

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**SIBELI DE CARLI**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS  
FENOLOLÍTIICAS PARA TRATAMENTO DE  
EFLUENTES DE REFINARIAS DE  
PETRÓLEO**



Rio Claro  
2013

SIBELI DE CARLI

Seleção de bactérias fenololíticas para tratamento de efluentes de refinarias de petróleo

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Dr<sup>a</sup> Dilza Aparecida Nalin

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2013

574.5263 De Carli, Sibeli

D291s Seleção de bactérias fenololíticas para tratamento de efluentes de refinarias de petróleo / Sibeli De Carli. - Rio Claro, 2013  
53 f. : il., figs., gráfs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

Coorientador: Dilza Aparecida Nalin

1. Ecologia aquática. 2. Biodegradação de fenóis. 3. Fenol. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

*Aos meus avôs Leonilda, Paschoal (in memoria),  
Maria Aurea (in memoria), que me foram um grande  
exemplo de vida; à minha mãe Acileide, meu pai  
Irineu e meus irmãos, Cynthia e Danilo, os quais  
sempre me forneceram apoio incondicional,  
incentivo, carinho e amor, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que se faz presente em todos os momentos da minha vida e zelando por mim em cada passo, amparando-me e guiando-me nos momentos difíceis e acima de tudo por tornar real mais este sonho.

Aos meus pais, razões da minha existência, que sempre me deram tanto apoio e suporte durante todos estes anos de estudo. Só tenho a dizer que cada gota de suor que derramaram está simbolicamente representada neste trabalho. Sempre serei grata por tudo. Amo vocês!

Agradeço também aos meus irmãos, Cynthia e Dani, sempre tão companheiros, atenciosos e compreensivos.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis pela orientação, carinho, paciência e ensinamentos passados nesses três anos de orientação. É uma grande mulher, que admiro imensamente.

Agradeço a Dr.<sup>a</sup> Dilza Nalin, Márcio Ramos, Emily, Letícia, Lu, Inês, Márcio, Zito, Mariane, Ju, Nair, Dú, Oscar, Richard e todos os outros companheiros do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, pelas conversas descontraídas, sempre dispostos a ajudar e ensinar.

Ao Prof. Dr. Dimas Dias Brito, pela aprovação do projeto e pela confiança em meu trabalho.

Ao Rodrigo Goya, auxiliar administrativo do PRH-05, por toda ajuda e pela amizade.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geociências e Ciências Ambientais Aplicadas ao Petróleo – PRH 05/UNESP, ao PFRH/Petrobrás e ao PRH/ANP – FINEP/MCT, pelo apoio acadêmico e financeiro, indispensáveis à realização deste trabalho de conclusão de curso.

A todos os meus colegas de graduação, sem exceções, tenho boas recordações de cada um e certamente serão levadas pelo resto de minha vida. Foi realmente muito bom tê-los comigo durante estes cinco anos.

Agradeço em especial às minhas grandes amigas, Amanda, Bruna e Kethy. São pessoas muito queridas e serão sempre guardadas com um carinho especial. Foi simplesmente excepcional conviver com vocês. Muito obrigada por tudo!

Agradeço também, todos meus amigos de Pirassununga, pelas festas, churrascos e conversas e, que mesmo os vendo poucas vezes, a cada reencontro a amizade é sempre a mesma, como sempre foi.

Enfim, meu muito obrigado a todas as pessoas que de alguma forma participaram e ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento do trabalho e do ser humano que o assina.

*“Por isso mesmo, pelo amor, fé e luz, tenho absoluta certeza que tudo vai dar certo”*

*Caio Fernando Abreu*

## RESUMO

Os efluentes de indústrias, como refinarias e petroquímicas, frequentemente contém elevadas concentrações de substâncias tóxicas, dentre elas, os compostos fenólicos. Estas substâncias, mesmo em pequenas quantidades, afetam as propriedades organolépticas da água, além de que durante o processo de cloração da água potável, podem ser transformadas em clorofenóis e policlorofenóis, pela reação com o cloro, formando substâncias com características carcinogênicas. Neste sentido, o refino do petróleo produz grande variedade de poluentes cujas propriedades modificam-se em função dos processos utilizados. Os fenóis são compostos tóxicos, com características fungicida e desinfetante, sendo tóxico para a maioria dos microrganismos, além de apresentarem ação de carcinogenicidade, mutagenicidade e serem recalcitrantes, acumulam-se nos corpos receptores, gerando danos à saúde e à vida aquática. No entanto, embora o fenol possua ação bactericida, alguns microrganismos adquiriram a habilidade de se adaptar e utilizar este composto como fonte de carbono e energia. O presente trabalho pretendeu selecionar linhagens bacterianas, a partir do efluente de uma refinaria de petróleo, da região de Paulínia – SP, que sejam capazes de utilizar altos teores de fenóis como fonte de carbono e energia para seu crescimento e desenvolvimento, a fim de serem aplicadas nas estações de tratamento de efluentes industriais, com foco nas refinarias de petróleo. Foram isoladas 3 linhagens a partir das amostras enriquecidas do efluente da refinaria e, após os ensaios, constatou-se que 1 linhagem apresentou resistência à concentração de fenol de  $1.000 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os ensaios de biodegradação e crescimento em fenol como única fonte de carbono, demonstraram que estas linhagens são capazes de biodegradar aproximadamente 20% do fenol disponível no meio, no período de 24 horas. A quantificação do fenol residual foi realizada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A partir dos resultados, pode-se concluir que há eficiência na ação degradadora destes microrganismos, uma vez que a concentração de fenol em efluentes de refinarias e outras indústrias com frequência ultrapassam o limite para descarte estabelecido pela legislação de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

**Palavras chave:** *Fenol; bactérias fenololíticas; efluentes.*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Água e a Humanidade.....	12
2.2. Petróleo.....	13
2.3. Tratamento de Efluentes Industriais.....	16
2.3.1. Tratamento Biológico.....	16
2.4. Legislação Ambiental.....	17
2.5. Fenol.....	18
2.5.1. Degradação do Fenol.....	19
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Material.....	24
4.1.1. Isolamento de bactérias com potencial de biodegradar fenol.....	24
4.1.2. Meios de Cultura.....	24
4.1.3. Reagentes e Soluções.....	25
4.2. Métodos.....	26
4.2.1. Isolamento bacteriano.....	26
4.2.2. Preservação das bactérias.....	26
4.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fenol para os microrganismos presentes nos reatores de enriquecimento.....	26
4.2.4. Teste de biodegradação e quantificação do consumo de fenol.....	27
4.2.4.1. Método 1: Quantificação do fenol em Espectrofotômetro pelo método 4-aminoantipirina.....	29
4.2.4.2. Método 2: Quantificação de fenol em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	30
4.2.5. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica das linhagens isoladas.....	31
4.2.6. Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> .....	31

4.2.7. Teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> .....	32
4.2.8. Criação de microcrustáceos. ....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1. Isolamento .....	35
5.2. Teste para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	36
5.3. Quantificação do Consumo de Fenol .....	37
5.3.1. Método 1: Quantificação de Fenol em Espectrofotômetro pelo Método 4-Amino-Antipirina.....	37
5.3.2. Método 2: Quantificação de Fenol em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	38
5.3.2.1. Biodegradação do fenol no efluente da refinaria .....	41
5.3.2.2. Biodegradação do fenol na água de produção do petróleo.....	43
5.4. Identificação .....	45
5.5. Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia similis</i> .....	46
5.6. Teste de Toxicidade Crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> .....	47
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

Com o constante e progressivo avanço da industrialização, desde a segunda metade do século XIX, ocorreram diversos danos ao meio ambiente, incluindo atmosfera, água e solo. A busca por melhores condições de vida intensificou o consumo dos produtos industrializados, e conseqüentemente, grande quantidade de resíduos são gerados. O modelo econômico atual, associado aos avanços tecnológicos, propiciou a criação de muitos produtos, que são descartados na natureza, gerando resíduos sólidos, líquidos ou gasosos.

Como controle às emissões de poluentes, foram impostas pela legislação brasileira, medidas para diminuição destas substâncias nas emissões gasosas, efluentes aquosos e na descontaminação de solos. Nesta visão, a crescente preocupação em preservar o meio ambiente, despertou o interesse de muitos pesquisadores em desenvolver novas tecnologias para o tratamento de efluentes industriais, que sejam mais eficientes a fim de minimizar o impacto causado por estes resíduos. Maior atenção é dada à poluição das águas, pois este recurso, além de controlar as condições climáticas no planeta, representa o recurso vital aos seres vivos e que, atualmente, tornaram-se escassos para atender toda demanda, devido o aumento da população mundial, pelo uso indiscriminado nas cidades, na agricultura e na indústria.

Os efluentes de indústrias, como refinarias e petroquímicas, frequentemente contém elevadas concentrações de compostos tóxicos, dentre eles, os compostos fenólicos. Estas substâncias, mesmos em pequenas quantidades, afetam as propriedades organolépticas da água. Além disso, durante o processo de cloração da água para descontaminá-la e tornando-a potável, os fenóis podem ser transformados em clorofenóis e policlorofenóis, pela reação com o cloro, formando substâncias com características carcinogênicas.

Neste sentido, o refino do petróleo produz grande variedade de poluentes cujas propriedades modificam-se em função dos processos utilizados. Entretanto, são destacados os fenóis, óleos e graxas, sulfetos, mercaptanas, amônia, sais, metais pesados, cianetos, fosfatos, sólidos em suspensão e dissolvidos e substâncias que aumentam as demandas química e bioquímica de oxigênio, (DQO) e (DBO), respectivamente (MORAES, 2000).

Dentre todas estas substâncias, destacam-se os fenóis, uma vez que sua presença no ambiente pode causar sérios danos. Trata-se de um composto tóxico e com características de carcinogenicidade e mutagenicidade (RODRIGUES et al., 2007). Os fenóis nos efluentes são resultantes das etapas de craqueamento térmico e catalítico, produção de lubrificantes e de solventes e nas águas de lavagem de hidrocarbonetos, seguidos dos tratamentos cáusticos (MARIANO, 2001).

A tabela 1 fornece a relação dos compostos normalmente encontrados nos efluentes das refinarias de petróleo, assim como as respectivas concentrações nas quais eles tornam-se tóxicos aos peixes.

Tabela 1 – Compostos Tóxicos Normalmente Encontrados nos Efluentes de Refinarias de Petróleo

Composto Tóxico	Concentração Média (mg.L <sup>-1</sup> )	Limite de Toxicidade aos Peixes (mg.L <sup>-1</sup> )
Cádmio	0,04	0,10
Cromo	0,28	0,70
Cobre	0,07	0,15
Chumbo	0,23	2,50
Níquel	0,11	1,50
Fenol	154,00	40,00
Sulfetos (como H <sub>2</sub> S)	24,00	4,00
Zinco	0,17	1,00

Fonte: BRAILE, 1979

Nos processos tecnológicos, os tratamentos baseados em processos biológicos são aqueles utilizados mais frequentemente, uma vez que permitem o tratamento de grande volume de efluentes transformando compostos orgânicos tóxicos, como os fenóis, em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, com custo mais baixos que processos físicos químicos.

No entanto, os processos que envolvem microrganismos podem apresentar algumas limitações, devido à baixa biodegradabilidade e alta toxicidade do composto em questão, por isso, numerosas espécies de bactérias resistentes e degradadoras de elevadas concentrações de fenol têm sido isoladas e suas vias de degradação estudadas.

Diante desta realidade, o objetivo deste estudo foi selecionar e identificar cepas bacterianas, provenientes de amostras ambientais, resistentes e capazes de degradar os compostos fenólicos produzidos na indústria petrolífera.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Água e a Humanidade**

A água desempenha papel importante na geração e manutenção da vida na Terra, influenciando a distribuição espacial dos organismos e compondo a maior parte dos seres vivos, estando presente nos processos fisiológicos, como transporte de nutrientes, manutenção de temperatura corpórea, produção e armazenamento de energia (SCHMIDT-NIELSEN e KNUT, 2002).

A humanidade sempre esteve ligada à disponibilidade de água e a evolução de seu desenvolvimento dependeu fortemente do uso e da qualidade dos recursos hídricos. A água está envolvida em diversas atividades humanas como, produção de energia, produção de alimento, desenvolvimento industrial, agrícola e econômico, além de ser utilizada em atividade de lazer, higienização e transporte.

