

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DO FENOL
POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Aspergillus* sp.**

ENG°. CÁTIA TAVARES DOS PASSOS

**Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
ORIENTADOR**

**RIO GRANDE, RS
MARÇO, 2006**

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DO FENOL
POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Aspergillus* sp.**

ENG^o. CÁTIA TAVARES DOS PASSOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
Orientador

Prof^a Dr^a Susana Juliano Kalil
Co-orientadora

RIO GRANDE – RS
MARÇO, 2006

Este trabalho é dedicado aos meus pais Crésio Pereira dos Passos e Luiza Tavares dos Passos (*in memorium*); e a minha irmã Cássia Carina Passos dos Santos pelo amor, amizade, incentivo e dedicação para realização dos meus projetos de vida.

"Se as coisas são inatingíveis
Ora, não é motivo para não querê-las.
Que tristes os caminhos se não fora a presença distante das
estrelas".
(Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

A realização dessa dissertação foi a efetivação de um sonho de adolescência que só foi possível ser alcançado devido ao apoio de muitas pessoas que se empenharam de muitas formas para ajudar, logo agradeço:

Aos meus pais, que me fizeram acreditar que era possível estudar em uma universidade federal e principalmente ao meu pai, que esteve junto comigo nessa fase da minha vida, sempre pronto a ajudar e a ouvir, a essa pessoa que foi meu pai e minha mãe faço um agradecimento muito especial;

Aos meus queridos orientadores: Carlos André e Susana, pelo exemplo, amizade, paciência e compreensão, os quais sempre estiveram dispostos a ajudar fazendo muito mais do que se pode esperar de um orientador, divido o mérito de estar recebendo o título de mestre com vocês;

A Janaína que esperando o Guilherme e após o seu nascimento sempre arrumou tempo para ajudar, a qualquer momento, obrigada também pela confiança e amizade;

A Elisane e a Ana Sanzo que além de serem amigas de longa data, ainda ofereceram todo o apoio técnico para o desenvolvimento do trabalho. Obrigada pelas conversas, pela preocupação, pelo ombro amigo e por estarem sempre dispostas a ajudar;

As minhas companheiras de projeto Fernanda e Katiane as quais me ajudaram a vencer esse desafio e acabaram se tornando grandes amigas, foi muito bom trabalhar com vocês;

As minhas colegas de mestrado Ana, Carol, Francine, Lorena, Giniani e Silvana, algumas grandes companheiras de festa e todas amigas do laboratório, pela grande amizade onde não tenho palavras para mensurar o que significou esses últimos anos devido a imensidão do significado dessa amizade;

Quero fazer um agradecimento especial também a todos os professores que participaram da minha formação, tenham a certeza de que levarei para o resto da vida, seus bons exemplos;

A prima Patricinha, Itiara e Andréia, que moraram comigo no período do mestrado pela paciência, compreensão e grande amizade. Mesmo sendo um período curto de tempo, vivemos muitas coisas juntas, sentirei saudades;

A todos os amigos colegas de mestrado, do laboratório, dos outros cursos da FURG e também de fora da faculdade, os quais não vou citar os nomes para não cometer nenhuma injustiça, por terem sido inesquecíveis, amigos de verdade, sempre presentes na hora certa, nunca os esquecerei;

A Rosane, Islanda e a Kelly pela simpatia e por serem sempre muito prestativas;

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto e bolsa de mestrado.

RESUMO

A presença de um pólo industrial em Rio Grande-RS, junto a um ecossistema delicado, que compreende a região estuarina da Lagoa dos Patos, tem um impacto ambiental indiscutível, podendo prejudicar atividades econômicas importantes como pesca e turismo. Neste contexto são essenciais a pesquisa e desenvolvimento de estratégias para a recuperação ambiental de áreas impactadas por compostos tóxicos. A bioaumentação consiste na adição de número expressivo de microrganismos hidrocarbonoclasticos, em ambientes contaminados, tornando-se interessante a aplicação de microrganismos selecionados das populações nativas, adaptadas às condições locais e com alta capacidade degradativa. Entre os contaminantes do ambiente, os fenóis aparecem entre os mais perigosos devido aos seus efeitos microbicida e fitotóxico. O objetivo desse trabalho foi estudar a capacidade do fungo filamentoso *Aspergillus* sp. LEBM2, isolado pelo Laboratório de Microbiologia - FURG, na região da cidade do Rio Grande - RS, de degradar fenol. Tipos diferentes de inóculo foram estudados, utilizando distintas fontes de carbono. A influência dos parâmetros de cultivo concentração de glicose, volume de inóculo e agitação foi verificada utilizando um planejamento experimental 2^3 . Estudou-se a tolerância do fungo ao fenol, verificando sua capacidade degradativa em diferentes concentrações do substrato tóxico. Além disso, um estudo comparativo com microrganismos livres e encapsulados foi realizado. No estudo do tipo de inóculo foi observada diferença significativa entre os inóculos utilizados, sendo que o processo mais eficiente foi utilizando o meio de adaptação contendo glicose e fenol, com velocidade média de degradação de fenol de $0,67 \text{ mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Para o planejamento foi observado, na condição 500 mg.L^{-1} de glicose, volume de inóculo de 20 % e agitação de 200 rpm, degradação total do fenol em 72 h, apresentando uma velocidade de degradação de $3,76 \text{ mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Quanto à tolerância ao fenol, constatou-se que este microrganismo conseguiu consumir o fenol até uma concentração de $989 \pm 15 \text{ mg.L}^{-1}$ e que a maior velocidade de degradação encontrada foi de $5,18 \text{ mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para a concentração de $320 \pm 0,57 \text{ mg.L}^{-1}$, mostrando que o fungo estudado tem grande potencial para ser utilizado em processos de bioaumentação. No estudo comparativo entre microrganismos livres e encapsulados, verificou-se aumento na velocidade de degradação de fenol atingindo valores de até 49,2 % superiores, pela encapsulação em alginato de cálcio em todas as concentrações estudadas, indicando a presença de um microambiente mais favorável para a biodegradação pelo efeito protetor da matriz do gel, reduzindo o estresse abiótico. A encapsulação do fungo filamentoso *Aspergillus* sp. LEBM2 mostrou-se uma técnica promissora para aplicação em processos de bioaumentação.

PALAVRAS-CHAVE: biorremediação, bioaumentação, biodegradação, fenol, fungos filamentosos, encapsulação.

ABSTRACT

The presence of chemical industrial installations in Rio Grande – RS, near to a complex ecosystem, that include Patos Lagoon estuary, has a serious environmental impact, with damage in economic activities such as fishery and tourism. In this context, research and development strategies to impacted areas recovery are essential. Bioaugmentation involves the addition of an expressive number of hydrocarbonclastic microorganisms in impacted areas. It is interesting the application of selected microorganisms from indigenous population, adapted to local conditions and with high degradation capacity. Phenols, in particular, are hazardous pollutants, because of antimicrobial and phytotoxic effects. The main goal of this work was to study the phenol degradation capacity of *Aspergillus* sp. LEBM2 filamentous fungus, isolated by Microbiology Laboratory – FURG, in the region of Rio Grande-RS. Different types of inoculum were studied, using different carbon sources. Influence of batch cultivation parameters (glucose concentration, inoculum volume and agitation) was verified using a 2³ experimental design. Phenol tolerance was studied, verifying degradative capacity for different contaminant concentrations. A comparative study was carried out with free and encapsulated microorganisms. With respect to the type of inoculum, it was observed significative differences. A more efficient process was obtained using an adaptation medium containing glucose and phenol, reaching a degradation of 0.67 mg.L⁻¹.h⁻¹. In relation to experimental design, glucose concentration of 500 mg.L⁻¹, inoculum volume of 20 % and agitation of 200 rpm were the best conditions, with total phenol degradation rate in 72 h and degradation of 3.76 mg.L⁻¹.h⁻¹ with respect to phenol tolerance, this microorganism was able to consume 989 ± 15 mg.L⁻¹. The highest phenol degradation rate was 5.18 mg.L⁻¹ in the concentration of 320 ± 0,57 mg.L⁻¹, showing that *Aspergillus* sp. LEBM2 has great potential to bioaugmentation purposes. In the comparative study involving free and encapsulated cells, it was observed an increase in phenol degradation rate with filamentous fungi encapsulated in calcium alginate beads, in all concentrations. The presence of a microenvironment more favorable, because of the protector effect of gel matrix, reduced abiotic stress. Encapsulated *Aspergillus* sp. LEBM2 application showed a potential technique for bioaugmentation process.

KEY WORDS: bioremediation, bioaugmentation, biodegradation, phenol, filamentous fungi, encapsulation.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A produção e utilização em larga escala de produtos orgânicos tem levado a sérios problemas ambientais nas últimas décadas, sendo que muitos destes compostos podem persistir no ambiente por longos períodos.

A presença de um pólo industrial em Rio Grande-RS, junto a um ecossistema delicado, que compreende a região estuarina da Lagoa dos Patos, tem um impacto ambiental indiscutível. O problema das emissões de efluentes líquidos e gasosos é uma realidade, provocando prejuízo em atividades econômicas da região, em particular a pesca, em que Rio Grande destaca-se como um dos principais pólos do sul do país, acarretando graves implicações sócio-econômicas aos que dependem desta atividade, bem como efeitos diretos sobre a qualidade de vida dos habitantes da região. Além disso, é concreto o risco de acidentes que envolvam produtos químicos na zona costeira, bem como a existência de áreas já impactadas, como solo e sedimentos.

O fenol, um dos poluentes perigosos mais freqüentes, está presente em efluentes de indústrias de gaseificação de carvão, produção de coque, refino de petróleo, farmacêutica, alimentos, pesticidas, fertilizantes, produção de tintas, química sintética e polpa de papel. Uma concentração de fenol de 1 mg.L^{-1} é considerada tóxica, por isso na maioria dos casos os limites de emissão são mais restritos, sendo de até $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. No Brasil, os padrões de qualidade da água estabelecem concentrações de fenol de até $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ para uso em locais destinados a balneabilidade e até 1 mg.L^{-1} para uso na navegação. Os padrões de emissão de efluentes correspondem a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. O fenol é biodegradável tanto aeróbia como anaerobiamente, mas é tóxico aos microrganismos mesmo a concentrações relativamente baixas de 10 mg.L^{-1} . O fenol apresenta efeito microbicida e fitotóxico, e pode ser inibidor do crescimento mesmo em espécies que o utilizam como substrato, acarretando problemas operacionais nas estações de tratamento de efluentes (SANCINETTI *et al.*, 2003). Em concentrações na faixa de 5 a 25 mg.L^{-1} é letal para a vida aquática (YAN *et al.*, 2005).

Um dos caminhos para aumentar a degradação desse composto é inocular um único microrganismo do meio ambiente ou uma combinação de microrganismos conhecidos por degradar fenol. Fungos em geral incluindo

Aspergillus, entre outros, utilizam uma grande faixa de compostos aromáticos simples e tem altas atividades de produção de enzimas catabólicas. Além disso, alguns deles são considerados hábeis para degradar compostos fenólicos (GARCÍA *et al.*, 2000).

De acordo com COLOMBO *et al.* (1996), numerosos microrganismos são conhecidos por sua habilidade de degradar hidrocarbonetos, mas a maioria dos trabalhos foca a biodegradação destes por bactérias, sendo que poucos trabalhos tratam da degradação utilizando fungos.

Os estudos em biorremediação envolvem estimulação microbiana indígena por modificações ambientais (bioestimulação) ou introduzindo populações microbianas exógenas que são conhecidas por degradar determinados compostos tóxicos (bioaumentação) (MANFIO *et al.*, 2005).

A utilização de microrganismos inclui completa destruição dos contaminantes, baixo custo de tratamento, maior segurança e menor distúrbio ao meio ambiente (GHAZALI, 2001).

A bioaumentação consiste na utilização de técnicas para se aumentar populações microbianas degradadoras, sendo definida como a suplementação de microrganismos externos de ocorrência natural, tais como bolores, leveduras e bactérias, visando aumentar a eficiência dos processos (LAZZARETTI, 1998; MANFIO *et al.*, 2005).

Os problemas ambientais relacionados à crescente atividade industrial têm gerado preocupação aos órgãos governamentais e entidades de proteção ambiental, sendo necessários estudos acadêmicos que busquem novas alternativas para a recuperação de áreas impactadas e solução de problemas operacionais das técnicas empregadas.

Para a avaliação da toxicidade e biodegradabilidade, os ensaios em batelada são úteis para classificar variáveis importantes (OWEN *et al.*, 1979, citado por SANCINETTI *et al.*, 2003).

Um outro aspecto é que o sucesso da bioaumentação depende altamente da sobrevivência das células inoculadas, que pode ser promovida por sua encapsulação em um carreador, como alginato, goma gelana, entre outros, o qual os protege contra a competição natural com a microflora local (JÉZÉQUEL *et al.*, 2005; MOSLEMY *et al.*, 2003).

Segundo MOSLEMY *et al.* (2002), o uso de células encapsuladas para aplicações no ambiente tem muitas vantagens em relação às formulações com células livres, incluindo a proteção do estresse biótico e abiótico, evitando também a compactação microbiana do solo, pois impede a formação de polímeros celulares, bem como minimiza a distribuição insatisfatória de células ativas no solo, sedimentos e aquíferos.

No Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG vem sendo desenvolvido desde 2002 a linha de pesquisa Biotecnologia Ambiental e Biorremediação. Diversos microrganismos foram isolados a partir de solo contaminado na cidade do Rio Grande, planície costeira sul do Estado do Rio Grande do Sul. Foram identificados e caracterizados quanto à capacidade de crescimento em diferentes hidrocarbonetos, apresentando potencial degradativo para hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e clorados, o que possibilita a formulação de consórcios microbianos com alta capacidade degradativa e amplo espectro de degradação (BURKERT *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2004). Neste contexto, o presente trabalho vem contribuir nesses estudos.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Estudar a capacidade de degradar fenol, do fungo *Aspergillus sp.* LEBM2, isolado pelo Laboratório de Microbiologia – FURG, para viabilizar seu uso em bioaugmentação.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tipo de inóculo na degradação de fenol;
- Estudar a influência dos parâmetros de cultivo em batelada, como concentração de glicose, volume de inóculo e agitação, na degradação do fenol;
- Avaliar a tolerância do fungo ao fenol, em termos do efeito da concentração na velocidade de degradação;
- Comparar a utilização do fungo na forma livre e encapsulada para constatar qual é a mais promissora a ser utilizada em processos de bioaugmentação.

CAPÍTULO II
REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biorremediação de compostos orgânicos

De acordo com THASSITOU & ARVANITTOYANNIS (2001), a biorremediação é um conceito geral que inclui todos aqueles processos e ações que levam a biotransformação do ambiente, já modificados por contaminantes, para voltar ao seu estado original. As tecnologias empregadas no tratamento de resíduos são freqüentemente definidas em termos da melhor tecnologia disponível, que por sua vez está associada a dois fatores primordiais: informação disponível e condições econômicas. Diante da necessidade do tratamento de efluentes, torna-se lógico que se deva considerar a melhor tecnologia disponível quando esta oferecer vantagens em comparação com outras técnicas, quer no sentido de custos e ou de benefícios obtidos.

