



DTD

SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISA

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA
AV. PROF. FREDERICO HERMANN JR., 345 CEP 05489 - PINHEIROS
SÃO PAULO - BRASIL

REMOÇÃO DE FENÓIS E SEUS DERIVADOS

TRATAMENTO BIOLÓGICO - ENSAIOS DE LABORATÓRIO

5312
AL25r(RCET)
002008



12713

002008

CIAL

5312
AL25r (RCET)
002008

CLASS	
A OR	
MBD	2008

DEPARTAMENTO DE ECONOMIA AMBIENTAL
BIBLIOTECA
AV. PÉREZ GONZÁLEZ, 100 - CAJALMA
CAJALMA - PERÚ

APRESENTAÇÃO

O presente relatório parcial refere-se a pesquisa, desenvolvida em 1979, do projeto "Remoção de Fenol e seus Derivados" sendo referente aos trabalhos de biodegradação de fenol por cultura mista, em diferentes concentrações do composto.

Esta pesquisa está sendo realizada pela Superintendência de Pesquisa da CETESB e subsidiada pelo Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo, através do convênio DAEE/CETESB.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

ÍNDICE

	<u>pág.</u>
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	3
2.1. BIODEGRADAÇÃO POR CULTURA MISTA.....	3
2.2. ISOLAMENTO DE LINHAGENS RESISTENTES A FENOL	7
3. <u>RESULTADOS</u>	9
3.1. BIODEGRADAÇÃO POR CULTURA MISTA.....	9
3.2. ISOLAMENTO DE LINHAGENS RESISTENTES A FENOL	26
4. <u>DISCUSSÃO</u>	31
4.1. BIODEGRADAÇÃO POR CULTURA MISTA.....	31
4.2. ISOLAMENTO DE LINHAGENS RESISTENTES A FENOL	33
5. <u>CONCLUSÕES</u>	36

1. INTRODUÇÃO

Com o rápido crescimento das indústrias químicas, petroquímicas, carboquímicas, siderúrgicas e outras, os corpos de água, que recebem os efluentes líquidos finais dessas indústrias, passaram a receber uma quantidade crescente de compostos orgânicos que prejudicam a utilização das águas para os seus diversos usos e em particular para o abastecimento público.

Dentre os compostos orgânicos que causam grandes prejuízos às águas superficiais do Estado de São Paulo e largamente distribuídos na natureza estão os compostos aromáticos (fenóis). Após os carboidratos, os fenóis constituem o maior grupo de substâncias em madeiras. Existe uma grande variedade de compostos fenólicos desde simples monocíclicos a substâncias complexas policíclicas, substâncias tais como flavonóides, terpenos, alcalóides, taninos e lignina.

Os fenóis originam-se de uma variedade de fontes. As fontes naturais incluem a urina de alguns animais e deterioração da vegetação, a contribuição dessas fontes são insignificantes quando comparadas com as fontes industriais; refinarias de petróleo, coquearias, indústrias de fabricação de usinas, plásticas, biocidas, desinfectantes, corantes explosivos, e vários outros produtos.

Os fenóis são reconhecidos como um dos maiores problemas do meio ambiente. Sua presença em águas municipais, na concentração de 0,002 mg/l, provoca a presença de gosto e odor quando tratadas com cloro. Portanto, para águas potáveis recomenda-se que a concentração de fenol não ultrapasse 0,001 mg/l.

Concentrações de 0,02 mg/l de fenol podem também causar odor e gosto em peixes.

Devido aos problemas causados pela presença de fenol em águas residuárias, a pesquisa, ora realizada na Superintendência, se destina a estudar experimentalmente as técnicas de remoção do contaminante e analisar, comparativamente, os resultados obtidos pelos diferentes métodos, objetivando aplicação técnica e economicamente viável.

O tratamento biológico, para remoção de compostos fenólicos, tem sido largamente utilizado. O processo biológico pode incluir lagoas, valos de oxidação, filtros biológicos e lodos ativados.

Variações de concentração de fénol de 5 a 500 mg/l são tratadas, normalmente por processos de biodegradação, quando não existem altas concentrações de tóxicos que possam interferir no desenvolvimento de microrganismos.

Os ensaios, em andamento, compreendem estudos que procuram verificar a máxima concentração de fenol que pode ser tratada pelo processo biológico e que não tenha efeito tóxico na cultura que está agindo sobre o composto. Estão sendo pesquisadas concentrações que variam de 0,5 a 2,0 g/l de fenol.

Estão sendo realizadas, também, ensaios de isolamento e selecionamento de linhagens resistentes a fenol, com a finalidade de se utilizar culturas puras para a biodegradação do fenol.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. BIODEGRADAÇÃO POR CULTURA MISTA

Preparação do inóculo

O esgoto gradeado foi homogeneizado e centrifugado a 15.000 min^{-1} por 15 min. Em seguida suspendeu-se o depositado em uma solução tampão de NaCl (8,5 g/l) e a suspensão foi centrifugada novamente.

Após a lavagem o depositado foi suspenso em solução salina. Esta suspensão foi utilizada como inóculo para os ensaios na concentração de 1%.

Meio de Cultura

Foi utilizado para o estudo da biodegradação meio de cultura salino, contendo como única fonte de carbono o fenol. Os componentes salinos do meio utilizado são os seguintes:

K_2HPO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Na Cl	0,1 g

Ca Cl ₂	0,1 g
F ₂ Cl ₃	0,02 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
Fenol	0,5 g
Água destilada	1000 ml
pH	7,5

Os sais são dissolvidos em água destilada e autoclavados. Uma solução concentrada de fenol é preparada, separadamente, em água esterilizada e antes de iniciar o ensaio era adicionada ao meio de cultura a quantidade necessária para se obter a concentração inicial de fenol desejada.

Para acompanhamento do crescimento de bactérias utilizou-se Ágar Nutritivo da Difco empregando-se a técnica de contagem em profundidade.

Condições do ensaio de biodegradação

As condições do ensaio foram as seguintes:

- Volume de meio em cada frasco: 500 ml em frascos de 1000 ml.
- Volume de inóculo : 5 ml .
- Incubação: Agitador giratório de temperatura controlada a 30°C.

- Agitação : 130 min^{-1}
- Concentração de fenol inicial e tempo de ensaio (ver tabela I).

TABELA 1 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL E O TEMPO DE DURAÇÃO DE CADA ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO DE FENOL POR CULTURA MISTA.

Nº DE ENSAIO	TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL mg/l	
		TESTE 1	TESTE 2
1	72	503	492
2	184	497	488
3	143	503	570
4	360	628	661
5	336	1000	1003
6	184	1232	1237
7	288	1345	1320
8	336	1350	1336

O ensaio nº 8 foi realizado utilizando como inóculo bactérias adaptadas à concentração de 1340 mg/l. O inóculo foi preparado da mesma maneira que o descrito no item 2.1.1.

Metodologia

O meio de cultura salino foi preparado e distribuído nos frascos e em seguida autoclavados. Antes de iniciar o ensaio, o fenol foi adicionado na concentração desejada. Após a inoculação, incubou-se a 30°C em agitador giratório de temperatura controlada. Periodicamente, dependendo do ensaio considerado foi realizada amostragem de 15 ml para as determinações necessárias.

Controle Analítico

O crescimento celular foi acompanhado segundo o método de contagem em placa e a degradação do fenol foi acompanhada por cromatografia à gás de ionização de chama nas seguintes condições de operação:

coluna - SE 30 - 3% em varaport

Níquel - 1,8 m , diâmetro 1/8"

Temperatura $(89 \pm 1)^\circ\text{C}$

gás de arraste - Nitrogênio

fluxo = (80 ± 5) ml/min.

temperatura - vaporizador $(230 \pm 2)^\circ\text{C}$

detector $(240 \pm 2)^\circ\text{C}$

2.2. ISOLAMENTO DE LINHAGENS RESISTENTES A FENOL

Estão sendo isoladas linhagens resistentes a fenóis, de processos de tratamento de lodos ativados e de esgoto gradeado. Foi utilizada como técnica de selecionamento o isolamento em placas gradiente de fenol utilizando concentrações variando de 0 a 4,0 g/l sendo que como primeiro estágio foram preparadas placas com concentrações de 0 a 2,0 g/l.

Preparação de placas gradientes

Colocar 10 ml de meio basal (item 2.1.1.) contendo 20 g/l de ágar fundido em placas de Petri, previamente aquecida, inclinada de modo que o fundo da placa permaneça coberto, após a solidificação, adicionar 10 ml de ágar basal, liquefeito mantido a 50°C contendo a concentração limite em fenol desejada. Esta metodologia proporciona uma placa contendo uma concentração gradiente uniforme de fenol. Após o tempo de uma hora inocular 0,1 ml de uma cultura na superfície da placa e distribuir com auxílio de um espalhador de vidro.

Como inóculo utilizou-se esgoto gradeado lavado 3 vezes com solução salina (0,9%). Em seguida a inoculação das placas gradientes foram incubadas em estufas bacteriológicas a 30°C.