Este recurso ocupa aproximadamente 71% de toda a superfície terrestre, tendo um volume de 1,4 bilhões de Km<sup>3</sup>, no entanto, quase 98% deste total é água salgada, encontrada nos mares e oceanos, e dos 2% de água doce restantes, apenas 13% está disponível para ser utilizada, uma vez que a maior parte encontra-se congelada em geleiras (GRASSI, 2001).

A tabela 2 apresenta detalhes quanto à distribuição de água no planeta.

Tabela 2 – Distribuição de água no planeta Terra

Reservatórios	Volume (Km <sup>3</sup> )	Percentual (%)
Oceanos	1.320.305.000	97,24
Geleiras e calotas polares	29.155.000	2,14
Águas subterrâneas	8.330.000	0,61
Lagos	124.950	0,009
Mares	104.125	0,008
Umidade do solo	66.640	0,005
Atmosfera	12.911	0,001
Rios	1.250	0,0001
Total	1.358.099.876	100

Fonte: Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, 2001

Estes 13% de água disponível, subdividem-se em águas subterrâneas, de superfície, no solo, na atmosfera e nos seres vivos. Assim, somente uma pequena porção de todo recurso hídrico do planeta é destinada ao consumo humano (CHAPMAN, 1990).

Nas últimas décadas o crescimento do consumo de água tornou crítico o abastecimento em várias regiões de planeta, principalmente nas grandes cidades, além de ter gerado muitos resíduos, contribuindo negativamente para a manutenção da qualidade dos recursos hídricos.

A industrialização é uma das atividades antrópicas que têm contribuído para a degradação da qualidade da água, sendo uma das principais fontes de poluição, pela grande quantidade de compostos não biodegradáveis e tóxicos que são produzidos. Além disso, os processos industriais utilizam grande volume de água e, pela dificuldade de tratamento de todo efluente gerado, podem contaminar os corpos d'água que são utilizadas no abastecimento para consumo humano (MAHMOUND e FREIRE, 2007).

## 2.2. Petróleo

O petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, que pode apresentar concentrações variadas de enxofre, nitrogênio, oxigênio e alguns metais, além disso, a composição do óleo pode variar de acordo com o reservatório de origem (BRASIL et al., 2012). De acordo com a definição proposta pela ASTM (*American*

*Society for Testing and Materials*), “o petróleo é uma mistura de ocorrência natural, consistindo predominantemente de hidrocarbonetos e derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados e/ou oxigenados, o qual é, ou pode ser removido da terra no estado líquido”.

Segundo BRASIL et al. (2012), a composição elementar do petróleo varia pouco, como é apresentado na tabela 3, o que pode ser explicado pelo fato de ser constituído por uma série de hidrocarbonetos (substâncias compostas por átomos de carbono e hidrogênio e que apresentam cadeias que vão desde um único átomo de carbono – o metano – até mais de 60 átomos).

Tabela 3 – Composição elementar média de petróleo

<b>Elemento</b>	<b>% em massa</b>
Carbono	83,0 a 87,0
Hidrogênio	10,0 a 14,0
Enxofre	0,05 a 6,0
Nitrogênio	0,1 a 2,0
Oxigênio	0,05 a 1,5
Metais (Fe, Ni, V etc.)	< 0,3

Fonte: Brasil et al., 2012

O refino potencializa o uso energético do petróleo para que seja aproveitado ao máximo em seus diversos derivados, uma vez que o principal objetivo deste procedimento é a obtenção da maior quantidade possível de derivados de alto valor comercial com menores custos operacionais, além de máxima qualidade (MARIANO, 2011; BRASIL et al., 2012).

A composição química do petróleo e a busca por atender os interesses econômicos, ambientais e sustentáveis têm forte influência quanto à escolha do método de refino, o qual poderá determinar quais os produtos que melhor poderão ser obtidos. Assim, nem todos os derivados do petróleo são produzidos com alta qualidade e que sejam economicamente viáveis. Deste modo, os esquemas de refino variam de uma refinaria para outra, pois além das razões citadas, o mercado demanda nos produtos

produzidos e os processos de refino são dinâmicos, estando sujeitos a alterações em função, principalmente, de uma constante evolução tecnológica.

Em geral, as principais etapas de uma refinaria são:

- Dessalinização;
- Destilação Atmosférica;
- Destilação a Vácuo;
- Desasfaltação a Propano;
- Desaromatização a Furfural;
- Desparafinação;
- Desoleificação.

Todas as etapas deste processo geram dejetos que irão compor o efluente da refinaria. Em geral, para cada litro de derivado processado, temos dois litros de despejos gerados, onde são presentes, além do óleo, diversos contaminantes tóxicos como os fenóis, sulfetos, amônia, cianeto, metais pesados, cloretos, enxofre entre outros (CARVALHO, s/d). A tabela 4 ilustra a caracterização dos efluentes das refinarias, quanto ao teor dos compostos lançados após o refino do petróleo.

Tabela 4- Características dos efluentes das refinarias.

<b>Parâmetro</b>	<b>Teor (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Sulfetos	50 – 10.000
Amônia	50 – 9.000
Fenóis	10 – 1.200
Cianetos	< 1 – 20
Hidrocarbonetos	50 – 300

Fonte: Piras, P. F. (1993).

Durante o processo de refino de petróleo, o fenol é lançado nos efluentes nas etapas de craqueamento catalítico, produção de lubrificantes e de solventes e nas águas de lavagem da gasolina. A seguir são introduzidos tratamentos cáusticos, que são fases dos processos de tratamento das frações obtidas, e tem o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos, diminuindo possíveis impurezas, sem causar grande modificação nas frações (MARIANO, 2011). Nos efluentes, este composto pode ser encontrado em mais de uma forma, podendo apresentar estrutura mais complexa quando

há ligação com outros íons (como nitrofenóis e clorofenóis), que são mais tóxicas que o fenol (ZHOU e FANG, 1997).

### **2.3. Tratamento de Efluentes Industriais**

Com o intuito de minimizar os impactos gerados pela grande quantidade de resíduos industriais, a legislação pressiona o setor industrial para que arquem com a responsabilidade de controle dos seus efluentes, diminuindo o seu potencial poluidor. Assim, a presença de estações de tratamento de efluentes é uma condição básica em toda instalação industrial.

O sistema de águas residuais é composto por uma série de operação de natureza física, química e biológica usadas para transformação ou remoção de compostos que são indesejáveis no meio ambiente.

Segundo BRITO (1996), existem três tipos de tratamento de efluente, dependendo do tipo de material a ser removido:

- Tratamento primário: remoção de substâncias flutuantes e de sólidos finos sedimentares;
- Tratamento secundário: processo biológico com finalidade de reduzir o teor de matéria orgânica solúvel;
- Tratamento terciário: remoção de substâncias não eliminadas nos níveis anteriores.

Para a escolha do método a ser empregado devem ser consideradas as vantagens e desvantagens de cada procedimento, além da eficiência, segurança, simplicidade, formação de lodo, custo de implantação e operação, espaço físico requerido e impacto no meio receptor (SPERLING, 1996).

#### **2.3.1. Tratamento Biológico**

O tratamento biológico de efluentes industriais é o método mais utilizado atualmente, devido ao baixo custo e à sua versatilidade na oxidação de vários poluentes orgânicos, além da possibilidade de tratamento de grande volume de águas residuais.

Neste tipo de tratamento são utilizados microrganismos, principalmente bactérias, que convertem a matéria orgânica disponível no efluente em compostos inorgânicos inócuos.

Segundo TEIXEIRA e JARDIM (2004) são conhecidos, basicamente, dois tipos de tratamentos biológicos:

- Anaeróbio: emprega algumas formas de carbono, enxofre e nitrogênio como aceptores de elétrons, oxidando a matéria orgânica do substrato à  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ .
- Aeróbio: utiliza o oxigênio molecular dissolvido no efluente comoceptor de elétrons, oxidando a matéria orgânica do poluente à  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ .

Apesar das inúmeras vantagens, o processo biológico possuem algumas limitações. Compostos com elevada toxicidade podem interferir neste tipo de tratamento, uma vez que o impacto de compostos altamente tóxicos gera a diminuição dos microrganismos, além de poder causar modificações em seus metabolitos, impedindo a degradação dessas substâncias (LOPES, 2009).

Em efluentes que apresentam altas concentrações de fenol, este tipo de tratamento pode não ter tecnologia adequada, devido ao caráter inibitório do composto que estabelece uma barreira ao metabolismo microbiano. No entanto, vários estudos estão sendo realizados a fim de selecionar cepas bacterianas capazes de tratar efluentes que apresentam elevadas concentrações de compostos fenólicos. Segundo PERPETUO et al. (2009) cepas bacterianas de *Chromobacterium violaceum* possuem o gene da fenol-hidroxilase, capaz de metabolizar o fenol; diversos outros autores relatam a capacidade de degradação de compostos aromáticos em espécies pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* e *Ralstonia* (AVANZI et al., 2009; CHEN et al., 2004; THAKUR et al., 2002).

## 2.4. Legislação Ambiental

No Estado de São Paulo existem muitas indústrias contendo efluentes fenólicos ligados à rede pública de esgoto, para isso, estes efluentes devem sofrer tratamento na própria unidade industrial a fim de minimizar a concentração de fenóis para enquadrar-se dentro da norma imposta pela legislação.

Em 2005, a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março (BRASIL, 2005), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, limitava a emissão de fenóis totais em  $0,003 \text{ mg.L}^{-1}$ , propondo um alto padrão de qualidade, cuja finalidade era a proteção à saúde humana, bem como às comunidades aquáticas. No entanto, a Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011), que

complementa e altera a resolução anterior, bem como o Artigo 18 do Decreto Estadual nº 8.469/76, do Estado de São Paulo, estabelecem o limite de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de fenóis em emissões de esgoto diretamente no corpo receptor.

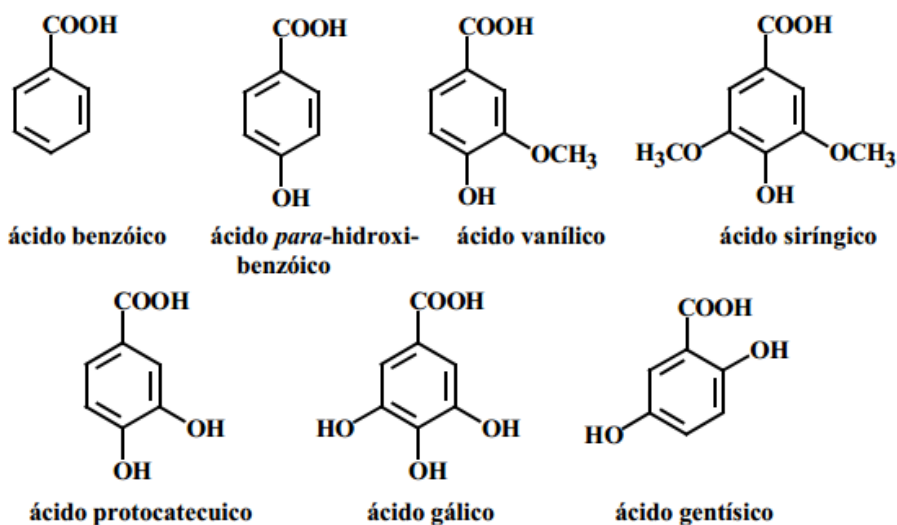
## 2.5. Fenol

O fenol é um hidrocarboneto aromático, com várias formas isoméricas que diferem dos álcoois por apresentarem um grupo  $-\text{OH}$  ligado diretamente a um anel aromático. Em seu estado puro, o fenol encontra-se na forma sólida branca ou incolor e quando fundido tem baixo ponto de fusão, porém apresentam ponto de ebulição elevado, conferido pela existência de hidrogênio entre as moléculas. Possui cheiro desagradável, detectável a uma concentração de  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  em ar e entre 1 a  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  em água (ATSDR, 1998) e por ser muito solúvel em água, torna-se facilmente um sério contaminante para o meio ambiente (LOPES, 2009).

Produzido naturalmente ou por processos antropogênicos, o composto pode ser encontrado em alimentos, restos de animais e em material orgânico em decomposição, bem como no ser humano. Em anos passados o fenol era obtido pela destilação do alcatrão da hulha, no entanto, atualmente, é produzido sinteticamente a partir do benzeno (EPA, 2002).

Na figura 1 são mostrados alguns dos ácidos de ocorrência natural contendo a molécula de fenol, a qual estão ligados diferentes radicais.

Figura 1 - Derivados do ácido benzoico de ocorrência natural.