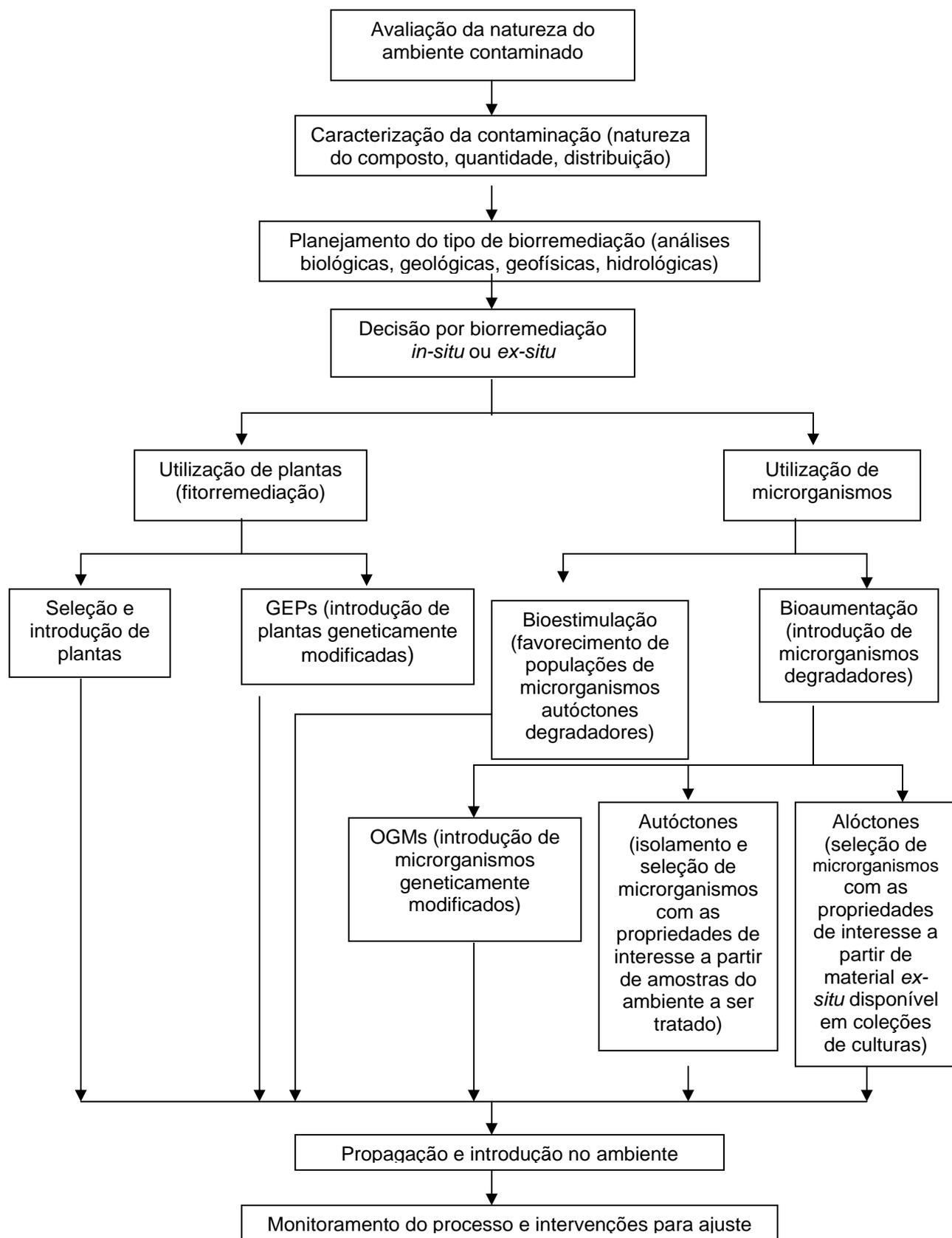
Os processos de biorremediação são tecnologias que utilizam organismos viáveis, especialmente microrganismos selecionados através de funções catabólicas, para degradação de substâncias tóxicas presentes no solo e água em outras menos tóxicas, não tóxicas ou redução de sua concentração a níveis aceitáveis. Estes microrganismos transformam o poluente em biomassa, água, dióxido de carbono e outros componentes menos tóxicos, sendo que o intuito da biorremediação é minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e à atividade microbiana. A bioestimulação e a bioaumentação podem ser consideradas abordagens gerais nessa tecnologia (CAPREZ *et al.*,2002).

As técnicas de biorremediação podem ser usadas para descontaminação de solo e água e são classificadas em duas grandes categorias: *in situ* e *ex situ* (COLLERAN, 1997). Estratégias de tratamento *in situ* podem diminuir os custos em relação às técnicas *ex situ*, pela eliminação da necessidade de escavação ou bombeamento, transporte e estocagem (GHAZALI, 2001). A biorremediação *in situ* envolve o incremento das taxas de biodegradação de contaminantes orgânicos no solo, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas. Requer a estimulação da atividade degradativa de populações microbianas endógenas pela provisão de nutrientes e aceptores de elétrons, técnica conhecida como bioestimulação. Ou a

adição de inóculos microbianos exógenos com ou sem suplementação de nutrientes, que constitui a bioaugmentação. A biorremediação *ex situ* requer a remoção física do material contaminado seguido de tratamento em biorreatores, *landfarming*, biopilhas, compostagem e lagoas, utilizando as técnicas citadas (FURTADO, 2001).

A tecnologia de bioaugmentação não é nova, vem sendo praticada nos EUA desde os anos 60. No Brasil, esta tecnologia teve maior incremento nos anos 90, com a chegada ao país de empresas que comercializam aditivos bioquímicos para esta finalidade (LAZZARETTI, 1998).

As etapas de implementação de um processo de biorremediação compreendem o estudo do ambiente, do tipo de contaminante, dos riscos e da legislação pertinente (Figura 1). As avaliações biológicas ocorrem, em primeira instância, em laboratório, e têm como objetivo a otimização da biodegradação do composto. Elas compreendem os testes de bioestimulação, pela adição de nutrientes e/ou surfactantes, e os testes de bioaugmentação, pela adição de culturas de microrganismos biodegradadores. Com base nos dados obtidos é, então, escolhida a técnica de biorremediação mais adequada para a situação e testes de campo são realizados, para verificar a eficiência do processo (MANFIO *et al.*, 2005).



Fonte: MANFIO *et al.* (2005).

Figura 1: Esquema geral das etapas para definição e implementação de um processo de biorremediação.

3.2. Fontes xenobióticas de fenol

A origem do fenol no ambiente é natural bem como xenobiótica. As fontes naturais são oriundas da queima de florestas e de tecidos vegetais, ocorrendo naturalmente, por consequência, no solo. As fontes xenobióticas são constituídas de resíduos dos processos industriais, processos de manufatura química, processos da indústria de celulose e papel e pesticidas (ALEMZADEH *et al.*, 2002).

A tabela 1 mostra algumas informações referentes a estas fontes.

Tabela 1: Algumas fontes de emissão de fenóis.

Fonte de emissão (efluentes)	Fenóis totais (mg.L ⁻¹)	pH	DQO (mg.L ⁻¹)	Referência
Vinhaça de destilarias de álcool	469	4,4	75.000	GARCÍA <i>et al.</i> (1997)
Siderúrgicas	5-326	-	-	SANTOS & LINARDI (2004)
Resíduos da indústria de azeite de oliva	1200	4,7	82.000	GARCÍA <i>et al.</i> (2000)
Resíduos da indústria de azeite de oliva	265	-	-	KACHOURI & HAMDI (2003)
Resinas fenólicas	107-615	-	3.140-6.060	HIDALGO <i>et al.</i> (2002)
Lubrificantes e derivados de petróleo	0,19-0,66	4,0	-	RODRIGUES <i>et al.</i> (2005)
Papel	20	10,34	5.800	MORAES <i>et al.</i> (2001)
Beneficiamento de Soja	10	-	-	GUIOURELIOTIS & NICELL (1999)

Fenóis e clorofenóis são contaminantes comuns do meio ambiente, originados principalmente pelo seu uso em biocidas na indústria e na agricultura, sua formação durante o branqueamento de polpa e a incineração de material

orgânico na presença de cloro. Muitos fenóis e fenóis clorados persistem em muitos ambientes, devido às condições impróprias de biodegradação (ANTIZAR-LADISLAO & GALIL, 2004).

Hidrocarbonetos monoaromáticos como benzeno, tolueno e fenol são produzidos em grandes quantidades quando são usados como solventes e materiais na produção dos plásticos, fibras sintéticas e pesticidas (HAMED *et al.*, 2003).

A indústria de azeite de oliva gera grandes quantidades de resíduos líquidos escuros. Este resíduo tem um alto poder poluente com uma Demanda Bioquímica de Oxigênio variando entre 89.000 a 100.000 mg.L⁻¹, e Demanda Química de Oxigênio entre 80.000 a 200.000 mg.L⁻¹. Estes valores são em torno de 200 a 400 vezes maiores que um esgoto típico municipal. A produção anual do resíduo do azeite de oliva nos países mediterrâneos fica em torno de 3 x 10⁷ m³. A fração orgânica do resíduo de azeite de oliva inclui açúcares, taninos, polifenóis, polialcoóis, pectinas e lipídios (KACHOURI & HAMDÍ, 2003).

Polifenóis encontrados em azeite de oliva virgem, responsáveis pela estabilidade, vem da fruta da oliveira. Durante o processo de extração, uma grande parte destes compostos é perdido em meio à fase aquosa. Os sólidos e o efluente aquoso contém substâncias orgânicas como os polifenóis, compostos fenólicos que consistem de moléculas aromáticas monocíclicas, como os ácidos hidroxilato e metoxilato-benzóico, fenilacético e ácido fenil propenóico, e compostos de alto peso molecular são obtidos com a sua polimerização. Estes compostos são responsáveis pela cor escura, efeitos fitotóxicos e atividade antibacteriana (KACHOURI & HAMDÍ, 2003).

A vinhaça, efluente de destilarias de álcool etílico, contém matéria orgânica abundante, que inclui numerosos compostos fenólicos e seus polímeros (GARCÍA *et al.*, 1997).

LEIFA & SOCCOL (2001) citam a presença de componentes tóxicos como cafeína, taninos e polifenóis nos resíduos sólidos (cascas) do processamento de café, e que impedem sua utilização como ração para ruminantes, gerando um sério problema de poluição ambiental.

3.3. Métodos biológicos para degradação de fenol

De acordo com SANCINETTI *et al.* (2003), o fenol é considerado um dos poluentes perigosos mais freqüentes, estando presente em efluentes de indústrias de gaseificação de carvão, produção de coque, refino de petróleo, farmacêutica, alimentos, pesticidas, fertilizantes, produção de tintas, química sintética e polpa de papel. Uma concentração de fenol de 1 mg.L^{-1} é considerada tóxica, por isso na maioria dos casos os limites de emissão são mais restritos, sendo que a legislação brasileira estabelece padrões de emissão no corpo receptor em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (artigo 21 da resolução nº 20/86 do CONAMA).

Devido a seus efeitos tóxicos, que incluem permeabilização da membrana celular e coagulação citoplasmática, os fenóis podem causar danos sensíveis à célula e isto causa profundos problemas à saúde e ao meio ambiente, particularmente durante os processos de tratamento dos resíduos líquidos. Tradicionalmente, o fenol tem sido removido de efluentes industriais por métodos físico-químicos, mas técnicas recentemente desenvolvidas de biodegradação têm potencial de mineralizar estes compostos tóxicos completamente, relativamente a pequenos custos. Apesar das suas propriedades tóxicas, numerosos microrganismos podem utilizar compostos fenólicos sob condições aeróbicas como única fonte de carbono e energia (FIALOVÁ *et al.*, 2004).

O tratamento de compostos aromáticos por métodos físicos e químicos é caro, então a biorremediação destes compostos é uma opção de baixo custo. O tratamento biológico de xenobióticos é limitado por propriedades intrínsecas destes compostos. Devido à sua toxicidade, eles são pouco biodegradáveis, e a degradação pelos microrganismos ocorre em baixa concentração do substrato (HAMED *et al.*, 2004).

De acordo com TONG *et al.* (1998), a remoção de fenóis inclui técnicas como extração por solventes, adsorção em carvão ativado, oxidação química e destoxificação enzimática. No entanto, tais técnicas apresentam limitações, como alto custo, incompleta descontaminação, formação de subprodutos e aplicabilidade em faixas de concentração limitadas.

Devido à grande difusão da ocorrência de fenóis, microrganismos hábeis para usar estes compostos como fonte de carbono e energia podem ser

encontrados em muitos ambientes. Eles incluem tanto microrganismos aeróbicos como anaeróbios. A biodegradação aeróbia tem sido estudada desde o começo do século XX. Muitos microrganismos degradadores de fenol têm sido isolados e os caminhos da degradação do fenol, os quais começaram a ser elucidados desde 1950, são agora bem estabelecidos. Nos últimos anos, diversos genes envolvidos na degradação aeróbica de fenol em diferentes organismos tem sido clonados e caracterizados.

Pesquisas desenvolvidas no hemisfério norte mostraram que diversos grupos de bactérias e fungos têm habilidade para degradar os componentes do petróleo. As bactérias, denominadas hidrocarbonoclásticas, fazem parte da microflora presente no solo, na água e no sedimento. Quando estes ambientes são contaminados, ocorre a adaptação de certas populações microbianas, que passam a reconhecer os componentes do óleo como fonte de carbono (MÁSTER & MOHN, 1998).

Os métodos biológicos usados para o tratamento de efluentes fenólicos são o lodo ativado aeróbico e digestão anaeróbica. O uso de fungos filamentosos no pré-tratamento tem sido adotado para reduzir a toxicidade e promover a biodegradabilidade na digestão anaeróbica. A aplicação dos fungos em larga escala é limitada pela dificuldade de realização contínua devido a formação de *pellets* e micélios filamentosos (ASSAS *et al.*, 2002).

Segundo GARCÍA *et al.* (1997), os compostos fenólicos são conhecidos pela dificuldade de degradação biológica, e pelo efeito antimicrobiano e fitotóxico, afetando os processos de digestão anaeróbia. A remoção prévia destes compostos acelera a digestão anaeróbia do efluente, resultando em decréscimo de custos.

Em processos de bioaugmentação, a utilização de fungos filamentosos não tem sido ainda suficientemente investigada, sendo que sua utilização em solos pode apresentar vantagens como a adaptabilidade às condições físico-químicas e o acesso facilitado aos xenobióticos adsorvidos pelas partículas de solo, pela formação de hifas (POTIN *et al.*, 2004).

Desde 1980 já é conhecido que os fungos do gênero *Aspergillus* degradam uma larga faixa de compostos aromáticos como lignina e que é mais rápido do que muitos outros fungos. Além disso, *Aspergillus japonicus* tem sido descrito como o mais eficiente para degradar em relação a outras cepas como o

Aspergillus terreus, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus flavus*. *Aspergillus japonicus* é capaz de realizar descarboxilações não oxidativas e oxidativas, oxidação de álcoois aromáticos e aldeídos, redução de ácidos aromáticos, desmetilação de compostos aromáticos, hidroxilação e clivagem do anel aromático (ZIINO *et al.*, 1999).

A complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação leva à formação de consórcios, com bactérias e/ou fungos de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações do contaminante. Os consórcios microbianos podem ser comercializados na forma sólida, adicionados a farelos, ou imobilizados em microcápsulas, como alginato de sódio (KNAEBEL *et al.*, 1997).

As taxas de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos estão limitadas por fatores como temperatura, umidade, concentração do contaminante, de oxigênio, de nitrogênio e de fósforo, aclimatação ou mesmo adaptação ao contaminante (LI *et al.*, 2000).

A tabela 2 mostra microrganismos citados na literatura como hábeis na degradação de fenóis, sendo aplicáveis em processos de bioaumentação tanto em estações de tratamento de efluentes quanto diretamente no ambiente (solos, aquíferos e sedimentos).

