Benzeno e o-Xileno	Não tóxica	6,44	1	2
Benzeno, Tolueno e o-Xileno	99,99%	7,01	2	2

CE (50)* Grau de toxicidade.

FD** Fator de diluição sem efeito.

Os testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* não foram realizados com os compostos antes de seu tratamento, porque seriam necessárias muitas diluições para que os mesmos não apresentassem toxicidade ao microcrustáceo. Para se obter a ordem de grandeza do número de diluições necessárias, levou-se em consideração os valores máximos permitidos pela Resolução 357 de 17 de março de 2005 do CONAMA.

Os resultados apresentados na Tabela 5.1 mostram que a maioria dos compostos analisados apresenta toxicidade aguda acima do

limite máximo permitido (LMP), exceto o BX. O composto benzeno, tolueno, o-xileno e BT são os compostos mais tóxicos e o TX e BTX são os de menor toxicidade no efluente após seu tratamento. Este mesmo resultado pode ser observado em Mello (2007) onde foram estudados apenas para os compostos mono componentes, o qual todos ficaram acima da do limite permitido (LMP).

No entanto, o efluente contendo os compostos, após o tratamento, apesar de estar acima do LMP, apresentou baixa toxicidade aguda, se forem consideradas as diluições necessárias para enquadrá-lo nos limites impostos pela Resolução 357 de 17 de março de 2005 do CONAMA, mostrando que houve redução da toxicidade após o tratamento microbiológico.

Com estes resultados, pode-se concluir que o fator de toxicidade dos compostos BTX após o tratamento com biofilmes é muitas vezes menor do que o fator de toxicidade do composto não tratado.

5.1.3 Microscopia

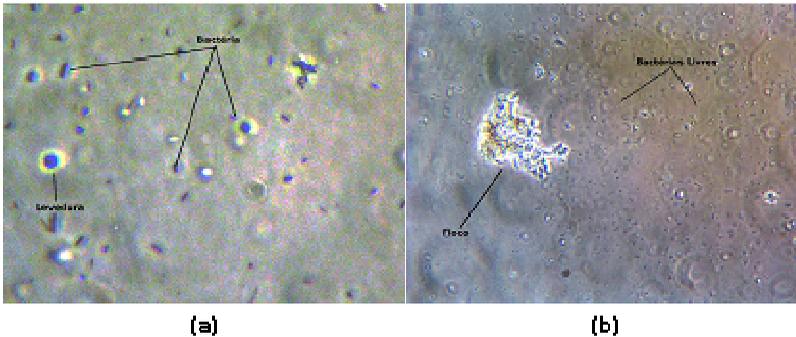
O monitoramento da biomassa foi feito por microscopia óptica, sendo esta uma boa ferramenta de análise, pois indica a abundância microbiana de espécies diretamente relacionadas com o processo. Neste tipo de processo a alta atividade microbiana e a variedade de microorganismos existentes proporcionam o adequado tratamento ao efluente.

As imagens da microscopia foram obtidas através da microscopia óptica, na ampliação de 200 e 400 vezes e são apresentadas na Figura 5.3. As amostras foram feitas e analisadas pelo Laboratório da Umwelt da cidade de Blumenau e a metodologia utilizada na obtenção dos resultados microbiológicos segue os padrões publicados no "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" 20th Ed., 1998.

Na amostra observou-se a presença de raros fragmentos de flocos e a presença de bactérias, na maioria em forma de bastonetes com baixa mobilidade. Também foi observado a presença de leveduras.

As bactérias estão presentes na maioria dos processos aeróbios e são responsáveis por formar macroestrutura dos flocos. Sua presença contribui para uma boa eficiência do processo, já que possuem alta capacidade de consumir matéria orgânica e,

conseqüentemente produzir um efluente final de boa qualidade. Enquanto o número de bactérias permanecerem constante sem prejudicar a sedimentação do lodo, normalmente não haverá problema (VON SPERLING, 1996).



(a) Microscopia de contraste de fase 400x mostrando a presença de bactérias livres e leveduras
 (b) Microscopia de contraste de fase 200x mostrando a presença de flocos e bactérias livres

Figura 5.3 – Microscopia do efluente sintético petroquímico

A presença desses microrganismos e de outros que não puderam ser identificados evidencia uma das principais características do ambiente desses reatores, que é a diversidade microbiana, tanto no biofilme, como em suspensão.

A escassez ou abundância desses microrganismos pode servir como indicação da qualidade do tratamento. No entanto, devido à heterogeneidade de flocos e biofilmes, e diferentes condições no macro e micro ambiente, fica difícil estabelecer essas relações de diversidade, abundância e qualidade do processo.

5.1.4 Cinéticas de biodegradação dos compostos BTX

Os testes cinéticos em batelada são realizados com o objetivo de determinar o tempo necessário para se obter a biodegradação dos compostos BTX.

Os resultados cinéticos serão apresentados em curvas de concentração dos compostos BTX em função do tempo. Para o estudo cinético de biodegradação dos compostos BTX, monocomponentes, a

concentração utilizada para todos os compostos foi de 50 mg/L, à temperatura de 25°C e 150 rpm de agitação. Para bi e tricomonente, seguiu-se a metodologia de Dou *et al.* (2008), apresentada no Capítulo IV.

5.1.4.1 Curvas de degradação dos compostos BTX

As Figuras 5.4 a 5.6 apresentam as curvas de degradação para os sistemas monocomponentes, realizadas com os compostos orgânicos benzeno, tolueno e o-xileno. Cada composto foi analisado em um reator individual.

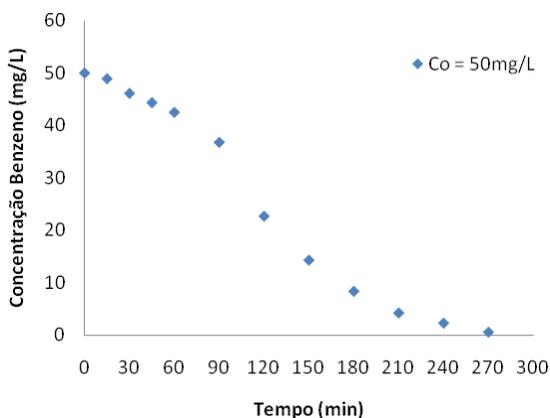


Figura 5.4 - Curva de degradação do benzeno em relação ao tempo

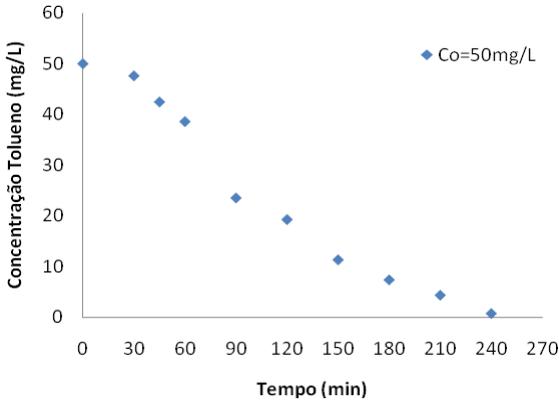


Figura 5.5 - Curva de degradação do tolueno em relação ao tempo

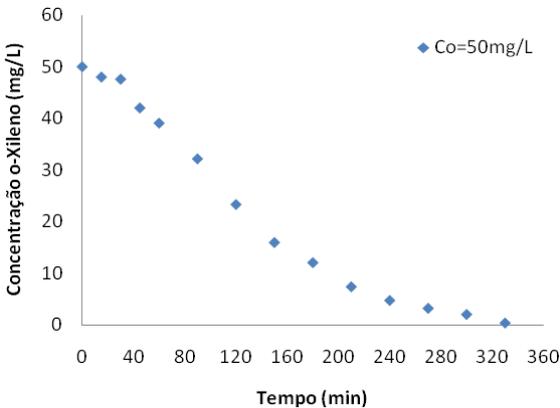


Figura 5.6 - Curva de degradação do o-xileno em relação ao tempo

Com base nos resultados obtidos, é possível verificar que a biomassa foi capaz de degradar toda a quantidade do composto (benzeno, tolueno e o-xileno) presente no biorreator. Pode-se observar que, em um período aproximado de 270 minutos, a concentração de benzeno está muito próxima de zero. Verifica-se também que o consumo é praticamente completo num período aproximado de 240 e 330 minutos para o tolueno e o-xileno, respectivamente.

Através dos gráficos das Figuras 5.4 a 5.6, é possível verificar que a quantidade de substrato consumido pela biomassa varia em

relação ao tempo. No início do processo tem-se uma maior concentração de substrato e ele é consumido em uma velocidade maior; à medida que a concentração de substrato vai diminuindo e a concentração do produto vai aumentando, a velocidade de degradação diminui também, mesmo mantendo-se constante a temperatura e o pH, mostrando então que a velocidade de reação é influenciada pela concentração do substrato.

5.1.4.2 Modelo cinético para a biodegradação de único substrato

No estudo da biodegradação de único substrato avaliaram-se os modelos de Monod e Andrews, modelos fundamentais, que posteriormente servirão de base para uma melhor avaliação dos modelos mais complexos. Esta etapa mostra que estes modelos simples também podem ser utilizados com sucesso na representação de dados experimentais e, portanto, a avaliação de outros modelos pode ser descartada, facilitando a avaliação da cinética de crescimento microbiano e o projeto de biorreatores.

5.1.4.2.1 Modelo de Monod

Os balanços individuais para processo em batelada e volume constante para os compostos benzeno, tolueno e *orto*-xileno são expressos pelas equações abaixo:

$$\frac{dS_b(t)}{dt} = -\frac{\mu_{m\acute{a}x_b} \cdot S_b(t)}{Ks_b + S_b(t)} \cdot \frac{X}{Y_x} \quad (5.1)$$

$$\frac{dS_t(t)}{dt} = -\frac{\mu_{m\acute{a}x_t} \cdot S_t(t)}{Ks_t + S_t(t)} \cdot \frac{X}{Y_x} \quad (5.2)$$

$$\frac{dS_x(t)}{dt} = -\frac{\mu_{m\acute{a}x_x} \cdot S_x(t)}{Ks_x + S_x(t)} \cdot \frac{X}{Y_x} \quad (5.3)$$

Os parâmetros cinéticos do modelo de Monod foram obtidos utilizando o software STATISTICA 7.0, utilizando o modelo não linear,

o que possibilitou realizar a regressão não linear dos dados.

5.1.4.3 Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação individual dos substratos BTEX

As Figuras 5.7 a 5.9 apresentam os modelos de Monod para a biodegradação dos compostos BTX individualmente, juntamente com os dados experimentais conduzidos em reator batelada, utilizando uma mistura de culturas microbianas.

Os parâmetros cinéticos do modelo de Monod são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação dos compostos BTX individualmente - Modelo de Monod.

Parâmetros	Benzeno	Tolueno	o-Xileno
$\mu_{\text{máx}}$	1,87	0,51	0,59
Ks	70,99	31,47	23,97
R	0,84	0,91	0,96

Utilizando-se o modelo de Monod verifica-se que a velocidade máxima de crescimento específico $\mu_{\text{máx}}$ mostra-se similar para o composto Tolueno e o-Xileno, destacando o Benzeno como o composto dentre os três com a maior velocidade de crescimento específico. Da mesma forma podemos observar os valores de Ks do Tolueno e o-Xileno, novamente ambos são semelhantes, sendo que a cultura apresentou maior afinidade pelo xileno e desta forma resultou num maior rendimento. Analisando ainda a Tabela 5.2, o Modelo de Monod para o composto o-Xileno apresentou uma boa concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,96 seguido do Tolueno com 0,91 e Benzeno 0,84, respectivamente.

Nas Figuras 5.7 a 5.9 observa-se um ótimo ajuste para o modelo de Monod com os dados experimentais. Verifica-se que o modelo de Monod prediz satisfatoriamente a cinética de biodegradação individual dos compostos BTEX, principalmente em baixas concentrações (CHANG *et al.*, 1993).

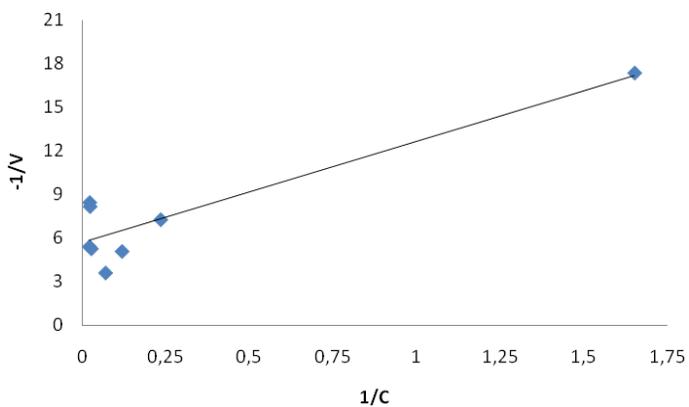


Figura 5.7 - Ajuste da cinética de Monod obtida para o benzeno na concentração de 50mg/L.