Atualmente, o fenol é principal matéria prima empregada como intermediária na produção de resinas fenólicas, que são usadas nas fundições, construção civil e automobilística, produção de fibras sintéticas, como o *nylon* e resinas *epoxy*. O fenol e seus isômeros são ainda empregados como fungicida e desinfetante, por serem tóxicos para a maioria dos microrganismos (GRACIOSO et al., 2010).

Nos efluentes industriais, os fenóis são encontrados em mais de uma forma, podendo apresentar estrutura mais complexa quando há ligação com outros íons (como nitrofenóis e clorofenóis), que são mais tóxicas que o fenol (ZHOU e FANG, 1997).

### **2.5.1. Degradação do Fenol**

Atualmente, existem diversas tecnologias e processos destinados ao tratamento de efluentes fenólicos, que envolvem mecanismos físicos, químicos, biológico e eletroquímico. Estes processos objetivam a: completa oxidação dos contaminantes para CO<sub>2</sub>, água e produtos inorgânicos. Outras modificações ou alterações nas estruturas químicas das moléculas orgânicas visam realizar a decomposição parcial ou total do composto, a fim de torna-los menos tóxicos e permitirem a biodegradação (WU e ZHOU, 2001).

Os métodos mais comumente empregados na remoção do fenol de efluentes industriais são: processos de extração (geralmente extração líquido-líquido), tratamento com carvão ativado, processos térmicos, arraste com ar ou osmose reversa, tratamento biológico (PERA TITUS et al., 2004).

No entanto, todas as tecnologias citadas apresentam desvantagens. O tratamento com processo de extração, com carvão ativado acoplado com processos térmicos mostra baixa eficiência em sistemas com concentrações baixas de soluto, como é o caso de efluentes industriais fenólicos, podendo ser um processo com custos operacionais mais elevados ou permitirem a regeneração dos fenóis ou ainda, envolverem problemas ambientais, uma vez que os resíduos gerados são dispostos no meio ambiente (KOJIMA et al., 1995). Os processos que envolvem floculação, precipitação ou osmose reversa também apresentam aplicações limitadas, uma vez que necessitam de tratamento posterior para a remoção do poluente (PERA TITUS et al., 2004).

Como citado anteriormente, os tratamentos que envolvem microrganismos também são limitados pela alta toxicidade dos compostos fenólicos e seus derivados por causa dos efeitos deletérios sobre os diferentes microrganismos.

Neste cenário, a utilização de microrganismos mais resistentes aos fenóis surge como uma importante ferramenta no tratamento de efluentes industriais fenolíticos, visto que as bactérias estão envolvidas em inúmeros ciclos biogeoquímicos e muitas apresentam mecanismos para suportar condições adversas, podendo transformar substâncias tóxicas em compostos menos tóxicos (MUKHOPADHYAY et al., 2002).

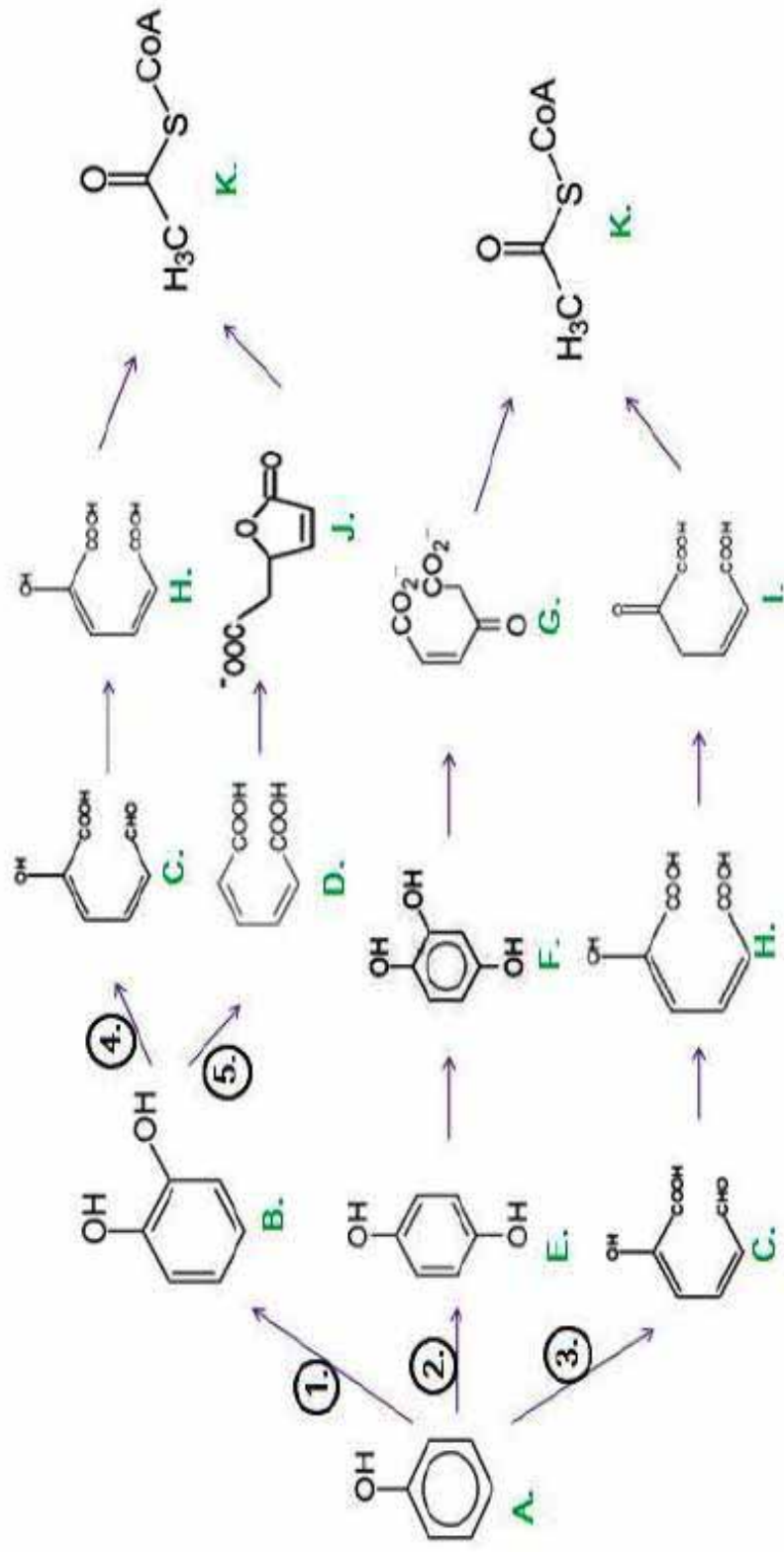
Diversos grupos de microrganismos vêm sendo estudados nos processos de biodegradação de fenol, por conseguirem utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Tais organismos são capazes de colonizar e utilizar diversos substratos exóticos ou tóxicos para seu crescimento.

A via de degradação aeróbia de um composto fenólico por microrganismos, conforme mostrado na figura 2, é iniciada pela hidroxilação do composto, a fim de formar catecol ou formação da hidroquinona para posterior formação do catecol (GRACIOSO, 2012). Esta reação é catalisada pela fenol-hidroxilase (fenol 2-monooxigenase), sendo considerada limitante na via degradativa. Dentre as bactérias, existem 2 tipos de enzimas fenol hidroxilase: a uni-componente e a multi-componente (FUTAMATA et al., 2001).

O segundo passo da degradação é a quebra do catecol formado, mediante a abertura do anel aromático, pela ação da catecol dioxigenases. Nesta fase o catecol é degradado pela via *orto* clivagem (enzima catecol 1,2 dioxigenases) ou pela via *meta* clivagem (enzima catecol 2,3 dioxigenases) (NAIR et al., 2008). Estes produtos formados são, então, transformados em produtos do metabolismo celular, até que haja a formação de CO<sub>2</sub> e água.

Às vezes, a degradação do fenol pode ocorrer de forma parcial ou ocorrer a biotransformação de um composto aromático em outros intermediários, que podem ter efeitos contrários, tornando a toxicidade no ambiente mais elevada. Portanto, o monitoramento dos compostos intermediários gerados durante todo o processo é de extrema importância.

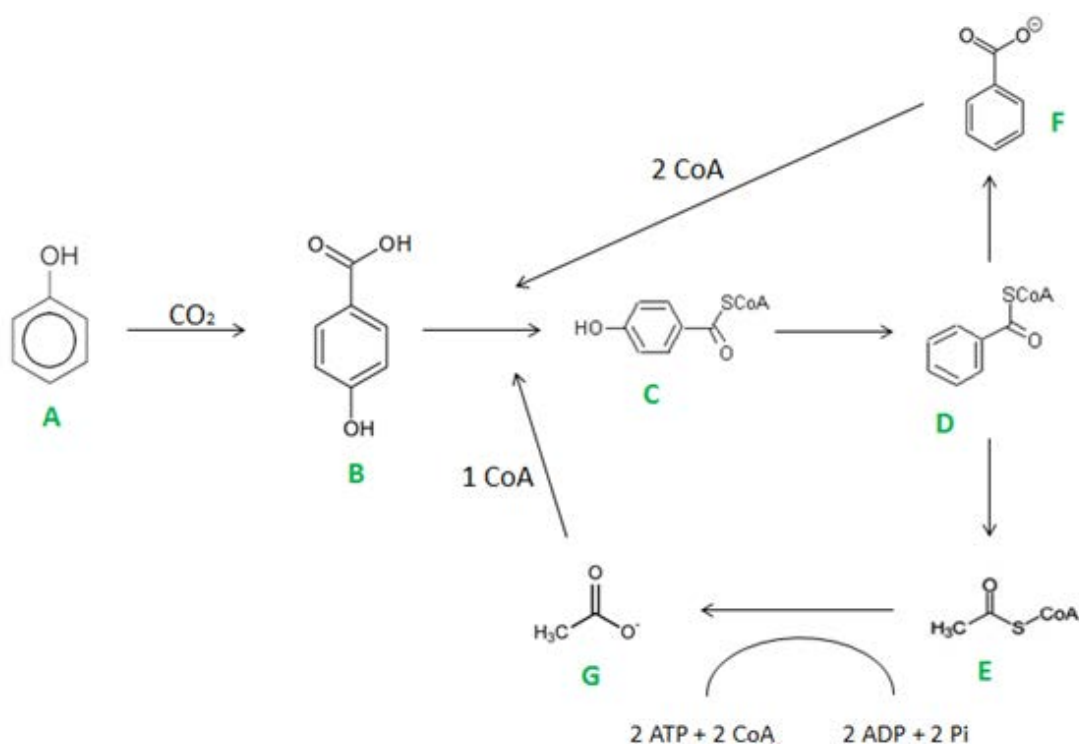
Figura 2 - Via de degradação aeróbia de um composto fenólico por microrganismos.



A. Fenol; B. Catecol; C. 2-hidroxi-3-oxo-6-oxociclohex-2-en-1-carboxilato; D. cis,cis - mucônico; E. Hidroquinona; F. 1,2,4- trihidroxibenzeno; G. maleilacetato; H. 2-hidroxi-3-oxo-6-oxociclohex-2-en-1-carboxilato; I. 2- oxalocronato; J. Muconolactona; K. Acetil CoA 1. orto hidroxilação do fenol formando catecol. 2. para hidroxilação formando hidroquinona. 3. Fenol sendo degradado por meta clivagem formando diretamente 2- hidroxi-3-oxo-6-oxociclohex-2-en-1-carboxilato. 4. meta clivagem do catecol. 5. orto clivagem do catecol.

Na degradação anaeróbica apresentada na figura 3, o caminho mais estudado de transformação de fenol sob condições metanogênicas é mediante a formação de benzoil-CoA. Nesta via metabólica há a presença de enzimas que promovem a carboxilação, reações de descarboxilação e desidroxilação durante a transformação de fenol, apresentada por Gallert e Winter (1992 e 1994). Estes autores sugeriram que o fenol é degradado à benzoato, via 4-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoil-CoA e benzoil-CoA.

Figura 3 - Via de degradação anaeróbica de um composto fenólico por microrganismos.



A: Fenol; B: 4-hidroxibenzoato; C: 4-hidroxibenzoilCoA; D: BenzoilCoA; E: AcetilCoA; F: Benzoato; G: Acetato.

Adaptado de KARLSSON et al., 1998.

### **3. OBJETIVOS**

Esta proposta visa selecionar e identificar bactérias resistentes à altas concentrações de fenol e capazes de metabolizá-lo como fonte de energia, para serem acrescentadas às estações de tratamento de efluentes em refinarias de petróleo, a fim de contribuir para aumento da velocidade de degradação do fenol, minimizando, em menor tempo, o seu efeito tóxico no efluente.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Isolamento de bactérias com potencial de biodegradar fenol.