Tabela 2: Alguns microrganismos usados em estudos de biodegradação de fenol.

Efluente	Microrganismo	Referência
Resina fenólica	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	HIDALGO <i>et al.</i> (2002)
Sintético	<i>Candida tropicalis</i>	CHEN <i>et al.</i> (2002)
Lubrificantes e derivados de petróleo	<i>Aspergillus niger</i>	RODRIGUES <i>et al.</i> (2005)
Sintético	<i>Aspergillus niger</i>	FÉLIX <i>et al.</i> (2005)
Resíduo de azeite de oliva	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	GARCÍA <i>et al.</i> (2000)
Sintético	<i>Graphium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i>	SANTOS & LINARDI (2004)
Vinhaça de destilaria de álcool	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	GARCÍA <i>et al.</i> (1997)
Sintético	<i>Candida parapsilopsis</i>	RIGO & ALEGRE (2004)
Sintético	<i>Candida tropicalis</i>	YAN <i>et al.</i> (2005)
Sintético	<i>Pseudomonas putida</i>	HAMED <i>et al.</i> (2004)
Resíduo de azeite de oliva	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KACHOURI & HAMDÍ (2004)
Sintético	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 e HKR1	MOHARIKAR & PUROHIT (2003)
Sintético	<i>Pseudomonas mendocina</i> PC1, <i>P. fluorescens</i> PC18, PC20 e PC24	HEINARU <i>et al.</i> (2005)
Resíduo de azeite de oliva	<i>Aspergillus terreus</i>	HOYOS <i>et al.</i> (2002)
Resíduo de fermentação alcoólica	<i>Penicillium</i> sp., <i>Penicillium decumbens</i> , <i>Penicillium lignorum</i> e <i>Aspergillus niger</i>	JIMÉNEZ <i>et al.</i> (2003)
Sintético	<i>Candida maltosa</i>	FIALOVÁ <i>et al.</i> (2004)

3.4. Fundamentos da encapsulação de microrganismos

A encapsulação de microrganismos é uma técnica que oferece algumas vantagens nas aplicações da biorremediação. A encapsulação, ou mais apropriado, imobilização em partículas, é um processo pelo qual células são retidas dentro de esferas poliméricas semi-permeáveis, com as células uniformemente distribuídas dentro delas. O processo consiste da mistura das células com uma solução prepolimérica, aplicando uma força que separa a mistura célula/polímero em partículas, geralmente esféricas, e seguido de solidificação do material. Os polímeros que são comumente usados incluem o alginato, goma gelana, carragenana, agarose, poliuretano, poli(acrilamida) e metacrilato. Dependendo do polímero e da técnica de formação usada, as partículas podem variar de tamanho, de muito pequenas (aproximadamente 2 a 10 μm de diâmetro) a muito grandes (aproximadamente 3 mm). Tipo de polímero e tamanho de partícula influenciam na atividade celular, retenção, difusão de nutrientes e estabilidade da partícula (KNAEBEL *et al.*, 1997).

O uso de células encapsuladas para aplicação no meio ambiente tem muitas vantagens em relação às formulações feitas com células livres, incluindo a proteção do estresse biótico como a predação por protozoários e bacteriófagos, proteção do estresse abiótico como o efeito inibitório dos compostos tóxicos. Além disso, garante a sobrevivência e promove a atividade fisiológica, aumenta a densidade celular e o crescimento celular preferencial em várias zonas aeróbicas e anaeróbicas do gel encapsulado.

A encapsulação também pode aumentar a distância do transporte de células de degradação para bioaugmentação, melhorando sua distribuição, diminuindo a compactação microbiana da superfície do solo pela formação de polímeros extracelulares, o qual representa o maior impedimento para o sucesso da distribuição de células livres através de solos saturados (MOSLEMY *et al.*, 2002).

Outras vantagens incluem a possibilidade de co-encapsulação de nutrientes, bem como a garantia da sobrevivência dos microrganismos por longos períodos, com retenção de sua atividade fisiológica.

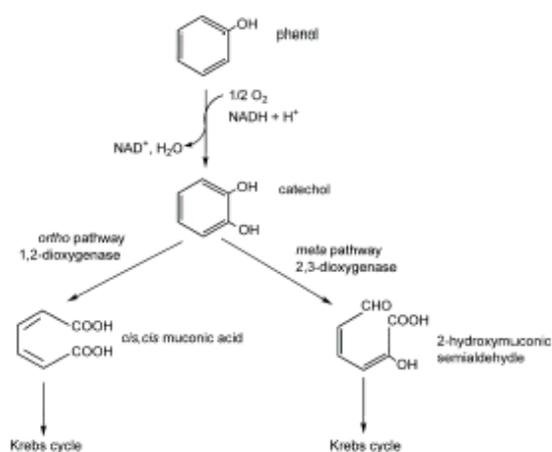
Por outro lado, concentrações elevadas de polímero e partículas muito grandes podem criar limitações difusionais, como redução do oxigênio disponível às

células encapsuladas, o que pode reduzir em alguns aspectos a atividade celular. No entanto, a barreira difusional pode proteger as células de altas concentrações do substrato tóxico que está sendo degradado (KNAEBEL *et al.*, 1997).

3.5. Bioquímica da degradação

O metabolismo microbiano, que consiste, basicamente, de uma série de reações enzimáticas, divide-se em três fases principais: hidrólise, ciclo de Krebs e cadeia respiratória (LEITE, 1997).

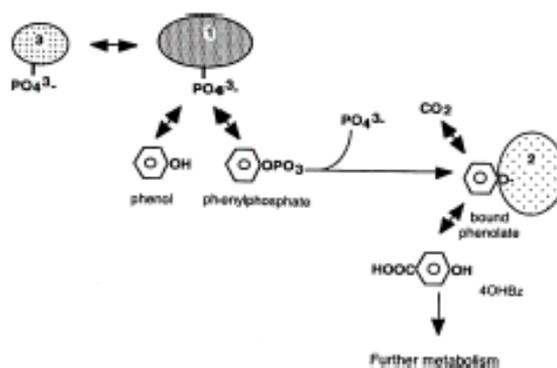
Durante a primeira etapa da biodegradação aeróbica do fenol (figura 2), o oxigênio molecular é usado pela enzima fenol hidroxilase para adicionar uma segunda hidroxila ao grupamento na posição orto. A reação requer uma redução do NADH_2 . O resultado é catecol (1,2-dihidroxibenzeno), molécula que pode ser degradada por dois caminhos alternativos, dependendo do organismo. No caminho orto- β -cetoadipato, o anel aromático é clivado entre as hidroxilas do catecol por uma catecol 1,2-dioxigenase. O resultado é cis, cis-muconato, que posteriormente é metabolizado, via β -cetoadipato, para o ciclo de Krebs. No caminho meta, a fissão do anel ocorre na parte adjacente para os dois grupos hidroxila do catecol. A enzima catecol 2,3-dioxigenase transforma catecol para 2-hidroxi-mucônico semialdeído, que é metabolizado posteriormente no ciclo de Krebs.



Fonte: SCHIE & YOUNG, 2000.

Figura 2: Visão esquemática do caminho aeróbico de degradação do fenol.

A enzima responsável pela carboxilação do fenol para 4- hidroxibenzeno (40HBz) tem sido nomeada como “fenol carboxilase”. Até o momento esta enzima ainda não foi purificada. A atividade da fenol carboxilase é localizada no citoplasma, onde catalisa a para-carboxilação reversível de fenol para 40HBz. Entretanto, em estudos *in vitro*, somente são reversíveis em trocas isotópicas entre $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -40HBz. Nenhuma carboxilação do fenol foi observada, indicando que o fenol não foi o real substrato para essa carboxilação. As propriedades da reação da troca isotópica sugere que o ânion fenolato seria o intermediário reversível da descarboxilação do 40HBz, indicando que o fenolato podia ser o real substrato da carboxilação, o que pode ser observado na figura 3.



Fonte: SCHIE & YOUNG, 2000

Figura 3: Representação esquemática da conversão do fenol, via fenilfosfato, para 4-hidróxibenzeno. Todas as reações ocorrem intracelularmente.

É conhecido que reações de descarboxilação podem criar gradientes de prótons através da membrana. Estes gradientes de prótons podem gerar energia eletromagnética. Tem sido mostrado que os níveis de ATP intracelular, em consórcios metanogênicos, aumentam depois da descarboxilação do 40HBz para fenol. Conseqüentemente, o rendimento de células no 40HBz foi significativamente mais alto do que com o fenol como substrato. Adicionalmente, um próton ionóforo (carbonilcianido *m*-clorofenilhidrazona; CCCP) ou um inibidor H^1 -ATPase (diciclohexilcarbodiâmido; DCCD) ambos diminuem os níveis de ATP. Estes resultados foram mostrados como evidência que a descarboxilação do 40HBz gera

um gradiente de próton através da membrana, o qual permite a geração de energia via H¹-ATPase (SCHIE & YOUNG, 2000).

Em todos esses estudos, o fenol foi metabolizado pelo caminho β -cetoacido, através da fissão orto do catecol, por isso a importância de estudar e selecionar microrganismos para serem usados como biocatalisadores na destoxificação destes compostos no ambiente (SANTOS & LINARDI, 2004).

Segundo DURÁN & ESPOSITO (2000), peroxidases e/ou polifenoloxidasas podem atuar em poluentes recalcitrantes específicos por precipitação ou transformação em outros produtos e permitindo um melhor tratamento final dos resíduos. Em seu trabalho eles citam diversos tipos de enzimas e suas características, como as descritas a seguir.

As peroxidases são hemoproteínas, produzidas principalmente por numerosos microrganismos e plantas, as quais catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio. A cloroperoxidase teve a estereoquímica do seu sítio ativo e modelo molecular recentemente publicado. Ela provém do fungo *Caldariomyces fumago*, que tem sido relatado para oxidação de diversos compostos fenólicos, oxidação do etanol para aldeído e oxidação de íons cloro. As lignina peroxidases são bem conhecidas atualmente, especialmente as oriundas de basíomicetes como *Phanerochaete chrysosporium*, sendo mostrado que elas mineralizam uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes e oxidam aromáticos policíclicos e compostos fenólicos. A manganês peroxidase foi menos estudada que a lignina peroxidase, mas recentemente, muitos estudos foram publicados sobre esta enzima. Ela catalisa a oxidação de diversos fenóis monoaromáticos e corantes aromáticos, mas depende de manganês divalente e de certos tipos de tampões.

As fenoloxidasas são oxidoreduções que catalisam a oxidação de compostos fenólicos. Elas estão divididas em duas subclasses, tirosinases e lacases, e esses grupos reagem com oxigênio e não precisam de cofatores. A tirosinase é conhecida como uma polifenoloxidase ou catecolase. Ela catalisa a hidroxilação de monofenóis com oxigênio molecular para formar o-quinonas as quais posteriormente farão uma polimerização não enzimática. As lacases são cuproproteínas oriundas de pequeno grupo de enzimas chamadas de azul oxidases. Elas são fenoloxidasas que catalisam a oxidação de diversas substâncias aromáticas e inorgânicas com uma redução concomitante do oxigênio para água.

Em geral, as lacases exibem quatro átomos de cobre vizinhos, os quais estão distribuídos entre diferentes lugares e eles são classificados dentro de três tipos: cobre tipo 1, 2 e 3 os quais são diferenciados pela suas propriedades específicas que permitem desenvolver importantes mecanismos catalíticos da enzima.

3.6. Aplicação de microrganismos na biorremediação de fenóis

Diversas investigações têm sido conduzidas usando microrganismos capazes de crescerem em condições aeróbias, a fim de reduzir a carga orgânica inicial e o conteúdo fenólico. Em particular, pré-tratamentos com *Aspegillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Geotrichum candidum*, *Azotobacter chroococcum* e *Phanerochaete chrysosporium* reduziram consideravelmente a DQO e a concentração total de compostos fenólicos, de efluentes líquidos de azeite de oliva, os quais são responsáveis pela toxicidade desse resíduo (FADIL *et al.*, 2002).

Linhagens de fungos degradadores de hidrocarbonetos foram isolados por OUDOT *et al.* (1993), em ambientes tropicais poluídos na Indonésia (solo e sedimento). Foram utilizados dois meios, um contendo extrato de malte e outro contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono, incubando-se a 28 °C por 8 dias, para avaliação da população total de fungos, e 21 dias para a população de fungos degradadores de hidrocarbonetos. Os fungos foram identificados como sendo dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gliocadium*, *Emericella*, *Graphium*, *Acremonium*, *Eupenicillium* e *Talaromyces*. Os mais efetivos na assimilação de hidrocarbonetos saturados (> 40 %) e aromáticos (> 30 %) foram *Emericella nidulans*, *Graphium putredinis*, *Eupenicillium javanicum* e *Aspergillus flavipes*. Alguns isolados degradaram significativamente resinas (15 a 18 %) e asfaltenos (15 a 40 %), sendo estes índices maiores que os observados para cepas isoladas no hemisfério norte.

GARCÍA *et al.* (1997) estudaram a biodegradação de compostos fenólicos presentes na vinhaça usando *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum*. Com *A. terreus* foi observado remoção de fenóis totais e o-difenóis de 66 e 94 %, respectivamente. No caso de *G. candidum*, os resultados obtidos foram 70 e 91 %.

GARCÍA *et al.* (2000) estudaram a remoção de compostos fenólicos em efluente de produção de azeite de oliva utilizando diferentes fungos. A remoção de fenóis totais, relativo à matéria orgânica total consumida, indicou a seletividade com

que os microrganismos removeram fenol entre os compostos orgânicos presentes, tendo o fungo *Phanerochaete chrysosporium* apresentado melhor seletividade, seguido de *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*.

Um estudo cinético foi conduzido por HOYOS *et al.* (2002), para o tratamento aeróbico de resíduo resultante da obtenção de azeite de oliva, utilizando *Aspergillus terreus*. Foi utilizado um biorreator com 5 litros de capacidade operando com agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C. Foi observada degradação pelo acompanhamento da Demanda Química de Oxigênio e Demanda Bioquímica de Oxigênio. Um incremento na vazão de ar produziu maior porcentagem de degradação em menor tempo com uma redução de 65 % da DQO e 85 % da DBO.

ASSAS *et al.* (2002) avaliaram a descoloração de compostos fenólicos contidos em resíduos frescos da indústria de azeite de oliva, os quais foram estocados no escuro, pelo fungo *Geotrichum candidum* em um biorreator aerado. Durante a estocagem do resíduo, autooxidação e subsequente polimerização dos compostos fenólicos e taninos deram origem a uma coloração escura, não sendo prontamente biodegradável. *G. candidum* cresceu no resíduo fresco diminuindo o pH e reduzindo a DQO em 50 % nos três primeiros dias e subsequente remoção de 15 %. Em contraste, 75 % da cor foi removida durante os três últimos dias da cultura devido o fungo ter hidrolisado os compostos fenólicos com alto peso molecular e removido muitos compostos fenólicos simples. *G. candidum* que cresceu no escuro foi rapidamente inibido resultando em pequena redução da DQO (25 %), não havendo descoloração devido a polimerização do fenol ser amplificada pelo aumento do pH e oxigênio. Logo, a adição de oxigênio capacitou o crescimento do fungo e a biodegradação dos compostos fenólicos, a fim de evitar a polimerização dos compostos fenólicos e dos taninos.