Ao observar as placas após 72 horas de incubação verifica-se que na zona de menor concentração do fenol a cultura deverá crescer normalmente e que, o crescimento diminui a medida que aumenta a concentração de fenol, onde podem aparecer colônias isoladas.

Após o crescimento repicar as colônias isoladas que cresceram

na região da placa gradiente da maior concentração de fenol em meio líquido. Após incubação, em estufa a 30°C dependendo do objetivo, pode-se selecionar linhagem mais resistente, se meando-se a cultura de bactéria isolada em placa gradiente contendo concentração de fenol equivalente ao dobro da anterior. Após o crescimento de colônias isoladas repicar, purificar e estocar em meio contendo fenol. As linhagens isoladas serão tratadas em ensaios de biodegradação. Os inóculos utilizados nos ensaios foram preparados em meio líquido sendo o fenol a única fonte de carbono.

Metodologia

A metodologia empregada, para os ensaios de biodegradação utilizando cultura pura, foi a mesma utilizada nos ensaios de cultura mista com as seguintes modificações:

- 1) O inóculo era constituído de cultura pura, em meio líquido contendo fenol, isolada das placas gradientes;
- 2) O acompanhamento do crescimento celular foi feito com leituras de absorbância a 610 nm;

3. RESULTADOS

3.1. BIODEGRADAÇÃO POR CULTURA MISTA

As Tabelas de 2 a 8 e as Figuras de 1 a 7 apresentam os resultados obtidos em ensaios onde a concentração de fenol varia de 503 a 1345 mg/l. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada inóculo.

A Tabela 9 e a Figura 8 mostram os resultados obtidos do ensaio inoculado com cultura adaptada a concentração alta de fenol por 150 horas.

TABELA 2 - VALORES DAS CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ln nº bact/ml)
E DE CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE OS DOIS
TESTES DO ENSAIO Nº 1

TEMPO DO ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ln do nº de bact/ml)		CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)	
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 1	TESTE 2
0	9,85	9,85	503,0	492,0
15	13,91	13,81	499,0	493,0
24	14,08	13,91	510,0	509,0
39	14,08	14,00	294,00	203,0
48	16,30	16,03	55,0	53,8
63	17,84	18,13	< 1	< 1
72	18,38	18,52	-	-

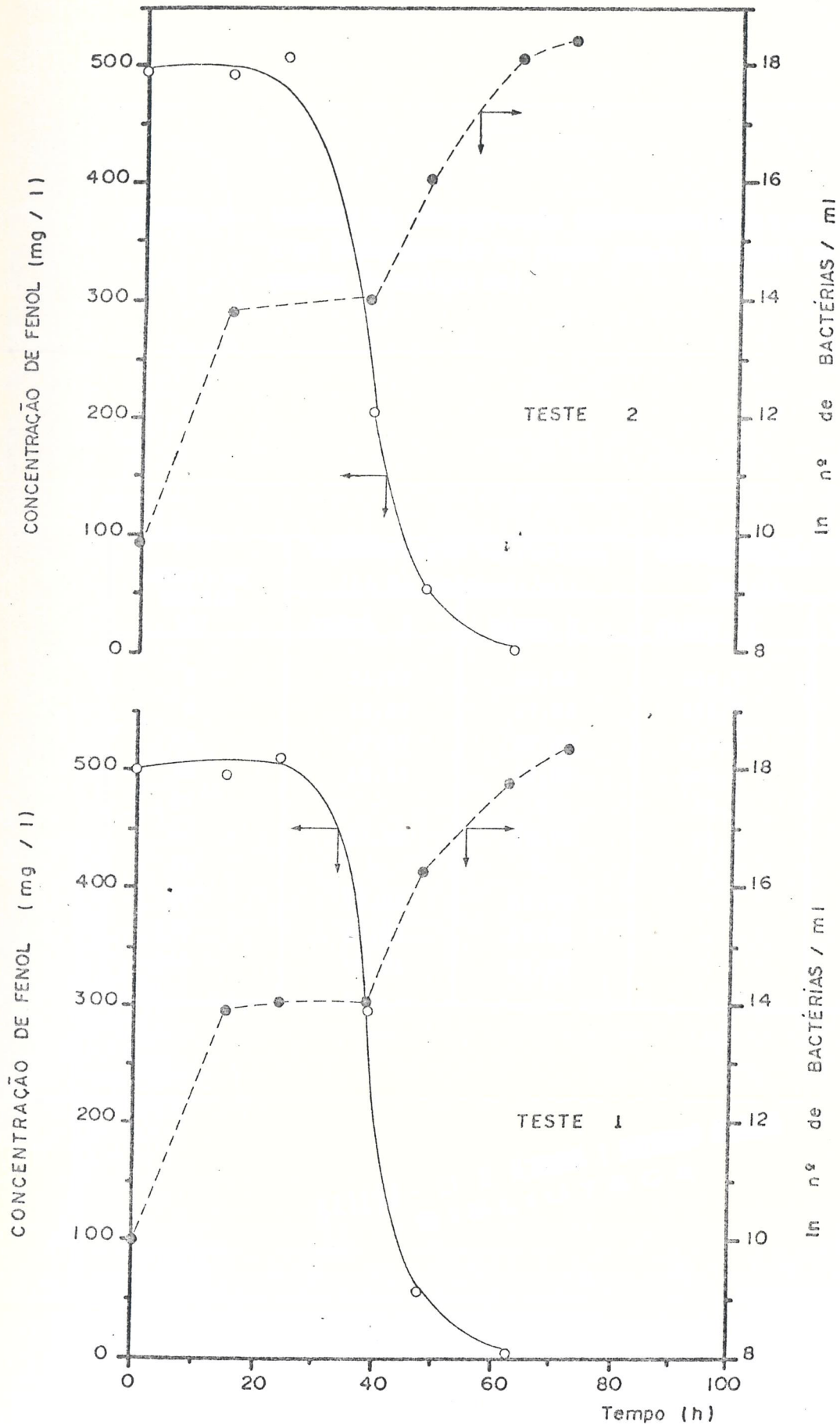


FIGURA 1 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DO LOGARÍTIMO NEPERIANO (ln) DO Nº DE BACTÉRIAS POR ml DURANTE OS TESTES DO ENSAIO UTILIZANDO CULTURA MISTA SEM ACLIMATAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL DE 500 mg/l (ENSAIO Nº 1)

TABELA 3 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA ($\ln n_0$ de bact/ml) E DA CONCENTRAÇÃO DO FENOL (mg/l) DURANTE OS DOIS TESTES DO ENSAIO Nº2.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA ($\ln n_0$ de bact/ml)		CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)	
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 1	TESTE 2
0	11,03	10,88	496,7	488,0
6	12,87	13,06	525,0	512,0
23	17,25	17,22	510,0	506,0
30	18,32	17,96	364,5	351,0
47	-	-	32,6	98,3
54	17,07	19,70	23,0	17,34
71	-	-	0	0
96	19,52	17,00	-	-
120	19,21	17,48	-	-
146	19,01	16,99	-	-