As cepas bacterianas foram isoladas a partir de amostras ambientais, como efluente de refinaria de petróleo, água do rio Atibaia (GPS: (22°41'28'') (47°07'22'')) que recebe efluente tratado de refinaria petrolífera e solo de plantação de pinheiros, que liberam substâncias alelopáticas com pequena concentração de fenol, a fim de evitar competição por outras plantas (Gatti, 2004).

#### 4.1.2. Meios de Cultura

##### Plate Count Agar (PCA) (HIMEDIA®)

Peptona de Caseína Hidrolizada	0,50 g
Extrato de Levedura	0,25 g
Dextrose	0,10 g
Ágar	1,50 g
Água destilada q.s.p.	100 mL
pH 7,0 à 25°C	

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

##### Caldo Nutriente (HIMEDIA®)

Peptona de carne	0,50 g
Extrato de Levedura	0,15 g
Extrato de Carne	0,15 g

Cloreto de Sódio	0,50 g
Água destilada q.s.p.	100 mL
pH 7,4 à 25°C	

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### **Meio Mineral Mínimo**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,02 g
NaCl	0,01 g
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g
FeCl <sub>2</sub>	0,002 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
pH ajustado para 7,0	

O meio foi filtrado em membrana Millipore 0,45 µm

#### **4.1.3. Reagentes e Soluções**

##### **Solução salina 0,85%**

NaCl	8,50 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

##### **Solução padrão de fenol**

Fenol PA (Synth<sup>®</sup>) foi utilizado para o preparo da solução padrão. A concentração inicial de fenol da solução, nos experimentos realizados foi de 3.000 mg.L<sup>-1</sup>. Toda água utilizada no trabalho foi proveniente de um purificador de água Millipore<sup>®</sup> (“água Milli-Q”).

##### **Acetonitrila**

Acetonitrila (TEDIA <sup>®</sup> )	900 mL
Água Milli-Q	100 mL

A solução foi filtrada em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Isolamento bacteriano**

A população microbiana, a partir destas amostras, foi adaptada para crescer em fenol a uma concentração inicial de 1.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . O processo de adaptação foi realizado em reatores, submetidos à temperatura ambiente com aeração. O fenol foi gradativamente acrescentado a cada 24h até atingir a concentração de 3.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , no reator. Diariamente era realizado plaqueamento das amostras, para assegurar a viabilidade dos microrganismos.

No 10º dia de adaptação, as amostras foram plaqueadas em meio de cultura “*Plate Count Agar*” (PCA) com incubação à 36°C por 24h para obtenção de culturas puras.

### **4.2.2. Preservação das bactérias**

As cepas foram preservadas pelo método de repicagem contínua em tubo inclinado com meio PCA, em duplicata, mantidos sob refrigeração a 10°C.

### **4.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fenol para os microrganismos presentes nos reatores de enriquecimento.**

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que representa a concentração de fenol necessária para inibir o crescimento bacteriano, de forma que quanto menor o CIM, maior a dificuldade da bactéria se desenvolver, foi utilizado adaptação do método proposto por SOUZA (2000):

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL inocular 1 mL das cepas bacterianas isoladas no reatores em 90 mL de meio mineral mínimo, com volumes variáveis de soluções de fenol, de forma que cada um dos frascos fique com as concentrações de 0; 100; 200; 400; 600; 800; 1.000; 3.000; 3.500 e 4.000  $\text{mg.L}^{-1}$  de fenol, ajustando-se os volumes finais para 100 mL com meio mineral mínimo.

Os frascos Erlenmeyer foram incubados em estufa a 36°C, por um período de 24 horas. Para a verificação da resistência para cada concentração, foi efetuado um plaqueamento em meio PCA, meio de cultura indicado para o cultivo de microrganismos heterotróficos aeróbios, pela técnica de “pour plate” ou espalhamento.

As placas foram incubadas a 36°C, por 24 horas para se confirmar o crescimento das culturas.

#### 4.2.4. Teste de biodegradação e quantificação do consumo de fenol.

Para a quantificação do consumo de fenol foram utilizados dois métodos: Método 1 (espectrofotométricos, com o kit *Nanocolor Fenol 5* (MACHEREY-NAGEL®)) e Método 2 (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)), sendo este último desenvolvido no próprio laboratório de Toxicidade de Águas, Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – UNESP, Rio Claro.

Para os dois métodos foram preparados quatro frascos *SCHOTT*®, um para cada cepa bacteriana e para o controle, com 90 mL de meio mineral mínimo e adicionou-se fenol para a concentração de 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. Ao frasco utilizado como controle não foi acrescentado suspensão bacteriana e aos outros, adicionou-se 1 mL de suspensão bacteriana de uma das cepas isoladas. Os frascos foram incubados à 36°C em estufa.

Para o Método 2 foram realizados mais dois experimentos, em que as linhagens isoladas foram aplicadas ao efluente de uma refinaria petrolífera e à água de produção de petróleo, ambos acrescidos com 1.000 mg.L<sup>-1</sup>. As características físico-químicas destas amostras são apresentadas na tabela 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Parâmetros Físico-químicos do Efluente da Refinaria

PARÂMETROS		
<b>Alumínio (Al)</b>	0,13	µg/L
<b>Arsênio (As)</b>	11,10	µg/L
<b>Silício (Si)</b>	15,53	µg/L
<b>Bário (Ba)</b>	0,56	µg/L
<b>Cálcio (Ca)</b>	41,16	µg/L
<b>Selênio (Se)</b>	19,25	µg/L
<b>Cianetos</b>	4,016	µg/L
<b>Ferro (Fe)</b>	0,13	µg/L
<b>Mercúrio (Hg)</b>	< 1	µg/L
<b>Potássio (K)</b>	15,78	µg/L
<b>Magnésio</b>	9,74	µg/L

<b>Sódio (Na)</b>	550,61	µg/L
<b>Estrôncio (Sr)</b>	2,42	µg/L
<b>Alcalinidade</b>	403,77	mg/L
<b>Amônia</b>	62,03	mg N-NH <sub>3</sub> /L
<b>Cloreto</b>	670,91	mg/L
<b>Condutividade</b>	2761,5	µS/cm <sup>2</sup>
<b>Turbidez</b>	29,0	NTU
<b>Cor Aparente</b>	1128	Ptco
<b>Temperatura</b>	31,90	°C
<b>DBO</b>	805,11	mg/L
<b>DQO</b>	965,20	mg/L
<b>OD</b>	2,202	mg/L
<b>Fósforo</b>	0,72	mg P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> /L
<b>pH</b>	7,65	-
<b>Sulfeto</b>	0,2270	mg/L
<b>Nitrato</b>	15,68	mg/L
<b>Nitrito</b>	0,0135	mg/L

Fonte: ANGELIS, 2013

Tabela 6 – Parâmetros Físico-químicos da Água de Produção de Petróleo

<b>PARÂMETROS</b>		
<b>Prata (Ag)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Alumínio (Al)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Arsênio (As)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Boro (B)</b>	17	mg/L
<b>Bário (Ba)</b>	13	mg/L
<b>Cálcio (Ca)</b>	1274	mg/L
<b>Cádmio (Cd)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Cromo (Cr)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Cobre (Cu)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Ferro (Fe)</b>	0,8	mg/L
<b>Mercúrio (Hg)</b>	< 2	µg/L
<b>Potássio (K)</b>	285	mg/L
<b>Magnésio (Mg)</b>	673	mg/L
<b>Manganês (Mn)</b>	0,8	mg/L
<b>Sódio (Na)</b>	15418	mg/L
<b>Níquel (Ni)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Chumbo (Pb)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Antimônio (Sb)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Estanho (Sn)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Estrôncio (Sr)</b>	104	mg/L
<b>Vanádio (V)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Zinco (Zn)</b>	< 0,1	mg/L
<b>Alcalinidade</b>	1919	mg/L
<b>Amônia</b>	198	mg N-
<b>Cloreto</b>	26	g/L
<b>Condutividade</b>	168825	µS/cm <sup>2</sup>

<b>DBO</b>	261	mg/L
<b>Fenol</b>	2,8	mg/L
<b>Fósforo</b>	0,5	mg P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
<b>pH</b>	7,75	-
<b>Salinidade</b>	41	g NaCl/L
<b>Sulfato</b>	162	mg/L
<b>Sulfeto</b>	150	mg/L
<b>TOC</b>	135	mg/L

#### 4.2.4.1. Método 1: Quantificação de fenol em Espectrofotômetro pelo método 4-amino-antipirina.

O kit *Nanocolor Fenol 5* (MACHEREY-NAGEL<sup>®</sup>), figura 4, tem a mesma metodologia apresentada pelo STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (CLESCERI et al., 1998), trata-se da determinação fotométrica de fenóis, pela produção de um composto avermelhado, gerado pela reação com o reagente 4-amino-antipirina presente nos tubos de reação.

No tubo de ensaio do kit, adicionou-se 4 mL da amostra de estudo, diluída 1.000 vezes, juntamente com os reagentes do kit (devidamente dosados pelo comerciante) agitou-se e aguardou-se 5 minutos para medição no espectrofotômetro MACHEREY-NAGEL<sup>®</sup>, com detector ultravioleta-visível, no comprimento de onda de 520 nm. Este espectrofotômetro apresenta um software para a quantificação de fenol, quando se utiliza o kit *Nanocolor Fenol 5* (MACHEREY-NAGEL<sup>®</sup>), dispensando a construção de curva de calibração ou curva padrão.

Figura 4: Kit NANOCOLOR<sup>®</sup> FENOL



#### 4.2.4.2. Método 2: Quantificação de fenol em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A CLAE (figura 5) foi utilizada para a quantificação do consumo de fenol e identificação de compostos intermediários da decomposição do fenol. O cromatógrafo utilizado foi o SHIMATZU® - CL Solution, com detector ultravioleta-visível e coluna cromatográfica Kromasil® C18: 5,0 µm, 25,0 cm.

Figura 5: Equipamento de análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)



Fonte: Dados do autor.

Para as análises, as condições do equipamento foram:

- fase móvel: Acetonitrila (ACN) diluída em água ultrapura;
- comprimento de onda: 254 nm;
- temperatura: 30°C;
- fluxo: 0,8 mL.min<sup>-1</sup>;
- tempo de análise: 14 minutos.

No preparo das amostras, filtrou-se 1 mL da amostra em filtro Millipore® 0,22 µm. O filtrado foi diluído 1.000 vezes em água ultrapura e a partir desta diluição utilizou-se 20 µL para injeção manual no cromatógrafo. Os resultados foram obtidos mediante integração e tratamento de dados pelo Lab Solutions – CL Solution SHIMATZU.

#### 4.2.5. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica das linhagens isoladas.

As linhagens foram identificadas utilizando-se protocolo do kit de extração MO BIO<sup>®</sup> para extração do DNA genômico. O material genético das linhagens foi enviado à MACROGEN Inc. para sequenciamento do gene 16S utilizando-se dos primers listados abaixo, que formam um contígio (sequência completa do rRNA):

27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT

518F CCAGCAGCCGCGGTAATACG

800R TACCAGGGTATCTAATCC

As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados BLAST para identificação das linhagens.

#### 4.2.6. Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*.

O teste de toxicidade aguda foi realizado com a utilização de *Daphnia similis* (figura 6), seguindo a norma ABNT NBR 12713:2009.

Figura 6: *Daphnia similis*



Fonte: <http://www.cqa.com.br/bioensaios.html>

Neste teste, indivíduos jovens, de 6 a 24 horas de idade, foram expostos às amostras a serem avaliadas, por um período de 4 a 48 horas, determinando-se assim, a Concentração Efetiva Média (CE 50) e a Concentração Letal Média (CL 50), constatada de acordo com a imobilidade ou mortalidade de 50% dos indivíduos expostos. Essa

resposta é a mais significativa para ser extrapolada a uma população (Gherardi-Golgstern et. al., 1990).

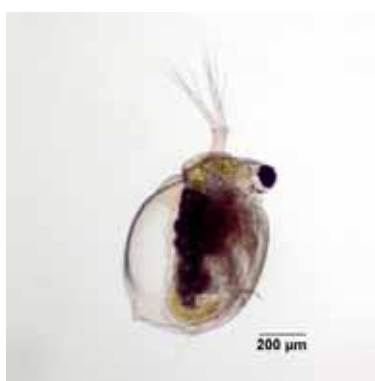
Para a realização do teste, adicionou-se em tubos de ensaio 10 mL de água do rio Atibaia, a qual continha as seguintes concentrações de fenol: 0,3; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup>. Estas concentrações envolvem o limite máximo de fenol (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) nos efluentes, estabelecido pela Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011, proposta pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.