FADIL *et al.* (2002) analisaram o crescimento e biodegradação de polifenóis em resíduo de indústria de azeite de oliva, por três microrganismos nomeados *Geotrichum sp.*, *Aspergillus sp.* e *Candida tropicalis*. Estes microrganismos foram selecionados devido à sua tolerância para os polifenóis. O processo de biodegradação foi investigado pela condução de experimentos onde a concentração inicial de DQO foi variada. As remoções de DQO foram de 55 %, 52,5 % e 62,8 % respectivamente. A remoção máxima de polifenóis foi de 46,6 % (*Geotrichum sp.*), 44,3 % (*Aspergillus sp.*) e 51,7 % (*C. tropicalis*).

SANTOS & LINARDI (2004) isolaram trinta cepas de um efluente de uma siderúrgica e testaram quanto à tolerância para o fenol. Quinze cepas dos gêneros *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Graphium* sp. toleraram acima de 10 mM de fenol, verificando-se sua habilidade para degradar fenol. A degradação foi em função da cepa, tempo de incubação e concentração inicial de fenol. Três cepas de *Graphium* sp. e uma de *Fusarium* sp., apresentaram maior porcentagem de degradação de fenol, com 75 % de degradação de 10 mM de fenol em 168 h. Todas as cepas apresentaram atividade de catecol 1,2-dioxigenase e fenolhidroxilase em extratos livres de células obtidos das células crescendo em fenol.

Um sistema orgânico aquoso de duas fases usado para degradar benzeno, tolueno e fenol, individualmente e misturados, por *Pseudomonas putida* (F₁), foi estudado por HAMED *et al.* (2004). No primeiro estágio do trabalho, o efeito da concentração da fase 0 a 1 (v/v) e a velocidade de agitação (150 e 200 rpm) no processo de biodegradação foi investigado em um *shaker* orbital usando 2-undecano como solvente e a concentração da fase e agitação mais suscetível foi encontrada como 0,0625 (v/v) e 200 rpm, respectivamente. *P. putida* (F₁) foi adicionada dentro da fase aquosa no sistema de duas fases, que consistia de 40 mL de fase aquosa e 2,5 mL de 2-undecano. Os experimentos foram conduzidos a pH 7 e 30 °C. Benzeno, tolueno e fenol foram completamente consumidos, individualmente, abaixo de concentrações de 4400 mg.L⁻¹ de benzeno, 4200 mg.L⁻¹ de tolueno e 600 mg.L⁻¹ de fenol de acordo com o volume da fase aquosa. A presença da segunda fase (fase orgânica) não somente preveniu a inibição do efeito de substratos, mas também diminuiu o tempo de biodegradação. As velocidades máximas de biodegradação do benzeno, tolueno e fenol foram 183, 197 e 18 mg.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Nos experimentos usando misturas, a presença de fenol não mudou os tempos de biodegradação do benzeno e do tolueno e a presença de benzeno e tolueno diminuíram os tempos de biodegradação do fenol.

BURKERT *et al.* (2004) isolaram fungos filamentosos a partir de solo contaminado na cidade do Rio Grande, planície costeira sul do Estado do Rio Grande do Sul. Foram identificados e caracterizados quanto à capacidade de crescimento em diferentes hidrocarbonetos, apresentando potencial degradativo para hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e clorados, tornando possível a formulação de consórcios microbianos com alta capacidade degradativa e amplo

espectro de degradação. No caso específico do fenol, foi observado tolerância até 500 mg.L⁻¹ de fenol pelas linhagens de *Aspergillus* sp. LEBM1 e LBM2, tendo esta última apresentado maior velocidade de crescimento microbiano na presença de fenol como única fonte de carbono (SANTOS *et al.*, 2004).

RIGO & ALEGRE (2004), entre 22 espécies de microrganismos isolados de efluente fenólico, *Candida parapsilopsis* foi capaz de crescer em meio contendo 1000 mg.L⁻¹ de fenol. Também foram determinados os parâmetros cinéticos, com $\mu_{\text{máx}} = 0,174\text{h}^{-1}$, $K_s = 11,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e $K_i = 298 \text{ mg.L}^{-1}$.

YAN *et al.* (2005) isolaram *Candida tropicalis* a partir de lodo ativado aclimatado, demonstrando alta capacidade degradativa (até 2000 mg.L⁻¹). Observaram também que maior volume de inóculo diminuiu a toxicidade do fenol e incrementou a velocidade de degradação.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para melhor compreensão do trabalho, o mesmo foi dividido em 2 artigos, sendo estes:

Artigo 1: Estudo da capacidade degradativa de uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. para remoção de fenol.

Artigo 2: Biodegradação de fenol por *Aspergillus* sp. livre e encapsulado: um estudo comparativo.

ESTUDO DA CAPACIDADE DEGRADATIVA DE UMA NOVA LINHAGEM DE *Aspergillus* sp. PARA REMOÇÃO DE FENOL

PASSOS, C.T.¹, NOGUEIRA, K.A.¹,
BURKERT, J. F.M.¹, KALIL, S.J.², BURKERT, C.A.V.^{1*}

1-Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química
Laboratório de Engenharia de Bioprocessos¹ – Laboratório de Microbiologia²
Rua Alfredo Huch, 475, 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil

RESUMO

Os compostos fenólicos têm alta atividade antimicrobiana e inibidora do crescimento celular. Embora sendo biodegradável tanto aeróbica como anaerobiamente, são tóxicos para a maioria dos microrganismos, mesmo em concentrações relativamente baixas de 10 mg.L⁻¹. A biorremediação desses compostos por microrganismos biodegradadores permite a restauração dos ambientes contaminados. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade degradativa de fenol do fungo *Aspergillus* sp. LEBM2, estudando-se o tipo de inóculo, os parâmetros de cultivo em batelada (concentração de glicose, volume de inóculo e agitação) e a tolerância ao fenol. Foi observada diferença significativa entre os tipos de inóculos utilizados, sendo que o processo mais eficiente foi usando o meio de adaptação contendo glicose e fenol, com velocidade média de consumo de fenol de 0,67 mg.L⁻¹.h⁻¹. Para o planejamento experimental 2³ foi observado, na condição 500 mg.L⁻¹ de glicose, volume de inóculo de 20% e agitação de 200 rpm, degradação total do fenol em 72 h, apresentando uma velocidade de degradação de 3,76 mg.L⁻¹.h⁻¹. Com relação à tolerância do fungo estudado constatou-se que este consegue consumir o fenol até uma concentração de 989 ± 15 mg.L⁻¹, tendo sido observado diferenças significativas entre as concentrações testadas em termos de velocidade de degradação. A maior velocidade média de degradação encontrada foi de 5,18 mg.L⁻¹.h⁻¹ para a concentração de 320 ± 0,57 mg.L⁻¹, não havendo diferenças significativas até 581 ± 57 mg.L⁻¹, mostrando que o fungo estudado apresenta grande potencial para ser utilizado em processos de bioaumentação.

PALAVRAS-CHAVE: bioaumentação, biodegradação, fungos filamentosos, fenol

ABSTRACT

Phenolic compounds have high antimicrobial activity and cellular growth inhibitory effect. They are biodegradable aerobically and anaerobically, but in relative low concentration of 10 mg.L⁻¹ are toxic for a great number of microorganisms. Bioremediation with microorganisms able to degradate them permits the complete restauration of polluted environments. The main goal of this work was to study the phenol degradation capacity of *Aspergillus* sp. LEBM2 filamentous fungus. Type of inoculum, batch cultivation parameters (glucose concentration, inoculum volume and agitation) and phenol tolerance were studied. It was observed a significative difference with respect to type of inoculum. More efficient performance was obtained using an adaptation medium containing glucose and phenol, reaching a degradation rate of 0.67 mg.L⁻¹.h⁻¹. With a 2³ experimental design, it was observed, using glucose concentration of 500 mg.L⁻¹, inoculum volume of 20 % and agitation of 200 rpm, total phenol degradation in 72 h, presenting a degradation rate of 3.76 mg.L⁻¹.h⁻¹. In relation to phenol tolerance, *Aspergillus* sp. LEBM2 was able to consume 989 ± 15 mg.L⁻¹. The highest phenol degradation rate was 5.18 mg.L⁻¹.h⁻¹ in the concentration of 320 ± 0.57 mg.L⁻¹. It is not observed significative differences until 581 ± 57 mg.L⁻¹. *Aspergillus* sp. LEBM2 shows great potential to be used in bioaugmentation process.

KEY WORDS: bioaugmentation, biodegradation, filamentous fungi, phenol

* Autor para correspondência:
Telefone: (53) 32338754
E-mail: burkert@vetorial.net

1. INTRODUÇÃO

A produção e utilização em larga escala de produtos orgânicos tem levado a sérios problemas ambientais nas últimas décadas, sendo que muitos destes compostos podem persistir no ambiente por longos períodos.

O fenol atua como agente membrano-ativo que aumenta a permeabilidade da membrana celular causando perda de material citoplasmático (RIGO & ALEGRE, 2004). Esse contaminante ocorre naturalmente em resíduos de plantas, e por conseqüência no solo, entretanto há também fontes xenobióticas de fenol, incluindo a indústria petroquímica, farmacêutica, química e de alimentos (FIALOVÁ *et al.*, 2004; ELMALEH *et al.*, 1999; THASSITOU & ARVANITTOYANNIS, 2001).

Embora sendo biodegradável tanto aeróbica como anaerobiamente, o fenol é tóxico para a maioria dos microrganismos, mesmo em concentrações relativamente baixas de 10 mg.L^{-1} , ocasionando problemas em estações de tratamento de efluentes (SANCINETTI *et al.*, 2003). Concentrações de 5 a 25 mg.L^{-1} de fenol comprometem a sobrevivência dos peixes e outros animais aquáticos de importância comercial (YAN *et al.*, 2005).

Em muitos países, agências de proteção ambiental citam o fenol como um dos principais poluentes do ambiente. Para ganhar respaldo científico para a degradação do fenol de forma natural, microrganismos degradadores têm sido isolados em laboratório e estão sendo usados para investigar a capacidade degradativa para serem utilizados no ambiente (WATANABE, 2002).

De acordo com COLOMBO *et al.* (1996), numerosos microrganismos são conhecidos por sua habilidade de degradar hidrocarbonetos, mas a maioria dos trabalhos focam a biodegradação destes por bactérias, sendo que poucos trabalhos tratam da degradação utilizando fungos. Estes, em geral, incluindo *Aspergillus* entre outros, utilizam uma grande faixa de compostos aromáticos simples e tem altas atividades de produção de enzimas catabólicas. Além disso, algumas espécies são consideradas hábeis para degradar compostos fenólicos. Logo, esses microrganismos estão sendo extensamente utilizados, em estudos de

bioaugmentação, pelo poder de consumir uma grande parte da carga orgânica total, bem como demonstrando seletividade, pela qual o microrganismo tem a capacidade de remover, entre outros compostos, o poluente alvo presente no resíduo (GARCÍA *et al.*, 1997; GARCÍA *et al.*, 2000; ASSAS *et al.*, 2002; FADIL *et al.*, 2002; HOYOS *et al.*, 2002; SANTOS & LINARDI, 2004).

A bioaugmentação tem sido praticada intencionalmente já há muitos anos principalmente na agricultura e para o tratamento de efluentes. A capacidade de adaptação dos microrganismos nativos não é normalmente focada na maioria dos trabalhos, mas investigações estão começando a serem feitas devido à capacidade excepcional dos microrganismos pré-adaptados para degradarem mais rapidamente o composto alvo (VOGEL, 1996; CAPREZ *et al.*, 2002).

A bioaugmentação por microrganismos biodegradadores selecionados constitui a chave do sucesso para a restauração dos ambientes contaminados. A biodisponibilidade dos poluentes e atividade catabólica dos microrganismos introduzidos são fatores importantes para o desenvolvimento das tecnologias de biorremediação. Além disso, antes de aplicar a bioaugmentação é necessário realizar experimentos laboratoriais com culturas puras para descobrir mais sobre a forma de ação e tolerância dos microrganismos (HEINARU *et al.*, 2005).

Para a avaliação da toxicidade e biodegradabilidade, os ensaios em batelada são úteis para classificar variáveis importantes, verificando seus efeitos no desempenho dos microrganismos no processo degradativo (OWEN *et al.*, 1979, citado por SANCINETTI *et al.*, 2003).

Em estudo anterior ao presente trabalho, foram isolados diversos microrganismos a partir de solo contaminado na cidade do Rio Grande, extremo sul do Brasil, os quais foram identificados e caracterizados quanto à capacidade de crescimento em diferentes hidrocarbonetos, apresentando potencial degradativo para hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e clorados (BURKERT *et al.*, 2004). No caso específico do fenol, foi observada tolerância de até 500 mg.L⁻¹ pelas linhagens de *Aspergillus* sp. LEBM1 e LEBM2, tendo este último apresentado maior velocidade de crescimento microbiano na presença de fenol como única fonte de carbono (SANTOS *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade degradativa do fungo *Aspergillus* sp. LEBM2, apresentando-se o estudo do tipo de inóculo, da influência de parâmetros de cultivo em batelada e da tolerância do fungo filamentososo ao fenol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado no trabalho foi o fungo filamentososo *Aspergillus* sp. LEBM2, isolado pelo Laboratório de Microbiologia – FURG, de um solo contaminado por hidrocarbonetos derivados de petróleo, na região da cidade do Rio Grande/RS, Brasil, sendo mantido a 4 °C, em ágar batata dextrose, até o momento da sua utilização (BURKERT *et al.*, 2004).

2.2. Preparo da água residuária sintética

A composição base da água residuária sintética utilizada nos experimentos foi (mg.L⁻¹): 400 KH₂PO₄; 200 MgSO₄. 7H₂O; 100 NaCl; 25 CaCl₂. 2H₂O; 3 MnSO₄. H₂O; 500 NH₄NO₃. H₂O (CUNHA *et al.*, 2001).

Para todos os experimentos, a água residuária sintética foi esterilizada a 120 °C por 15 min. A esta solução foram adicionadas as fontes de carbono, nas concentrações em estudo.

2.3. Efeito do tipo de inóculo na degradação de fenol

O inóculo foi preparado de acordo com BURKERT (2003), adicionando-se três circunferências de 1 cm de diâmetro do fungo crescido em placas de Petri com ágar batata, previamente incubados por 5 dias à 25 °C, para cada frasco erlenmeyer contendo 150 mL de água residuária sintética acrescida da fonte de carbono em estudo.

Para o estudo variou-se a fonte de carbono, sendo que para um experimento foi adicionado somente fenol (250 mg.L⁻¹), no segundo experimento

glicose (250 mg.L⁻¹) e fenol (250 mg.L⁻¹) e no terceiro somente glicose (250 mg.L⁻¹). Os frascos foram incubados a 25 °C durante 7 dias.

Foram realizados experimentos de degradação em triplicata, de forma estática (sem agitação), variando-se o tipo de inóculo. Como biorreatores foram utilizados frascos erlenmeyers de 500 mL de capacidade com 150 mL de água residuária sintética acrescida de 250 mg.L⁻¹ de fenol, sendo incubados com o respectivo inóculo, correspondente a 10 % do volume total. Paralelamente foi realizado um ensaio controle, sem a inoculação do microrganismo, para avaliar as perdas abióticas. A temperatura de todos os ensaios foi controlada em estufa a 25 °C.

Os resultados foram analisados pela velocidade de degradação de fenol (v), utilizando a equação 1.

$$v = \frac{C_i - C_f}{t_f} \quad (1)$$

Onde: C_i = concentração inicial de fenol (mg.L⁻¹)

C_f = concentração final de fenol (mg.L⁻¹)

t_f = tempo em que ocorreu a degradação (horas)

2.4. Estudo da influência dos parâmetros de cultivo na degradação do fenol

Foi utilizado o mesmo tipo de biorreator citado no item 2.3. A temperatura de todos experimentos foi controlada a 25 °C, sendo que os experimentos estáticos foram conduzidos em estufa com circulação de ar e os experimentos realizados sob agitação foram conduzidos em incubadora rotatória.