CETESB - CIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

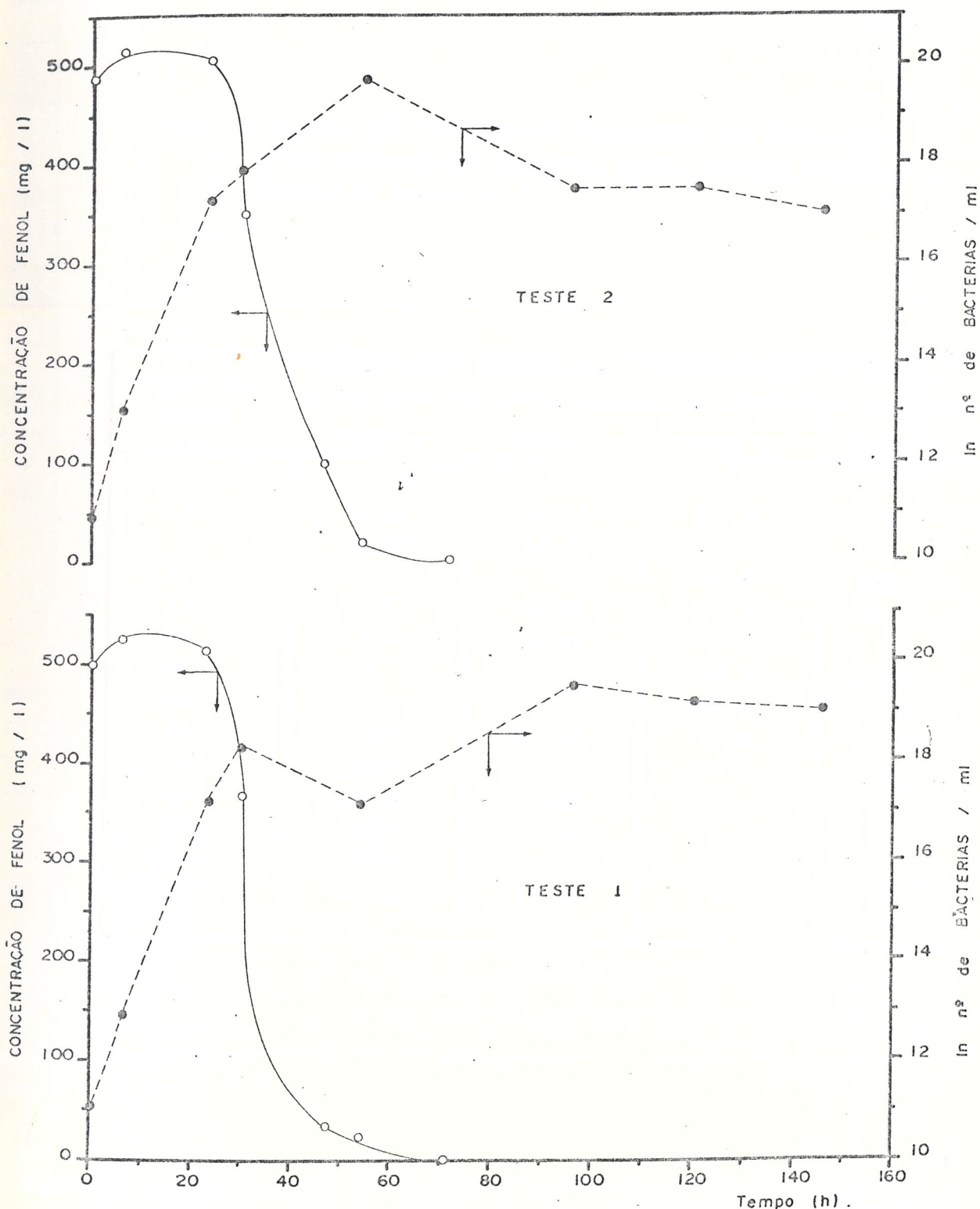


FIGURA 2 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DO LOGARÍTIMO NEPERIANO (ln) DO Nº DE BACTÉRIAS POR ml DURANTE OS TESTES DO ENSAIO UTILIZANDO CULTURA MISTA SEM ACLIMATAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL DE 500 mg/l (ENSAIO Nº 2).

TABELA 4 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA ($\ln n^{\circ}$ bact/ml) E DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE OS DOIS TESTES DO ENSAIO Nº 3.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA ($\ln n^{\circ}$ de bact/ml)		CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)	
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 1	TESTE 2
0	11,20	11,23	503,0	570,0
6	12,68	12,21	-	-
17	-	-	490,0	544,0
23	14,51	14,08	493,0	533,0
30	17,37	18,06	-	-
40	-	-	135,0	174,8
44	-	-	116,0	159,0
47	17,03	19,11	97,0	137,0
64	18,68	-	0	0
71	18,76	19,64	-	-
96	19,58	19,34	-	-
118	19,52	-	-	-
143	19,95	19,45	-	-

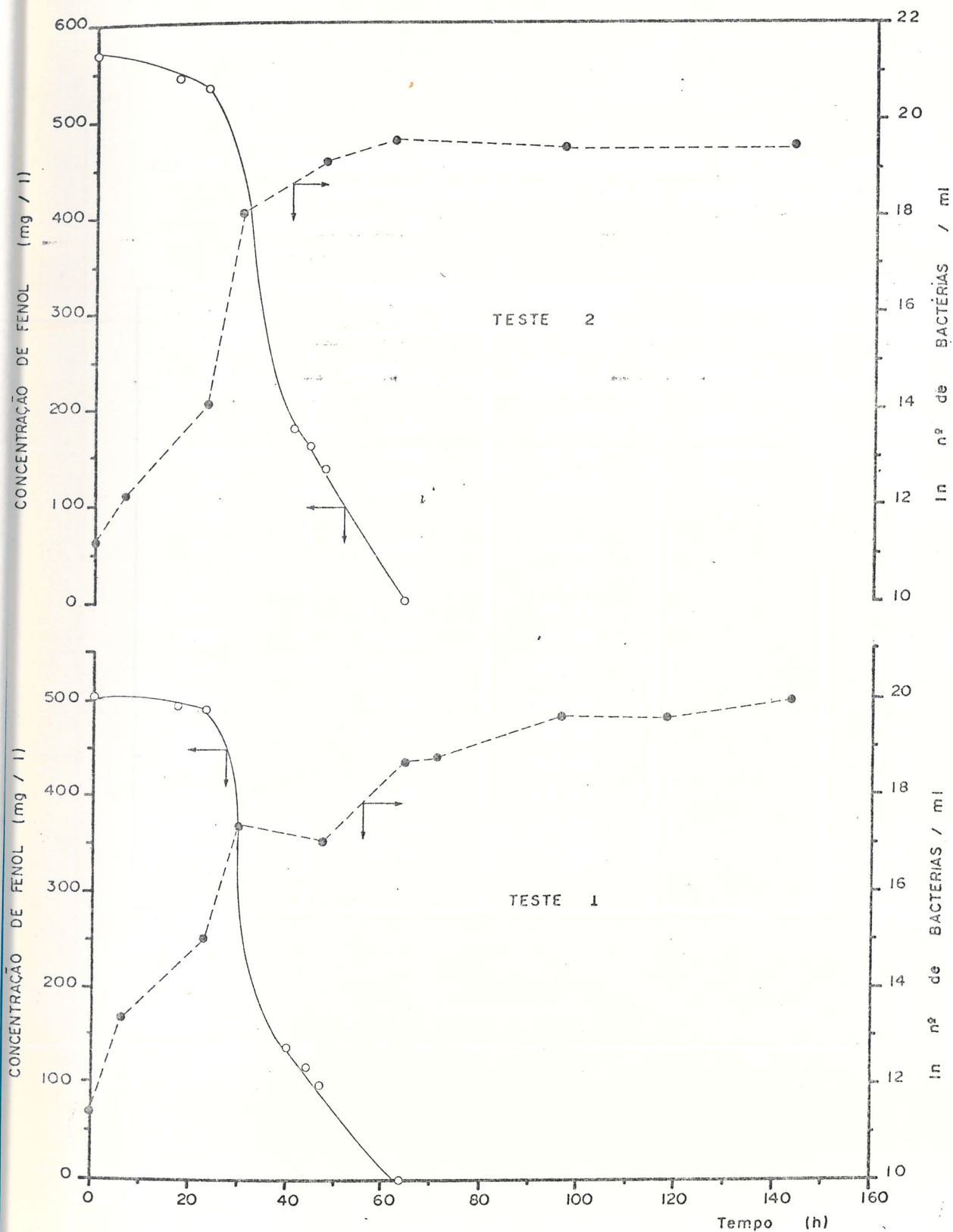


FIGURA 3 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DO LOGARITMO NEPERIANO (ln) DO Nº DE BACTÉRIAS POR ml, DURANTE OS TESTES DO ENSAIO UTILIZANDO CULTURA MISTA SEM ACLIMATAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL DE 500 e 570 mg/l (ENSAIO Nº 3).

TABELA 5 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ln nº de bact/ml) E DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE OS DOIS TESTES DO ENSAIO Nº 4.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ln nº de bact/ml)		CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)	
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 1	TESTE 2
0	10,24	10,55	628,3	661,0
24	14,60	14,65	644,0	678,3
46	20,68	20,62	70,9	298,0
54	-	-	0	0
72	20,82	20,99	-	-
94	19,90	20,82	-	-
144	17,91	18,52	-	-
168	18,68	19,25	-	-
192	18,68	19,11	-	-
216	18,60	18,89	-	-
240	18,42	18,83	-	-
264	17,96	18,42	-	-
312	17,80	18,35	-	-
336	17,11	18,23	-	-
360	16,76	17,84	-	-