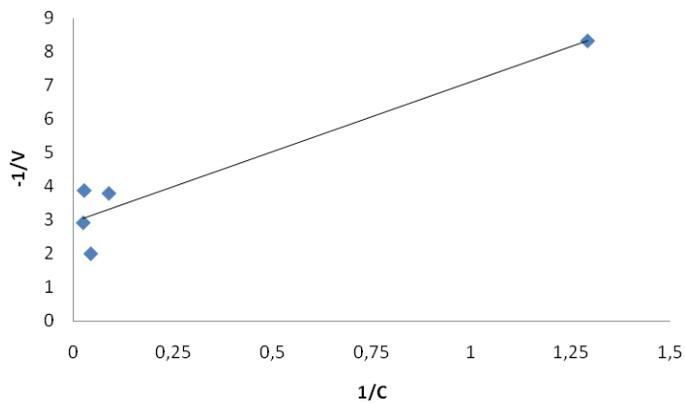


Figura 5.8 - Ajuste da cinética de Monod obtida para o tolueno na concentração de 50mg/L.

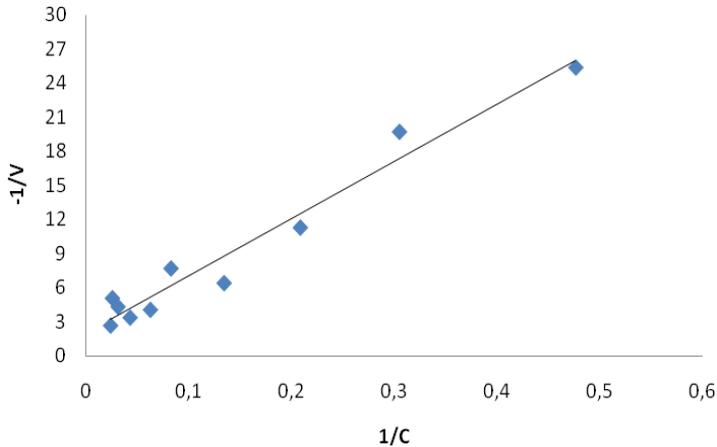


Figura 5.9 - Ajuste da cinética de Monod obtida para o o-xileno na concentração de 50mg/L.

5.1.4.3 Modelos cinéticos para a biodegradação de múltiplos substratos

Embora o crescimento microbiano em mistura de substratos seja comumente encontrado em biorremediação, tratamento de efluentes e processos de fermentação, a cinética do sistema em múltiplos substratos ainda tem sido limitada. O desempenho de modelos cinéticos não estruturados foi avaliado, assumindo que a biodegradação da mistura dos compostos BTX possa ser representada pelos modelos de inibição competitiva, inibição não-competitiva e inibição acompetitiva.

Uma série de experimentos, com todas as possíveis combinações binárias, foram investigados para análise de competitividade na biodegradação. Foram analisadas diferentes cinéticas com o composto puro na concentração de 50 mg/L, e posteriormente avaliou-se a mistura bicomponente de 50 mg/L de um contaminante com 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L e 100 mg/L do outro composto a ser investigado. Para o caso do benzeno na Figura 5.13 foram representadas todas as concentrações de 50 mg/L de benzeno (puro, 50B +30T, 50B +50T, 50B+75T, 50B+100T) e avaliada a influência da presença do tolueno sobre a biodegradação do benzeno. Para o caso do benzeno na Figura 5.14, foram representadas todas as concentrações de 50 mg/L de benzeno (puro, 50B +30X, 50B +50X, 50B+75T, 50B+100X) e avaliada a influência da presença do o-xileno sobre a biodegradação do benzeno.

Esta análise foi aplicada a todas as combinações dos compostos BTX.

5.1.4.3.1 Modelo de inibição competitiva

As velocidades de crescimento específico em benzeno, tolueno e *o*-xileno são dadas pelas equações (5.4), (5.5) e (5.6), respectivamente, para a mistura dos compostos BTX:

$$\mu_{x_b} = \frac{\mu_{máx_b} \cdot S_b}{\left(Ks_b + S_b + S_t \left(\frac{Ks_b}{Ks_t} \right) + S_x \left(\frac{Ks_b}{Ks_x} \right) \right)} \quad (5.4)$$

$$\mu_{x_t} = \frac{\mu_{máx_t} \cdot S_t}{\left(Ks_t + S_t + S_b \left(\frac{Ks_t}{Ks_b} \right) + S_x \left(\frac{Ks_t}{Ks_x} \right) \right)} \quad (5.5)$$

$$\mu_{x_x} = \frac{\mu_{máx_x} \cdot S_x}{\left(Ks_x + S_x + S_b \left(\frac{Ks_x}{Ks_b} \right) + S_t \left(\frac{Ks_x}{Ks_t} \right) \right)} \quad (5.6)$$

5.1.4.3.2 Modelo de inibição não-competitiva

As velocidades de crescimento específico em benzeno, tolueno e *o*-xileno são dadas pelas equações (5.7), (5.8) e (5.9), respectivamente, para a mistura dos compostos BTX:

$$\mu_{x_b} = - \frac{\mu_{máx_b} \cdot S_b}{\left(Ks_b + S_b + S_t \left(\frac{Ks_b}{Ks_t} \right) + \frac{S_b S_t}{Ks_t} + S_x \left(\frac{Ks_b}{Ks_x} \right) + \frac{S_b S_x}{Ks_x} \right)} \quad (5.7)$$

$$\mu_{x_t} = - \frac{\mu_{máx_t} \cdot S_t}{\left(Ks_t + S_t + S_b \left(\frac{Ks_t}{Ks_b} \right) + \frac{S_t S_b}{Ks_b} + S_x \left(\frac{Ks_t}{Ks_x} \right) + \frac{S_t S_x}{Ks_x} \right)} \quad (5.8)$$

$$\mu_{x_x} = - \frac{\mu_{máx_x} \cdot S_x}{\left(Ks_x + S_x + S_b \left(\frac{Ks_x}{Ks_b} \right) + \frac{S_x S_b}{Ks_b} + S_t \left(\frac{Ks_x}{Ks_t} \right) + \frac{S_x S_t}{Ks_t} \right)} \quad (5.9)$$

5.1.4.3.3 Modelo de Inibição Acompetitiva

As taxas de crescimento específico no benzeno, tolueno e o-xileno são dadas pelas equações (5.10), (5.11) e (5.12), respectivamente, para a mistura dos compostos BTX:

$$\mu_{x_b} = - \frac{\mu_{máx_b} \cdot S_b}{\left(Ks_b + S_b + \frac{S_b S_t}{Ks_t} + \frac{S_b S_x}{Ks_x} \right)} \quad (5.10)$$

$$\mu_{x_t} = - \frac{\mu_{máx_t} \cdot S_t}{\left(Ks_t + S_t + \frac{S_t S_b}{Ks_b} + \frac{S_t S_x}{Ks_x} \right)} \quad (5.11)$$

$$\mu_{x_x} = - \frac{\mu_{máx_x} \cdot S_x}{\left(Ks_x + S_x + \frac{S_x S_b}{Ks_b} + \frac{S_x S_t}{Ks_t} \right)} \quad (5.12)$$

5.1.4.3.4 Efeito do tolueno e o-Xileno na biodegradação do benzeno

Nas cinéticas do benzeno na presença do outro contaminante resulta numa menor velocidade de biodegradação comparada à cinética de biodegradação monocomponente, devido à disputa da cultura por esse outro contaminante.

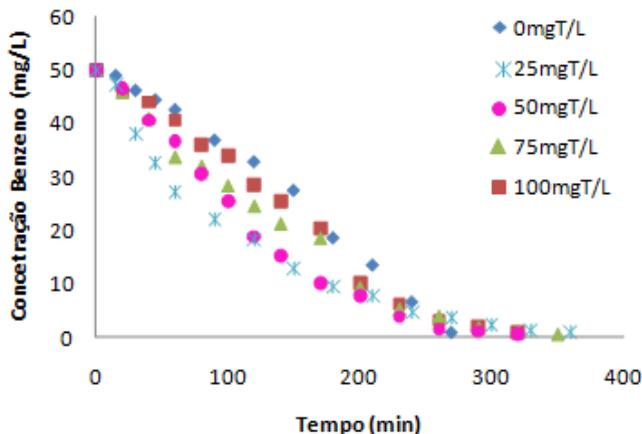


Figura 5.10 - Cinética de biodegradação do benzeno na mistura bicomponente com tolueno avaliando as diferentes concentrações de tolueno.

Através da Figura 5.10, verifica-se que para uma concentração inicial de 50 mg/L de benzeno, a biodegradação foi estudada com simultânea presença de tolueno em diferentes concentrações (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L). Pela Figura 5.10 percebe-se que a biodegradação do benzeno não foi inibida na presença de elevada concentração de tolueno, em 100 mg/L comparado a ele mesmo puro. Ainda podemos observar que ao longo da cinética, mais aproximadamente aos 200 min todas as concentrações em estudos começaram a obter o mesmo perfil e depois as mesmas seguem para atingir o equilíbrio da biodegradação em cerca de 360 min.

A Tabela 5.3 nos mostra que realmente houve inibição entre as concentrações e através do coeficiente de regressão linear podemos dizer que tipo de inibição esteve presente na biodegradação bicomponente BT em suas diversas concentrações. A estimativa dos parâmetros apresentados na Tabela 5.3, para cada um dos modelos foi feita por regressão não linear, através do *Software* Statistica, versão 7.0. Pode-se observar que para mistura de Benzeno com concentração inicial de 50 mg/L para todas as concentrações de Tolueno (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L), o modelo de Inibição Acompetitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,87, 0,82, 0,93, 0,82, respectivamente.

Através da Figura 5.11, verifica-se que para uma concentração inicial de 50 mg/L de benzeno, a biodegradação foi estudada com

simultânea presença de o-xileno em diferentes concentrações (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L). Na Figura 5.11 a biodegradação do benzeno não foi inibida na presença de elevada concentração de o-xileno, em 100 mg/L comparado a ele mesmo puro. Ainda pode-se observar que nas concentrações de 75 mg/L e 100 mg/L as cinéticas de biodegradação apresentam semelhanças no perfil. A mesma percepção tem-se ao observar os perfis nas concentrações de 25 mg/L e 50 mg/L.

Tabela 5.3 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente BT

Mistura	C ₀ (mg/L)	Modelo	R ²
B (B/T)	50/100	Inibição competitiva	0,80
B (B/T)	50/100	Inibição acompetitiva	0,82
B (B/T)	50/100	Inibição não competitiva	0,78
B (B/T)	50/75	Inibição competitiva	0,88
B (B/T)	50/75	Inibição acompetitiva	0,93
B (B/T)	50/75	Inibição não competitiva	0,91
B (B/T)	50/50	Inibição competitiva	0,79
B (B/T)	50/50	Inibição acompetitiva	0,82
B (B/T)	50/50	Inibição não competitiva	0,81
B (B/T)	50/25	Inibição competitiva	0,76
B (B/T)	50/25	Inibição acompetitiva	0,87
B (B/T)	50/25	Inibição não competitiva	0,85

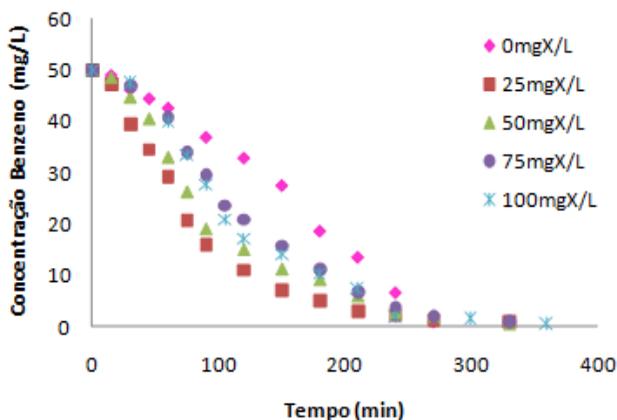


Figura 5.11 - Cinética de biodegradação do benzeno na mistura bicomponente com o-xileno avaliando as diferentes concentrações de o-xileno.