A leitura do teste foi feita 48 horas após o início, quando se procedeu a contagem dos indivíduos imóveis ou mortos em cada diluição. Os dados foram trabalhados estatisticamente no software Spearman-Kärber ICP-Program para testes de toxicidade.

#### 4.2.7. Teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*

De acordo com o protocolo, o ensaio se inicia com a seleção de organismos (figura 7) com até 24 horas, que serão mantidos nas amostras testes por até 8 dias. A cada dia a solução é renovada, os organismos são alimentados e é registrado a sobrevivência e o número de filhotes por indivíduos. Cabe ressaltar que por se tratar de um organismo partenogenético (reprodução assexuada) os indivíduos são mantidos individualmente em cada reservatório e o objetivo do ensaio é avaliar a sobrevivência e a reprodução dos indivíduos durante o período do ensaio.

Figura 7: *Ceriodaphnia dubia*



Fonte: <http://cfb.unh.edu>

Os organismos foram utilizados copos plásticos descartáveis com capacidade de 40 ml em dez réplicas por concentração incluindo o controle. A diluição das amostras foi feita em balão volumétrico de 250 mL para as concentrações de 25; 50; 75 e 100%. Em cada réplica, foi acrescentado um organismo neonato de *Ceriodaphnia dubia* com auxílio de pipeta média de 20 mL da amostra segundo sua concentração. Após o acréscimo do organismo cada réplica foi alimentada com 100 µl de alga *Pseudokirchneriella subcapitata* durante os oito dias de exposição, acrescentando 50 µl de ração como complemento alimentar. O tempo de exposição utilizado foi de sete dias, contando com o grupo controle. As concentrações de fenol utilizadas foram de 0,03; 0,05; 0,10; 0,20 e 0,50 mg.L<sup>-1</sup>.

A partir do número médio de organismos jovens produzidos por fêmea em cada concentração serão calculadas as Concentrações de Efeito não Observadas (CENO), que é a maior concentração que não causa efeito deletério na sobrevivência e reprodução dos organismos, e a Concentração de Efeito Observada (CEO), menor concentração que causa efeito deletério na sobrevivência e reprodução dos organismos (CETESB, 1991). Para os cálculos dos valores de CENO e CEO serão analisados com o programa estatístico “TOXSTAT 3.5 Computer Program”.

#### **4.2.8. Criação de microcrustáceos.**

Os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* utilizados nos ensaios de toxicidade foram cultivados no Laboratório de Ensino de Toxicidade de Águas, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, da UNESP – Rio Claro/SP, seguindo as normas propostas pela a norma ABNT NBR 12713:2009. A água de cultivo utilizada na manutenção e também nas diluições procede do Ribeirão Claro, Rio Claro/SP, onde é coletada mensalmente. A água de cultivo, assim que chega ao laboratório, é filtrada em rede de plâncton de 0,45 mm para retirada do material particulado. A dureza é ajustada para atingir os valores entre 40 e 48 mg/L de CaCO<sub>3</sub>, de acordo com os procedimentos especificados na Norma ABNT 12713, 2009. O parâmetro pH é sempre controlado e a água permanece em aeração constante para estabilização do pH, solubilização dos sais e saturação do oxigênio dissolvido, que deve estar numa faixa entre 60 e 100% de saturação.

Após cada uma das coletas de água de manutenção foram realizados ensaios de viabilidade da água com a exposição de pelo menos 10 organismos teste durante 48 horas sem alimentação e mantidos na incubadora sob as mesmas condições das culturas. A imobilidade dos organismos não deve exceder 10% do total de organismos expostos para que a água possa ser utilizada (CETESB, 1997). O alimento utilizado para a manutenção das *Daphnias* e *Ceriodaphnias* é a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (cultivada seguindo a Norma ABNT 12713 (2009)), na concentração de  $2,0 \times 10^6$  células por organismos, aproximadamente, complementado com ração para truta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento

A partir de diluições decimais das amostras ambientais enriquecidas em reator, conforme figura 8, com a realização de plaqueamentos em meio PCA. Verificou-se que houve desenvolvimento dos microrganismos, necessitando-se diluir as amostras ao nível de  $10^{-5}$ , para poder isolar as colônias.

Figura 8: Reatores com amostras ambientais



As culturas foram examinadas no microscópio, com aumento de 100 vezes, para observação de características macroscópica, além das microscópicas, para que fossem purificadas por estriamento, e então preservadas em tubos de cultura com meio PCA. Os critérios de seleção foram: colônias de rápido desenvolvimento, vigorosas e que propiciam maior biomassa.

De acordo com a tabela 6, foram isoladas 6 linhagens bacterianas das amostras utilizadas.

Tabela 6 - Culturas bacterianas isoladas e preservadas em tubos de cultura em meio PCA.

Amostra	Cultura
Rio Atibaiba	C1
Solo	C2
	C3
	C4
Efluente	C5
	C6

## 5.2. Teste para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após análise das placas cultivadas com amostras dos Erlenmeyer que continham as concentrações de 0; 100; 200; 400; 600; 800; 1.000; 3.000; 3.500 e 4.000 mg.L<sup>-1</sup> de fenol, observou-se que a concentração de 3.000 mg L<sup>-1</sup> foi inibitória para as linhagens C 3, C 4 e C 5, enquanto as outras linhagens não apresentaram resistência à esta concentração, sendo desprezadas para o teste de biodegradação, conforme a figura 9.

Figura 9: Placas com linhagens bacterianas resistentes a 3000 mg L<sup>-1</sup> de fenol.



Estas linhagens apresentaram maior resistência às maiores concentrações de fenol provavelmente por estarem mais adaptadas ao composto no ambiente de origem.

Na literatura, foram descritas linhagens bacterianas resistentes ao fenol capazes de crescer em concentrações máximas de 2.600 mg.L<sup>-1</sup>, como no trabalho de Afzal et al. (2007), que relatou resistência ao fenol nesta concentração, em *Pseudomonas aeruginosa* e *P. pseudomallei*. Há ainda outros relatos, tais como: resistência a 1.000 mg.L<sup>-1</sup> de fenol por *P. putida* (GONZÁLEZ et al., 2001); linhagem de *Alcaligenes faecalis* resistentes a 1.600 mg.L<sup>-1</sup> de fenol (JIANG et al., 2007).

### 5.3. Quantificação do Consumo de Fenol

Os ensaios de biodegradação, apresentado pela figura 10, e crescimento em fenol como única fonte de carbono, demonstraram que estas linhagens foram capazes de consumir o fenol em um período de 24 horas, diminuindo a concentração inicial. A quantificação da redução do fenol no meio de cultura foi realizada utilizando-se métodos em espectrofotômetro e em cromatografia líquida e os resultados são apresentados a seguir:

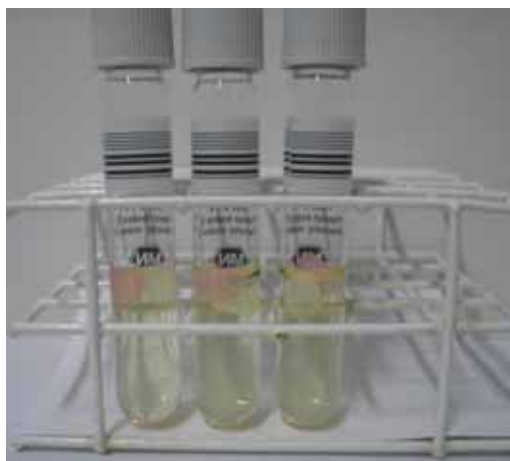
Figura 10: Frascos para ensaio de biodegradação



#### 5.3.1. Método 1: Quantificação de Fenol em Espectrofotômetro pelo Método 4-Amino-Antipirina

Para este trabalho, este método não se mostrou eficiente, uma vez que não conseguiu expressar a redução do fenol no meio de cultura (figura 11).

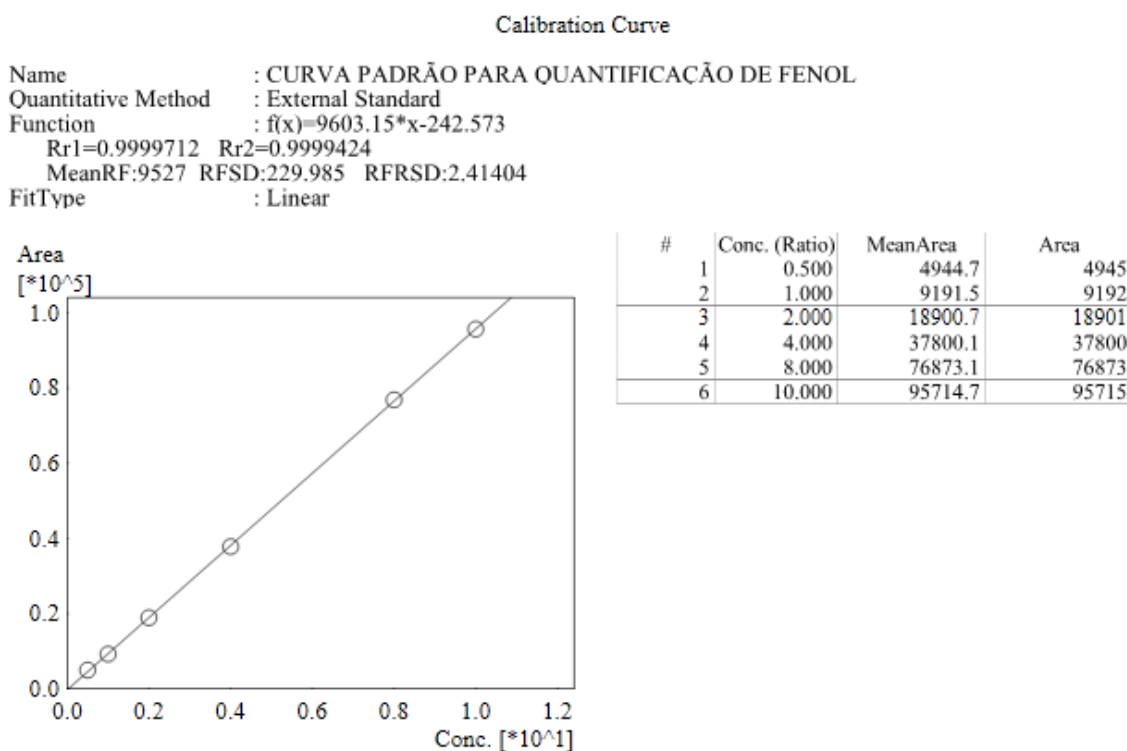
Figura 11: Teste de quantificação de fenol com o kit *Nanocolor Fenol 5* (MACHEREY-NAGEL®)



### 5.3.2. Método 2: Quantificação de Fenol em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

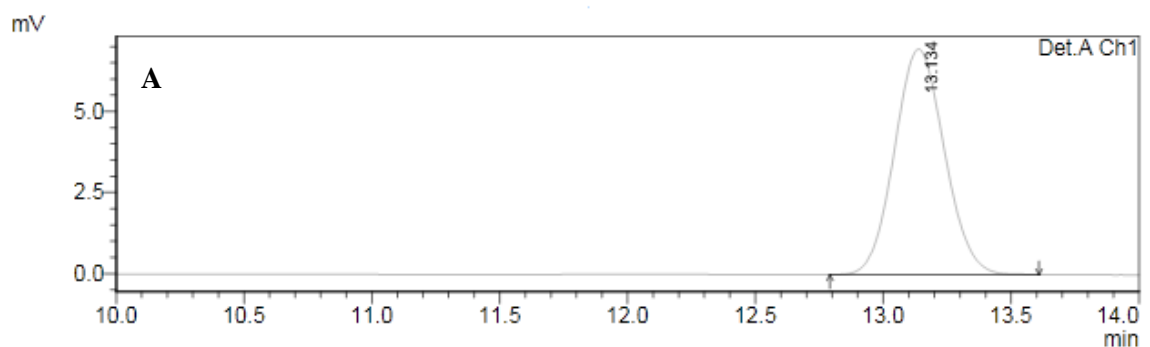
Inicialmente, realizou a construção de uma curva padrão (figura 12) para plotagem das concentrações a serem comparadas com a análise das amostras.