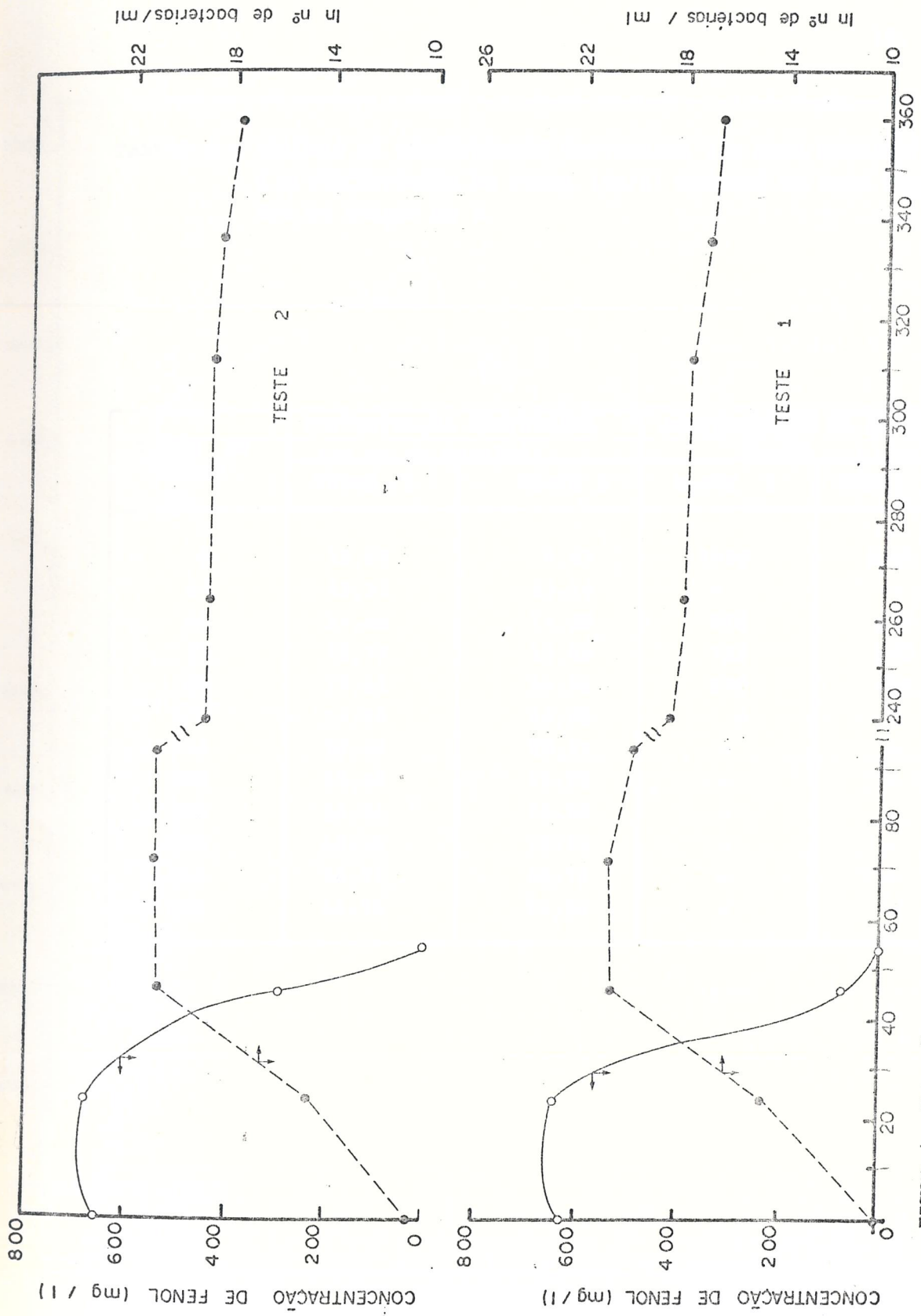


FIGURA 4 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DO LOGARITMO NEPERIANO (ln) DO Nº DE BACTÉRIAS POR ml DURANTE OS TESTES DO ENSAIO UTILIZANDO CULTURA MISTA SEM ACLIMAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL DE 630 e 660 mg/l (ENSAIO Nº 4).

TABELA 6 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (\ln n^o de bact/ml) E DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE OS DOIS TESTES DO ENSAIO N^o 5.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (\ln n ^o de bact/ml)		CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)	
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 1	TESTE 2
0	10,69	9,62	1000	1003
24	13,33	13,16	-	-
48	14,46	14,35	965	977
72	15,79	15,69	705	683
96	17,11	16,21	600	581
120	16,08	16,06	0	0
144	16,30	16,12	-	-
192	15,98	15,25	-	-
240	16,21	16,52	-	-
288	16,30	16,71	-	-
312	16,71	16,76	-	-
336	16,30	16,52	-	-

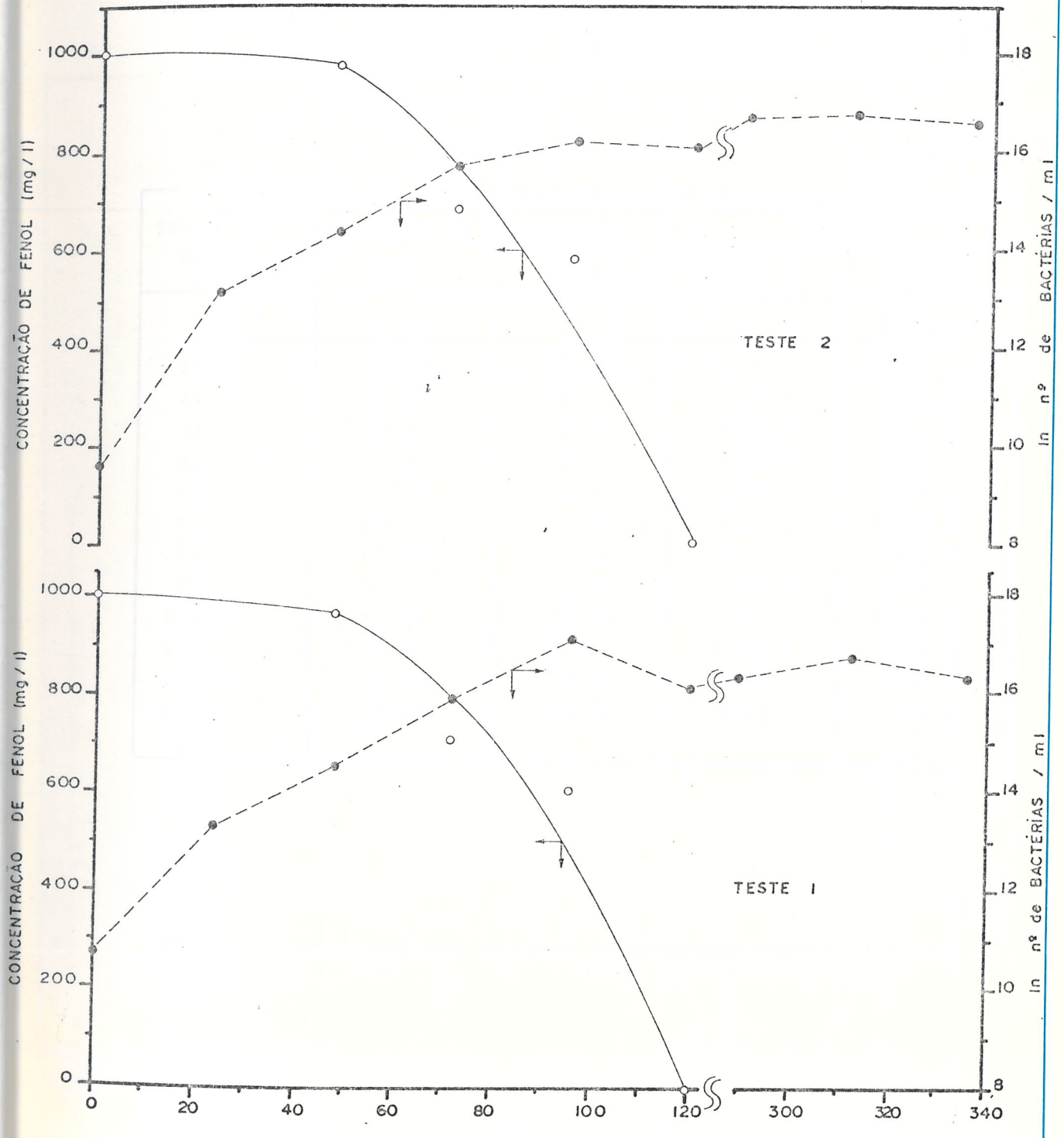


FIGURA 5 - VARIACÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DO LOGARITMO NEPERIANO (ln) DO Nº DE BACTÉRIAS POR ml DURANTE OS TESTES DO ENSAIO UTILIZANDO CULTURA MISTA SEM ACLIMATAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL 1000 mg/l (ENSAIO Nº 5).