A Tabela 5.4 nos mostra que realmente houve inibição e através do coeficiente de regressão linear podemos dizer que tipo de inibição esteve presente na biodegradação bicomponente BX em suas diversas concentrações. Podemos observar que para mistura de benzeno com concentração inicial de 50 mg/L para todas as concentrações de o-xileno (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L), o modelo de Inibição Acompetitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,98, 0,95, 0,89, 0,87, respectivamente.

Tabela 5.4 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente BX

Mistura	C ₀ (mg/L)	Modelo	R ²
B (B/X)	50/100	Inibição Competitiva	0,79
B (B/X)	50/100	Inibição Acompetitiva	0,87
B (B/X)	50/100	Inibição Não Competitiva	0,80
B (B/X)	50/75	Inibição Competitiva	0,83
B (B/X)	50/75	Inibição Acompetitiva	0,89
B (B/X)	50/75	Inibição Não Competitiva	0,86
B (B/X)	50/50	Inibição Competitiva	0,74
B (B/X)	50/50	Inibição Acompetitiva	0,95
B (B/X)	50/50	Inibição Não Competitiva	0,80
B (B/X)	50/25	Inibição Competitiva	0,91
B (B/X)	50/25	Inibição Acompetitiva	0,98
B (B/X)	50/25	Inibição Não Competitiva	0,95

5.1.4.3.5 Efeito do Benzeno e o-Xileno na Biodegradação do Tolueno

A biodegradação do tolueno com diferentes concentrações de benzeno e o-xileno é apresentada na Figura 5.12 e 5.13, respectivamente.

Através da Figura 5.12, verifica-se que para uma concentração inicial de 50 mg/L de tolueno, a biodegradação foi estudada com simultânea presença de benzeno em diferentes concentrações (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L). Pela Figura 5.12 percebe-se que a biodegradação do tolueno foi inibida na presença de elevada concentração de benzeno, em 100 mg/L. Ainda pode-se observar que ao longo da cinética, mais aproximadamente aos 180 min todas as

concentrações em estudos começaram a obter o mesmo perfil e depois as mesmas seguem para atingir o equilíbrio da biodegradação em aproximadamente 240 min.

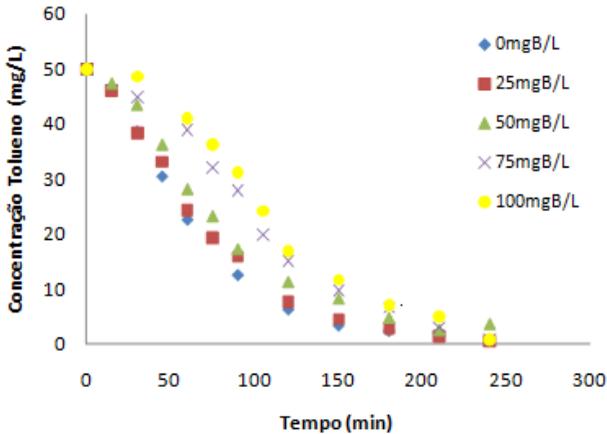


Figura 5.12 - Cinética de biodegradação do tolueno na mistura bicomponente com benzeno avaliando as diferentes concentrações do benzeno

Tabela 5.5 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente TB.

Mistura	C_0 (mg/L)	Modelo	R^2
T (T/B)	50/100	Inibição Competitiva	0,85
T (T/B)	50/100	Inibição Acompetitiva	0,78
T (T/B)	50/100	Inibição Não Competitiva	0,74
T (T/B)	50/75	Inibição Competitiva	0,84
T (T/B)	50/75	Inibição Acompetitiva	0,83
T (T/B)	50/75	Inibição Não Competitiva	0,81
T (T/B)	50/50	Inibição Competitiva	0,87
T (T/B)	50/50	Inibição Acompetitiva	0,81
T (T/B)	50/50	Inibição Não Competitiva	0,78
T (T/B)	50/25	Inibição Competitiva	0,86
T (T/B)	50/25	Inibição Acompetitiva	0,81
T (T/B)	50/25	Inibição Não Competitiva	0,79

Pela Tabela 5.5 observa-se que realmente houve inibição e através do coeficiente de regressão linear podemos dizer que tipo de inibição

esteve presente na biodegradação bicomponente TB em suas diversas concentrações. Pode-se observar que para a mistura de Tolueno com concentração inicial de 50 mg/L para com todas as concentrações de Benzeno (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L), o modelo de Inibição Competitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,86, 0,87, 0,84, 0,85, respectivamente.

Na Figura 5.13, novamente para uma concentração inicial de 50 mg/L de tolueno, a biodegradação foi estudada com simultânea presença de o-xileno em diferentes concentrações (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L). Percebe-se que a biodegradação do tolueno foi inibida na presença de elevada concentração de o-xileno. Ao longo da cinética, as concentrações de 25mg/L e 50mg/L obtiveram relativamente o mesmo perfil, sendo que todas atingem o equilíbrio da biodegradação em aproximadamente 300 min.

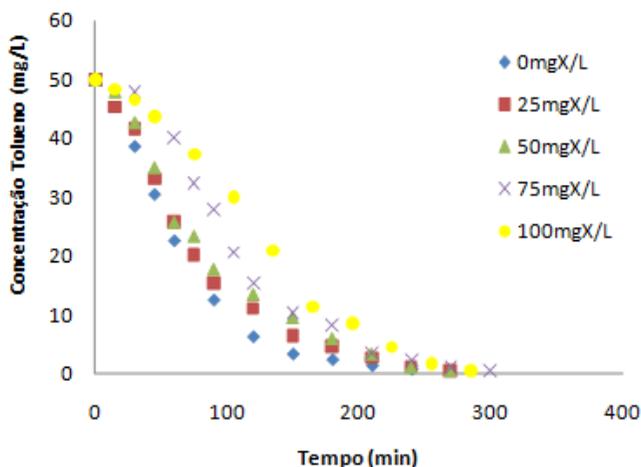


Figura 5.13 - Cinética de biodegradação do tolueno na mistura bicomponente com o-xileno avaliando as diferentes concentrações de o-xileno.

Abaixo na Tabela 5.6 observa que realmente houve inibição e através do coeficiente de regressão linear pode-se dizer que tipo de inibição esteve presente na biodegradação bicomponente TX em suas diversas concentrações. Pode-se observar que para mistura de Tolueno com concentração inicial de 50 mg/L para todas as concentrações de Benzeno (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L), o modelo de Inibição Competitiva novamente foi o que melhor apresentou concordância com

os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,86, 0,85, 0,82, 0,81, respectivamente.

Tabela 5.6 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente TX

Mistura	C ₀ (mg/L)	Modelo	R ²
T (T/X)	50/100	Inibição Competitiva	0,81
T (T/X)	50/100	Inibição Acompetitiva	0,80
T (T/X)	50/100	Inibição Não Competitiva	0,78
T (T/X)	50/75	Inibição Competitiva	0,82
T (T/X)	50/75	Inibição Acompetitiva	0,81
T (T/X)	50/75	Inibição Não Competitiva	0,80
T (T/X)	50/50	Inibição Competitiva	0,85
T (T/X)	50/50	Inibição Acompetitiva	0,83
T (T/X)	50/50	Inibição Não Competitiva	0,82
T (T/X)	50/25	Inibição Competitiva	0,86
T (T/X)	50/25	Inibição Acompetitiva	0,84
T (T/X)	50/25	Inibição Não Competitiva	0,81

5.1.4.3.6 Efeito do benzeno e tolueno na biodegradação do o-Xileno

A biodegradação do o-xileno com diferentes concentrações de benzeno e tolueno é apresentada na Figura 5.14 e 5.15, respectivamente.

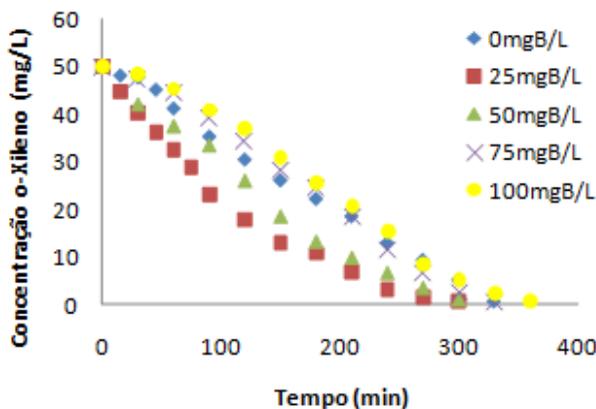


Figura 5.14 - Cinética de biodegradação do o-xileno na mistura bicomponente com benzeno avaliando as diferentes concentrações do benzeno.

Através da Figura 5.14, verifica-se que para uma concentração inicial de 50 mg/L de o-Xileno, a biodegradação foi estudada com simultânea presença de benzeno em diferentes concentrações (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L). Pela Figura 5.14 percebe-se que a biodegradação do o-Xileno foi inibida na presença de elevada concentração de benzeno, 75mg/L e 100 mg/L, sendo que nas concentrações inferiores (25mg/L, 50mg/L) não houve inibição. Pode-se observar que para atingir o equilíbrio da biodegradação para todas as concentrações foi necessário aproximadamente 380 min.

Tabela 5.7 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente XB.

Mistura	C ₀ (mg/L)	Modelo	R ²
X (X/B)	50/100	Inibição Competitiva	0,89
X (X/B)	50/100	Inibição Acompetitiva	0,97
X (X/B)	50/100	Inibição Não Competitiva	0,94
X (X/B)	50/75	Inibição Competitiva	0,86
X (X/B)	50/75	Inibição Acompetitiva	0,95
X (X/B)	50/75	Inibição Não Competitiva	0,90
X (X/B)	50/50	Inibição Competitiva	0,79
X (X/B)	50/50	Inibição Acompetitiva	0,80
X (X/B)	50/50	Inibição Não Competitiva	0,82
X (X/B)	50/25	Inibição Competitiva	0,88
X (X/B)	50/25	Inibição Acompetitiva	0,87
X (X/B)	50/25	Inibição Não Competitiva	0,90

Acima na Tabela 5.7 observa que realmente houve inibição e através do coeficiente de regressão linear pode-se dizer que tipo de inibição esteve presente na biodegradação bicomponente XB em suas diversas concentrações. Pode-se observar que para mistura de o-Xileno com concentração inicial de 50 mg/L para as concentrações de benzeno 25mg/L e 50mg/L houve Inibição Não Competitiva como mostra o coeficiente de correlação linear de 0,90 e 0,82, respectivamente. Para as concentrações de 75mg/L e 100mg/L, o modelo de Inibição Acompetitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,95 e 0,97, respectivamente.

Através da Figura 5.15, verifica-se que para uma concentração inicial de 50 mg/L de o-Xileno, a biodegradação foi estudada com

simultânea presença de tolueno em diferentes concentrações (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L). Verifica-se que a biodegradação do benzeno não foi inibida na presença de elevada concentração de tolueno. Ainda pode-se observar que nas concentrações de 75 mg/L e 100 mg/L as cinéticas de biodegradação apresentam semelhanças no perfil. A mesma percepção temos em observar os perfis nas concentrações de 25 mg/L e 50 mg/L quando ambas tendem ao equilíbrio da cinética de biodegradação.

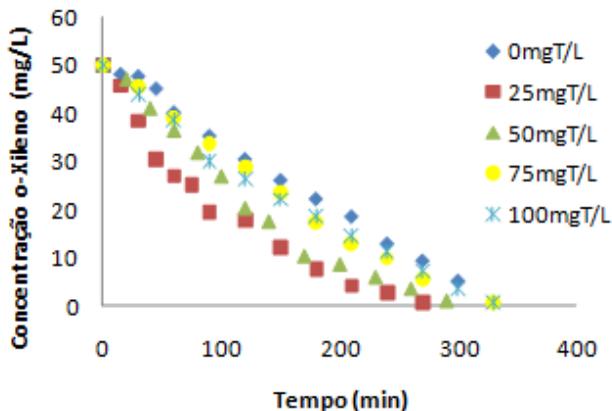


Figura 5.15 - Cinética de biodegradação do o-xileno na mistura bicomponente com tolueno avaliando as diferentes concentrações do tolueno.

