

**Biodegradação de Fenol por *Candida parapsilopsis* em
Reator Contínuo (CSTR) Pressurizado**

**Phenol degradation by *Candida parapsilopsis* in a
Pressurized Continuous Reactor (CSTR)**

Maurício Rigo

Prof. Dr. Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)
Departamento de Engenharia de Alimentos (DEALI)
mauriciorigo@yahoo.com.br

Mônica Ronobo Coutinho

Prof^ª. Dr^ª. Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)
Departamento de Engenharia de Alimentos (DEALI)

David Chacón Alvarez

Prof. Ms. Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)
Departamento de Engenharia de Alimentos (DEALI)

José Raniere Mazile Vidal Bezerra

Prof. Dr. Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)
Departamento de Engenharia de Alimentos (DEALI)

Ivanise Guilherme Branco

Prof^ª. Dr^ª. Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Ranulfo Monte Alegre

Prof. Dr. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de
Campinas
ranulfo@fea.unicamp.br

Resumo: Nesse trabalho foi estudada a degradação de fenol por *Candida parapsilopsis* em reator contínuo (CSTR) pressurizado. O reator operou por 24 dias consecutivos e a entrada de afluente no reator apresentou concentrações de fenol na faixa de 300 a 900 mg/L. Durante 16 dias, o reator funcionou em regime permanente, com a

eficiência de remoção de fenol atingindo 100 % e a produtividade volumétrica média, nesse período, foi de 10 mg/Lh.

Palavras-chave: fenol, biodegradação, *Candida parapsilopsis*, água residuária, tratamento aeróbio, reator CSTR.

Abstract: A study of Phenol degradation by *Candida parapsilopsis* in a pressurized continuous reactor CSTR is reported. The reactor was on for 24 consecutive days and its flow inlet had phenol concentration ranging from 300 to 900 mg/L. The reactor functioned permanently for 16 days, with phenol removal efficiency reaching 100% and average volumetric yield of 10mg/Lh during this period.

Key words: phenol, biodegradation, *Candida parapsilopsis*, wastewater, aerobic treatment, CSTR reactor.

1 Introdução

O fenol e seus compostos são considerados produtos de difícil tratamento, no que tange a sua remoção ou degradação do meio ambiente ou de efluentes industriais, e as alternativas para recuperação de ambientes contaminados por esses compostos necessitam do desenvolvimento de tecnologias inovadoras, buscando a eficiência e baixo custo do processo (TORNISIELO, 1996).

Dois processos tradicionais em tratamentos de efluentes industriais são adsorção em carvão ativado e *air stripping*. A adsorção em carvão ativado é um processo de separação líquido-sólido, cujas aplicações envolvem controle de esgoto e odor, além da remoção de compostos orgânicos específicos tais como organoclorados e aromáticos (URANO et al., 1991). Embora, o carvão ativado apresente boa capacidade de adsorção de aromáticos halogenados, a freqüente necessidade de reativação do carvão torna esse processo economicamente inconveniente. “Air stripping” é um processo de separação líquido-gás, eficiente para remoção de compostos orgânicos halogenados voláteis. Entretanto, o maior problema com o uso destes dois processos é que ambos envolvem somente a transferência de poluente de uma fase para outra (CLARK et al., 1988). Dentre as alternativas técnicas mais eficientes propostas para degradação de compostos orgânicos de efluentes, a biodegradação é a técnica mais usada.

Um dos principais problemas estudados na ecologia contemporânea é a degradação, biotransformação e assimilação de xenobióticos. Fenol e seus derivados são típicos representantes desses grupos. Muitos estudos com vários microrganismos já foram feitos, tais como *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp*, *Streptomyces sp*, *Bacillus steorothermophilus*, *Rhodospseudomonas polistris*, *Candida tropicalis*, *Phanerochaete chrysosporium*, os quais revelaram seus potenciais de degradação de fenol na faixa de concentração de 0,3 a 0,5 g/L (GODJEVARGOVA et al., 2000). Entretanto, nesses estudos a degradação de hidrocarbonetos aromáticos ocorreu através da ação de culturas puras

ou mistas em ambiente asséptico, com temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido controlados, além de meio nutriente suplementado com sais e vitaminas, o que é inviável economicamente quanto à ampliação de escala. Daí a necessidade de se estudar como biodegradar fenóis em águas residuárias usando um sistema de tratamento que opere sob condições não assépticas, com presença de microrganismos adaptados ao ambiente de tratamento.