TABELA 7 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ln nº de bact/ml) E DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE OS 2 TESTES DO ENSAIO Nº 6.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ln nº de bact/ml)		CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)	
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 1	TESTE 2
0	10,80	10,80	1232,0	1237,0
15	10,95	10,71	-	-
24	11,61	11,34	1232,0	1237,0
39	13,91	13,04	1232,0	1214,0
43	13,91	13,16	1224,0	1213,0
48	14,08	13,70	1202,0	1201,0
63	14,00	14,00	1221,0	1228,0
72	14,35	14,46	1214,0	1213,0
88	14,46	14,51	1235,0	1214,0
112	14,08	14,35	1192,0	1228,0
136	15,07	-	1234,0	1126,0
156	15,38	15,94	1230,0	940,0
184	16,21	16,91	1227	850,0

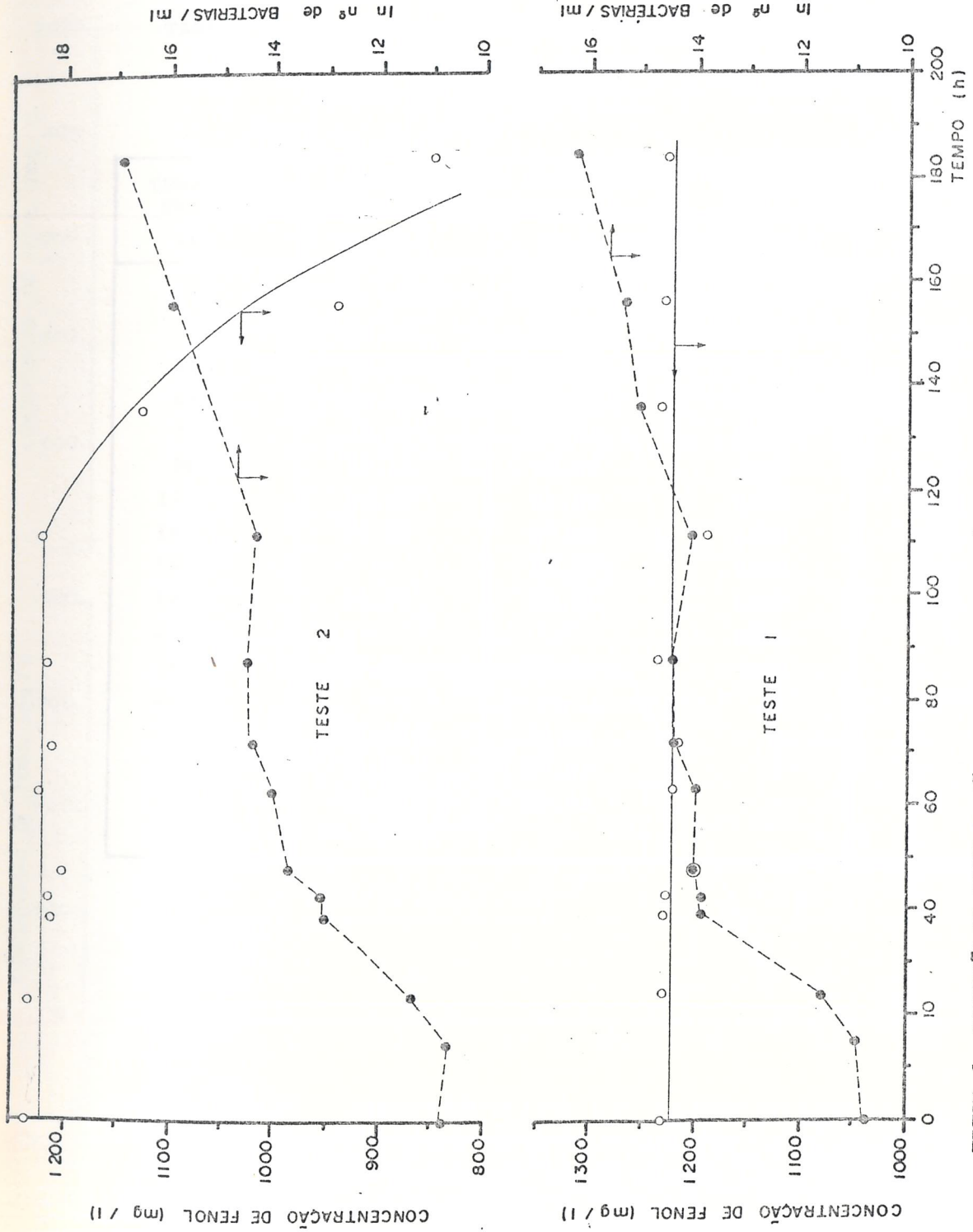


FIGURA 6 -- VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DO LOGARITMO NEPERIANO (L_n) DO Nº DE BACTÉRIAS POR ml DURANTE OS TESTES DO ENSAIO UTILIZANDO CULTURA MISTA SEM ACLIMATAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL 1230 e 1240 mg/l (ENSAIO Nº 6)

TABELA 8 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ln nº de bact/ml) E DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE OS DOIS TESTES DO ENSAIO Nº 7.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ln nº da bact/ml)		CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)	
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 1	TESTE 2
0	10,69	10,20	1345	1320
24	13,33	10,52	-	-
48	14,46	12,92	1331	1335
72	15,79	13,82	1342	1341
96	17,11	14,00	1345	1340
120	16,08	14,88	1347	1329
144	16,30	17,86	1353	1251
168	-	18,60	1343	1086
192	15,98	19,01	1345	915
216	-	-	1091	0
240	16,21	16,59	592	-
264	-	-	36	-
288	16,30	16,86	0	-
312	16,71	17,03	-	-
336	16,30	17,03	-	-

CETESB - CIA. DE TÉCNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

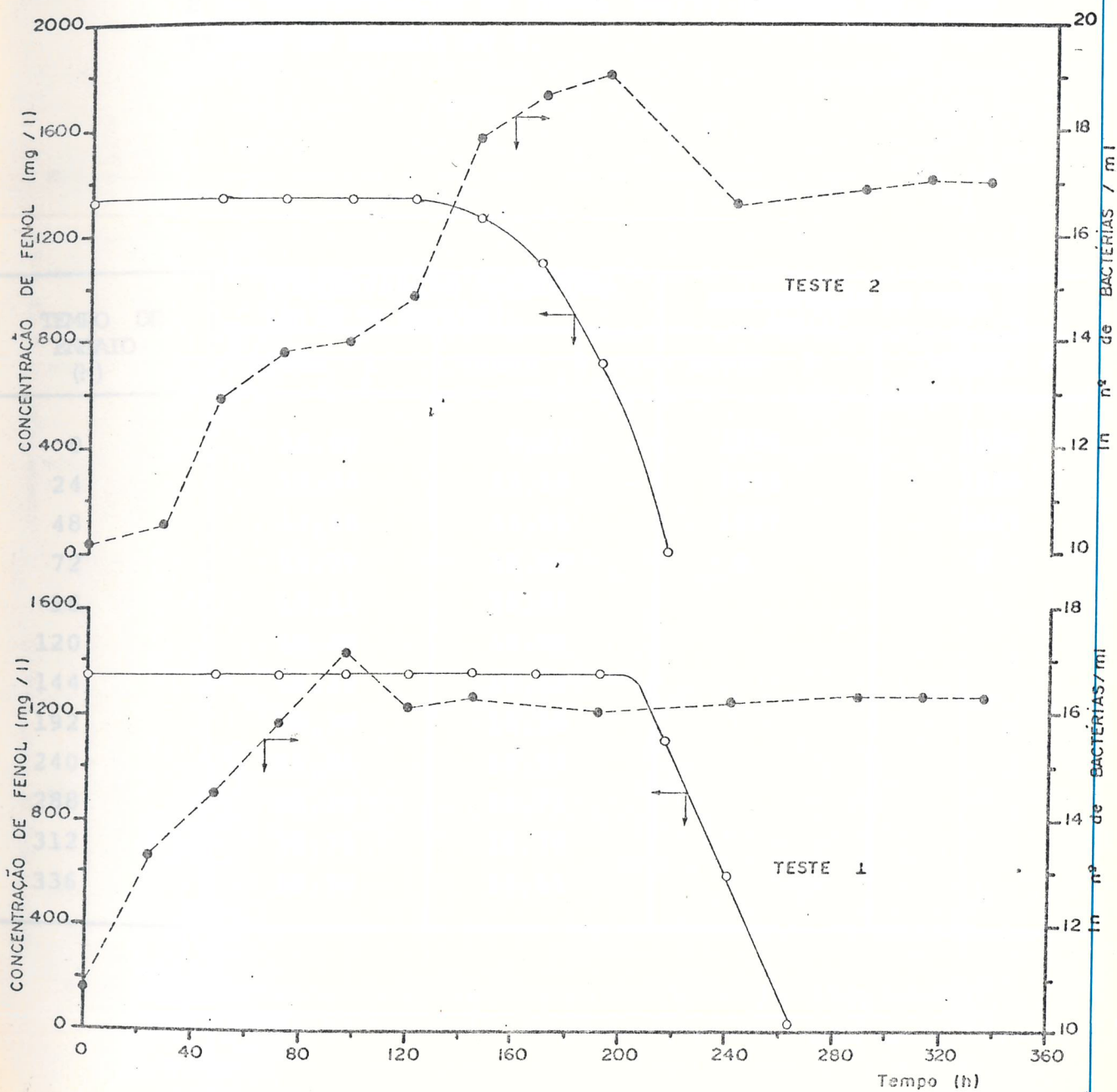


FIGURA 7 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DO LOGARITMO NEPERIANO (lg) DO Nº DE BACTÉRIAS POR ml DURANTE OS TESTES DO ENSAIO UTILIZANDO CULTURA MISTA SEM ACLIMATAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL 1320 e 1340 mg/l (ENSAIO Nº 7)