Figura 12: Curva padrão para quantificação de fenol



A partir da análise dos dados obtidos, pode-se observar que houve redução na concentração de fenol das amostras em que se utilizou o meio mineral acrescido com fenol como única fonte de carbono, em apenas 24 horas. Os cromatogramas (figura 13) e o gráfico 1 mostram a concentração inicial de fenol no meio e a diminuição quando acrescentou-se as linhagens bacterianas:

Figura 13: Cromatogramas da quantificação de fenol em meio mineral, em 24 horas.



1 Det.A Ch1/254nm

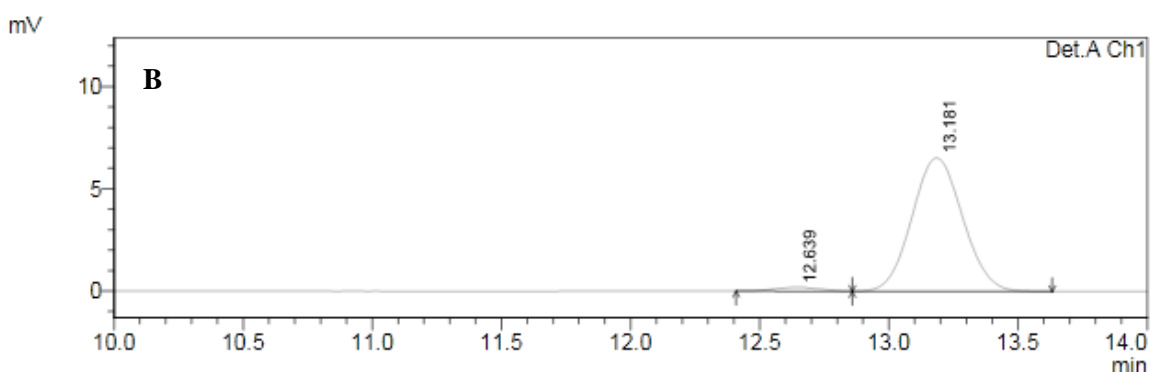
Quantitative Results

Detector A

Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.159	101663	6834	10.612	mg/L

F.D = 100

→ 1061,2 mg.L<sup>-1</sup>



1 Det.A Ch1/254nm

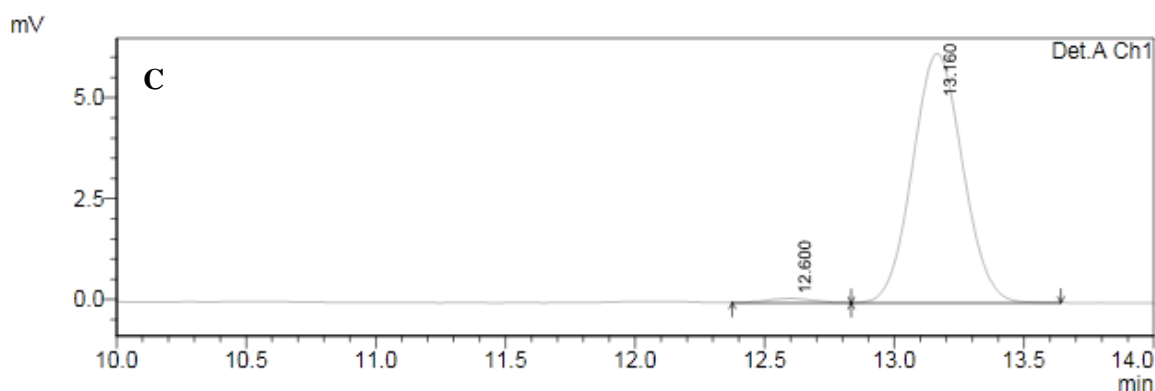
Quantitative Results

Detector A

Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.154	87195	6487	9.105	mg/L

F.D = 100

→ 910,5 mg.L<sup>-1</sup>

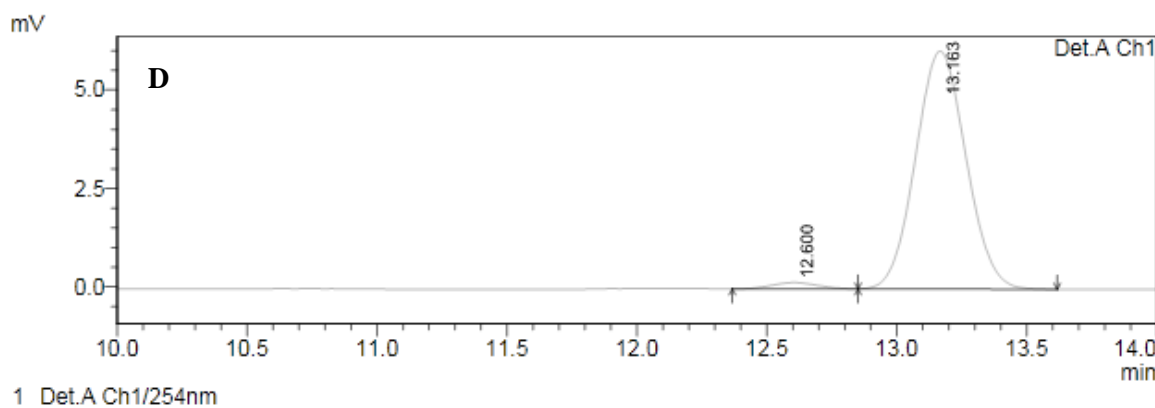


1 Det.A Ch1/254nm

Quantitative Results

Detector A				
Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.189	82010	5961	8.565	mg/L

F.D = 100 → 856,5 mg.L<sup>-1</sup>



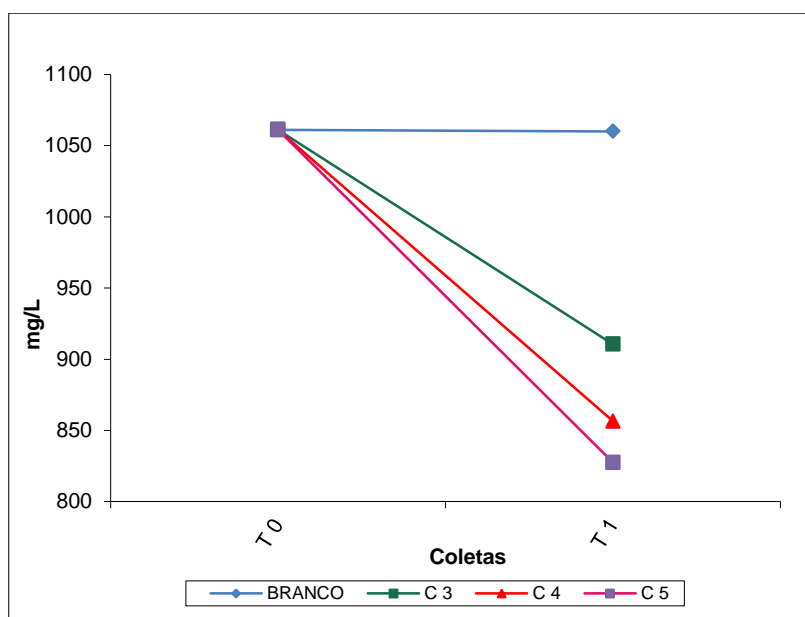
Quantitative Results

Detector A				
Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.157	79220	5252	8.275	mg/L

F.D = 100 → 827,5 mg.L<sup>-1</sup>

A: Cromatograma da concentração inicial de fenol no meio de cultura (1061,2 mg.L<sup>-1</sup>); B: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C3 isolada do solo e formação de subproduto, com redução de 14,2% de fenol. C: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C4 isolada do efluente e formação de subproduto, com redução de 19,3% de fenol. D: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C5 isolada do efluente e formação de subproduto, com redução de 22,0% de fenol.

Gráfico 1: Consumo de fenol em meio mineral em 24 horas

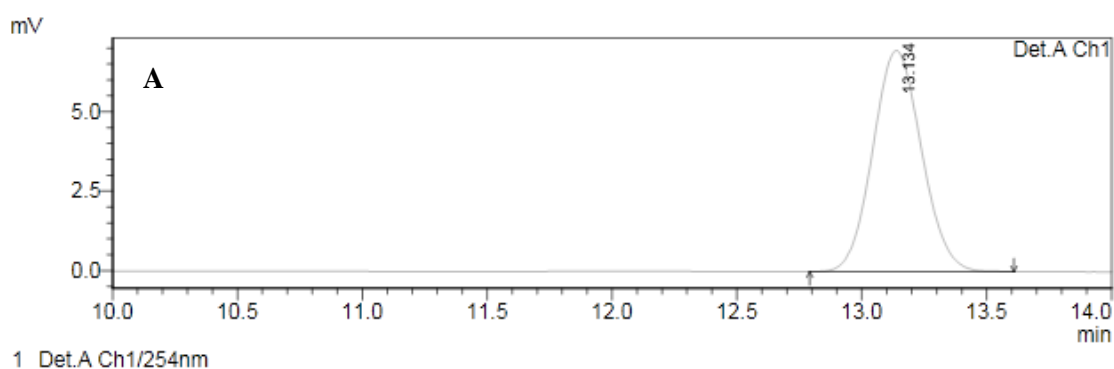


No mesmo estudo realizado por Avanzi (2009), o autor isolou *Pseudomonas aeruginosa* na região da zona industrial de Cubatão-SP e com ensaios de biodegradação concluiu que esta linhagem foi capaz de consumir até  $800 \text{ mg.L}^{-1}$  de fenol em apenas 24 horas, restando como principal intermediário a hidroquinona. O estudo realizado por Agarry et al. (2008) demonstrou que a espécie *P. aeruginosa* degradou 94,5% de fenol em uma concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  em 72 horas e a espécie *P. fluorescência* degradou 69,4% de fenol na mesma concentração inicial e no mesmo tempo. Do mesmo modo, Annadurai et al. (2002) estudaram a capacidade máxima de degradação de fenol por *P. putida*, relatando que esta linhagem foi capaz de consumir 85% de fenol em uma concentração inicial de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$ , porém o tempo de degradação não foi citado.

### 5.3.2.1 – Biodegradação do fenol no efluente da refinaria

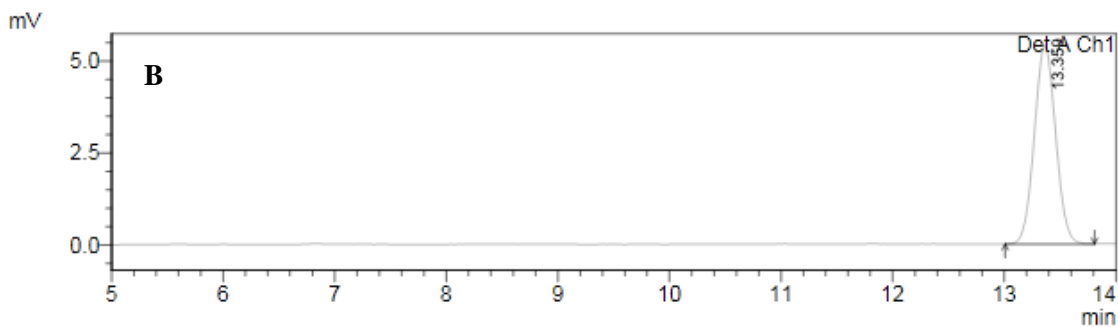
Para o teste em que se utilizou o efluente da refinaria de petróleo, os resultados obtidos nas análises cromatográficas indicam que houve diminuição de aproximadamente 24% para linhagem C3; 18% para linhagem C4 e 21% para linhagem C5 em relação à concentração inicial de fenol no período de 120 horas. Os cromatogramas (figura 14) e o Gráfico 2 mostram a concentração inicial de fenol no efluente e a diminuição quando acrescentou-se as linhagens bacterianas:

Figura 14: Cromatogramas da quantificação de fenol no efluente em 120 horas.