O emprego de hidrocarbonetos aromáticos produzidos pela indústria química tem ocasionado inevitavelmente sua liberação para o ambiente. Tal problema tem se intensificado ultimamente mesmo que considerada a intervenção governamental. Neste escopo, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos objetivando apresentar possíveis soluções para a redução da presença de poluentes no ambiente.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a capacidade da levedura *Candida parapsilopsis* degradar fenol em meio sintético num reator contínuo pressurizado por longo período de tempo.

2 Materiais e métodos

2.1 Composição da água residuária sintética

Na tabela 1, é apresentada a composição da água residuária sintética usada no ensaio com reator contínuo (RIGO 2005).

Tabela 1 – *Composição da água residuária sintética empregada no ensaio contínuo*

Componente	Concentração (mg/L)
Glicose	84
Uréia	80
Caseína hidrolisada	2,8
Na ₂ HPO ₄	6,4
K ₂ HPO ₄	5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	2,5
MnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,14
FeSO ₄ . 6 H ₂ O	0,60
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	3,8
Fenol	variável

2.2 Inóculo

O meio de cultura sintético utilizado para a pré-fermentação do ensaio contínuo de biodegradação de fenol foi preparado segundo procedimento descrito por Yang e Humphrey, 1975. A fonte de carbono deste meio de cultura foi fenol, o qual foi acrescentado ao meio antes de seu uso até atingir a concentração de 50 mg/L para a pré-fermentação número 1 e de 250 mg/L na pré-fermentação número 2. O microrganismo empregado foi *Candida parapsilopsis* obtida em trabalho anterior (RIGO e ALEGRE, 2004). Ambas as pré-fermentações foram executadas em Erlenmeyer de 250 mL com aproximadamente 100 mL de meio de cultura, a 30°C com agitação de 150 rotações por minuto. O meio de cultura proveniente da pré-fermentação número 2 foi adicionado no reator até aproximadamente 30 % de seu volume útil.

2.3 Produtividade volumétrica e eficiência de remoção de fenol

Assumindo como hipótese que o reator operou com vazão constante, as equações 1 e 2 foram empregadas para cálculo de produtividade volumétrica de remoção de fenol (P), e de eficiência de remoção de fenol (R) foram:

$$P = \quad \quad \quad (\text{Eq. 1})$$

$$R = \quad \quad \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

P = produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg/Lh);

R = eficiência de remoção de fenol (%);

F = vazão (mL/min);

V = volume de líquido do reator (mL);

Sa = concentração de fenol no afluente (mg/L);

Se = concentração de fenol no efluente (mg/L).

As equações empregadas para cálculo de produtividade volumétrica específica de remoção de DQO (demanda química de oxigênio) e de eficiência de remoção de DQO foram análogas às apresentadas acima, alterando-se as concentrações de fenol no afluente e efluente pelas suas respectivas concentrações de DQO.

2.4 Análises

2.4.1 Fenol

O meio de cultura líquido foi centrifugado para separar as células e, então, foi feita a determinação de fenol segundo procedimento de YANG e HUMPHREY, 1975.

A curva padrão foi feita com solução de fenol em água destilada com concentrações variando de 0 a 600 mg/L. Para amostras que continham mais de 600 mg/L de fenol, foram feitas diluições para atingir a faixa de concentração de fenol varrida pela curva padrão.

2.4.2 Demanda química de oxigênio (DQO)

Para determinação de DQO na água residuária sintética e nos efluentes dos reatores, foi empregado o método colorimétrico, o qual se baseia na reação da amostra com uma quantidade conhecida de dicromato de potássio em presença de ácido sulfúrico, por duas horas a 150°C em bloco digestor. A matéria orgânica da amostra é oxidada e o dicromato que inicialmente tem cor amarela e reage gerando íons Cr^{+3} de cor verde. O sulfato de prata em meio ácido é o catalisador (APHA, 1976).

A reação envolvida no processo segue abaixo:



A DQO foi determinada pela absorbância da amostra a 620nm após digestão, sendo expressa em mgDQO/L.

2.4.3 Massa celular seca

As amostras de efluentes coletadas dos ensaios contínuos foram filtradas em membrana Millipore (0,22 μm) previamente pesadas, as quais foram levadas à estufa a vácuo por 24h, a 70°C, pesadas e, por diferença de peso, foi calculada a massa celular seca de cada amostra.

O filtrado obtido, dessa operação, foi congelado para posteriormente ser empregado para determinação de fenol e DQO.