TABELA 9 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA ($\ln n^{\circ}$ bact /ml) E DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE OS DOIS TESTES DO ENSAIO Nº 8.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA ($\ln n^{\circ}$ de bact/ml)		CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)	
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 1	TESTE 2
0	10,69	9,62	1336	1336
24	13,34	13,16	1316	1315
48	14,46	14,35	1077	1037
72	15,79	15,69	0	0
96	17,11	16,21		
120	16,08	16,06		
144	16,30	16,12		
192	15,98	15,25		
240	16,21	16,52		
288	16,30	16,71		
312	16,71	16,76		
336	16,30	16,52		

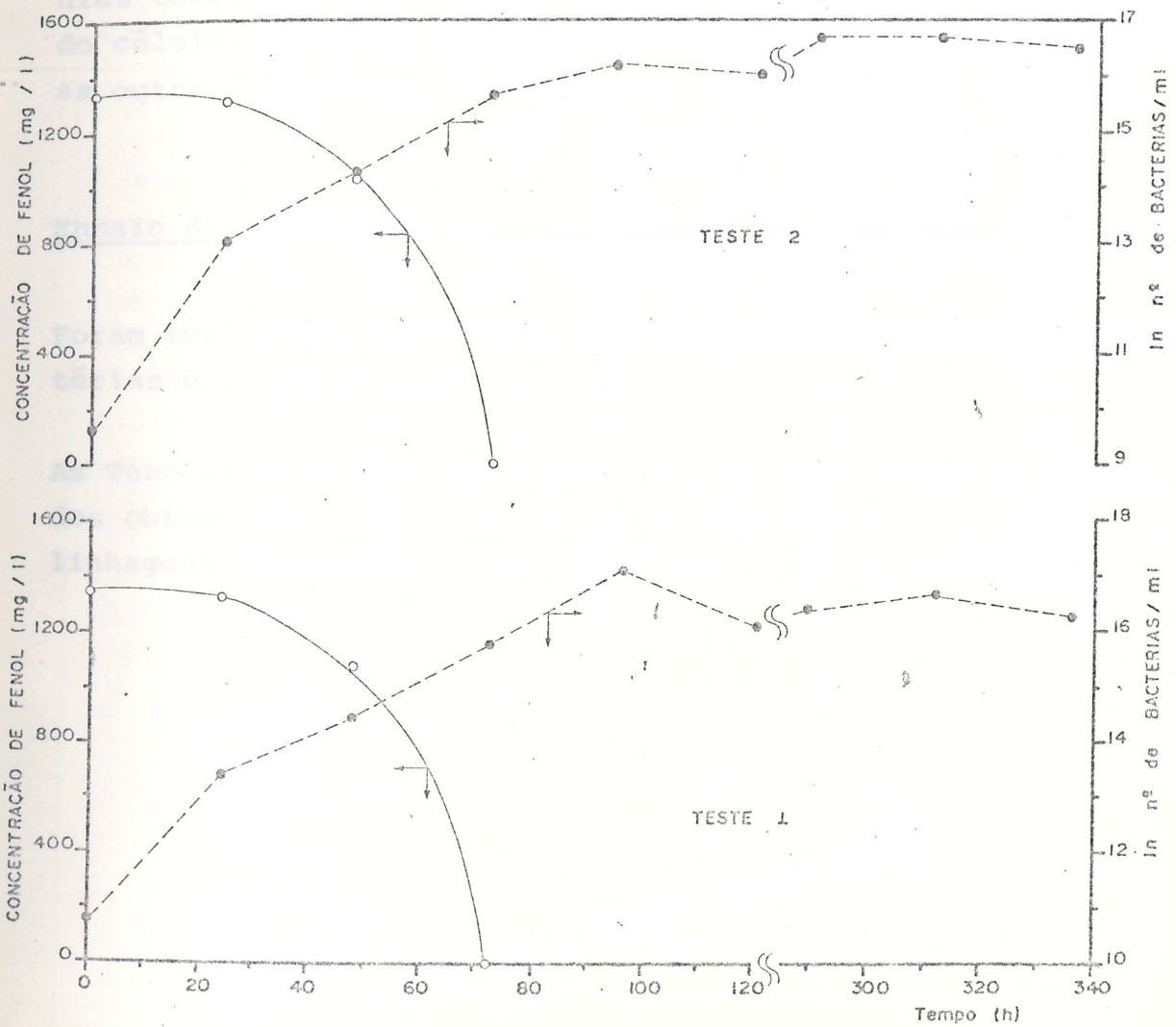


FIGURA 8 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DO LOGARÍTIMO NEPERIANO (ln) DO Nº DE BACTÉRIAS POR ml DURANTE OS TESTES DO ENSAIO UTILIZANDO CULTURA MISTA ACLIMATADA COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL DE 1340 e 1350 mg/l.

3.2. ISOLAMENTO DE LINHAGENS RESISTENTES A FENOL

Foram isoladas cinco colônias resistentes a fenol de placas gradientes (4,0 g/l) incubadas em estufa a 30°C. Duas colônias correspondem a linhagens de bactérias, uma compreendendo células em forma de cocos e outra em forma de bastonetes as outras 3 colônias correspondem a linhagens de leveduras.

Ensaio de Biodegradação

Foram realizados ensaios de biodegradação com culturas de bactérias e de leveduras.

As Tabelas 10 e 11 e as Figuras 9 e 10 apresentam os resultados obtidos durante o estudo de biodegradação utilizando as linhagens isoladas, levedura e bactéria respectivamente.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL

TABELA 10 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ABSORBÂNCIA a 610 nm) E DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE O ENSAIO UTILIZANDO CULTURA PURA DE BACTÉRIAS RESISTENTE A FENOL.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/ l)			CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS ABSORBÂNCIA-610nm
	I	II	MÉDIA	
0	554	554	554	0,013
4	557	559	558	0,020
7	549	542	546	0,025
10	542	529	536	0,027
22	544	536	540	0,028
24	538	533	536	0,030
26	538	537	538	0,030
28	528	536	532	0,030
30	533	538	536	0,030
32	533	537	535	0,033
38	522	533	528	0,032
46	531	533	532	0,035
54	531	536	534	0,082
70	242	243	243	0,703
72	24	26	25	0,835
74	12	13	13	0,920

1. A determinação da concentração de fenol foi realizada em duplicata
 2. Concentração média do "controle" = 546 mg/l - (C.V. = 1%)