O inóculo foi preparado conforme resultado obtido no estudo do tipo de inóculo.

Foi realizado um planejamento fatorial completo envolvendo 3 variáveis (2³ ensaios mais três pontos centrais), visando aumentar a eficiência de degradação do fenol pelo fungo *Aspergillus sp.* LEBM2. Nos experimentos, acompanhou-se a concentração de fenol e de glicose, e a resposta analisada foi a velocidade de degradação de fenol (equação 1).

Na tabela 1 estão apresentadas os níveis codificados e valores reais utilizados no planejamento experimental.

Tabela 1: Níveis codificados e valores reais utilizados no planejamento experimental.

Variável	-1	0	+1
Concentração de glicose (mg.L ⁻¹)	0	250	500
Volume de inóculo (%)	10	15	20
Agitação (rpm)	0	100	200

2.5. Acompanhamento do processo degradativo

Utilizando a melhor condição estabelecida pelo planejamento experimental, o processo degradativo promovido por *Aspergillus* sp. LEBM2 foi acompanhada pelas medidas de pH, biomassa, DQO, concentração de fenol e concentração de glicose.

2.6. Avaliação da tolerância ao fenol

A partir da melhor condição estabelecida pelo planejamento experimental, foram realizados testes de degradação em concentrações crescentes de fenol, em triplicata. Foram construídas curvas cinéticas de degradação, avaliando as velocidades de degradação, utilizando a Equação 1, visando determinar o efeito da concentração de fenol e a tolerância do fungo filamentoso ao mesmo.

2.7. Determinação do fenol total

Para a determinação do conteúdo total de fenol o método adotado foi o que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, envolvendo a adição sucessiva de 1 mL de carbonato de sódio (20 g.L⁻¹) e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:1), para 10 mL da amostra filtrada. Depois de 30 min, leu-se a absorbância a 25 °C, 750 nm contra água destilada e reagente branco. Utilizou-se curva padrão de fenol na faixa de concentração de 0,25 a 10 mg.L⁻¹ de fenol (GARCÍA *et al.*, 2000).

2.8. Determinação de glicose

A glicose foi quantificada pelo método do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Leu-se a absorbância a 25°C a 540 nm contra água destilada e reagente branco. Utilizou-se curva padrão de glicose na faixa de concentração de 100 a 1000 mg.L⁻¹ (MILLER, 1959).

2.9. Determinação da biomassa

O acompanhamento do crescimento da biomassa microbiana foi medido pela massa seca, separando-a por filtração com papel filtro Whatman nº1, fazendo-se secagem à 105 °C, até peso constante (BURKERT *et al.*, 2003).

2.10. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A matéria orgânica foi oxidada em presença de dicromato de potássio em meio fortemente ácido. O dicromato não reduzido foi titulado com sulfato ferroso amoniacal na presença de indicador ferroína, permitindo calcular a quantidade de dicromato consumido pela matéria orgânica (APHA, 1998).

2.11. pH

O pH foi acompanhado utilizando-se um medidor de pH.

3. RESULTADOS

3.1. Estudo do efeito do tipo de inóculo na degradação do fenol

A figura 1 mostra as concentrações de fenol ao longo do tempo e os desvios obtidos para os ensaios de degradação de fenol utilizando diferentes inóculos. Pode-se observar que a degradação foi mais rápida para o inóculo preparado com mistura de glicose e fenol, com término em 392 h. Convém ressaltar

que em todos os casos a degradação foi considerada total. Não houve perdas abióticas significativas.

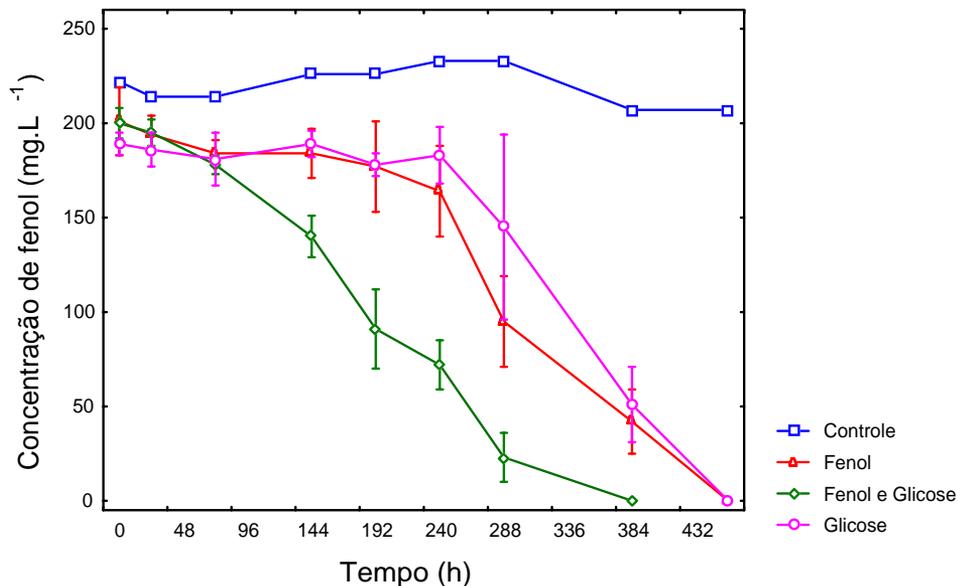


Figura 1: Ensaios de degradação de fenol utilizando diferentes tipos de inóculo de *Aspergillus* sp. LEBM2.

A figura 2 apresenta as médias de velocidade de degradação de fenol obtidas com o uso de diferentes inóculos. Realizando-se uma análise estatística de diferença de médias através do teste de Tukey, observou-se que a velocidade média obtida usando-se o inóculo preparado com glicose e fenol foi estatisticamente superior (média de $0,67 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e diferente dos demais inóculos. Foi observado que não houve diferenças significativas entre as médias de velocidades obtidas com os inóculos preparados somente com glicose ou fenol.

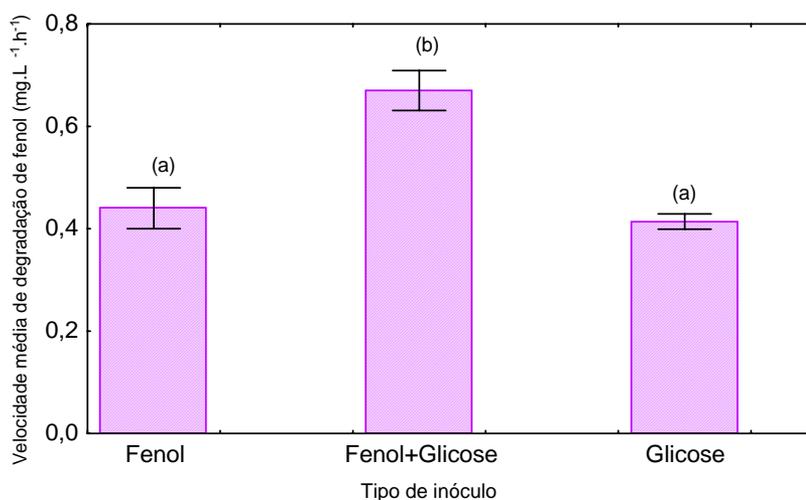


Figura 2: Velocidades médias de degradação de fenol para os diferentes inóculos testados e \pm desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferença significativa; letras distintas indicam diferença significativa entre as velocidades, a 95% de confiança.

A partir desse estudo pode-se constatar que a etapa de adaptação do microrganismo ao agente tóxico, durante o preparo do inóculo, é muito importante, pois quando se utilizou o inóculo preparado com glicose e fenol houve incremento significativo na velocidade de degradação de fenol (cerca de 1,26 vezes). Conforme CHEN *et al.* (2002), a adaptação ou aclimatação aumenta a velocidade de degradação e tolerância ao fenol, tornando o processo biológico mais eficiente.

Pode-se observar também, pela figura 1, que nos ensaios com inóculo contendo somente glicose ou fenol, nas primeiras 240 h tem-se um patamar com pouca variação na concentração de fenol. Provavelmente o microrganismo que cresceu somente em glicose estava mais sensível ao efeito tóxico do substrato, ampliando a fase lag na etapa de degradação, acarretando a menor velocidade de degradação. Quando o inóculo foi preparado somente com fenol, talvez esse meio não tenha dado suporte suficiente para o crescimento do microrganismo de forma que prontamente degradasse o contaminante após a inoculação, tendo sido observado, visualmente, menor formação de massa micelial neste inóculo. Logo, a presença de uma fonte primária de carbono em conjunto com contaminante tóxico no preparo do inóculo, com simultâneo favorecimento do crescimento e adaptação à

toxicidade, representou um fator muito importante para o processo de degradação, pois foi o diferencial que proporcionou ao fungo maior velocidade de degradação.

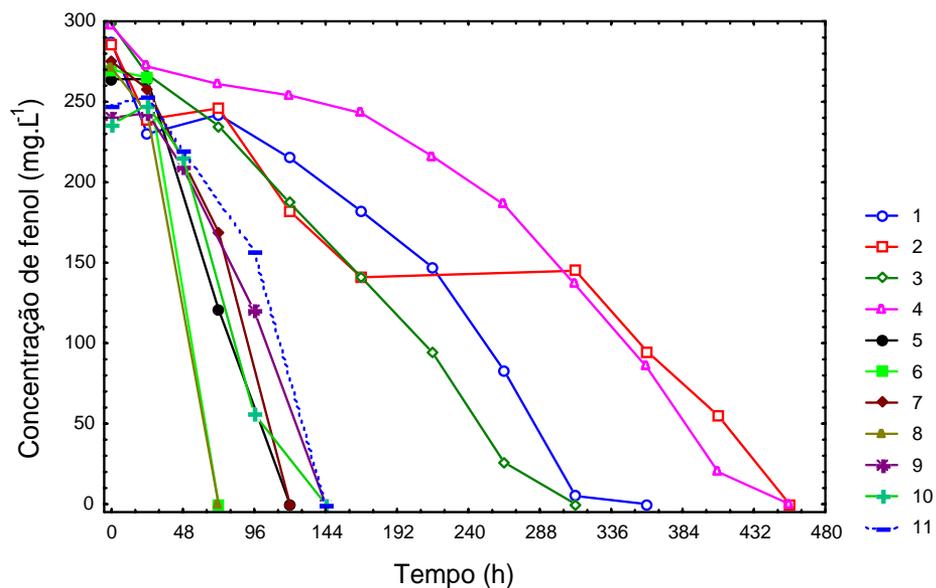
3.2. Influência dos parâmetros de cultivo na degradação do fenol

As curvas obtidas para o consumo de fenol e glicose para os 11 ensaios do planejamento experimental proposto (tabela 2) são mostradas nas figuras 3 (a) e 3 (b). A partir destes resultados foi possível calcular, de acordo com a equação 1, as respectivas velocidades de degradação de fenol. Estes valores são mostrados na tabela 2.

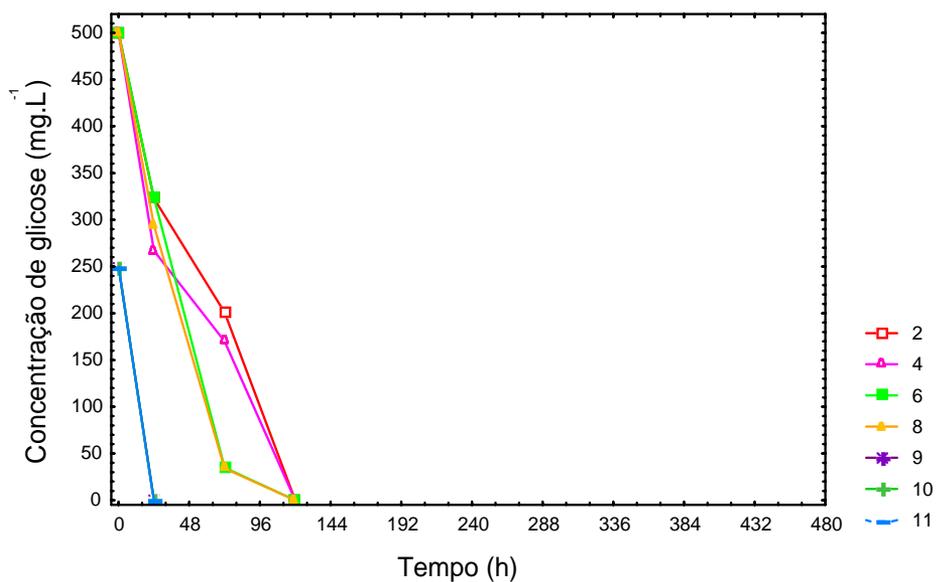
Tabela 2: Resultados da velocidade de degradação para os ensaios do planejamento experimental.

Ensaio	Concentração de glicose (mg.L ⁻¹)	Volume de inóculo (%)	Agitação (rpm)	Velocidade de degradação de fenol (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	-1 (0)	-1 (10)	-1 (0)	0,79
2	+1 (500)	-1 (10)	-1 (0)	0,58
3	-1 (0)	+1 (20)	-1 (0)	0,95
4	+1 (500)	+1 (20)	-1 (0)	0,65
5	-1 (0)	-1 (10)	+1 (200)	2,20
6	+1 (500)	-1 (10)	+1 (200)	3,75
7	-1 (0)	+1 (20)	+1 (200)	2,29
8	+1 (500)	+1 (20)	+1 (200)	3,76
9	0 (250)	0 (15)	0 (100)	1,66
10	0 (250)	0 (15)	0 (100)	1,63
11	0 (250)	0 (15)	0 (100)	1,72

Analisando a tabela 2, pode-se observar que a velocidade de degradação de fenol variou de 0,58 a 3,76 mg.L⁻¹.h⁻¹, notando-se que os menores valores relatados foram quando o experimento foi realizado de forma estática (sem agitação). Por outro lado, observou-se que a velocidade de degradação aumenta consideravelmente quando se agita o frasco proporcionando assim maior aeração do meio.



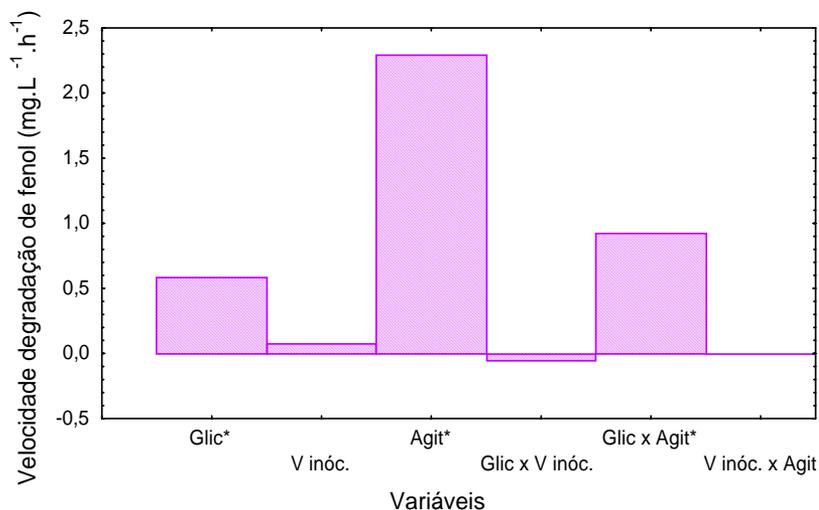
(a)



(a)

Figura 3: Ensaio de degradação de fenol proposto no planejamento experimental (a) Concentração de fenol ao longo do tempo. (b) Concentração de glicose ao longo do tempo. Nos ensaios 1, 3, 5 e 7 não foi utilizada a glicose (nível -1).