Quantitative Results				
Detector A				
Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.134	94832	6961	9.900	mg/L

F.D = 100  
 → 990,0  $\text{mg.L}^{-1}$



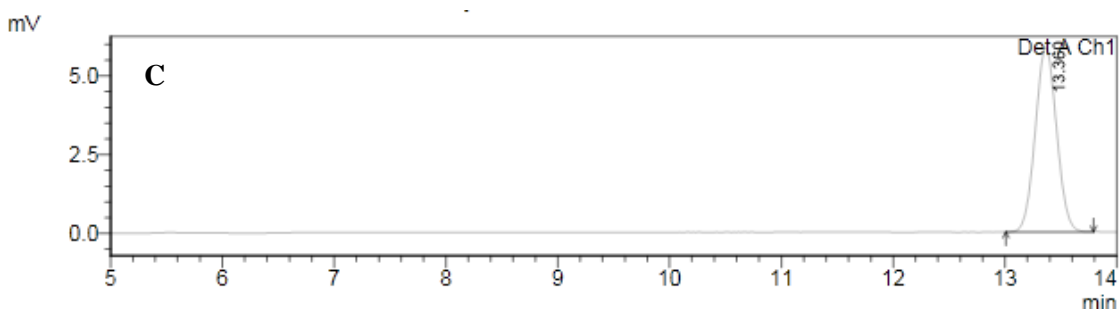
1 Det.A Ch1/254nm

## Quantitative Results

Detector A

Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.359	71775	5394	7.499	mg/L

F.D = 100

→ 749,9 mg.L<sup>-1</sup>

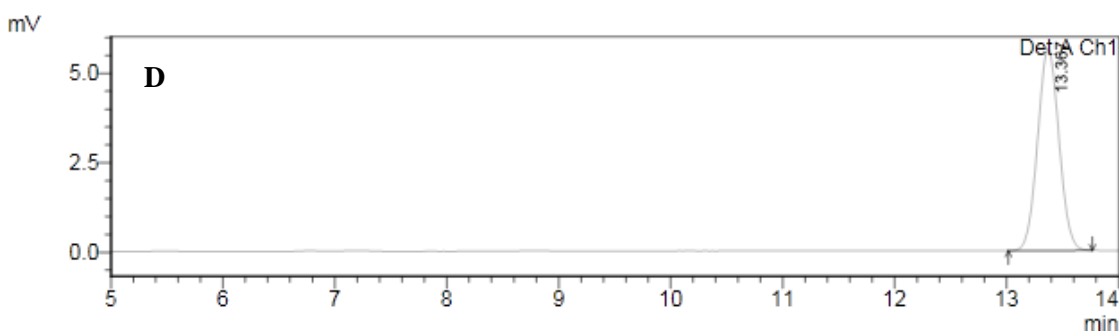
1 Det.A Ch1/254nm

## Quantitative Results

Detector A

Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.360	77742	5852	8.121	mg/L

F.D = 100

→ 812,1 mg.L<sup>-1</sup>

1 Det.A Ch1/254nm

## Quantitative Results

Detector A

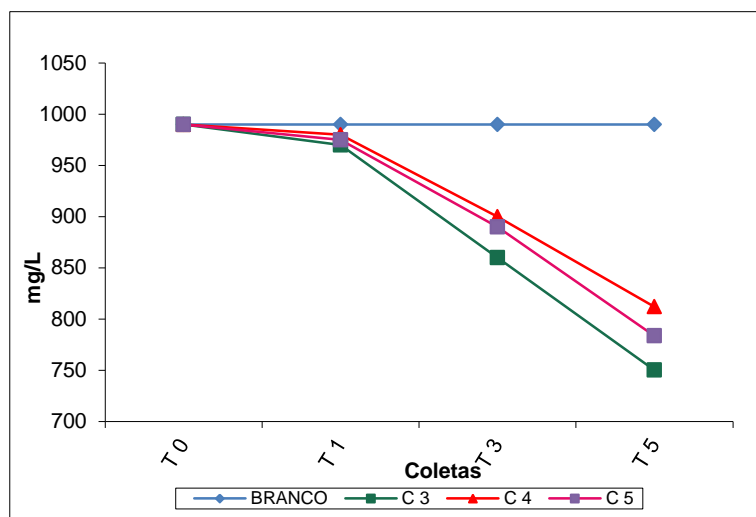
Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.367	74995	5641	7.835	mg/L

F.D = 100

→ 783,5 mg.L<sup>-1</sup>

A: Cromatograma da concentração inicial de fenol no meio de cultura (990,0 mg.L<sup>-1</sup>); B: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C3 isolada do solo, com redução de 24% de fenol. C: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C4 isolada do efluente, com redução de 18% de fenol. D: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C5 isolada do efluente, com redução de 21% de fenol.

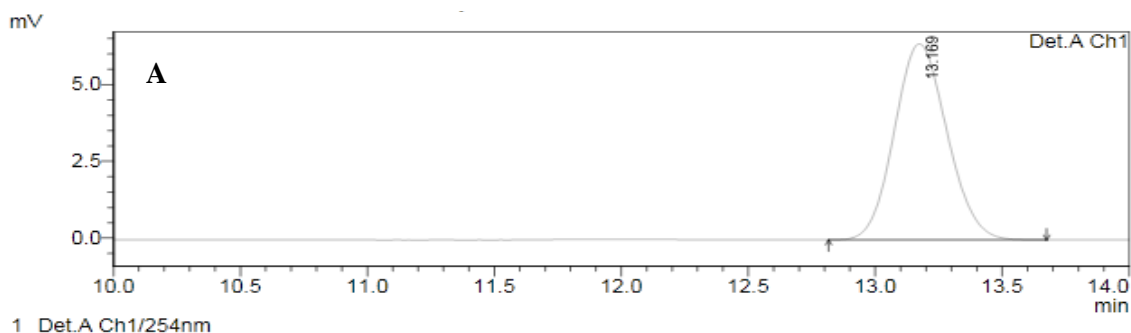
Gráfico 2: Consumo de fenol no efluente em 120 horas



### 5.3.2.2 – Biodegradação do fenol na água de produção do petróleo.

No experimento com água de produção de petróleo, os resultados mostram que ocorreu a diminuição de 19% com a linhagem C3; 15% com a linhagem C4 e 16% com a linhagem C5 em relação à concentração inicial de fenol no período de 120 horas. Os cromatogramas, apresentados na figura 15 e o gráfico 3 mostram a concentração inicial de fenol na água de produção de petróleo e a diminuição quando acrescentou-se as linhagens bacterianas:

Figura 15: Cromatogramas da quantificação de fenol na água de produção de petróleo em 120 horas.



1 Det.A Ch1/254nm

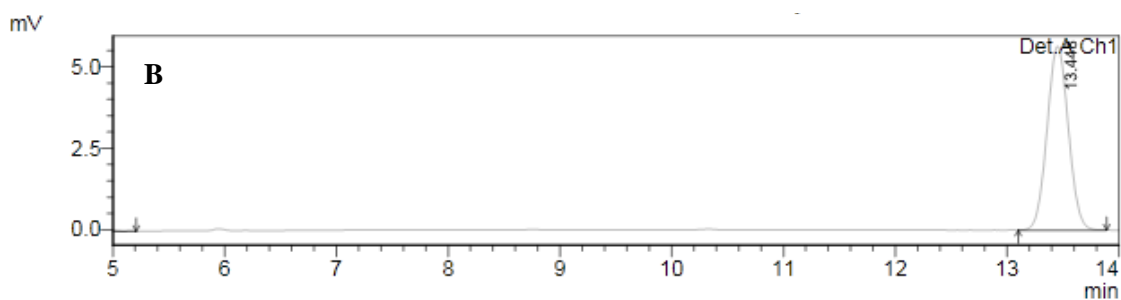
#### Quantitative Results

Detector A

Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.169	92226	6387	9.629	mg/L

F.D = 100

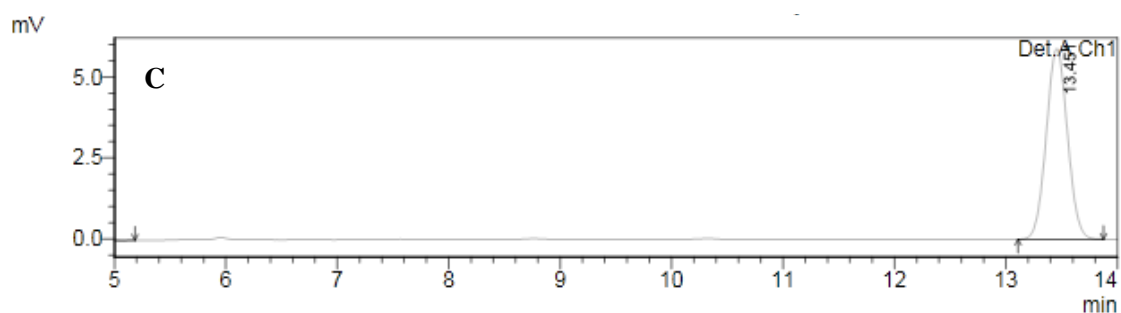
→ 962,9 mg.L<sup>-1</sup>



1 Det.A Ch1/254nm

Quantitative Results				
Detector A				
Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.448	74742	5638	7.808	mg/L

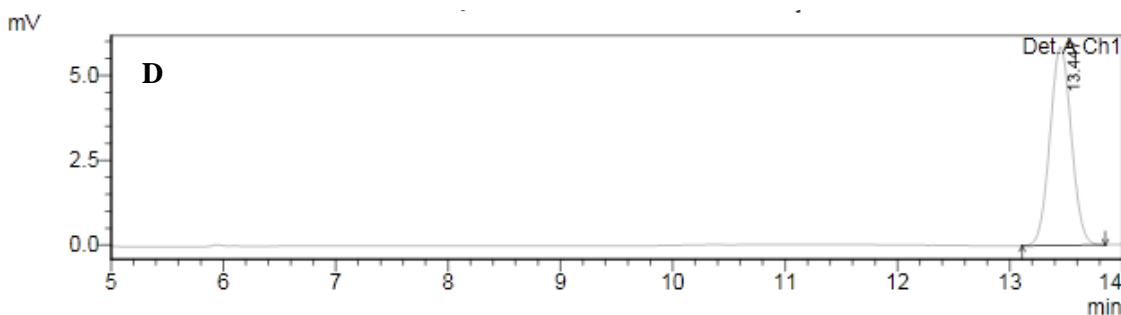
F.D = 100  
→ 780,8 mg.L<sup>-1</sup>



1 Det.A Ch1/254nm

Quantitative Results				
Detector A				
Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.451	77839	5875	8.131	mg/L

F.D = 100  
→ 813,1 mg.L<sup>-1</sup>



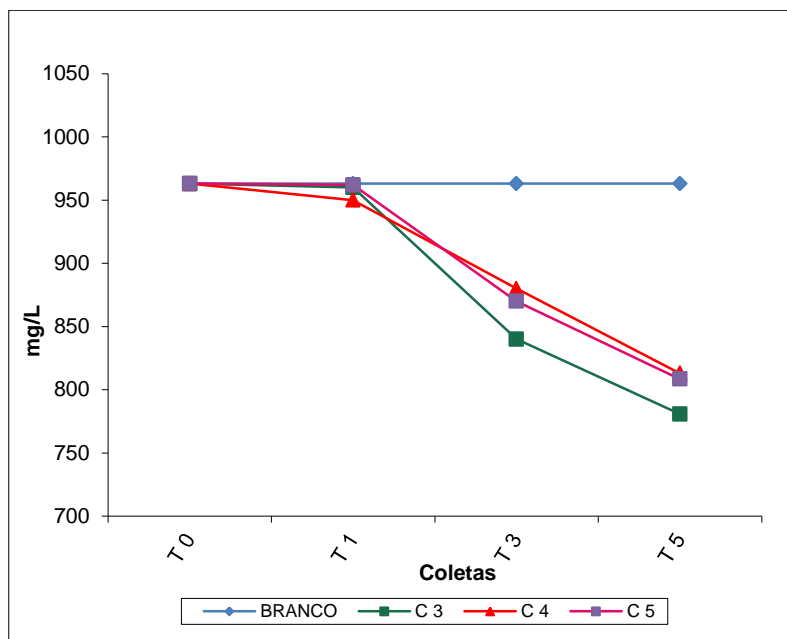
1 Det.A Ch1/254nm

Quantitative Results				
Detector A				
Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
13.447	77397	5847	8.085	mg/L

F.D = 100  
→ 808,5 mg.L<sup>-1</sup>

A: Cromatograma da concentração inicial de fenol no meio de cultura (963,0 mg.L<sup>-1</sup>); B: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C3 isolada do solo, com redução de 19% de fenol. C: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C4 isolada do efluente, com redução de 15% de fenol. D: Cromatograma da biodegradação do fenol pela bactéria C5 isolada do efluente, com redução de 16% de fenol.

Gráfico 3: Consumo de fenol na água de produção de petróleo em 120 horas



#### 5.4. Identificação

As análises moleculares permitiram a identificação ao nível de espécie da maioria das estirpes. As sequências obtidas foram comparadas, através do programa *Blast*, com as sequências depositadas no banco de dados e funções do Ribosomal Database Project (RDP).