2.5 Montagem e instalação do reator de mistura (CSTR) pressurizado

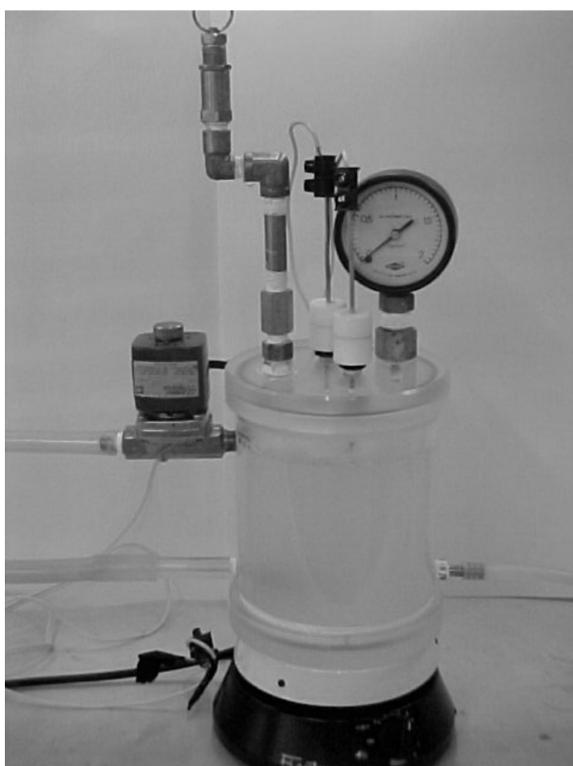
Na figura 1, é apresentado o esquema geral de instalação do reator de mistura pressurizado a uma faixa de 0,6 a 0,9 kgf/cm^2 (manométrica). O reator foi formado por uma coluna de acrílico com diâmetro de 12 cm, altura de 16 cm e volume total de 1,6 L. A agitação do meio líquido foi realizada através de um agitador magnético. A base do reator dispunha de entradas individuais para a água residuária sintética e ar. A oxigenação da fase líquida do reator foi promovida pela vazão de ar fornecida por um compressor e aplicada através de uma pedra porosa na base do reator. Antes de entrar no reator, a vazão de ar era medida num rotâmetro e permaneceu durante o ensaio na faixa de 0,3 a 0,6 L/min.

No topo do reator, foram postas uma tampa de acrílico com um manômetro, uma válvula de alívio de pressão regulada para manter a pressão manométrica no interior do reator entre 0,6 e 0,9 kgf/cm^2 e dois fios de prata de 3mm de diâmetro ajustada a uma altura de líquido de 12cm e responsável pelo acionamento da válvula

solenóide que permitia a saída do efluente do reator e mantinha o volume útil do reator constante em 1500 mL.

A água residuária sintética utilizada no ensaio foi acondicionada em béquer de 5 L e mantida em banho refrigerado a 5°C, enquanto era bombeada para o interior do reator pela sua base por uma bomba positiva que funcionava intermitentemente, pois estava ligada a um temporizador, para promover a vazão de afluente desejada. A cada dois dias, a água residuária sintética do béquer de 5 L era renovada.

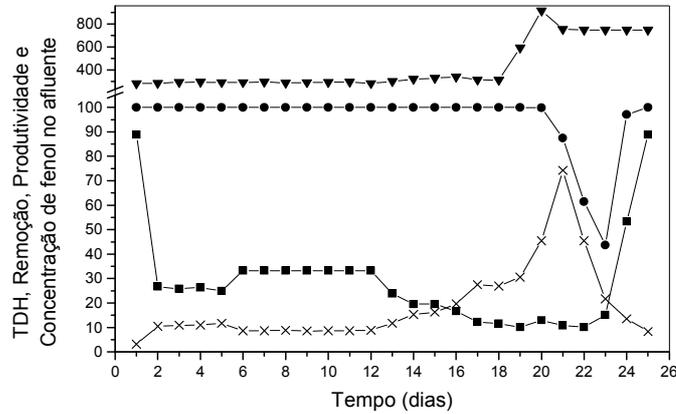
Figura 1 – Instalação do reator de mistura pressurizado utilizado no ensaio