Tabela 5.8 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, bicomponente XT

Mistura	C_0 (mg/L)	Modelo	R^2
X (X/T)	50/100	Inibição Competitiva	0,74
X (X/T)	50/100	Inibição Acompetitiva	0,75
X (X/T)	50/100	Inibição Não Competitiva	0,80
X (X/T)	50/75	Inibição Competitiva	0,83
X (X/T)	50/75	Inibição Acompetitiva	0,86
X (X/T)	50/75	Inibição Não Competitiva	0,87
X (X/T)	50/50	Inibição Competitiva	0,70
X (X/T)	50/50	Inibição Acompetitiva	0,84
X (X/T)	50/50	Inibição Não Competitiva	0,89
X (X/T)	50/25	Inibição Competitiva	0,75
X (X/T)	50/25	Inibição Acompetitiva	0,76
X (X/T)	50/25	Inibição Não Competitiva	0,87

Conforme Tabela 5.8 e através do coeficiente de regressão linear podemos dizer que tipo de inibição esteve presente na biodegradação bicomponente XT em suas diversas concentrações. Pode-se observar que para mistura de tolueno com concentração inicial de 50 mg/L para com todas as concentrações de benzeno (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L), o modelo de Inibição Não Competitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,87, 0,89, 0,87, 0,80, respectivamente.

5.1.4.4 Cinética de Biodegradação Tricomponente

As Figuras 5.16 a 5.18 apresentam a cinética de biodegradação para os compostos BTX, para o sistema tricomponente.

Através da Figura 5.16, verifica-se que para uma concentração inicial de 50 mg/L de benzeno, a biodegradação foi estudada com simultânea presença de tolueno e o-xileno em diferentes concentrações (25mg/L e 75mg/L). Percebe-se que a biodegradação do benzeno não foi inibida na presença da concentração de tolueno e o-xileno, sendo este o mesmo comportamento verificado na biodegradação bicomponente. É possível observar que ao longo da cinética o equilíbrio da biodegradação é atingido em cerca de 320 min para a concentração maior (50/75/75).

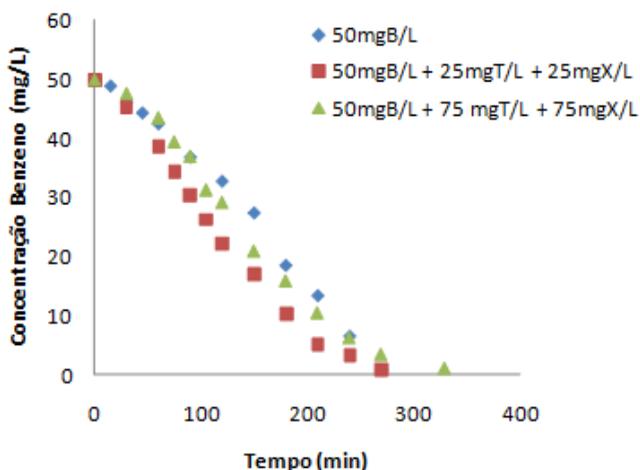


Figura 5.16 - Cinética de biodegradação da mistura tricomponente dos compostos BTX, avaliando as diferentes concentrações iniciais de benzeno

Na Tabela 5.9 é ilustrado o coeficiente de regressão linear mostrando o tipo de inibição que esteve presente na biodegradação tricomponente BTX em suas diversas concentrações. Pode-se observar que para ambas as misturas, o modelo de Inibição Não Competitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, resultando em um coeficiente de correlação de 0,91 e 0,97, respectivamente.

Tabela 5.9 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, tricomponente B (B/T/X)

Mistura	C_0 (mg/L)	Modelo	R^2
B (B/T/X)	50/75/75	Inibição Competitiva	0,89
B (B/T/X)	50/75/75	Inibição Acompetitiva	0,87
B (B/T/X)	50/75/75	Inibição Não Competitiva	0,91
B (B/T/X)	50/25/25	Inibição Competitiva	0,83
B (B/T/X)	50/25/25	Inibição Acompetitiva	0,94
B (B/T/X)	50/25/25	Inibição Não Competitiva	0,97

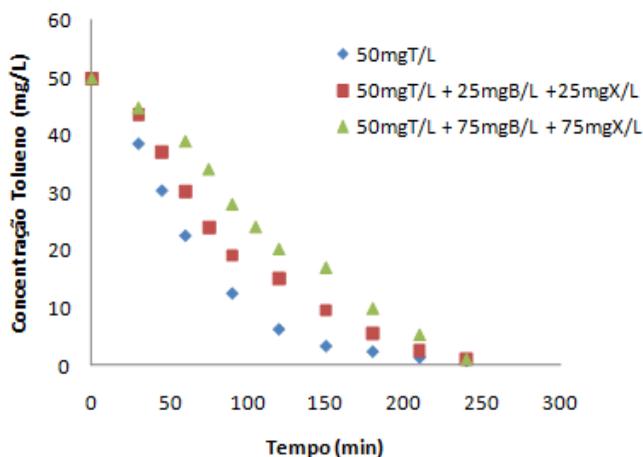


Figura 5.17 - Cinética de biodegradação da mistura tricomponente dos compostos BTX, avaliando as diferentes concentrações iniciais de tolueno.

Na Figura 5.19, verifica-se que para uma concentração inicial de 50 mg/L de tolueno, a biodegradação foi estudada com simultânea

presença de benzeno e o-xileno em diferentes concentrações (25mg/L e 75mg/L). Percebe-se que a biodegradação do tolueno foi inibida na presença da concentração de benzeno e o-xileno, sendo este o mesmo comportamento verificado na biodegradação bicomponente. É observado que para atingir o equilíbrio da biodegradação os compostos BTX levam aproximadamente 240 min.

Conforme Tabela 5.10 o coeficiente de regressão linear mostra o tipo de inibição que esteve presente na biodegradação tricomponente TBX em suas diversas concentrações. Pode-se observar que para ambas as misturas (50/75/75 e 50/25/25), o modelo de Inibição Acompetitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, resultando em um coeficiente de correlação de 0,98 e 0,82, respectivamente.

Tabela 5. 10 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, tricomponente T (T/B/X)

Mistura	C ₀ (mg/L)	Modelo	R ²
T (T/B/X)	50/75/75	Inibição Competitiva	0,79
T (T/B/X)	50/75/75	Inibição Acompetitiva	0,82
T (T/B/X)	50/75/75	Inibição Não Competitiva	0,81
T (T/B/X)	50/25/25	Inibição Competitiva	0,91
T (T/B/X)	50/25/25	Inibição Acompetitiva	0,98
T (T/B/X)	50/25/25	Inibição Não Competitiva	0,94

A Figura 5.18, mostra que para uma concentração inicial de 50 mg/L de o-xileno a biodegradação foi estudada com simultânea presença de benzeno e tolueno em diferentes concentrações (25mg/L e 75mg/L). Percebe-se que a biodegradação do o-xileno parte foi inibida na presença da concentração de benzeno e tolueno e parte não foi inibida. No início da cinética observa-se o favorecimento, no entanto no término prevaleceu à inibição pela maior concentração. É observado que para atingir o equilíbrio da biodegradação os compostos BTX levam aproximadamente 330 min.

Através da Tabela 5.12 o coeficiente de regressão linear mostra o tipo de inibição que esteve presente na biodegradação tricomponente XBT em suas diversas concentrações. Pode-se observar que para ambas as misturas (50/75/75 e 50/25/25), o modelo de Inibição Competitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais,

resultando em um coeficiente de correlação de 0,95 e 0,86, respectivamente.

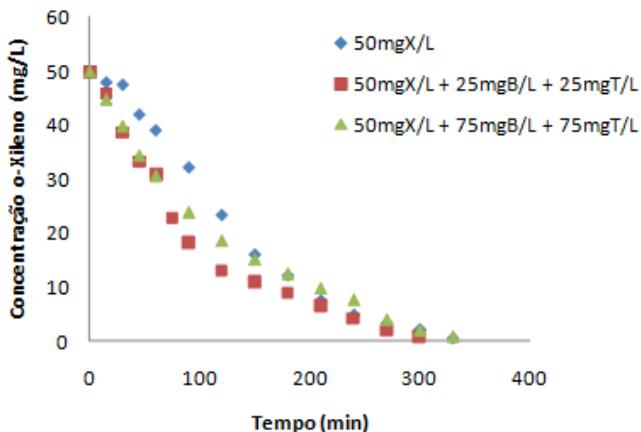


Figura 5.18 - Cinética de biodegradação da mistura tricomponente dos compostos BTX, avaliando as diferentes concentrações iniciais de o-xileno

Tabela 5.11 – Comparação dos modelos e seus valores experimentais obtidos para o coeficiente de regressão linear, tricomponente X (X/B/T).

Mistura	C ₀ (mg/L)	Modelo	R ²
X (X/B/T)	50/75/75	Inibição Competitiva	0,86
X (X/B/T)	50/75/75	Inibição Acompetitiva	0,83
X (X/B/T)	50/75/75	Inibição Não Competitiva	0,84
X (X/B/T)	50/25/25	Inibição Competitiva	0,95
X (X/B/T)	50/25/25	Inibição Acompetitiva	0,88
X (X/B/T)	50/25/25	Inibição Não Competitiva	0,90

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho foi realizado o estudo do processo de biodegradação avaliando o desempenho de modelos cinéticos de crescimento microbiano dos compostos BTX individualmente e em mistura, presentes em efluentes líquidos da Indústria Petroquímica, utilizando biofilmes. Foram realizados estudos cinéticos de biodegradação mono e multicomponente em biorreatores em batelada agitado, utilizando carvão ativado como suporte para a biomassa. Os parâmetros cinéticos e de equilíbrio foram obtidos experimentalmente no Laboratório de Transferência de Massa - LABMASSA, do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC.

A cinética de biodegradação dos compostos BTX, para uma concentração de 50 mg/L, atinge o equilíbrio em torno de 270 minutos para o benzeno, 240 minutos para o tolueno e em torno de 330 minutos para o o-xileno, monocomponente. Pelo ajuste cinético, comprova-se que a biodegradação do tolueno é a mais rápida comparativamente aos contaminantes estudados.

Na biodegradação dos compostos BTX monocomponentes no modelo de Monod destacou-se o Benzeno como o composto dentre os três com a maior taxa de crescimento específico. Observando os valores de K_s para o Modelo de Monod a cultura apresentou maior afinidade com o o-xileno e desta forma resultou num maior rendimento, apresentando uma boa concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,96.

Na biodegradação da mistura binária BT, para uma concentração inicial de 50 mg/L de benzeno, e em diferentes concentrações de tolueno (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L), a biodegradação do benzeno não foi inibida na presença de elevada concentração de tolueno. O modelo de Inibição Acompetitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,87, 0,82, 0,93, 0,82, respectivamente.

Os mesmos ensaios foram feitos para a biodegradação da mistura binária BX e, da mesma forma, a biodegradação do benzeno não foi inibida na presença de elevada concentração de o-xileno. Novamente o modelo de Inibição Acompetitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de

correlação de 0,98, 0,95, 0,89, 0,87, respectivamente.

Para a biodegradação binária TB para uma concentração inicial de 50 mg/L de tolueno em diferentes concentrações de benzeno (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L) e TX nas mesmas condições a biodegradação do tolueno foi inibida, tanto na presença de elevada concentração de benzeno como o-xileno. Através do coeficiente de regressão linear o modelo de Inibição Competitiva foi o que melhor apresentou concordâncias com os resultados experimentais TB e TX, com um coeficiente de correlação de 0,86, 0,87, 0,84 e 0,85 para TB, e 0,86, 0,85, 0,82 e 0,81 para TX, respectivamente.

Na concentração inicial de 50 mg/L de o-Xileno, a biodegradação foi estudada com simultânea presença de benzeno em diferentes concentrações (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L). Nestas cinéticas de biodegradação do o-Xileno a inibição ocorreu na presença de elevada concentração de benzeno (75mg/L e 100 mg/L), sendo que nas concentrações inferiores (25mg/L, 50mg/L) não houve inibição. No entanto, na mistura de o-Xileno com concentração inicial de 50 mg/L para as concentrações de Benzeno 25mg/L e 50mg/L houve Inibição Não Competitiva como mostra o coeficiente de correlação linear de 0,90 e 0,82, respectivamente.

Para as concentrações de 75mg/L e 100mg/L, o modelo de Inibição Acompetitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,95 e 0,97, respectivamente. Com uma concentração inicial de 50 mg/L de o-Xileno, com simultânea presença de tolueno em diferentes concentrações (25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L) verificou-se que a biodegradação do benzeno não foi inibida na presença de elevada concentração de tolueno. Neste caso de biodegradação o modelo de Inibição Não Competitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, com um coeficiente de correlação de 0,87, 0,89, 0,87, 0,80, respectivamente.