A identificação taxonômica está representada abaixo:

#### Amostra C 3

domain Bacteria (20)

phylum Firmicutes (20)

class Bacilli (20)

order Bacillales (20)

family Bacillaceae 1 (20)

genus Bacillus (20)

**Bacillus sp.; JJ#1; Y15466**

**Amostra C 4**

domain Bacteria (20)  
phylum Firmicutes (20)  
class Bacilli (20)  
order Bacillales (20)  
family Bacillaceae 1 (20)  
genus Bacillus (20)

**Bacillus cereus; ATCC BAA-1005; AY631056**

**Amostra C 5**

domain Bacteria (20)  
phylum Firmicutes (20)  
class Bacilli (20)  
order Bacillales (20)  
family Bacillaceae 1 (20)  
genus Bacillus (20)

**Bacillus thuringiensis; ATCC33679; AF290549**

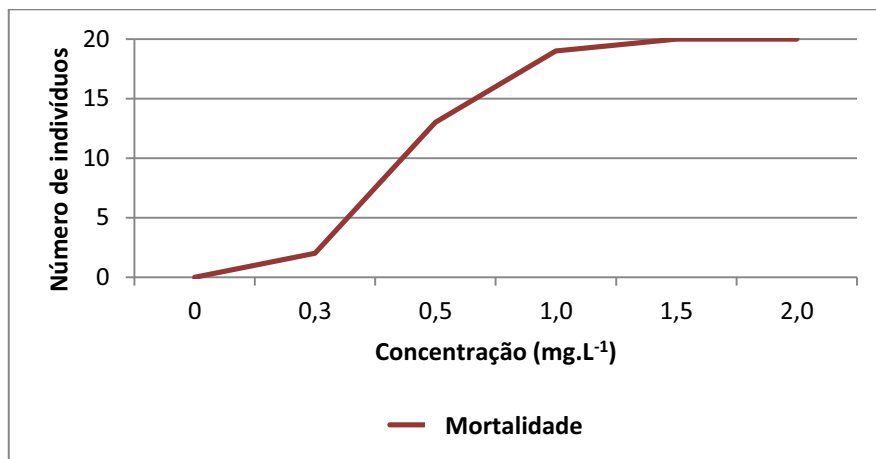
**5.5. Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis***

Avaliou-se a toxicidade aguda do fenol em *Daphnia similis* na água do Rio Atibaia, o qual recebe o efluente tratado de uma refinaria de petróleo.

Ao final de 48 h de exposição, percebeu-se que o controle e a concentração de 0,3 mg.L<sup>-1</sup> não afetaram a mortalidade dos organismos. No entanto, para as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> observou-se mortalidade. O teste indicou que a mortalidade de 50% (CE 50) dos indivíduos expostos foi observada próxima a concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (gráfico 4), indicando que o fenol é um composto de alta toxicidade para *D. similis* e a legislação CONAMA, na resolução 430 de 2011, que

dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, considera este parâmetro, uma vez que a concentração máxima de fenol em efluentes descartados é de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Gráfico 4. Toxicidade aguda do fenol em *Daphnia similis* na água do Rio Atibaia



A análise estatística utilizada foi o método Spearman-Kärber, que indicou que a faixa de toxicidade do fenol para *Daphnia similis* encontra-se entre  $0,43$  e  $0,73 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Em relação à reprodução, pôde-se observar interferência do fenol na partenogênese, uma vez que não houve nascimento de nenhum neonato.

### 5.6. Teste de Toxicidade Crônica com *Ceriodaphnia dubia*

O teste de toxicidade crônica com *C. dubia* não foi realizado, uma vez que o teste de toxicidade aguda com *D. similis* mostrou alta toxicidade do fenol para este microcrustáceo, dispensando a realização do teste.

## 6. CONCLUSÃO

As linhagens de *Bacillus* sp., *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* isoladas neste trabalho apresentam alta tolerância à toxicidade do fenol e conseqüentemente podem ter potencial de aplicação no biotratamento de efluentes contendo altas concentrações de compostos fenólicos ou mesmo, em biorremediação de solos *in situ*.

Os resultados obtidos nos três experimentos de biodegradação indicam a eficiência destes microrganismos no tratamento da água em diferentes etapas do processo de refino de petróleo, devido à resistência destas linhagens à diversas composições químicas do meio em que estiverem presentes.

Os testes de toxicidade demonstraram que o fenol é um composto de alta toxicidade para *D. similis* e a legislação CONAMA, na resolução 430 de 2011, que dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, considera este parâmetro, uma vez que a concentração máxima de fenol em efluentes descartados é de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro. NBR 12713, 2009.

AFZAL, M.; IQBAL, S.; RAUF, S.; KHALID, Z. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. **Journal of Hazardous Materials**; 149:60-6. 2007.

AGARRY, S.E.; DUROJAIYE, A. O.; YUSUF, R. O.; AREMU, M. O. Biodegradation of phenol in refinery wastewater by pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950 and *Pseudomonas fluorescence* NCIB 3756. **Int Journal of Environment Pollution**; 32(1):3-11. 2008.

ANGELIS, D. F. *et al.* **Estudo das condições físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas (atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica) do efluente final da refinaria e das águas do rio Atibaia na região de influência do lançamento**. UNESP – Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro – Departamento de Bioquímica e Microbiologia e Departamento de Biologia – PETROBRAS / REPLAN, 2013.

ANNADURAI, G.; JUANG, R.S.; LEE, D.J; Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge. **Waste Manage**; 22:703-10. 2002.

ASTM (*American Society for Testing and Materials*) - <http://www.astm.org/>

AVANZI, I. R., GRACIOSO, L. H., PERPETUO, E. A., Isolamento e identificação de bactéria degradadora de fenol da zona industrial de Cubatão-sp, através da técnica de amplificação do 16S. **Revista Ceciliana**, 1(2): 66-70, 2009.

BRAILE, P. M. **Manual de tratamento de águas residuárias**. São Paulo, CETESB, 1979.

BRASIL, N. I.; ARAÚJO, M. A. S.; SOUSA, E. C. M. **Processamento de Petróleo e Gás: Petróleo e seus derivados, Processamento primário, Processos de refino, Petroquímica, Meio Ambiente**. PETROBRAS. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

BRASIL, **Resolução nº 357, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA**. Brasília, DF: Imprensa Nacional, 2005.

BRASIL, **Resolução nº 430, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA**. Brasília, DF: Imprensa Nacional, 2011.

BRITO, I. R. C. **Efluentes de refinaria de petróleo: seleção de bactérias autóctones com potencial de biodegradação e redução de toxicidade aguda**. 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

CARVALHO, D. D. **Notas de aula – Etapa de Refino do petróleo**. Laboratório de Tecnologia Ambiental – Departamento de Eng. Bioquímica – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CETESB. Levantamento de surfactantes encontrados no meio aquático. **Revista Ambiente**. v. 1, n 1, 1991.

CETESB. **Métodos para a avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. São Paulo. v.1, 1997.

CHAPMAN, D. Freshwater quality. **World resources**. Oxford University Press, New York, p. 161-177, 1990.

CHEN, W. M.; CHANG, J. S.; WU, C. H.; CHANG, S. C. Characterization of phenol and TCE degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. **Research in Microbiology**. 155: 672-680, 2004.

COLARIETI, M. L.; TOSCANO, G.; GRECO JR, G. Soil - catalyzed polymerization of phenolics in polluted waters. **Water Research**, v. 36, n. 12, p. 3015-3022, 2002.

EPA (Environmental protection agency) – **Toxicological review of phenol**. U.S, Washington D.C., 2002.

FUTAMATA, H.; HARAYAMA, S.; WATANABE, K. Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assesmente of phenol-stimulates trichloroethylene bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**. 67, (10): 4671-77, 2001.

GALLERT, C.; WINTER, J. Comparison of 4-hydroxybenzoate and phenol carboxylase activities in cell-free extracts of a defined, 4-hydroxybenzoate and phenol-degrading anaerobic consortium. **Applied Microbiology Biotechnology**, 37: 119±124, 1992.

GALLERT, C.; WINTER, J. Anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate: reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA and ATP formation during 4-

hydroxybenzoate decarboxylation by the phenol-metabolizing bacteria of a stable, strictly anaerobic consortium. **Applied Microbiology Biotechnology**, 42: 408±414, 1994.

GATTI, A. B. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorífera* (Vell) Rohwer na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.** Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos naturais – UFSCAR, São Carlos, 2004.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. **Procedimentos para a utilização de ensaios de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo: CETESB, 1990.

GONZÁLEZ, G.; HERRERA, G.; GARCÍA, M.T. Biodegradation of phenol industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technology**; 80:137-42. 2001.

GRACIOSO, L. H. **Análise das proteínas expressas em resposta ao fenol em bactérias isoladas da zona industrial de Cubatão-SP. 2012.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GRACIOSO, L. H.; AVANZI, I. R.; PERPETUO, E. A. Otimização do meio de cultivo do lodo biológico para a biodegradação do fenol. **Revista Ceciliana**, Jun 2(1): 7-10, 2010.

GRASSI, M. T. As águas do planeta Terra. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.** ed especial, Maio, 2001.

JIANG, Y.; WEN, J.; BAI, J.; JIA, X.; HU, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Hazardous Materials**; 147:672-76. 2007.

KARLSSON, A.; EJLERTSSON, J.; NEZIREVIC, D.; SVENSSON, B. H. Degradation of phenol under meso- and thermophilic anaerobic conditions. **Anaerobe, metabolism/microbial chemistry**, 5, 25-35, Dec, 1998.

KOJIMA, T.; NISHIJIMA, K.; MATSUKATA, M. Removal and recovery of phenol from FCC effluent. **Journal of Membrane Science**, v. 102, p. 43-47, 1995.

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante.** 2009. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

LOPES, P. R. M. **Degradação fotocatalítica de efluentes simulado de refinaria de petróleo e monitoramento de sua toxicidade com microrganismos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MAHMOUD, A.; FREIRE, R. S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. **Química Nova**, vol. 30, n. 1, p. 198-205, 2007.

MARIANO, J. B. **Impactos Ambientais do Refino de Petróleo**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MORAES, P. B. **Aplicação do processo eletrolítico em efluentes de refinaria de petróleo e efluentes simulado utilizando eletrodos de Ti/TiRuO<sub>2</sub> e eletrodos de ferro fundido**. 2000. 110 f. Dissertação (Mestrado em Geociências) – Instituto de Geociências de Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MUKHOPADHYAY, R. R.; PHUNG, B. P.; PHUNG, L. T.; SILVER, S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 311-325, 2002.

NAIR, I.C.; JAYACHANDRAN, K.; SHASHIDHAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**, 7 (25): 4951-58, 2008.

PERA-TITUS, M.; GARCÍA-MOLINA, V.; BAÑOS, M. A.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S.; Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: A general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 47, n. 4, p 219-256, 2004.

PERPETUO, E. A.; MARQUES, R. C. P.; MENDES, M. A.; LIMA, W. C.; MENCK, C. F. M. NASCIMENTO, C. A. O. Characterization of the phenol monooxygenase gene from *Chromobacterium violaceum*: potential use for phenol biodegradation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 1-7, 2009.

PIRAS, P. R. F. **Tratamento biológico de efluentes de refinarias**, Tese de mestrado – PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 1993.

RODRIGUES, K. A. *et al.* Influências da glicose sobre o consumo de fenol por *Aspergillus niger* na 400 em reatores em batelada. **Engenharia Sanitária e Ambiental**; v. 12, nº 2, 2007.

SÃO PAULO, **Artigo 18 do Decreto Estadual nº 8.469** – São Paulo, 1976.

SCHMIDT-NIELSEN, KNUT. **Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente**. 5 ed. São Paulo: Livraria Santos, 2002.

SOUZA, A. M. G. F. **Aplicação de método respirométrico na avaliação do emprego de areia fenólica de fundição, juntamente com solo, na cobertura de aterro sanitário**. Rio Claro – SP, 2000, 122 p., Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Microbiologia Aplicada Instituto de Biociências, UNESP.

SPERLING, M. V. Comparison among the most frequently used systems for wastewater treatment in developing countries. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 59-72, 1996

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. Processos oxidativos avançados. Conceitos teóricos. **Caderno temático**, v.3. Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Agosto de 2004.

THAKUR, I. S.; VENNA, P.; UPADHAYAYA, K. Molecular cloning and characterization of pentachlorophenol-degrading monooxygenase genes of *Pseudomonas* sp. from the chemostat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 290: 770-74, 2002.

WU, Z.; ZHOU, M. Partial degradation of phenol by advanced electrochemical, oxidation process. **Environmental Science & Technology**, v 35, p. 2698-2703, 2001.