A partir desses resultados foram determinados os efeitos das variáveis sobre a velocidade de degradação de fenol, conforme apresentado na figura 4, onde se pode observar que as variáveis concentração de glicose e agitação influenciaram positivamente na degradação do fenol, bem como a interação entre estas variáveis.



* Fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

Figura 4: Efeito das variáveis sobre a velocidade de degradação de fenol.

Para verificação da validade do modelo linear da velocidade de degradação do fenol em função das variáveis significativas codificadas (Equação 2), foi realizada uma análise de variância (ANOVA), conforme tabela 3, de acordo com RODRIGUES & IEMMA (2005), onde observa-se a validade do modelo pelo teste F, que foi 109,65 vezes maior que o tabelado, obtendo-se também bom coeficiente de correlação. Portanto, foi gerada a superfície de resposta apresentada na figura 5.

$$v = 1,82 + 0,29\text{glic} + 1,14\text{agit} + 0,46\text{glic} \times \text{agit} \quad (2)$$

Tabela 3: Análise de variância para a velocidade de degradação de fenol ao longo do tempo.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	Teste F
Regressão	3	12,879	4,293	477
Resíduo	7	0,064	0,009	
Falta de ajuste	5	0,060	0,012	
Erro puro	2	0,004		
total	10	12,944		

Coefficiente de correlação: 0,995

$F_{0,95; 3; 7} = 4,35$

Foram calculados, conforme apresentado na tabela 4, os desvios relativos entre as respostas experimentais e previstas pelo modelo, mostrando que a Equação 2 realmente é válida, já que os desvios ficaram abaixo de 20 %, valor considerado satisfatório para experimentos com fungos filamentosos. Os ensaios 6 e 8 do planejamento experimental, correspondentes a região de interesse, onde foram obtidas as melhores respostas em termo da velocidade de degradação, apresentaram desvio relativo de 1,07 e 1,33% respectivamente, considerados muito satisfatórios.

Tabela 4: Desvios relativos entre os dados experimentais e previstos pelo modelo.

Ensaio	Concentração de glicose (mg.L ⁻¹)	Volume de inóculo (%)	Agitação (rpm)	Velocidade de degradação experimental (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Velocidade prevista (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Desvio Relativo (%)
1	-1 (0)	-1 (10)	-1 (0)	0,79	0,85	-7,60
2	+1 (500)	-1 (10)	-1 (0)	0,58	0,51	12,07
3	-1 (0)	+1 (20)	-1 (0)	0,95	0,85	10,53
4	+1 (500)	+1 (20)	-1 (0)	0,65	0,51	21,54
5	-1 (0)	-1 (10)	+1 (200)	2,20	2,21	-0,46
6	+1 (500)	-1 (10)	+1 (200)	3,75	3,71	1,07
7	-1 (0)	+1 (20)	+1 (200)	2,29	2,21	3,49
8	+1 (500)	+1 (20)	+1 (200)	3,76	3,71	1,33
9	0 (250)	0 (15)	0 (100)	1,66	1,82	-9,64
10	0 (250)	0 (15)	0 (100)	1,63	1,82	-11,66
11	0 (250)	0 (15)	0 (100)	1,72	1,82	-5,81

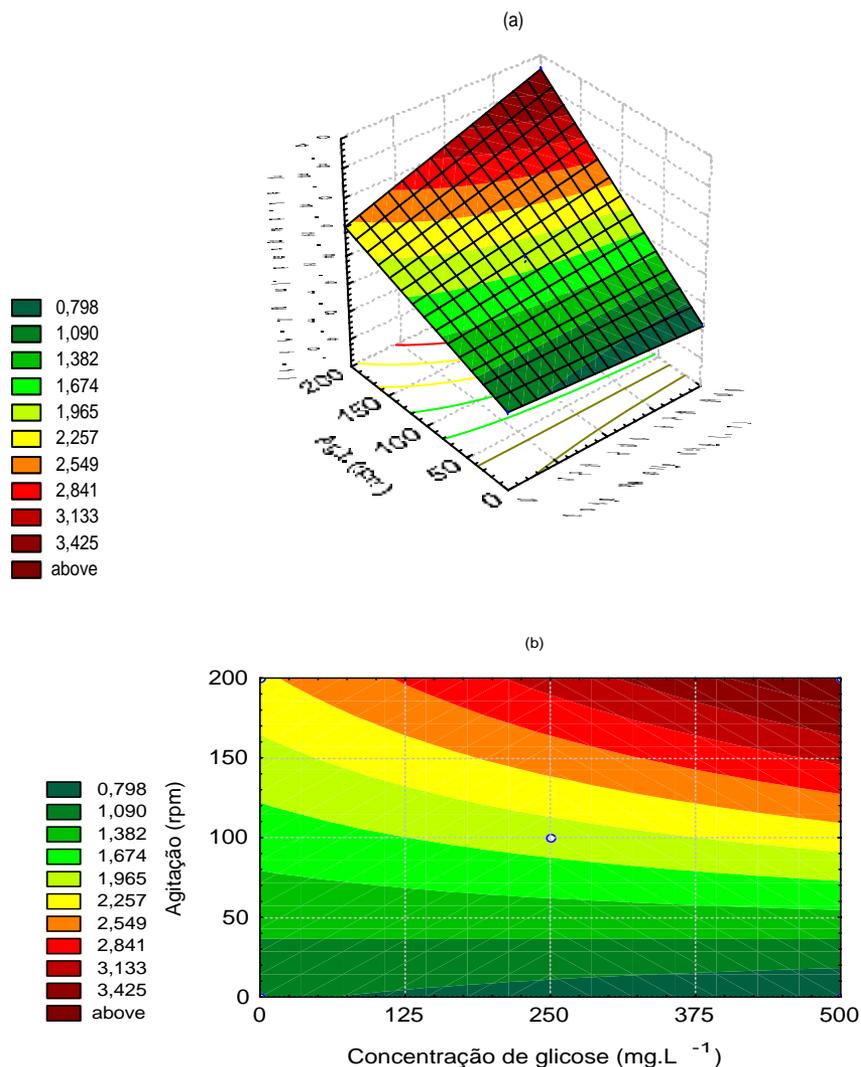


Figura 5: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para velocidade de degradação de fenol em relação à concentração de glicose e velocidade de agitação.

De acordo com a superfície de resposta (figura 5 – a), e análise dos efeitos (figura 4), comprova-se que ao mudar a concentração de glicose de -1 (0 mg.L^{-1}) para $+1$ (500 mg.L^{-1}) e a agitação de 0 (-1) para 200 rpm ($+1$), ocorreu um aumento substancial na velocidade de degradação do fenol.

Também se observa na figura 5 - b, que para valores de agitação abaixo de 100 rpm , o aumento da concentração de glicose tem menor influência na

velocidade de degradação, sendo a agitação um parâmetro fundamental para o desempenho do microrganismo no processo degradativo.

Com base nestas observações pôde-se constatar que as melhores condições a serem utilizadas que diminuem o tempo de degradação de fenol são 500 mg.L⁻¹ de glicose e 200 rpm de agitação, independente do volume de inóculo, conseguindo um aumento de 6,28 vezes na velocidade de degradação quando comparado ao ensaio menos eficiente. Sugere-se que seja utilizado o maior volume de inóculo testado, para garantir a eficiência do processo para maiores concentrações de fenol, já que se trata de uma substância tóxica.

Tendo-se em vista as análises de acompanhamento do consumo de glicose e fenol, verificou-se que o fungo consumiu preferencialmente o primeiro componente, provavelmente por se tratar de uma fonte primária de carbono. Após o consumo da glicose, o fenol continua sendo consumido, confirmando que o *Aspergillus* sp. LEBM2 também utiliza fenol em seu metabolismo como única fonte de carbono. No entanto, o incremento da velocidade de degradação de fenol, ao utilizar-se maior concentração de glicose no meio explica-se devido a glicose ser um composto preferencialmente assimilado pelos fungos (GRIFFIN, 1994, citado por FELIX *et al.*, 2005), e sua presença no substrato não implica que outros compostos não possam ser utilizados, o que indica a presença de um cometabolismo. Devido à habilidade catalítica não específica de algumas enzimas e cofatores, a transformação de muitos contaminantes orgânicos podem ocorrer sem nenhum benefício para a produção de energia ou requerimentos de nutrientes pelo microrganismo. As reações cometabólicas podem ser oxidativas ou redutivas dependendo do biocatalisador e do contaminante específico de interesse (WARD *et al.*, 2002). Esta habilidade de degradar fenol, mesmo na presença de glicose, implica na capacidade que o fungo tem de remover fenol em efluentes, solos e aquíferos que contenham outras fontes de carbono mais facilmente assimiláveis.

O efeito positivo da agitação é explicado devido a proporcionar aumento da aeração no biorreator, favorecendo o crescimento do fungo, constituindo um fator muito importante para o sucesso da bioaugmentação devido ao metabolismo aeróbico do fungo estudado.

3.3. Acompanhamento do processo de degradação

Os resultados do acompanhamento do processo degradativo de fenol pelo fungo *Aspergillus* sp. LEBM2, nas condições estabelecidas pelo planejamento experimental (correspondente ao ensaio 8), são apresentadas na figura 6.

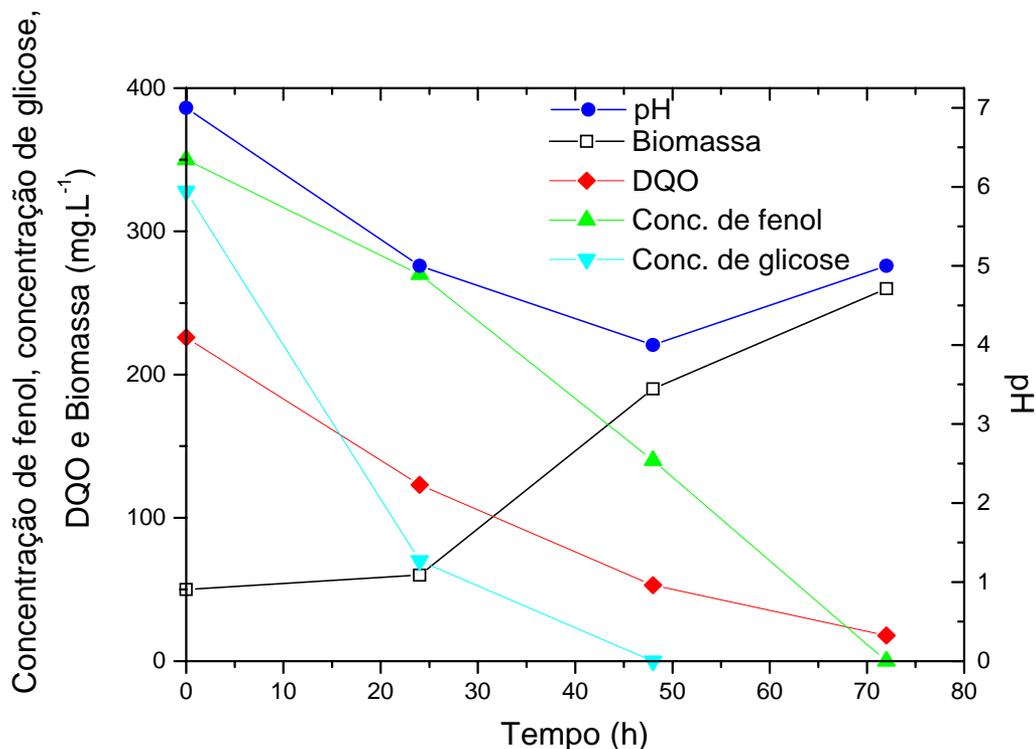


Figura 6: Acompanhamento do processo de degradação de fenol em água residuária sintética.

Observou-se no ensaio de degradação, realizado a uma concentração mais alta de fenol (350 mg.L^{-1}), que o microrganismo decompôs o composto tóxico em 72h, aumentando a velocidade de degradação de $3,76 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, anteriormente encontrado, para $4,86 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O provável motivo para que a velocidade de degradação tenha sido maior é a temperatura, que para esse experimento ficou em torno de 30°C , devido às condições experimentais do laboratório, podendo constituir uma variável importante do processo. A glicose, assim como nos ensaios anteriormente citados, continuou a ser consumida preferencialmente.

Outro resultado bastante importante foi à redução da DQO. Foi observada uma redução de 92 % do requerimento químico de oxigênio, o que significa que o método utilizado é eficiente também para promover uma redução da DQO, já que altos níveis de matéria orgânica no ambiente podem causar uma desestabilidade no conteúdo de oxigênio disponível, principalmente em mananciais e aquíferos, mostrando que esse fungo apresenta potencial para ser utilizado em processos de bioaumentação para remoção de matéria orgânica.

GARCÍA *et al.* (2000) obtiveram, para efluente da industrialização de azeite de oliva, cerca de 78 % de remoção de DQO com *Phanerochaete chrysosporium* em 144 h, 72 % com *Aspergillus niger* em 115 h e cerca de 63 % com *Aspergillus terreus* em 112 h.

Quanto ao crescimento celular, o microrganismo ainda apresentou um aumento na biomassa de 5,2 vezes em relação à biomassa inicial, verificando-se crescimento mesmo após esgotamento da glicose, o que indica que o fungo também utiliza o fenol como fonte de carbono para o crescimento celular.

De modo geral existe pouca informação a respeito do efeito do pH sobre o crescimento dos fungos, porém esses microrganismos freqüentemente alteram o pH do meio no qual se encontram, em virtude do seu metabolismo, através da retirada de ânions e cátions e produção de ácidos orgânicos e amônia. Nesse ensaio, foi verificada uma diminuição do pH inicial, de 7,0 para 5,0, ficando próximo ao pH 4, o que não ofereceu problemas ao metabolismo do fungo já que o pH 4 é considerado ótimo à maioria dos fungos do gênero *Aspergillus* (RODRIGUES *et al.*, 2005).

3.4. Avaliação da tolerância ao fenol

A figura 7 (a) apresenta os resultados obtidos para a degradação de fenol, utilizando diferentes concentrações do mesmo. Pode-se observar que a degradação ocorreu em tempos diferentes, conforme está apresentado na tabela 5, havendo aumento no tempo de degradação conforme incremento na concentração de fenol. Pode-se ressaltar que a degradação foi total até a concentração de $989 \pm 15 \text{ mg.L}^{-1}$ de fenol.

Assim como ocorreu no estudo dos parâmetros de cultivo, a glicose continuou a ser consumida preferencialmente e mais rapidamente que o fenol, para todas as concentrações, comprovando mais uma vez que o fungo consumiu a fonte primária de carbono preferencialmente, mas simultaneamente ao fenol, para após consumir todo o conteúdo fenólico, até uma dada concentração [figura 7 (b)].

Observa-se também, pela figura 7 (b), que aumentando-se a concentração de fenol, a glicose foi consumida mais lentamente, demonstrando claramente o efeito inibidor do fenol sobre o metabolismo do fungo filamentososo.

Tabela 5: Dados referentes ao tempo de degradação e a velocidade média de degradação para diferentes concentrações de fenol.