Na biodegradação tricomponente BTX com concentração inicial de 50 mg/L de benzeno, a biodegradação foi estudada com simultânea presença de tolueno e o-xileno em diferentes concentrações (50/25/25 e 50/75/75) sendo que a biodegradação do benzeno não foi inibida na presença da concentração de tolueno e o-xileno. Em ambas as misturas, o modelo de Inibição Não Competitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais, resultando em um coeficiente de correlação de 0,91 e 0,97, respectivamente. Já para uma concentração inicial de 50 mg/L de tolueno, a biodegradação foi estudada com simultânea presença de benzeno e o-xileno em diferentes

concentrações (50/25/25 e 50/75/75). Neste caso o tolueno foi inibido na presença da concentração de benzeno e o-xileno. O coeficiente de regressão linear que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais foi o modelo de Inibição Acompetitiva, com coeficiente de correlação de 0,98 e 0,82, respectivamente.

Para uma concentração inicial de 50 mg/L de o-xileno a biodegradação com simultânea presença de benzeno e tolueno em diferentes concentrações (25mg/L e 75mg/L) a biodegradação do o-xileno parte foi inibida na presença da concentração de benzeno e tolueno e parte não foi inibida. Do mesmo modo para ambas misturas o modelo de Inibição Competitiva foi o que melhor apresentou concordância com os resultados experimentais com coeficiente de correlação de 0,95 e 0,86, respectivamente.

De forma geral, pode-se concluir que tanto para a biodegradação de um único substrato, quanto para múltiplos substratos, o comportamento cinético será diferente para cada caso, devido principalmente às diferentes concentrações que estarão presentes no efluente, ao tipo de microrganismos presentes capazes de degradar em maior velocidade ou não os compostos, dentre outros fatores como pH, temperatura e requisitos nutricionais para a cultura poder desempenhar de melhor forma a degradação.

Com o objetivo de prosseguir com as investigações e resultados encontrados neste trabalho seguem algumas sugestões:

Obtenção de dados experimentais para a biodegradação dos compostos BTX em uma coluna de leito fixo, com fluxo contínuo;

Desenvolver a modelagem matemática de biorreatores para biodegradação de compostos tóxicos utilizando a cinética de biodegradação descrita pelo modelo *SKIP* para os compostos BTX;

Utilização de outros materiais suportes para avaliar o potencial de fixação dos microrganismos nos mesmos;

Aprofundamento do estudo nos biofilmes, identificando-se os microrganismos presentes;

Identificação e quantificação dos produtos formados pela biodegradação dos compostos BTX.

REFERÊNCIAS

ABUHAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, T.; MEHMETOĞLU, U. Kinetics model for growth os *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenolbiodegradation. *Process Biochemistry*, v.39, p.983-988, 2004.

ALEXANDER, M. (1994). Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, Inc., USA..p. 302.

ALVAREZ, P. J. J.; HUNT, C. S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v.44, n.2, p.83-104, 2002.

ALVAREZ, P. J. J.; VOGEL, T. M. Substrate interactions of benzene, toluene, and paraxylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *App Environ Microbiol*, v.57, n.10, p2981-2985, 1991.

ANP, Agência Nacional do Petróleo. **Produção Nacional de Derivados**. Disponível em:
<http://www.anp.gov.br/doc/dados_estatisticos>. Acesso em: 24 nov. 2008.

APPLEGATE, B. M.; KEHRMEYER, S. R.; SAYLER, G. S. A chromosomally based todluxCDABE whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl Environ Microbiology*, v.64, n.7, p.2730-2735, 1998.

ARINBASAROV, M.U.; KARPOV, A.V.; SELEZNEV, S.G.; GRISHCHENKOV, V.G. AND BORONIN, A.M. Approaches to creation of bacterial consortium for efficient biorremediation of oil-contaminated soil. *Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium*. Volume 4, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 523-528. 1997.

ARVIN, E.; JENSEN, B. K.; GUNDERSEN, A. T. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl Environ Microbiol*, v.55, p.3221-3225, 1989.

AZEREDO, J. and Oliveira, R. (2000). "The Role of Exopolymers Produced by *Sphingomonas paucimobilis* in Biofilm Formation and Composition". *Biofouling*, 16 (1), 17-27.

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

BAUMGARTEN, M. G. Z. & POZZA, S. A. P. Qualidade de águas – Descrição de parâmetros químicos referidos na legislação ambiental. 2001.

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*, v. 48, p. 413-423, 2004.

BERTONI, G.; BOLOGNESE, F.; GALLI, E.; BARBIERI, P. Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene and *o*-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzer* OX1. *Appl Environ Microbiol*, v.62, p.3704-3711, 1996.

BIELEFELDT, A. R.; STENSEL, H. D. Modeling competitive inhibition effects during biodegradation of BTEX mixtures. *Wat Res*, v.33, n.3, p.707-714, 1999a.

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

BONO, R.; BUGLIOSI, H. E.; SCHILIRÓ, T.; GILLI, G. The Lagrange Street story: the prevention of aromatics air pollution during the last nine years in a European city. *Atmos Environ*, v.35, p.107-113, 2001.

BOTT, T. R. (1993). Aspects of Biofilm Formation and Destruction. *Corrosion Reviews*, 11, 1-24.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein - Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

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.

BRYERS, J. D. (1983). Modelling Biofilm Accumulation. In: Bazin, M. Y. and Prosser, J. I. eds. *Physiological Models in Microbiology*, Boca Raton: CRC, 2, 110-144.

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

CARMOUZE, J. P. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudos e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher: FAPESP. 254p. 1994.

CHAÎNEAU, C. H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci Total Environ*, v.227, n.2/3, p.237-247, 1999.

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. *Biotechnol Bioeng*, v.41, p.1057-1065, 1993.

CHARACKLIS, W. G.; COOKSEY, K. E. (1983). Biofilms and Microbial Fouling. *Adv. Appl. Microbiol.*, 29, 93-138.

CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. (1989). Structure and Function of Biofilms. John Wiley & Sons, Chichester.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (1990). Biofilms: A Basis for an Interdisciplinary Approach. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 3-15.

CHARACKLIS, W. G.; MCFETERS, G. A.; MARSHALL, K. C. (1990). *Physiological Ecology in Biofilms Systems. Biofilms*. New York: Jonh Wiley and Sons, Inc, 341-394.

CHRISTENSEN, B. E.; CHARACKLIS, W. G. (1990). *Physical and Chemical Properties of Biofilms. Biofilms*. New York: Jonh Wiley and Sons, Inc, 93-130.

CHOI, Y. B.; LEE, J. Y.; KIM, H. S. A novel bioreactor for the biodegradation of inhibitory aromatic solvents: experimental results and mathematical analysis. *Biotechnol Bioeng*, v.40, p.1403-1411, 1992.

CLICK MACAÉ, “*O Refino – Passo a Passo*”. Disponível em: <www.clickmacae.com.br> Acesso em 25 de nov. de 2008.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), Resolução CONAMA nº 357/2005. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2008.

CORDAZZO, J. “*Modelagem e Simulação Numérica do Derramamento de Gasolina Acrescida de Álcool em Águas Subterrâneas*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural biremediation of aquifer material contaminated with gasoline-ethanol mixtures. *Rev Microbiol*, v.27, n.1, p.19-26,1996b.

CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.4, n.1, n.2, p.71-75, 1999.

CORSEUIL, H.X., FERNANDES, M. “*Efeito do Etanol no Aumento da Solubilidade de Compostos Aromáticos Presentes na Gasolina Brasileira*”, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 1996.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, C.; FERREIRA, R. S.; ALVAREZ, P. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Water Res*, v.32, n.7, p.2065-2072, 1998.

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

DALTON, H.; STIRLING, D. I.; QUAYLE, J. R. Co-metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 297, p. 481-496, 1982.

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*. *Biotechnol Bioeng*, v.62, n.5, p.526-536, 1999.

DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixtures. *Bioremediation Journal*, v.4, n.1, p.1-9, 2000.

DEEB, R. A.; HU, H.-Y.; HANSON, J. R.; SCOW, K. M.; ALVAREZ-COHEN, L. Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environ SciTechnol*, v.35, p.312-317, 2001.

DEL'ARCO, J. P. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimentos arenosos. 1999. 171p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

deNARDI, I. R.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. *Water Sci Tech*, v.45, n.10, p.175-180, 2002.

deNARDI, I. R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Kinetics of BTEX degradation in a packed-bed anaerobic reactor. *Biodegradation*, v.18, p.83-90, 2007.

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.

DOU, J., LIU, X., HU, Z. Substrate Interactions during Anaerobic Biodegradation of BTEX by the Mixed Cultures under Nitrate Reducing

Conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 158, p. 264-272, 2008.

DOURADO, F. F. M. *Tratabilidade de água subterrânea contaminada com hidrocarbonetos do petróleo*. 1998. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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*, v.47, p.417-425, 2002.

FLEMMING, H-C., (1993). Biofilms and Environmental Protection. *Water Science and Technology*, **27** (7-8), 1-10.

FLEMMING, H-C., (1991). Biofouling in Water Treatment. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Heidelberg, Springer-Verlag, 47-80.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. (1999). Extracellular Polimeric Substances (EPS): the Biofilm Construction Material. *Biofouling and Materials: COST 520 Workshop*. Bern: EDMZ, 2-18.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, v.12, n.5, p.325-335, 2001.

GJALTEMA, A., (1996). *Biofilm Development: Growth versus Detachment*. Dissertação de Doutorado. Delft: Technische Universiteit Delft, Netherlands.

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

GUELLI U. DE SOUZA, S. M. A.; BRANDAO, H. L.; SOUZA, A. A. U. *Modeling of liquid pollutant biodegradation process in a fluidized bed reactor with biofilm*. *Separation and Purification Technology*, v. 60, p. 162-173, 2008.

GUSMÃO, V. R.; MARTINS, T. H.; CHINALIA, F. A.; SAKAMOTO, I. K.; THIEMANN, O. H. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. *Process Biochem*, v.41, p.1391-1400, 2006.

GUSMÃO, V. R. *Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator anaeróbico horizontal de leito fixo utilizado na remoção de BTEX*. 2005. 174p. Tese Doutorado em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

HAIGLER, B. E.; PETTIGREW, C. A.; SPAIN, J. C. Biodegradation of mixtures of substituted benzens by *Pseudomonas sp.* strain JS150. *Appl Environ Microbiol*, v.58, p.2237-2244, 1992.

HAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOĞLU, T.; MEHMETOĞLU, U. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene and phenol mixtures. *Process Biochemistry*, v.39, p.27-35, 2003.

HEKMAT, D.; STEPHAN, M.; BAUER, R.; FEUCHTINGER, A.; VORTMEYER, D. Modelling of multispecies biofilm population dynamics in a trickle-bed bioreactor used for waste gas treatment. *Process Biochemistry*, v.41, p.1409-1416, 2006.

HERZBERG, M.; DOSORETZ, C.G.; GREEN, M. Increased biofilm activity in BGAC reactors. *AIChE Journal*, v. 51, n. 3, p. 1042-1047, 2005.

HSIEN, T. Y.; LIN, Y. -H. Biodegradation of phenolic wastewater in a fixed biofilm reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, p. 95-103, 2005.

HORAN, N. J.; ECCLES, C. R. (1986). Purification and Characterization of Extracellular Polysaccharide from Activated Sludges. *Water Research*, 20, 1427-1432.

JIANG, Y.; WEN, J.; BAI, J.; JIA, X.; HU, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *J of Hazard Materials*, v.147, p.672-676, 2007.

JORNAL ETADO DE SÃO PAULO. *On Line*. Disponível na internet em: <http://www.jornalestadosaopaulo.com.br> . Acessado 4 de Dezembro de 2007.

JO, M.-S.; RENE, E. R.; KIM, S.-H.; PARK, H.-S. An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology. *J Hazardous Materials*, in press, 2007.

JOU, C. -J. G.; HUANG, G. -C. A pilot study for oil refinery wastewater treatment using a fixed-film bioreactor. *Advances in Environmental Research*, v. 7, p. 463-469, 2003.

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

KAIPPER, B. I. A. *Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel*. 2003. 179p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KOTTURI, G.; ROBINSON, C. W.; INNISS, W. E. Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.34, p.539-543, 1991.

KUMAR, A.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Bioch Engineering Journal*, v.22, p.151-159, 2005.

LECHEVALLIER, M. W.; MCFETERS, G. A. (1985). Interactions between Heterotrophic Plate Count Bacteria and Coliform Organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1338-1341.

LEE, J.-Y.; JUNG, K. H.; CHOI, S. H.; KIM, H.-S. Combination of the *tod* and the *tol* pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene, and p-xylene mixture. *Appl Environ Microbiol*, v.61, n.6, p.2211-2217, 1995a.