3 Resultados e discussão

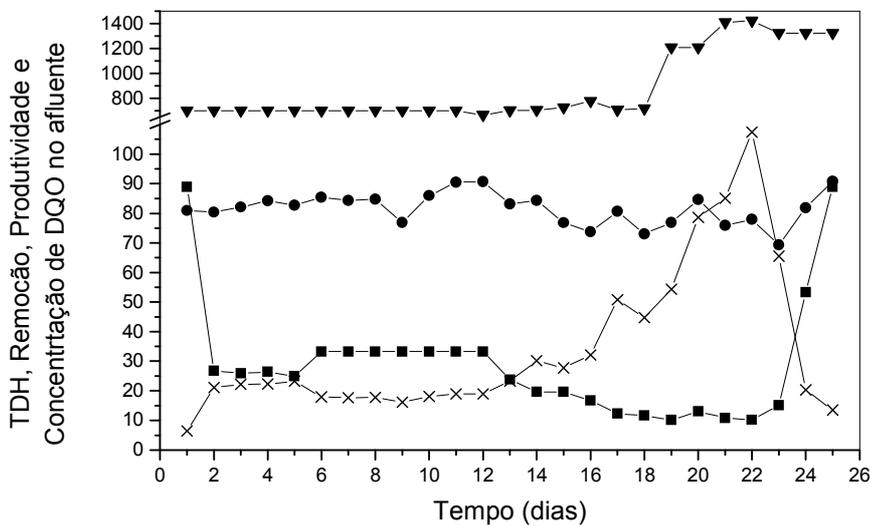
Os resultados de produtividade volumétrica e eficiência de remoção de fenol são apresentados nas figuras 2 e 3. O reator foi alimentado com água residuária sintética contendo fenol na faixa de concentração de 300 a 900 mg/L e operou por 24 dias consecutivos, sendo coletadas amostras diárias de 100 mL para determinação da concentração de fenol, DQO e massa celular seca .

Figura 2 – Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 0,9 kgf / cm²



—■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de fenol (%),
 —X— produtividade volumétrica de remoção de fenol (mg/Lh) e —▼— concentração de fenol de
 no afluente (mg/L).

Figura 3 – Reator de mistura pressurizado entre 0,6 e 0,9 kgf / cm²



—■— Tempo de detenção hidráulica TDH (horas), —●— eficiência de remoção de DQO (%),
 —X— produtividade volumétrica de remoção de DQO (mg/Lh) e —▼— concentração de
 DQO no afluente (mg/L).

Considerando-se os primeiros 18 dias de operação do reator, a concentração de fenol no afluente foi de aproximadamente 350 mg/L e a eficiência de remoção de fenol foi de 100 % até o 20º dia de operação. Entre o primeiro dia de operação do reator e o 12º dia o tempo de detenção hidráulica permaneceu na faixa de 25 a 30 h e a produtividade volumétrica de remoção de fenol manteve-se na faixa de 8 a 10 mg/Lh. A partir do 12º dia, o tempo de detenção hidráulica do meio no reator começou a declinar até atingir a faixa de 9 a 10 h entre o 17º dia de operação e o 22º dia. Entre os dias de operação 17 e 19, a produtividade volumétrica de remoção de fenol foi de 30 mg/Lh.

A partir do 19º dia de operação do reator, a concentração de fenol no afluente foi aumentada até estabilizar em aproximadamente 800 mg/L no 21º dia de operação. Com isso, a eficiência de remoção de fenol declinou até atingir o valor de 50 % no 23º dia. A produtividade volumétrica de remoção de fenol no 21º dia atingiu seu valor máximo de 70mg/Lh, mas não se manteve nos dias seguintes neste patamar. Portanto, o sistema biológico não entrou em estado estacionário depois da elevação na concentração de fenol do afluente e também não foi capaz de degradar com alta eficiência a carga orgânica de fenol que entrou no reator. O que ocorreu, nesse caso, foi um choque no sistema biológico ocasionado pela abrupta elevação da concentração de fenol do afluente, contribuindo para a diminuição da atividade das células de levedura responsáveis pela degradação de fenol. A massa celular seca dos últimos cinco dias de operação do reator permaneceu dentro da faixa de 250 a 406mg/L, mas através da análise microscópica verificou-se que a concentração de bactérias aumentou e, em contrapartida, a concentração de levedura filamentosa diminuiu.

Durante todo período de operação do reator, a eficiência de remoção de DQO ficou entre 70 e 90% e a curva de produtividade volumétrica de remoção de DQO em função do tempo de operação teve comportamento análogo à curva de produtividade volumétrica de remoção de fenol, mas com valores aproximadamente adicionados de 10 unidades.