Concentração inicial de fenol (mg.L ⁻¹)	Tempo de degradação (h)	Velocidade média de degradação (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
320 ± 0,57	72	5,18
581 ± 57	120	4,84
663 ± 20	192	3,45
743 ± 22	288	3,17
989 ± 15	600	1,66
1166 ± 11	-	-

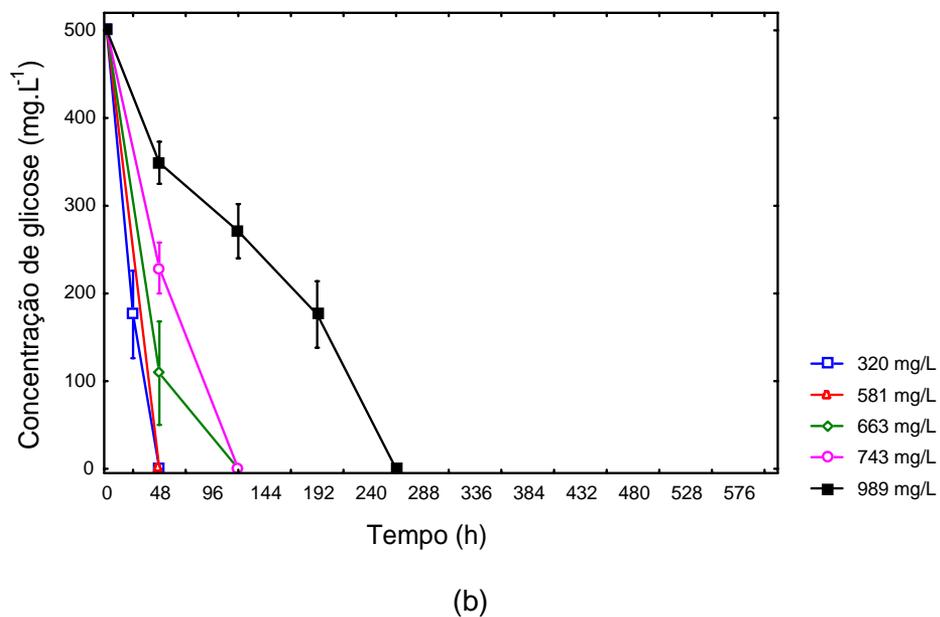
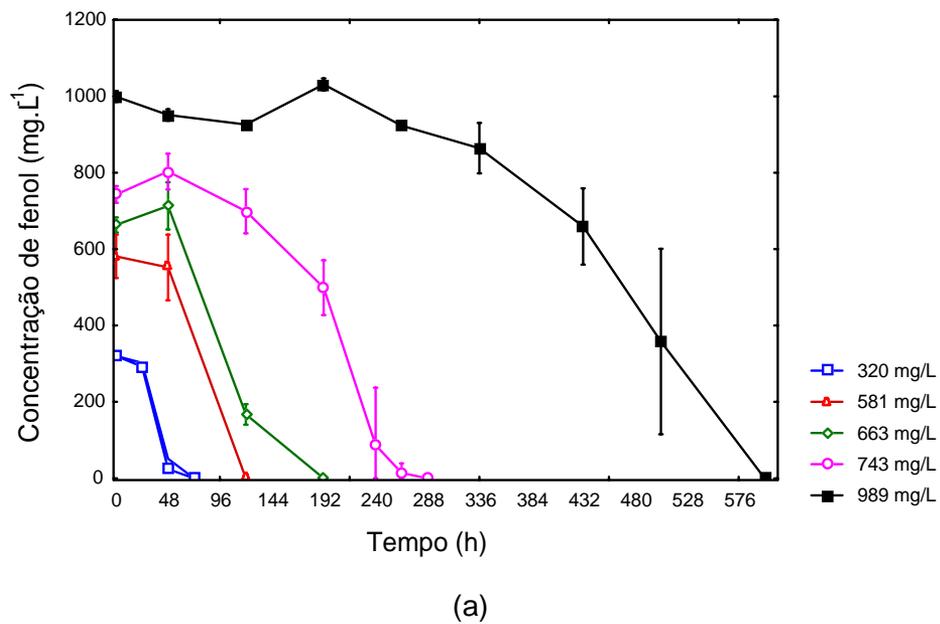


Figura 7: Ensaio de degradação de fenol em diferentes concentrações iniciais. (a) Concentração de fenol ao longo do tempo; (b) Concentração de glicose ao longo do tempo.

Através de uma análise estatística, utilizando o teste t (LSD), como pode ser observado na figura 8, foi verificado que as velocidades de degradação de $320 \pm 0,57$ e 581 ± 57 mg.L⁻¹ de fenol são estatisticamente iguais entre si, mas se diferenciam das velocidades de degradação nas concentrações de 663 ± 20 , 743 ± 22 e 989 ± 15 mg.L⁻¹. Também não foi observada diferença significativa na velocidade de degradação de fenol entre as concentrações de 663 ± 20 e 743 ± 22 mg.L⁻¹. A concentração de 989 ± 15 mg.L⁻¹ foi diferente de todos os outros ensaios, apresentando velocidade de degradação de fenol bem menor, provavelmente por estar se aproximando do limite de tolerância ao fenol. Este valor de concentração pode ser considerado bastante elevado tratando-se de fenol, o que possibilita afirmar que *Aspergillus* sp. LEBM2 apresenta alta tolerância ao fenol, sendo capaz de degradá-lo totalmente mesmo em altas concentrações. Pode-se constatar ainda, que a velocidade de degradação não está ligada a uma concentração específica do fenol, mas a faixas de concentração do composto tóxico.

Não foi observada variação expressiva na concentração de fenol para a concentração inicial de 1166 ± 11 mg.L⁻¹ durante o período de cultivo, apesar do consumo de glicose.

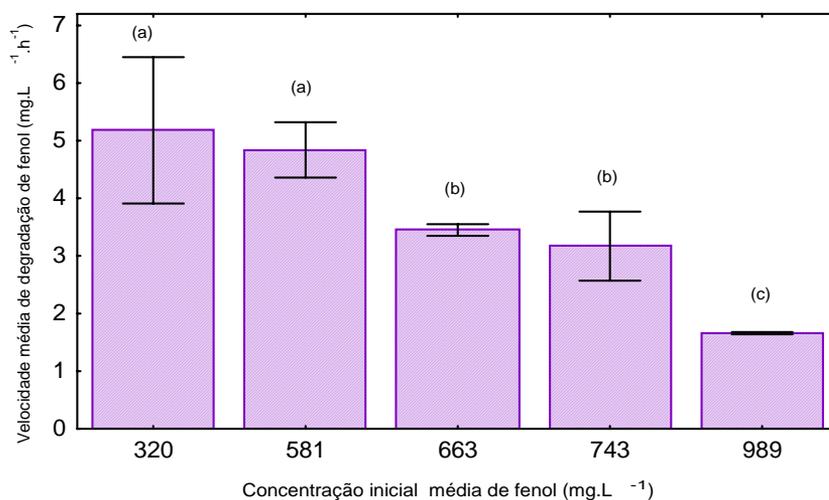


Figura 8: Velocidades médias de degradação de fenol para as diferentes concentrações de fenol testadas (e \pm desvio padrão). Letras iguais indicam que não

há diferença significativa; letras distintas indicam diferença significativa entre as velocidades, a 95% de confiança.

Em estudos em que foram avaliadas as degradações de fenol por fungos do mesmo gênero, obtiveram degradações a concentrações máximas inferiores às relatadas no presente trabalho (RODRIGUES *et al.*, 2005; FÉLIX *et al.*, 2005, HAMED *et al.*, 2004, JIMÉNEZ *et al.*, 2003), e na mesma faixa de concentração (SANTOS & LINARDI, 2004).

GARCÍA *et al.* (2000), utilizando *Aspergillus niger* e 1250 mg.L⁻¹ de fenóis conseguiram degradar até 300 mg.L⁻¹ (76 %) em 115 h (8,26 mg.L⁻¹.h⁻¹), mas em um meio nutricional mais rico (efluente de azeite de oliva).

No trabalho de SANTOS & LINARDI (2004), foram observados decréscimos pronunciados no percentual de degradação para concentrações de fenol acima de 6 mM (588 mg.L⁻¹). Para cepas de *Aspergillus*, os percentuais de degradação variam de cerca de 90 % (até 6 mM) até 4 % (10 mM), com velocidades de degradação na faixa de 3 a 4 mg.L⁻¹.h⁻¹.

Desta forma é importante destacar que com *Aspergillus* sp. LEBM2 foi possível a degradação total em altas concentrações de fenol, mesmo com decréscimo na velocidade de degradação.

4. CONCLUSÕES

Constatou-se que a adaptação do fungo *Aspergillus* sp. LEBM2 em meio contendo fenol e glicose, ambos na concentração de 250 mg.L⁻¹, como fontes de carbono, possibilitou uma maior velocidade de degradação de fenol, tornando o processo mais eficiente.

O estudo em biorreator em batelada para a degradação de fenol com o fungo *Aspergillus* sp. LEBM2 apresentou resultados bastante significativos, permitindo otimizar algumas variáveis que incrementaram a velocidade de degradação de fenol em até 6,48 vezes. As melhores condições para este tipo de processo foram a concentração de 500 mg.L⁻¹ de glicose com velocidade de agitação de 200 rpm, independente do volume de inóculo, sugerindo-se que seja

utilizado um volume de 20 % para garantir a eficiência do tratamento para maiores concentrações de fenol.

Quanto à tolerância do fungo ao composto tóxico, observou-se que o *Aspergillus sp.* LEBM2 degrada totalmente o fenol do meio até uma concentração de $989 \pm 15 \text{ mg.L}^{-1}$ a uma velocidade de degradação de $1,66 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Em concentrações mais baixas de fenol, foram observadas velocidades de degradação de até $5,18 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para a concentração de $320 \pm 0,57 \text{ mg.L}^{-1}$, não havendo diferença significativa nas velocidades obtidas para as concentrações de até $581 \pm 57 \text{ mg.L}^{-1}$ de fenol.

Desta forma, pode-se considerar que o fungo filamentososo *Aspergillus sp.* LEBM2 tem alta tolerância ao fenol, sendo capaz de degradá-lo mesmo em altas concentrações, apresentando potencial quanto ao uso em processos de bioaumentação.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a contribuição financeira ao CNPq, o qual possibilitou a realização desse trabalho.

6. REFERÊNCIAS

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, **Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater**, 20^a ed., 1998.

ASSAS, N., AYED L., MAROUANI, L., HAMDI, M., Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewater by *Geotrichum candidum*, **Process Biochemistry**, v. 38, p. 361-365, 2002.

BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J., SANZO, A. V. L., SANTOS, E. O., RIBEIRO, F., Fungos filamentosos degradadores de poluentes orgânicos: avaliação das velocidades de crescimento radial em diferentes hidrocarbonetos, **Anais do**

XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Curitiba-PR, setembro de 2004.

BURKERT, J.F.M.B., Otimização das Condições de Produção de Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL – Y552, Campinas, 2003. **Tese** (Doutorado em Engenharia de alimentos) – Universidade de Campinas, 2003, 172 p.

CAPREZ, M. A. C., BORGES, A. L. N., BISPO, M. G., PEREIRA, D., Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo, **Ciência Hoje**, v. 30/179, p 32-37, 2002.

CHEN, K.C., LIN, Y.H., CHEN, W.H., LIN, Y.C., Degradation of phenol by PAA – immobilized *Candida tropicalis*, *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p. 490 – 497, 2002.

COLOMBO, J. C., CABELLO, M., ARAMBARRI, A. M., Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi, **Environmental Pollution**, v. 94/3, p. 355-362, 1996.

CUNHA, C. D., ROSÁRIO, M., ROSADO, A. S., LEITE, S.G.F., Screening of microorganisms with potential to produce biosurfactants in the presence of gasoline, **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, p. 362, Foz do Iguaçu-PR, 2001.

ELMALEH, S., DEFRANCE, M.B., GHOMMIDH, C., Organic acids oxidation by *Candida utilis*: application to industrial waste water treatment, **Process Biochemistry**, v. 35, p. 441-449, 1999.

FADIL, K., CHAHLAOUI A., OUAHBI A., ZAID A., BORJA, R., Aerobic biodegradation and detoxification of wastewater from the olive oil industry, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p 37-41, 2002.

FÉLIX, J.P.L., SANTAELLA, S.T., NETO, M.A.F., Remoção de fenóis em águas residuárias de indústrias petrolíferas por fungos: influência da adição de glicose, **Anais do XV SINAIFERM**, Recife-PE, 2005.

FIALOVÁ, A., BOSHKE, E., BLEY, T., Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 69-76, 2004.

GARCÍA, I.G., PEÑA, P.R.J., VENCESLADA, J.L.B., MARTÍN, A.M., SANTOS, M.A.M., GÓMEZ E.R., Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*, **Process Biochemistry**, v. 35, p 751-758, 2000.

GARCÍA, I.G., VENCESLADA, B., PEÑA, P.R.J., GOMÉZ, E.R., Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*, **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 2005-2011, 1997.

HAMED, T.A., BAYRAKTAR, E., MEHMETOGLU, U., MEHMETOGLU, T., The biodegradation of benzene, toluene and phenol in a two-phase system, **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 137-146, 2004.

HEINARU, A., Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted área, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 363-373, 2005.

HOYOS, S.E.G, NIETO, L.M., RUBIO, F.C., CORMENZANA, A.R., Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*, **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1169-1176, 2002.

JIMÉNEZ, A.M., BORJA, R., MARTÍN, A., Aerobic-anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater, **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1275-1284, 2003.

MILLER, G. L, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

RIGO, M., ALEGRE, R.M., Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from industrial wastewaters and kinetics of the biodegradation, **Folia Microbiologica**, v. 49/1, p. 41-45, 2004.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F., **Planejamento de Experimentos e Otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Casa do Pão Editora, 326 p., Campinas – SP, 2005.

RODRIGUES, K.A., SANTAELLA, S.T., SAMPAIO, G.M.M.S., ZAIAT, M., Remoção de fenol de água residuária sintética por uso de reator com fungos, **Anais do XV SINAFERM**, Recife-PE, 2005.

SANCINETTI, S.T., FÉLIX, J.P.L., NETO, M.A.F., Remoção de fenóis em águas residuárias de indústrias petrolíferas por fungos: influência da adição de glicose, **Anais do XIV SINAFERM**, 2003.

SANTOS, E. O., ROSA, C. F. C., SANZO, A. V. L., KALIL, S. J., BURKERT, C. A. V., Fungos filamentosos degradadores de poluentes: avaliação das velocidades de crescimento radial em diferentes concentrações de fenol, **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Recife-PE, setembro de 2004.

SANTOS, V.L., LINARDI, V.R., Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potencial, **Process Biochemistry**, v. 39, p 1001-1006, 2004.

THASSITOU P.K., ARVANITTOYANNIS, I.S., Bioremediation: a novel approach to food waste management, **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 185-196, 2001.

VOGEL, T.M., Bioaugmentation as a soil bioremediation approach, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 311-315, 1996.

WARD, C.H., DUSTON, K.L., HUGHES, J.B., **Engineer and Bioremediation**, Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston, 2002.

WATANABE, K., Linking genetics, physiology and ecology: an interdisciplinary approach for advancing bioremediation, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94/6, p. 557-562, 2002.

YAN, J., JIANPING, W., HANGMEI, L., SOLIANG, Y., TONGDING, H., The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*, **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 243-247, 2005.