- LEE, J.-Y.; ROH, J.-R.; KIM, H.-S. Amplification of toluene dioxygenase genes in a hybrid *Pseudomonas* strain to enhance the biodegradation of benzene, toluene and p-xylene mixture. *Biotechnol Bioeng*, v.45, n.11, p.488-494, 1995b.
- LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. 1ed., São Paulo. Editora Edgard Blücher LTDA, 2001, v.2, 541p.
- LIN, C.-W.; CHENG, Y.-W.; TSAI, S.-L. Multisubstrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, in press, 2007.
- LIN, H.S., HUANG, C.Y. Adsorption of BTEX from Aqueous Solutions by Macroreticular Resins, *Journal of Hazardous Material*, v. 70, p. 21-37, 1999.
- LOVANH, N.; HUNT, C. S.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. *Water Res*, v.36, p.3739-3746, 2002.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS FARR, A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAK, K. S.; GRIEBLER, C.; MECKENSTOCK, R. U.; LIEDL, R.; PETER, A. Combined application of conservative transport modelling and compound-specific carbon isotope analyses to assess in situ attenuation of benzene, toluene, and o-xylene. *J of Contaminant Hydrology*, v.88, p.306-320, 2006.
- MALAMUD, E. S. T.; JÚNIOR C. J. A.; Rosário, M.; CORSEUIL, H. X. Avaliação da atenuação natural dos contaminantes BTEX e etanol em um derramamento controlado de gasolina através do balanço de massa. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23.,2005, Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- MARINO, J. B. Impactos Ambientais do Refino de Petróleo. Rio de Janeiro, Ed. Interciência, 2005. 228p.
- MELLO, J.M.M. “*Biodegradação dos Compostos BTEX em um Reator*

com *Biofilme*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MENDES, R. Exposição ocupacional ao benzeno e seus efeitos sobre a saúde dos trabalhadores. *Revista da Associação Médica do Brasil*, v.39, p.249-256, 1993.

MERCK INDEX: *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 10th edn. BUDAVARI, S., O'NEIL, M.J., SMITH, A., HECKELMAN, P.E. - Inc., Rahway, New Jersey, 1989.

METCALF & EDDY. *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse*. Metclaf & Eddy, Inc. 3 ed, 1334 pp. 1991.

MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. *Adv Env Res*, vol.7, n.4, p.881-887, 2003.

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

MORGAN, P.; STEPHEN, T.; WATKINSON, R. J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in gas-condensate-contaminated groundwater. *Environmental Pollution*, v.82, p.181-190, 1993.

MOTA, S. *Introdução à engenharia ambiental*. 3 ed. Rio de Janeiro, Ed. Abes, 2003. 419p.

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

NARANG, A. Comparative analysis of some models of gene regulation in mixed-substrate microbial growth. *J of Theoretical Biology*, v.246, p.489-501, 2006.

- NARDI, I. R.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. **Water Science and Technology**, v. 45, n. 10 p. 175–180, 2002.
- NARDI, I. R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 587-592, 2005.
- NETO, A.A.D. “*Refino de Petróleo e Petroquímica*”, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponível www.nupeg.ufrn.br/1.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2007.
- NEU, T. R. (1994). Ecophysiology and Structure – Biofilms and Microbial Mats. *Biostabilization of Sediments*. Oldenburg, Germany: Verlag, 9-15.
- NICHOLSON, C. A.; FATHEPURE, B. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*, v.70, n.2, p.1222-1225, 2004.
- NIEAD/COPPE. “*Curso de Tratamento de Efluentes na Indústria de Petróleo*”, Núcleo Interdisciplinar de Estudos Ambientais e Desenvolvimento - NIEAD, COPPE/UFRJ, 2002.
- NUHOGLU, A.; YALCIN, B. Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*, v.40, p.1233-1239, 2005.
- NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. A importância da biodegradação anaeróbica em aquíferos impactados por gasolina e etanol. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23., 2005, Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- ODEGAARD, H.; RUSTEN, B.; WESTRUM, T. A new moving bed biofilm reactor- applications and results. *Water Science and Technology*, v. 29, p. 157–165, 1994.
- OH, Y.-S.; BARTHA, R. Construction of a bacterial consortium for the biofiltration of benzene, toluene and xylene emissions. *World J Microbiol Biotechnol*, v.13, p.627-632, 1997.
- OH, Y.-S.; SHAREEFDEEN, Z.; BALTZIS, B. C.; BARTHA R.

Interactions between benzene, toluene and p-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnol Bioeng*, v.44, p.533-538, 1994.

ORTEGA, F.S.; ROCHA, R.M.; ZAIAT, M.; PANDOLFELLI, V.C. Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via *gelcasting* em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias. *Cerâmica*, v. 47, n. 304, p. 199-203, 2001.

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

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

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, Salvador, 2002. 229p.

PETROBRAS, 2007. *On Line*. Disponível na internet em: <http://www.petrobras.com.br> Acessado 4 de Dezembro de 2007.

PHELPS, C. D.; YOUNG, L. Y. Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Adv Agronomy*, v.70, p.329-357, 2001.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J. T. C.; GROENESTIJN, W. J. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora sp.* strain T1. *Appl Environ Microbiol*, v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.

PRUDEN, A. J. *Biodegradation of methyl-tert-butyl ether*. 2002. 211p. Tese (Título de PhD in Environmental Science) – College of Engineering, University of Cincinnati.

PRUDEN, A.; SEDRAN, M. A.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. Biodegradation of MTBE and BTEX in an aerobic fluidized-bed reactor. *Water Sci Technol*, v.47, n.9, p.123-128, 2003.

- REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. D. B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol Bioeng*, v.69, p. 385-400, 2000.
- 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. *Environ Health Perspectives*, v.110, suppl.6, p.1005-1011, 2002.
- RIBEIRO, R. *Recuperação de águas contaminadas com gasolina utilizando reatores de leito fixo*. 2005. 186p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- 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.
- SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potential. *Process Biochemistry*, v.39, p.1001-1006, 2004.
- SCHRÖDER, M.; MÜLLER, C.; POSTEN, C.; DECKWER, W. D.; HECHT, V. Inhibition kinetics of phenol degradation from unstable steady-state data. *Biotechnol Bioeng*, v.54, p.567-576, 1997.
- SEDRAN, M. A. *MTBE and BTEX biodegradation in a porous pot and a fluidized bed reactor*. 2004. 158p. Tese (Titulo de PhD in Environmental Engineering) – College of Engineering, University of Cincinnati. SEGEL, I. H. *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley & Sons, 1975.
- SEKER, S.; BEYENAL, H.; SALIH, B.; TANYOLAC, A. Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.47, p.610-614, 1997.
- SHALABY, M. EL-S. A. EL-H. *Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by Burkholderia cepacia G4*. 2003. 143p. Tese (Titulo de PhD) – Biochemical Engineering Division GBF, Alemanha.

- SHIM, H.; YANG, S.-T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *J Biotechnol*, v.67, n.2-3, p.99-112, 1999.
- SHIM, H.; HWANG, B.; LEE S.-S., KONG S.-H. Kinetics of biodegradation of BTEX by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. *Biodegradation*, v.16, p.319-327, 2005.
- 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*, v.7, p.203-216, 2002.
- TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 441-446, 2004.
- TORTORA, Gerard J.; FUNCK, Berdell R.; CASE, Christine L. *Microbiologia*. 6ª edição; Porto Alegre; Artmed, 2000.
- TSAO, C.-W.; SONG, H.-G.; BARTHA, R. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Appl Environ Microbiol*, v.64, n.12, p.4924-4929, 1998.
- VON SPERLING, M. Princípios básicos do tratamento de esgotos. DESA-UFMG, v.2, 211 p., 1996.
- XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*. n. 76, p. 2-13, 2003.
- Zaiat, M.; Vieira, L. G. T.; Foresti, E. (1997). Spatial and temporal variations of monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor treating synthetic substrate. *Water Research*, vol. 31, 7, 1760-1766.
- WANG, S.-J.; LOH, K.-C. Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme Microb Technol*, v.25, p. 177-184, 1999.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. V. 12(3), p. 237-41, jun 2001.

WILSON, G. J.; PRUDEN, A.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. Biodegradation kinetics of MTBE in laboratory batch and continuous flow reactors. *ASCE J Environ Eng*, v.128, p.824-829, 2002.

WIMPENNEY, J. W. T.; PETERS, A.; SCOURFIELD, M. A. The Physiology and Biochemistry of Biofilm. Structure and Function of Biofilms. Inc, 111-127, 1993.

WORLD BANK GROUP, **Pollution Prevention and Abatement Handbook - Petroleum Refining**, 1998. Disponível em: <www.miga.org/miga_documents/PetroleumRefining.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2006.

YADAV, J. S.; REDDY, C. A. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, v.59, p.756-762, 1993.

YANO, T.; KOGA, S. Dynamic behaviour of the chemostat subject to substrate inhibition. *Biotechnol Bioeng*, v.11, p.139-153, 1969.

YOON, H.; KLINZING, G.; BLANCH, H. W. Competition for mixed substrates by microbial populations. *Biotechnol Bioeng*, v.19, p.1193-1210, 1977.

Apêndice A - História do petróleo

Organismos aquáticos, vegetais e animais, proliferam nos mares, apresentando uma lenta, porém constante degradação bacteriológica. Esta matéria orgânica decomposta migra para camadas superiores do subsolo e se concentra em rochas permeáveis que atuam como um reservatório. O conjunto dos produtos provenientes desta degradação são hidrocarbonetos e gases que futuramente seriam conhecidos como petróleo, ou seja, o "óleo de pedra" ou o "ouro negro" um produto que daria um impulso extraordinário ao desenvolvimento econômico da humanidade, mas que, em contrapartida, seria o pomo da discórdia que levaria muitos povos à guerra (CLICK MACAÉ,2008).

Uma substância natural rica em carbono e hidrogênio, lodosa, semi sólida, chamada betume, também conhecida como asfalto, assoma à superfície através de fendas e fissuras e é largamente utilizada, acredita-se que desde 5000 a.C., como argamassa nas construções de Babilônia e até mesmo na muralha de Jericó.

Há registros de sua utilização no Egito, até como coadjuvante no processo de mumificação.

O betume é utilizado também como impermeabilizante e na pavimentação de estradas. Apesar de ser altamente inflamável é pouco utilizado para a iluminação e, como ocorreria mais tarde nos Estados Unidos, é muito usado como medicamento.

Acredita-se que o betume serviria também como poderosa arma de guerra já que relatos de Homero na *Ilíada* falam de ataques a embarcações com bolas de fogo que não podiam ser apagadas.

Na China, ao escavarem poços em busca de sal, os chineses descobrem óleo e gás que devidamente canalizados são usados na iluminação e como combustível. Posteriormente, Marco Polo fará referência ao uso de "pedras negras que são queimadas como se fossem pedaços de madeira", ou seja, o uso do carvão mineral conhecido na China desde o início da era cristã.

Estranhamente, o conhecimento sobre o petróleo ficaria restrito ao Oriente e, com raras exceções, não chegaria ao Ocidente. Tal fato talvez se explique porque as ocorrências de betume ficavam além das fronteiras do Império Romano, sendo relatadas apenas como curiosidade, não sendo transmitido às futuras nações ocidentais. Mas há relatos que dão conta, a partir da Idade Média, da ocorrência de petróleo em algumas localidades da Europa, sendo os poços cavados manualmente pelos camponeses. A técnica do refino chegou à Europa transmitida pelos árabes, mas o petróleo é usado apenas como uma

panacéia por antigos monges e médicos.

George Bissell em 1853, vê pela primeira vez, no oeste do Estado da Pensilvânia nos Estados Unidos, o "óleo de pedra" borbulhando nos mananciais ou vazando nas minas de sal das florestas da região. Alguns poucos barris eram obtidos por métodos bem primitivos, escumando o óleo que ficava na superfície dos mananciais e dos córregos ou embebendo-o em trapos e cobertores.

Mais tarde Bissell, observando em uma garrafa aquele líquido negro e viscoso e que era inflamável, num lampejo, concebeu a idéia de que o óleo poderia ser utilizado não como remédio mas sim como iluminante.

Naquela época o mundo e especialmente os Estados Unidos viviam uma grande crise relacionada com a iluminação. A explosão populacional e a Revolução Industrial aumentaram sobremaneira a necessidade de um iluminante que até então se baseava no uso de um simples pavio impregnado de alguma gordura animal ou óleo vegetal.

Em 27 de agosto de 1859, o primeiro poço foi perfurado. A broca ao atingir 21 metros de profundidade deslizou mais alguns centímetros e fez jorrar petróleo. Estava nascendo a "Luz da Era", uma iluminação forte, brilhante e barata.