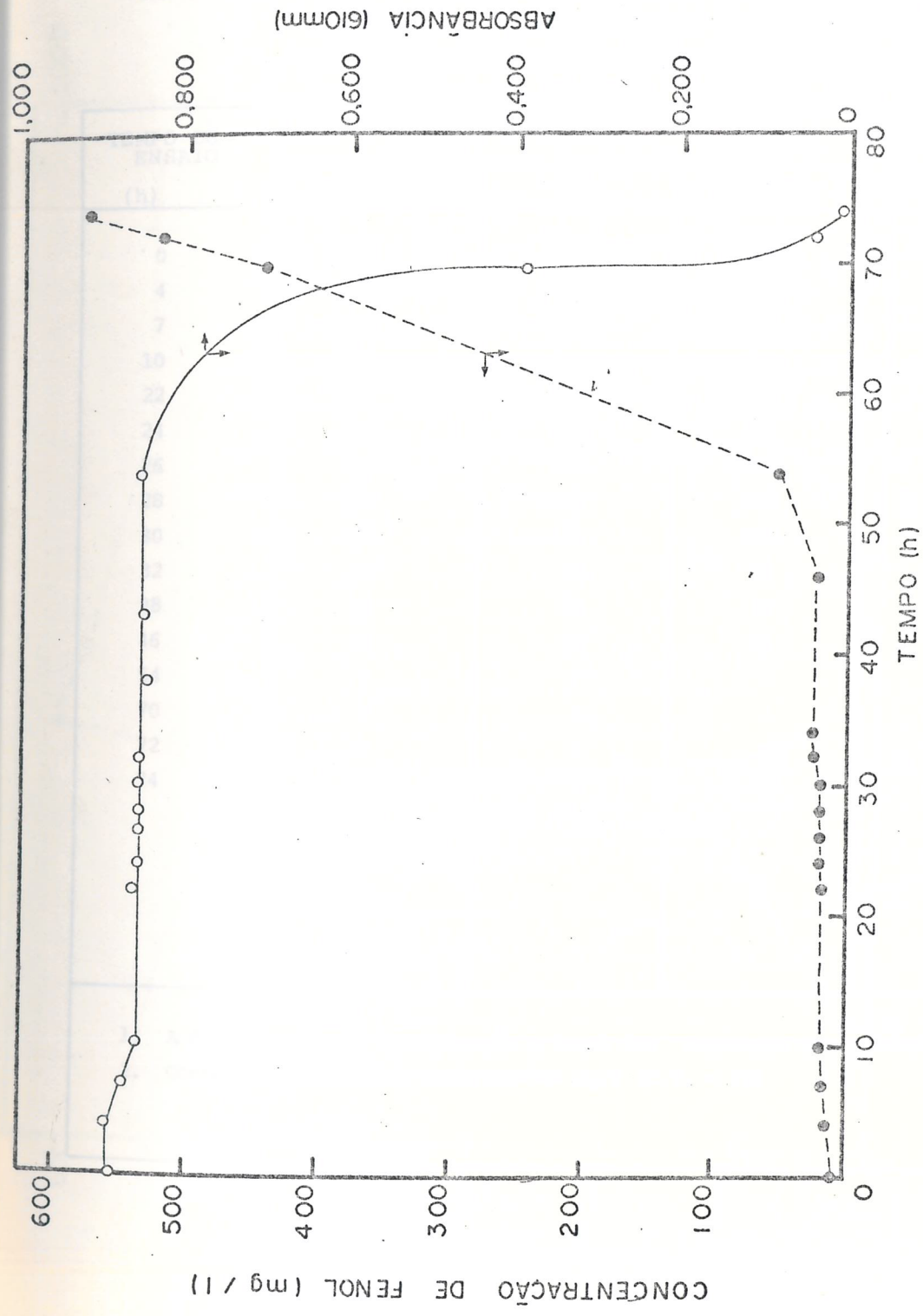


FIGURA 9 - VARIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DA CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS EM ABSORVÂNCIA DURANTE O ENSAIO REALIZADO UTILIZANDO CULTURA PURA DE BACTÉRIAS RESISTENTES E FENOL.

TABELA 11 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (ABSORBÂNCIA 610 nm) E DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l) DURANTE O ENSAIO UTILIZANDO CULTURA PURA DE LEVEDURAS RESISTENTE A FENOL.

TEMPO DE ENSAIO (h)	CONCENTRAÇÃO DE FENOL (mg/l)			CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS ABSORBÂNCIA-610nm
	I	II	MÉDIA	
0	553	557	555	0,009
4	554	555	555	0,010
7	549	540	545	0,028
10	542	540	541	0,034
22	505	502	504	0,164
24	463	463	463	0,179
26	393	392	393	0,443
28	309	307	308	0,604
30	192	191	192	0,804
32	54	53	54	0,996
38	12	11	12	0,955
46	10	11	11	0,925
54	-	-	-	0,883
70	-	-	-	0,891
72	-	-	-	0,889
74	-	-	-	0,884

1. A determinação de concentração e fenol foi realizada em duplicata
2. Concentração média do controle=546 mg/l (C.V. = 1%)

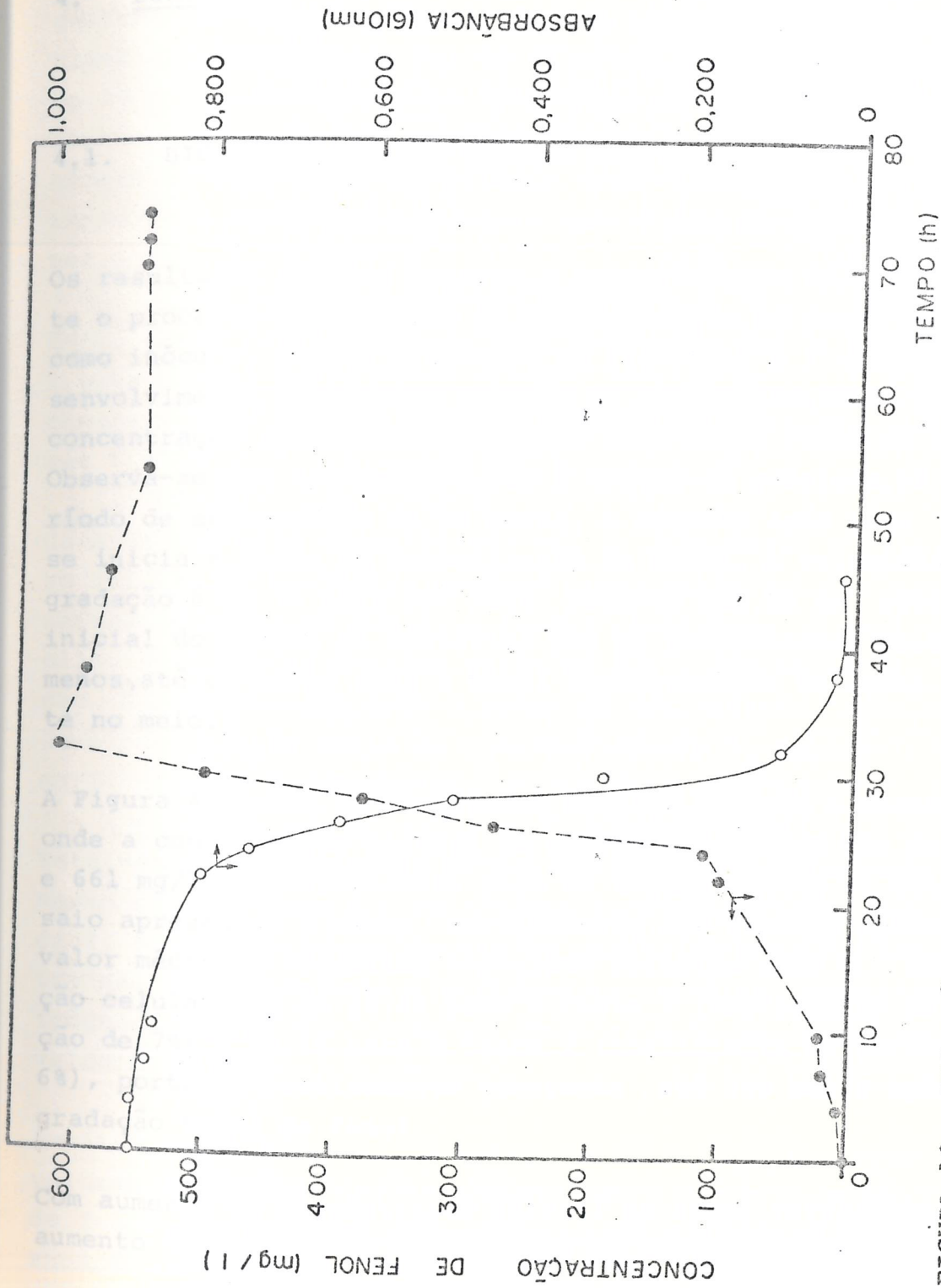


FIGURA 10 - VARIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL E DA CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS EM ABSORBÂNCIA DURANTE O ENSAIO REALIZADO UTILIZANDO CULTURA PURA DE LEVEDURAS RESISTENTES E FENOL.

4. DISCUSSÃO

4.1. BIODEGRADAÇÃO POR CULTURA MISTA

Os resultados obtidos mostram o comportamento da cultura durante o processo descontínuo da biodegradação do fenol utilizado como inóculo, esgoto gradeado. As figuras 1 a 3 apresentam de desenvolvimento bacteriano em meio de cultura contendo fenol na concentração inicial de 500 mg/l, como única fonte de carbono. Observa-se que nos ensaios, com 2 testes em paralelo, há um período de aclimatação de 24 horas, e somente após este período se inicia a queda da concentração de fenol. A velocidade de degradação é de 35 mg/l por hora. Nota-se que há um crescimento inicial do número de bactérias por ml permanecendo constante, pelo menos, até 80 horas após a total biodegradação do fenol existente no meio.

A Figura 4 mostra os resultados obtidos durante o ensaio Nº 4 onde a concentração inicial do composto fenólico foi de 628 e 661 mg/l respectivamente para os testes nº 1 e 2. Este ensaio apresentou o mesmo envolvimento dos ensaios iniciais. O valor médio do logaritmo neperiano atingido para a concentração celular foi de 18,61 para o Teste 1 (coeficiente de variação de 7%) e 19,16 para o Teste 2 (coeficiente de variação de 6%), portanto praticamente constante até 300 horas após a degradação total do fenol.

Com aumento da concentração inicial do fenol verifica-se um aumento do período de aclimatação da cultura. (Figuras 5 a 7)

A Figura 5 mostra os resultados do ensaio onde a concentração da fonte de carbono (fenol) foi de 1000 mg/l. O período de aclimatação neste caso foi de 40 horas e a velocidade máxima foi de 20 mg/l. Analisando os resultados relativos do acompanhamento de concentração celular nota-se o aumento progressivo do número de bactérias até atingir a um máximo permanecendo constante pelo menos até 120 horas após o fim da degradação do fe nol.

Estão sendo pesquisadas, ainda, concentrações de fenol superiores a 1000 mg/l. Os resultados obtidos em ensaios com concentrações de 1.200 a 1350 mg/l estão apresentados nas Figuras 6 e 7.

Nota-se que essa concentração não se apresentou tóxica à cultura inicial de bactérias havendo crescimento celular nas primeiras 40 horas em todos os testes realizados. O período de aclimatação nestes ensaios varia de 120 a 200 horas de incubação. Nesses ensaios após o tempo de aclimatação, a velocidade da biodegradação varia de 7 mg/l.h (Teste 1, Figura 7) a 20 mg/l.h (Teste 2, Figura 6).