Anselmo e Novais (1992) investigaram o uso de *Fusarium flocciferum*, em fermentações contínuas, para biodegradação de fenol. Os experimentos contínuos foram feitos assepticamente em reatores de 1 L de volume útil, a 25 °C, pH controlado na faixa de 4,0 a 4,5, agitação de 300 rotações por minuto e saturação de oxigênio maior que 60 %. O meio de alimentação do reator continha concentração inicial de fenol de 500 mg/L, e a taxa de diluição variou de 0,02 até 0,13 h⁻¹, porém obtiveram remoção total de fenol até a taxa de diluição de 0,08 h⁻¹. Os melhores resultados que os autores obtiveram foram eficiência e produtividade volumétrica de remoção de fenol de 100 % e 40 mg/Lh, respectivamente, na vazão volumétrica de 1,3 mL/min. O lixiviamento das células do reator ocorreu na taxa de diluição de 0,11 h⁻¹. Assim, os autores verificaram a capacidade do fungo em degradar fenol na forma livre, e inferiram que para o emprego em escala industrial, o sistema foi estável até a vazão volumétrica de 1,3 mL/min, possibilitando a determinação de parâmetros

relevantes do reator, apesar dos fungos filamentosos não serem facilmente adaptados em culturas submersas contínuas, devido sua característica morfológica de crescimento, cuja retenção de biomassa no reator ocasiona instabilidade no estado estacionário e o meio ter comportamento não-Newtoniano, entre outros problemas. Mas por outro lado, esse fungo tem grande importância na área da biotecnologia devida sua capacidade de degradar compostos tóxicos.

Nesse trabalho, as melhores respostas obtidas para o binômio, eficiência e produtividade volumétrica de remoção de fenol, foram de 100 % e 10 mg/Lh, respectivamente, que são valores inferiores aos reportados por ANSELMO e NOVAIS (1992), entretanto, no presente trabalho não se empregou condições assépticas na operação do reator, simulando desta forma condições mais realistas no que tange o emprego prático do sistema proposto para biodegradação de fenol.

4 Conclusões

A carga orgânica removida do reator foi medida em termos da produtividade volumétrica de remoção de fenol, a qual variou entre 5 e 70 mg/Lh e a eficiência de remoção de fenol foi de 100 % até o 20º dia de operação.

O desenvolvimento do reator contínuo, com a levedura selecionada para degradação de fenol, mostrou-se satisfatório, uma vez que foi possível obter a estabilidade operacional do reator por 18 dias consecutivos com eficiência de remoção de fenol de 100 %.

O reator pressurizado entre 0,6 e 0,9 kgf/cm² apresentou valores médios do binômio produtividade volumétrica de remoção de fenol e eficiência de remoção de fenol de 100% e 10 mg/Lh nos 16 primeiros dias, o que demonstrou a estabilidade operacional por mais de duas semanas.

5 Referências

APHA. Oxigen demand (chemical). In: **APHA Standard methods for the examination of water and wastewater**. 4. ed. Washington, D.C., p. 550 – 554. 1976.

ANSELMO, A. M.; NOVAIS, J. M. Biological treatment of phenolics wastes: comparison between free and immobilized cells systems. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 3, p. 239-244, 1992.

CLARK, R. M.; FRONK, C. A.; LYKINS, B. W. Jr. Remaining organic contaminants from groundwater – A cost and performance evaluation. **Environment. Science Technology**. v. 22, n. 10, p. 1126-1130, 1988.

GODJEVARGOVA, T.; ALEXIEVA, Z.; IVANOVA, D. Cell immobilization of *Trichosporon cutaneum* strain with phenol degradation ability on new modified polymer carriers. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 699-704, 2000.

RIGO, M. **Estudo da biodegradação compostos fenólicos em águas residuárias**. Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

RIGO, M.; ALEGRE, R. M. Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from industrial wastewater and kinetics of the biodegradation. **Folia Microbiol.** v. 49, n. 1, p. 41 – 45, 2004.

TORNISIELO, V. L. Degradação de fenol por microrganismos do solo. In: I REUNIÃO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO MEIO AMBIENTE, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas, 1996 p. 05.

URANO, K.; YAMAMOTO, E.; TONEGAWA, M.; FUJIE, K. Adsorption of chlorinated organic compounds on activated carbon from water. **Water Research**, v. 25, p. 1459-1464, 1991.

YANG, R. D.; HUMPHREY, A. E. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 17, p. 1211-1235, 1975.