Além da querosene outros usos do petróleo foram sendo incorporados como a vaselina e a parafina e, principalmente, como lubrificante, essencial para o bom funcionamento das máquinas da nascente atividade industrial.

O resto da história é sobejamente conhecido. Os campos de petróleo se espalharam pelo mundo numa empreitada de guerras, invasões, ganância, dinheiro e poder. O petróleo passa a ser a principal fonte de energia mundial, transformando a paisagem contemporânea e o modo de vida moderno. Seus subprodutos passam a ser fundamentais para a agricultura, como fertilizantes, para a indústria química, de plásticos e tantas outras mais, tornando-o indispensável para os novos tempos.

A História do petróleo no Brasil

A história do petróleo no Brasil começou no ano de 1858, quando o Marquês de Olinda concedeu a José de Barros Pimentel o direito de extrair betume em terrenos situados nas margens do rio Marau, na Bahia.

Em 1930, depois de vários poços perfurados sem sucesso em

alguns estados brasileiros, o engenheiro agrônomo Manoel Inácio Bastos tomou conhecimento que os moradores de Lobato, na Bahia, usavam uma "lama preta", oleosa, para iluminar suas residências.

No dia 29 de abril de 1938, foi criado o Conselho Nacional do Petróleo (CNP), para avaliar os pedidos de pesquisa e lavra de jazidas de petróleo, marcando o início de uma nova fase da história do petróleo no Brasil.

Em 3 de outubro de 1953, o presidente Getúlio Vargas assinou a Lei intensa 2004, que instituiu o monopólio estatal da pesquisa e lavra, refino e transporte do petróleo e seus derivados e criou a Petróleo Brasileiro S.A. - Petrobras.

Um marco na história da Petrobras foi a decisão de explorar petróleo no mar. Em 1968, a companhia iniciou as atividades de prospecção offshore.

Entretanto, foi em Campos, no litoral fluminense, que a Petrobras encontrou a bacia que se tornou a maior produtora de petróleo do país. O campo inicial foi o de Garoupa, em 1974, seguido pelos campos gigantes de Marlim, Albacora, Barracuda e Roncador.

A flexibilização do monopólio foi outro fato importante da história recente do petróleo no Brasil. No dia 6 de agosto de 1997, o presidente Fernando Henrique Cardoso sancionou a lei 9478 que permitiu a presença de outras empresas para competir com a Petrobras em todos os ramos da atividade petrolífera.

Em 2003, a Petrobras dobrou a sua produção diária de óleo e gás natural ultrapassando a marca de 2 milhões de barris, no Brasil e no exterior. Hoje, a produção diária é de 1.918 mil/bpd (bpd de petróleo e LGN) e 382 mil boe de gás natural por dia (ANP, 2008).

O valor das ações da Petrobras subiu 1.200% entre maio de 1997 e junho de 2007 e a empresa obteve um lucro recorde em 2006 de 25,9 bilhões de reais, ano em que tornou-se a oitava maior empresa de petróleo do mundo (PETROBRÁS, 2007).

Em 2008 a Petrobras ultrapassou a Microsoft, tornando-se a terceira maior empresa do continente americano em valor de mercado, segundo a consultoria Econômica. No mesmo ano a estatal tornou-se a terceira empresa mais lucrativa das Américas, exceto o Canadá, superando a Vale (JORNAL ESTADO SP, 2008).

Nas refinarias, o petróleo é submetido a diversos processos pelos quais se obtém grande diversidade de derivados: gás liquefeito de petróleo (GLP) ou gás de cozinha, gasolina, naftas, óleo diesel, gasóleos, querosenes de aviação e de iluminação, óleo combustível, asfalto, lubrificantes, solventes, parafinas, coque de petróleo e resíduos.

As parcelas dos derivados produzidos em determinada refinaria variam de acordo com o tipo de petróleo processado. Assim, petróleos mais leves dão maior quantidade de gasolina, GLP e naftas, que são produtos leves. Já os petróleos pesados resultam em maiores volumes de óleos combustíveis e asfaltos. No meio da cadeia estão os derivados médios, como o óleo diesel e o querosene (CLICK MACAÉ, 2006, citado por MELLO (2007).

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.

O Refino

O refino de petróleo é, basicamente, um conjunto de processos físicos e químicos que objetivam a transformação dessa matéria-prima em derivados. Ele começa pela destilação atmosférica, que consiste no fracionamento do óleo cru a ser processado em toda e qualquer refinaria. Tal operação é realizada em colunas de fracionamento, de dimensões variadas, que possuem vários estágios de separação, um para cada fração desejada (ANP, 2008).

Marino (2005) 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.

As refinarias de petróleo diferem de tamanho, complexidade, pelos processos existentes e pelo tipo de petróleo processado. Condições ambientais e localização das refinarias influenciam a natureza e a quantidade das emissões e o seu impacto no meio ambiente. Além disso, são grandes consumidoras de recursos, como água e energia (NIEAD/COPPE, 2002).

Refinar petróleo é, portanto, separar suas frações e processá-las, transformando-o em produtos de grande utilidade (NETO, 2007).

Apêndice B - Curvas de calibração dos compostos BTX

Neste Apêndice são apresentados os valores utilizados para construção das curvas de calibração para os compostos BTX.

Benzeno

Tabela B.1 – Dados para construção da curva de calibração do benzeno

Ponto	Concentração (mg/L)	Área (Mv/s)
0	0	0
1	5	16,49025
2	20	31,29130
3	40	54,55370
4	60	83,20790
5	80	117,16260
6	100	141,99010
7	120	158,94240
8	150	212,22090

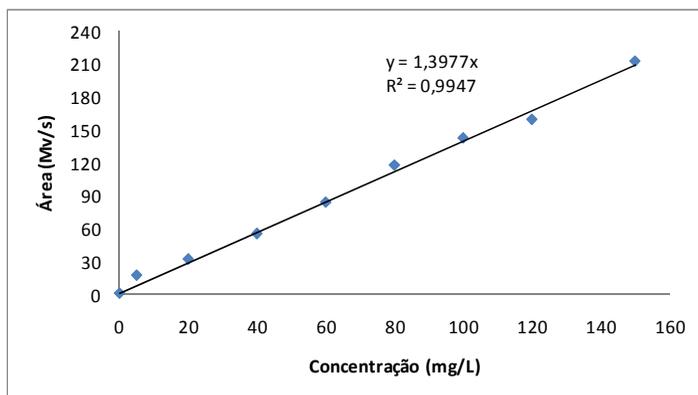
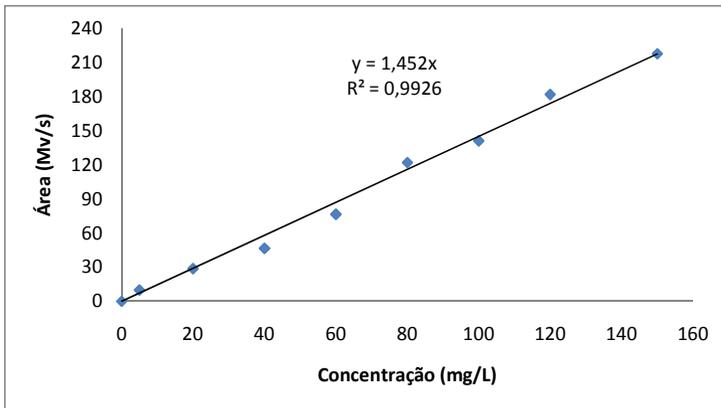


Figura B.1 – Curva de calibração do benzeno.

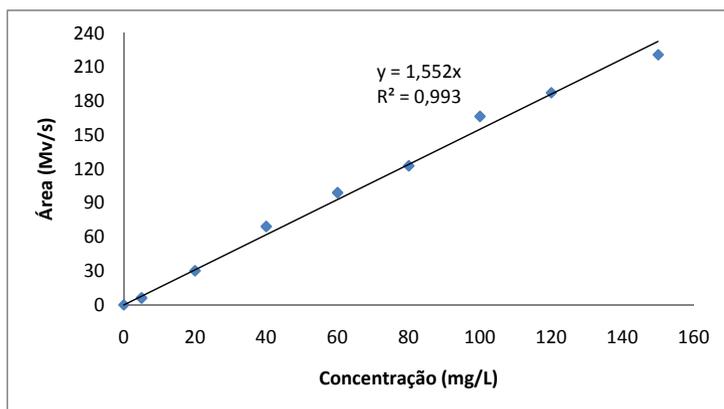
Tolueno**Tabela B.2** – Dados para construção da curva de calibração do tolueno

Ponto	Concentração (mg/L)	Área (Mv/s)
0	0	0
1	5	10,0449
2	20	28,7860
3	40	46,6244
4	60	76,6706
5	80	122,2180
6	100	141,3011
7	120	182,1646
8	150	218,0000

**Figura B.2** – Curva de calibração do tolueno.

o-Xileno**Tabela B.3** – Dados para construção da curva de calibração do o – xileno

Ponto	Concentração (mg/L)	Área (Mv/s)
0	0	0
1	5	6,2246
2	20	30,1550
3	40	69,3016
4	60	99,1474
5	80	122,8411
6	100	166,4861
7	120	187,3842
8	150	220,9114

**Figura B.3** – Curva de calibração do o - xileno.

Apêndice C - Valores experimentais da DQO e teste de adsorção

Neste apêndice serão apresentados os valores da DQO obtidos experimentalmente durante os 30 dias da fase de adaptação dos microrganismos. Nesta fase os biorreatores foram alimentados apenas com sacarose como fonte de carbono. Durante os 30 dias, foram coletadas amostras no início da manhã.

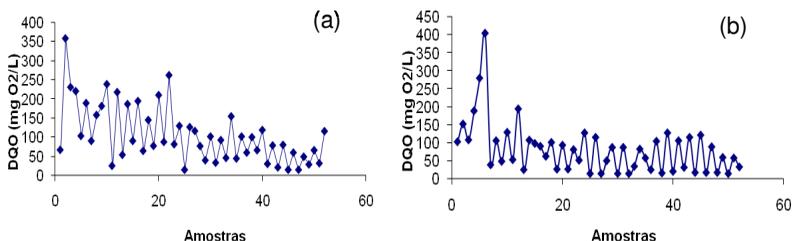
A Tabela C.1 apresenta os valores da DQO para os quatro biorreatores estudados. Os biorreatores 1 (benzeno), 2 (tolueno), 3 (o-xileno), respectivamente. Os números ímpares e pares, indica: antes da alimentação e após a alimentação com sacarose, respectivamente.

Tabela C.1 – Valores da DQO [mg/L] durante a fase de adaptação dos microrganismos.

Reator 1		Reator 2		Reator 3	
Amostras	DQO (mg/L)	Amostras	DQO (mg/L)	Amostras	DQO (mg/L)
1	67,68112	1	104,1248	1	132,75912
2	359,23056	2	153,58408	2	190,02776
3	231,67768	3	109,33104	3	327,99312
4	221,2652	4	190,02776	4	293,75568
5	104,1248	5	281,13696	5	101,52168
6	190,02776	6	406,08672	6	205,64648
7	91,1092	7	40,04077	7	143,1716
8	158,79032	8	107,16597	8	140,56848
9	182,2184	9	49,70016	9	80,69672
10	239,48704	10	130,46292	10	213,45584
11	26,0312	11	54,35955	11	83,29984
12	218,66208	12	195,69438	12	205,64648
13	54,66552	13	26,40321	13	216,05896
14	187,42464	14	108,7191	14	93,71232
15	91,1092	15	99,40032	15	75,49048
16	195,234	16	91,63467	16	124,94976
17	65,078	17	63,67833	17	49,45928
18	145,77472	18	102,50658	18	190,02776
19	78,0936	19	27,95634	19	83,29984
20	210,85272	20	94,74093	20	117,01216
21	88,50608	21	27,95634	21	137,96536
22	262,91512	22	82,31589	22	307,16816
23	82,31589	23	52,80642	23	49,70016
24	130,46292	24	128,90979	24	110,27223
25	15,5313	25	15,5313	25	26,40321
					Continua

Reator 1		Reator 2		Reator 3	
Amostras	DQO (mg/L)	Amostras	DQO (mg/L)	Amostras	DQO (mg/L)
Continuação					
26	127,35666	26	116,48475	26	122,69727
27	117,05682	27	15,5313	27	43,48764
28	77,65665	28	51,25329	28	125,80352
29	40,38138	29	88,52841	29	91,63468
30	102,50658	30	15,5313	30	153,20674
31	34,16886	31	88,52841	31	48,14703
32	93,1878	32	15,5313	32	128,90979
33	46,5939	33	35,72199	33	31,0626
34	155,313	34	83,86902	34	76,10337
35	45,04077	35	59,01894	35	18,63756
36	102,50658	36	26,40321	36	108,7191
37	60,57207	37	105,61284	37	31,0626
38	100,95345	38	17,08443	38	99,40032
39	66,78459	39	128,90979	39	54,35955
40	119,59101	40	21,74382	40	139,7817
41	31,0626	41	107,16597	41	31,0626
42	79,20963	42	32,61573	42	62,1252
43	21,74382	43	116,48475	43	15,5313
44	80,76276	44	18,63756	44	24,85008
45	15,5313	45	122,69727	45	15,5313
46	60,57207	46	18,63756	46	26,40321
47	15,5313	47	90,08154	47	15,5313
48	49,70016	48	18,63756	48	26,40321
49	29,50947	49	60,57207	49	15,5313
50	66,78459	50	15,5313	50	52,80642
51	32,61573	51	59,01894	51	41,93451
52	116,48475	52	34,16886	52	74,55024

A Figura C.1 apresenta os valores de DQO, apresentados na Tabela C.1, para os biorreatores 1, 2 e 3.