Esta variação no período de aclimatação e na velocidade para o mesmo ensaio deve ser consequência da natureza do inóculo inicial, sendo este uma alíquota de esgoto, é possível que a amostra não seja homogênia e portanto as espécies podem variar no inóculo inicial para os testes determinando uma maior ou menor velocidade de biodegradação.

Analisando-se a Tabela 12 e Figuras 11 e 12 onde apresentamos os valores do período de indução celular e a concentração inicial de fenol, verificamos um aumento desse período em relação ao aumento da concentração de fenol. Serão realizados ensaios com objetivo de se determinar em laboratório a concentração de fe

no limite em relação a cultura utilizada, a Figura 12 mostra que existe uma relação linear entre a concentração inicial de fenol e o inverso do tempo de indução.

Utilizando-se culturas aclimatadas em meio contendo fenol (Figura 8), a degradação de concentrações altas (1300mg/l) inicia em um período de 24 horas relativamente pequeno quando comparado ao de 130 a 200 horas, obtido utilizando células sem aclimação (Figura 7)

4.2. ISOLAMENTO DE LINHAGENS RESISTENTES A FENOL

As linhagens, resistentes a fenol, isoladas a partir de uma cultura mista, foram testadas em ensaios de biodegradabilidade contendo o composto como única fonte de carbono.

Analisando-se a Figura 9 verificamos que ocorre um período de indução de 50 horas quando se utilizou a linhagem de bactérias, nota-se ainda que não houve crescimento considerável após a incubação como se observa nas Figuras 6 e 7 utilizando-se como inóculo cultura mista. Este resultado vem de acordo com o que já foi discutido para cultura mista que neste caso pode haver contaminação de outras fontes de carbono como por exemplo ácidos graxos, aderentes às células que constituem a população bacteriana encontrada no esgoto que não ocorre quando se utiliza cultura pura.

Comparando-se as Figuras 9 e 10 verificamos que o período de indução encontrado para a bactéria é cerca de 5 vezes menor para a linhagem de levedura (Figura 10) em relação a linhagem de bactérias (Figura 9).

TABELA 12 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL E OS VALORES DO TEMPO DE INDUÇÃO OBTIDOS DURANTE OS ENSAIOS REALIZADOS

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL, C (mg/l)	TEMPO DE INDUÇÃO, t	
	t (h)	1000 l/t
500	24	41,7
630	26	58,5
660	28	35,7
1000	55	18,1
1230	120	8,3
1320	130	7,7
1350	200	5,0

FIGURA 11 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL, C (mg/l) EM RELAÇÃO AO TEMPO DE INDUÇÃO (h) DURANTE OS ENSAIOS DE BIOGRADAÇÃO

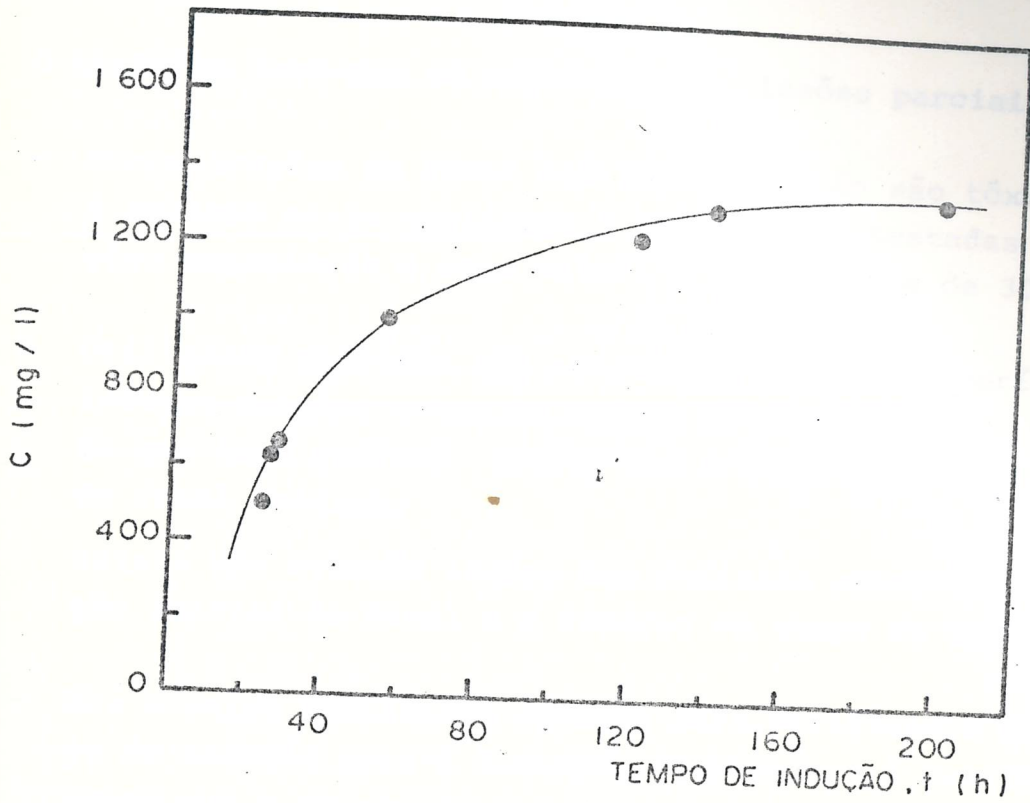
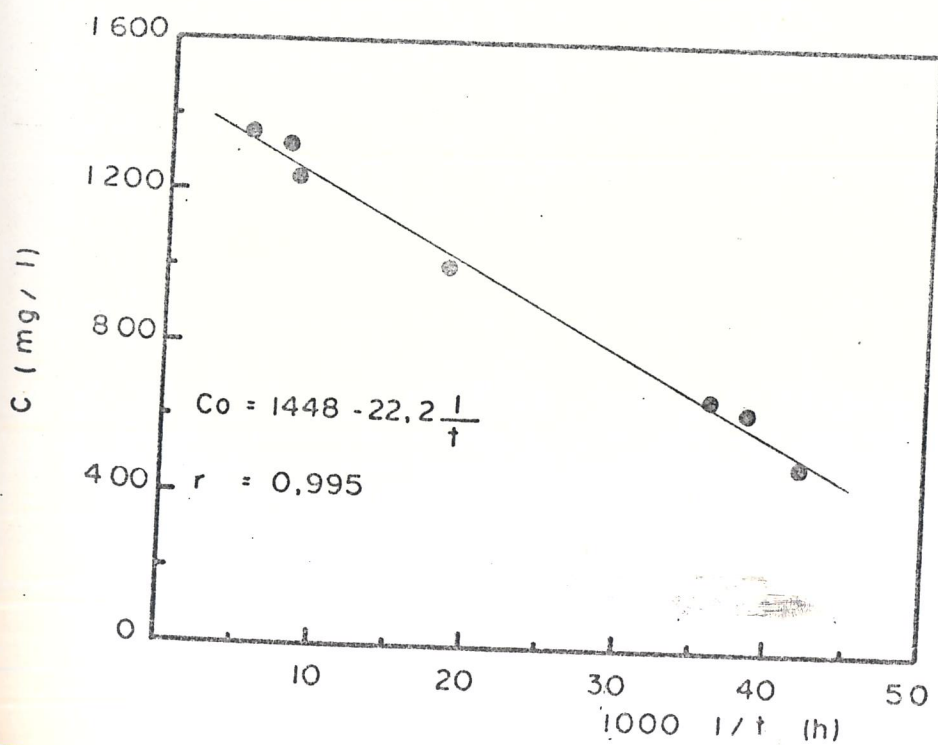


FIGURA 12 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FENOL, C (mg/l) EM RELAÇÃO AO INVERSO DO TEMPO DE INDUÇÃO (h)



5. CONCLUSÕES

O trabalho leva-nos as seguintes conclusões parciais:

- Concentrações de fenol até 1350 mg/l não são tóxicas para a cultura mista utilizada (estão sendo testadas concentrações superiores a este valor) a temperatura de 30° C.
- Utilizando culturas não adaptadas, ocorre um período de indução celular antes do início da degradação do fenol sendo que esse período cresce com o aumento de concentração de fenol inicial.
Existe uma relação linear bem definida entre a concentração inicial do fenol e o inverso do tempo de indução.
- Nos ensaios utilizando cultura pura, verificamos que o tempo de indução para a linhagem de levedura é quatro vezes menor que o observado no ensaio realizado com a linhagem de bactéria.

EQUIPE TÉCNICA

Pedro Alem Sobrinho (MSc)	-	Gerente
Rosana Elda Gregori (Dr.)	-	Coordenadora
Sueli Pires Machado	-	Analista
Amadeu José das Neves Silva	-	Analista
Daniel Anami	-	Analista
Eliana Rizzini	-	Estagiária