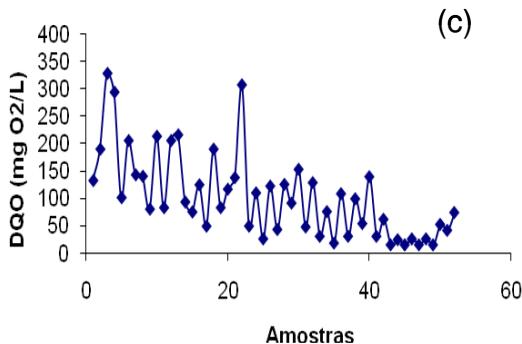


Figura C.1 – Valores da DQO obtidos durante o período de adaptação dos microrganismos à sacarose. (a) para o biorreator 1, (b) para o biorreator 2 e (c) para o biorreator 3.

A Tabela C.2 apresenta os valores do teste de adsorção para o biorreator BTX. No reator destinado foi adicionado 150 mg/L do composto e foi analisada sua queda através da curva de degradação mostrada na Figura C.2.

Tabela C.2 – Valores do teste de adsorção no carvão com o composto BTX.

Benzeno		Tolueno		o-Xileno	
Tempo (min)	Concetração (mg/L)	Tempo (min)	Concetração (mg/L)	Tempo (min)	Concetração (mg/L)
0	150,00	0	150,00	0	150,00
60	25,05855	60	15,24645	60	16,01865
61	150,00	61	150,00	61	150,00
120	22,1492	120	12,5093	120	26,6601
121	150,00	121	150,00	121	150,00
180	23,8814	180	13,8849	180	31,3785
181	150,00	181	150,00	181	150,00
240	28,662	240	16,1446	240	36,2711
241	150,00	241	150,00	241	150,00
300	23,3436	300	20,0491	300	33,9762
301	150,00	301	150,00	301	150,00

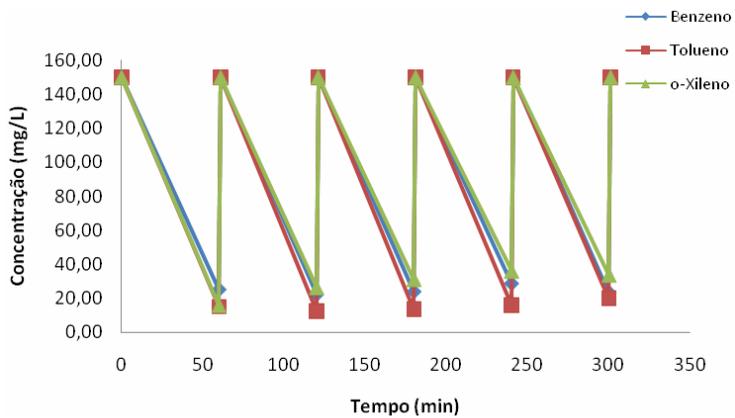


Figura C.2 – Degradação do composto BTX no teste de adsorção com carvão

Apêndice D - Cromatograma dos compostos BTX

A Figura D.1 representa um cromatograma dos compostos BTX obtido no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).

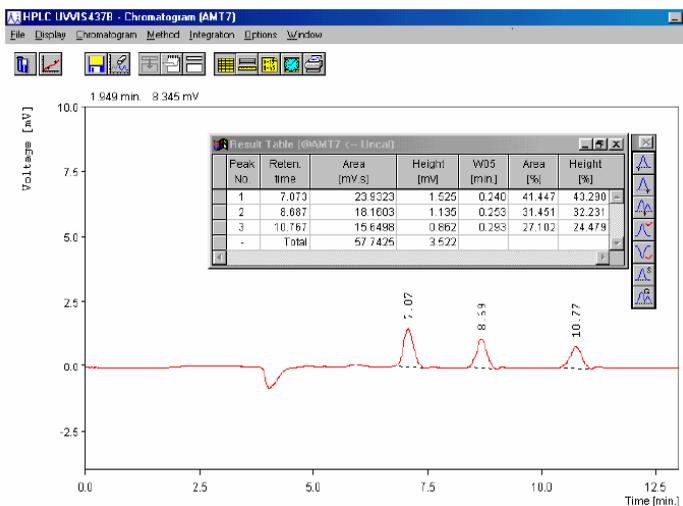


Figura D.1 – Cromatograma dos compostos BTX, concentração inicial de 150 mg/L de cada composto, durante 24 horas, 120 rpm e 0,5 g de carvão ativado.

Na Figura D.1 é apresentada uma tabela na qual está expresso o tempo de retenção e a área obtida de cada contaminante. Para determinar a área é utilizada a curva de calibração relativa a cada composto apresentada no Apêndice B. A área é multiplicada por dois, para levar em conta a diluição realizada na amostra em metanol em 1:1.

Apêndice E - Parâmetros de degradação bicomponentes e tricompontentes

Neste apêndice serão apresentados os valores dos parâmetros obtidos da degradação dos compostos bi componentes e tri componentes. A Tabela E.1 e E.2 apresentam os valores dos parâmetros bi componentes e tri componentes nas diferentes concentrações estudadas, respectivamente.

Tabela E.1 – Valores dos parâmetros obtidos da degradação bi componentes.

Composto/Concentração (mg/L)	Tipo de inibição		
	<i>Competitiva</i>	<i>Acompetitiva</i>	<i>Não Competitiva</i>
BT(100)			
R	0,8	0,82	0,78
a	0,07147	105,243	0,5446
b	0,9414	7489,004	25,7581
c	2,39319	0,417	351,8189
BT(75)			
R	0,88	0,93	0,91
a	0,2	173,49	0,91252
b	3,9	6671,469	16,42442
c	418752,1	0,095	30,04044
BT(50)			
R	0,79	0,82	0,81
a	0,20286	0,26004	0,2553
b	3,09175	5,13196	4,7514
c	90,4361	97,44501	116,8017
BT(25)			
R	0,76	0,87	0,85
a	0,582021	0,459442	0,43054
b	9,839778	9,063633	7,5111
c	1,538394	7,499765	10,12607
BX(100)			
R	0,79	0,87	0,8
a	0,3	190,752	0,4081
b	0,7	7350,591	7,3113
c	782750,9	0,143	190,8971
			Continua

Composto/Concentração (mg/L)	Tipo de inibição		
	<i>Competitiva</i>	<i>Acompetitiva</i>	<i>Não Competitiva</i>
BT(100)			
Continuação			
BX(75)			
R	0,83	0,89	0,86
a	0,2	114,591	0,85283
b	4	3760,406	12,8082
c	701381,8	0,156	34,51856
BX(50)			
R	0,74	0,95	0,8
a	7787,2	149,832	1,37551
b	139492	6151,076	34,01134
c	5,1	0,092	20,32027
BX(25)			
R	0,91	0,98	0,95
a	4671,3	57,969	1,68064
b	103588,4	2370,832	42,89294
c	3,3	0,119	9,20336
TB(100)			
R	0,85	0,78	0,74
a	0,3	179,275	0,72674
b	3,2	5323,375	11,51928
c	779657,5	0,146	66,22351
TB(75)			
R	0,84	0,83	0,81
a	0,3	114,952	1,1522
b	2,7	2172,71	7,43414
c	582150,2	0,801	25,49212
TB(50)			
R	0,87	0,81	0,78
a	0,3	135,269	0,7784
b	6,4	4008,963	14,15263
c	831401,2	0,122	45,74106
TB(25)			
R	0,86	0,81	0,79
a	0,4	35,3627	0,91198
b	5,5	896,5107	14,12773
c	301043,9	0,2535	20,60836
TX(100)			
R	0,81	0,8	0,78
			Continua

Composto/Concentração (mg/L)	Tipo de inibição		
	<i>Competitiva</i>	<i>Acompetitiva</i>	<i>Não Competitiva</i>
BT(100)			
Continuação			
a	0,2	89,48	0,48453
b	1	2179,121	5,28063
c	605420,5	0,183	56,70999
TX(75)			
R	0,82	0,81	0,8
a	0,3	154,87	1,07111
b	4	3613,376	10,88788
c	866028,7	0,135	30,50057
TX(50)			
R	0,85	0,83	0,82
a	0,3	4,2491	0,4558
b	6,4	160,3897	9,5462
c	635379,2	4,4203	149,6258
TX(25)			
R	0,86	0,84	0,81
a	0,867463	165,979	2,79772
b	1,894177	4996,167	30,99357
c	0,611964	0,053	5,23242
XB(100)			
R	0,89	0,97	0,94
a	0,57569	0,3028	0,30425
b	12,55796	5,20943	5,02896
c	5,55101	41,93579	47,05445
XB(75)			
R	0,86	0,95	0,9
a	0,506217	0,29656	0,29744
b	5,983552	3,1921	3,05658
c	2,598224	36,01207	38,73714
XB(50)			
R	0,79	0,8	0,82
a	0,085823	36,234	0,38622
b	0,000002	1622,551	8,68501
c	0,000006	0,229	44,92122
XB(25)			
R	0,88	0,87	0,9
a	0,3	9,5705	0,47659
b	7,1	482,8757	14,18967
			Continua

Composto/Concentração (mg/L)	Tipo de inibição		
	<i>Competitiva</i>	<i>Acompetitiva</i>	<i>Não Competitiva</i>
BT(100)			
Continuação			
c	137344,7	0,8349	49,21462
XT(100)			
R	0,74	0,75	0,8
a	0,050321	0,1	0,146
b	0,080074	0,3	0,337
c	0,249916	523774,7	2778,752
XT(75)			
R	0,83	0,86	0,87
a	0,08157	0,33081	0,19
b	0,1	8,77062	1,1668
c	0,2	53,73947	193,0954
XT(50)			
R	0,7	0,84	0,89
a	0,106125	45,394	0,60762
b	0,000016	2445,845	20,00542
c	0,000033	0,216	35,08339
XT(25)			
R	0,75	0,76	0,87
a	0,082514	0,48383	0,3653
b	0,091532	16,91472	9,8984
c	0,063382	59,40022	307,1874

Tabela E.1 – Valores dos parâmetros obtidos da degradação tri componentes.

Composto/Concentração (mg/L)	Tipo de inibição		
	<i>Competitiva</i>	<i>Acompetitiva</i>	<i>Não Competitiva</i>
BTX(50-25-25)			
R	0,89	0,87	0,91
a	0,2	19,663	1,022
b	1,8	558,017	14,727
c	232575,4	1082,217	2182,375
d	39250,3	0,231	7,437
BTX(50-75-75)			
R	0,83	0,94	0,97
a	1,6	0,1	0,9074
b	40,6	10,4	24,1121
c	287582,6	42,7	196,4332
d	4,8	230110,6	17,5089
TBX(50-25-25)			
R	0,79	0,82	0,81
a	52839,4	46,383	2,4263
b	954477,3	1775,719	52,9783
c	2,8	0,152	6,7728
d	954806	1387,361	805,3385
TBX(50-75-75)			
R	0,91	0,98	0,94
a	0,32	5,245	0,5742
b	119,56	0,42	3610,7
c	4,8133	5633,09	0,22
d	0,84085	7523,77	9964,244
XBT(50-25-25)			
R	0,86	0,83	0,84
a	0,118447	43,621	0,515
b	0,002028	2259,522	17,896
c	1,920363	2148,573	1499,348
d	0,002368	0,22	88,243
XBT(50-75-75)			
R	0,95	0,88	0,9
a	0,046	30,924	0,43
b	0,2741	2575,945	23,31
c	0,6039	1,023	530,22
d	3,539609	3485,399	21505