BIODEGRADAÇÃO DE FENOL POR *Aspergillus* sp. LIVRE E ENCAPSULADO: UM ESTUDO COMPARATIVO

PASSOS, C.T.¹, BURKERT, J. M.¹, KALIL, S.J.², BURKERT, C.A.V.^{1*}

1-Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química
Laboratório de Engenharia de Bioprocessos¹ – Laboratório de Microbiologia²
Rua Alfredo Huch, 475, 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil

RESUMO

A biodegradação do fenol tem sido bastante investigada a fim de reduzir a sua concentração para que não seja mais tóxico ao ambiente e à saúde humana. Técnicas promissoras para a biorremediação de áreas impactadas têm emergido, como a bioaugmentação, onde a utilização de microrganismos encapsulados ganha atenção devido a diversas vantagens que apresenta, como menor estresse biótico e abiótico, distribuição satisfatória em sedimentos e aquíferos e não compactação do solo. O objetivo do presente trabalho foi comparar a eficiência da degradação de fenol utilizando *Aspergillus* sp. LEBM2 de forma livre e encapsulado em alginato de cálcio. Foi verificado aumento na velocidade de degradação de fenol ao utilizar o fungo na forma encapsulada, em relação às células livres, sendo observado um incremento nas velocidades de degradação variando de 11,6 % a 49,2 %. Isso indicou a presença de um microambiente mais favorável para a biodegradação, pelo efeito protetor da matriz do gel, reduzindo o estresse abiótico. Logo, a técnica de encapsulação utilizando o fungo filamentososo *Aspergillus* sp. LEBM2 mostrou-se promissora para aplicação em processos de bioaugmentação.

PALAVRAS-CHAVE: biodegradação, encapsulação, fenol, fungos filamentosos

ABSTRACT

Phenol biodegradation had been investigated to reduce its concentration until an adequate level for environment and human health. New techniques to bioremediation of impacted areas had been proposed. Bioaugmentation using encapsulated microorganisms shows several advantages, such as protection against abiotic and biotic stress, satisfactory distribution in sediments and aquifers and no soil particle aggregation. The main goal of this work was to compare the degradation efficiency using free and encapsulated cells of *Aspergillus* sp. LEBM2. It was verified an increase in phenol degradation rate with encapsulated cells in calcium alginate, in relation to free cells (11.6 % until 49.2 %). This fact indicates a presence of a microenvironment more favorable to biodegradation, because of the protector effect of gel matrix, reducing abiotic stress. Filamentous fungus *Aspergillus* sp. LEBM2 showed a promise application in bioaugmentation processes.

KEY WORDS: biodegradation, encapsulation, phenol, filamentous fungi

* Autor para correspondência:
Telefone: (53) 32338754
E-mail: burkert@vetorial.net

1. INTRODUÇÃO

Os fenóis constituem contaminantes perigosos encontrados em efluentes de diversas indústrias incluindo a indústria petroquímica, farmacêutica, química e de alimentos. Sua toxicidade é tal que para a maioria dos microrganismos (principalmente não aclimatados) uma concentração relativamente baixa de 10 mg.L⁻¹ é letal, causando problemas em estações de tratamento de efluentes, sendo que concentrações de 5 a 25 mg.L⁻¹ de fenol comprometem a sobrevivência dos peixes e outros animais marinhos de importância comercial (YAN *et al.*, 2005).

Em muitos países agências de proteção ambiental citam o fenol como um dos principais poluentes para o ambiente. Numerosos estudos têm sido realizados utilizando microrganismos degradadores, isolados em laboratório, para investigar sua capacidade degradativa (WATANABE, 2002). Um estudo anterior isolou diversos microrganismos a partir de solo contaminado na cidade do Rio Grande/ RS – Brasil, os quais foram identificados e caracterizados quanto à capacidade de crescimento em diferentes hidrocarbonetos, apresentando potencial degradativo para hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e clorados (BURKERT *et al.*, 2004). No caso específico do fenol, foi observada tolerância de até 500 mg.L⁻¹ pelas linhagens de *Aspergillus* sp. LEBM1 e LEBM2, tendo este último apresentado maior velocidade de crescimento microbiano na presença de fenol como única fonte de carbono (SANTOS *et al.*, 2004).

Microrganismos podem degradar numerosos poluentes orgânicos por seus mecanismos metabólicos e pela sua capacidade de se adaptar a ambientes inóspitos. Entretanto, sua eficiência depende de muitos fatores, incluindo a natureza química e a concentração do poluente, sua biodisponibilidade e as características físico-químicas do ambiente. Apesar da bioaugmentação já ser bastante aplicada, principalmente no solo, ela é ainda experimental. A aplicação dessa técnica apresenta algumas desvantagens, mas diversas estratégias tem sido estudadas para fazer da bioaugmentação uma tecnologia de sucesso (AGATHOS & FANTROUSSI, 2005; HEINARU *et al.*, 2005; SCOW & HICKS, 2005; GHAZALI, 2001).

A bioaugmentação é definida como a suplementação de microrganismos externos de ocorrência natural, tais como bolores, leveduras e bactérias em estações de tratamento de efluentes, na unidade de tratamento biológico, ou diretamente no ambiente, visando aumentar a eficiência dos processos biológicos (LAZZARETTI, 1998).

A maioria dos experimentos de bioaugmentação depende altamente da sobrevivência das células inoculadas. Sua sobrevivência pode ser promovida por sua imobilização em um carreador, como alginato, goma gelana, entre outros, o qual os protege contra a competição natural com a microflora local (JÉZÉQUEL *et al.*, 2005; MOSLEMY *et al.*, 2002; MOSLEMY *et al.*, 2003).

Entre os materiais para encapsulação, o mais largamente usado é o alginato, o qual é um heteropolissacarídeo de ácidos D-manurônico e D-gulurônico extraído de várias espécies de algas. As propriedades funcionais do alginato como material de suporte estão fortemente associadas com a composição e seqüência dos ácidos-gulurônico e D-manurônico. Cátions divalentes como Ca^{2+} ligam-se preferencialmente ao polímero do ácido L-gulurônico (CHEN *et al.*, 2005).

O uso de células encapsuladas para aplicações no ambiente tem muitas vantagens em relação às formulações com células livres, incluindo proteção do estresse biótico como a predação por protozoários e bacteriófagos, proteção do estresse abiótico como a inibição do efeito dos compostos tóxicos, promovendo a sobrevivência e a atividade fisiológica. A matriz porosa da cápsula permite ainda uma adequada difusão do contaminante, gases, nutrientes e produtos metabólicos, levando a descontaminação do local que está sendo tratado. Essa técnica ainda impede a compactação microbiológica do solo pela formação de polímeros extracelulares que impediriam a distribuição das células livres através de solo saturados. Já a aplicação de células degradadoras encapsuladas para a bioaugmentação em um aquífero contaminado tem a vantagem de promover suficiente distribuição hidráulica dos microrganismos dentro da matriz do aquífero (MOSLEMY *et al.*, 2002; MOSLEMY *et al.*, 2003; DEGALDILLO & NOGALES, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi comparar a eficiência da degradação de fenol com *Aspergillus sp.* LEBM2 livre e encapsulado em alginato de cálcio.

Foram construídas curvas cinéticas para diferentes concentrações de fenol avaliando-se velocidade de degradação, para verificar diferenças entre as técnicas e sugerir o melhor método a ser empregado em processos de bioaugmentação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado no trabalho foi o fungo filamentosso *Aspergillus* sp. LEBM2, isolado pelo Laboratório de Microbiologia – FURG, de um solo contaminado por hidrocarbonetos derivados do petróleo, na região da cidade do Rio Grande/RS, Brasil, sendo mantido a 4 °C, em ágar batata dextrose, até o momento da sua utilização (BURKERT *et al.*, 2004).

2.2. Preparo da água residuária sintética

A composição base da água residuária sintética utilizada nos experimentos foi (mg.L⁻¹): 400 KH₂PO₄; 200 MgSO₄. 7H₂O; 100 NaCl; 25 CaCl₂. 2H₂O; 3 MnSO₄. H₂O; 500 NH₄NO₃. H₂O (CUNHA *et al.*, 2001).

Para todos os experimentos, foi esterilizada a 120 °C por 15 min. A esta solução foram adicionadas as fontes de carbono, nas concentrações em estudo.

2.3. Suspensão de esporos

O microrganismo foi propagado em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de ágar batata dextrose. Os frascos foram mantidos a 25°C durante 5 dias até completa esporulação. Os esporos formados foram suspensos em água estéril com 0,2 % de Tween 80. A raspagem foi feita com alça de Drigalsky e, para a remoção do micélio da suspensão, esta foi filtrada com tela metálica, para posterior contagem de esporos em Câmara de Neubauer (SANZO, 1998).

2.4. Encapsulação dos esporos

Para a encapsulação dos esporos foram utilizados 20 mL de solução de alginato de sódio (esterilizado a 120 °C durante 15 min), o qual foi misturado com 5 mL da suspensão de esporos (5×10^6 esporos. mL⁻¹). As cápsulas de alginato-Ca de cerca de 3 mm de diâmetro foram obtidas por gotejamento da mistura da suspensão de esporos com a solução de alginato de sódio, em cerca de 100 mL de solução de CaCl₂ 0,2 M. As cápsulas permaneceram durante 1 h em CaCl₂ à 4 °C, e após foram lavadas 2 a 3 vezes com H₂O destilada estéril (JÉZÉQUEL *et al.*, 2005).

2.5. Preparo do inóculo

Os esporos livres ou encapsulados foram inoculados em frascos erlenmeyers de 500 mL de capacidade com 50 mL de água residuária sintética (item 2.2), contendo 250 mg.L⁻¹ de fenol e 500 mg.L⁻¹ de glicose, sendo mantidos em estufa com circulação de ar a 25 °C durante 5 dias para a germinação dos esporos.

2.6. Comparação das técnicas de degradação de fenol utilizando células livres e encapsuladas

Foram realizados experimentos em duplicata variando-se a concentração de fenol do meio.

Aos inóculos contendo células livres e encapsulados, após o crescimento micelial, foi adicionada água residuária sintética acrescida de fenol e glicose, de forma que as concentrações iniciais correspondessem à concentração de estudo (para o fenol) e 500 mg.L⁻¹ (para a glicose), para um volume total de 150 mL. A temperatura de todos os ensaios foi controlada em incubadora rotatória, na faixa de 25 a 30 °C. Foram determinadas as concentrações de fenol ao longo do tempo.

Os resultados foram analisados pela velocidade de degradação de fenol (v), utilizando a equação 1, sendo tratados com auxílio do programa STATISTICA 5.0.

$$v = \frac{C_i - C_f}{t_f} \quad (1)$$

Onde: C_i = concentração inicial de fenol (mg.L^{-1})

C_f = concentração final de fenol (mg.L^{-1})

t_f = tempo em que ocorreu a degradação (horas)

2.7. Determinação do fenol total

Para a determinação do conteúdo total de fenol o método utilizado foi o que utiliza o reagente Folin-Ciocalteau, envolvendo a adição sucessiva de 1 mL de carbonato de sódio (20 g.L^{-1}) e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau (1:1), para 10 mL da amostra filtrada. Depois de 30 min, leu-se a absorbância a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 750 nm contra água destilada e reagente branco. Utilizou-se a curva padrão de fenol na faixa de concentração de 0,25 a 10 mg.L^{-1} de fenol (GARCÍA *et al.*, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1, 2 e 3 apresentam os resultados obtidos para a biodegradação de fenol utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus* sp. LEBM2 livre e encapsulado. Convém ressaltar que as diferenças observadas nas concentrações iniciais de fenol, nas repetições, ocorreram em virtude da dificuldade de reprodução do procedimento experimental envolvido.

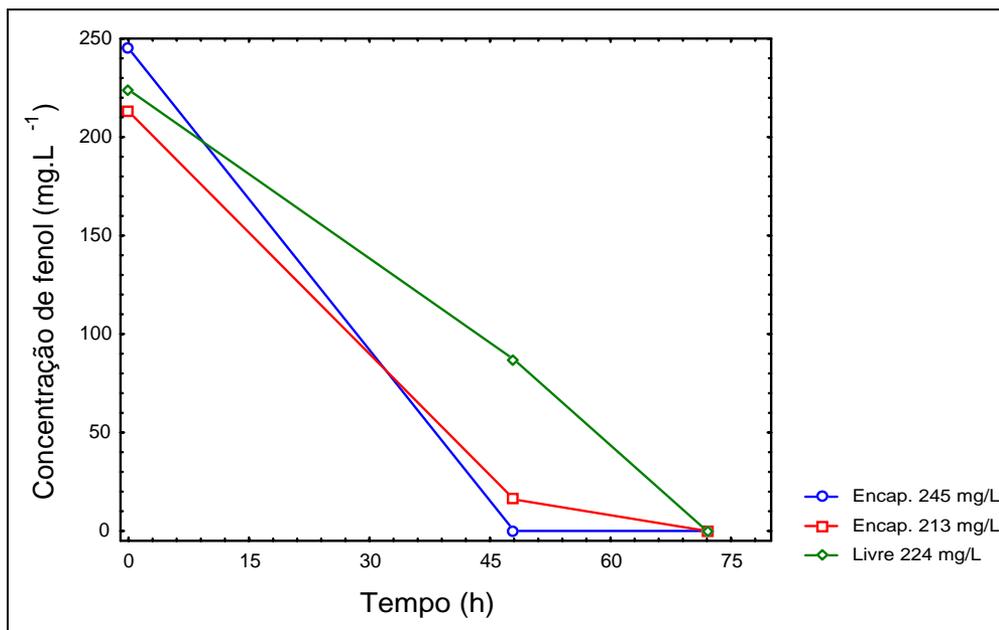


Figura 1: Ensaio de degradação de fenol ao longo do tempo utilizando células de forma livre e encapsuladas.

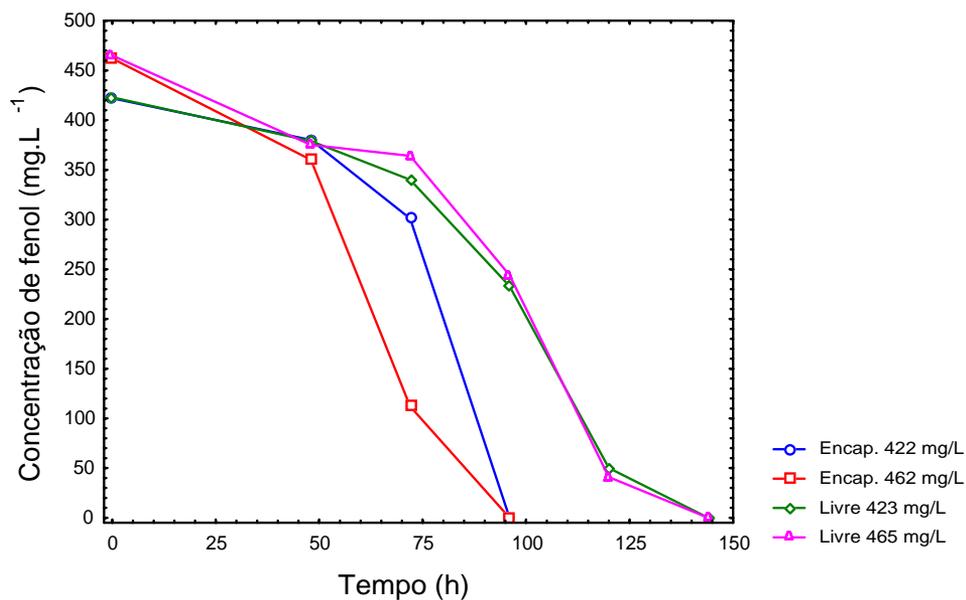


Figura 2: Ensaio de degradação de fenol ao longo do tempo utilizando células de forma livre e encapsuladas.

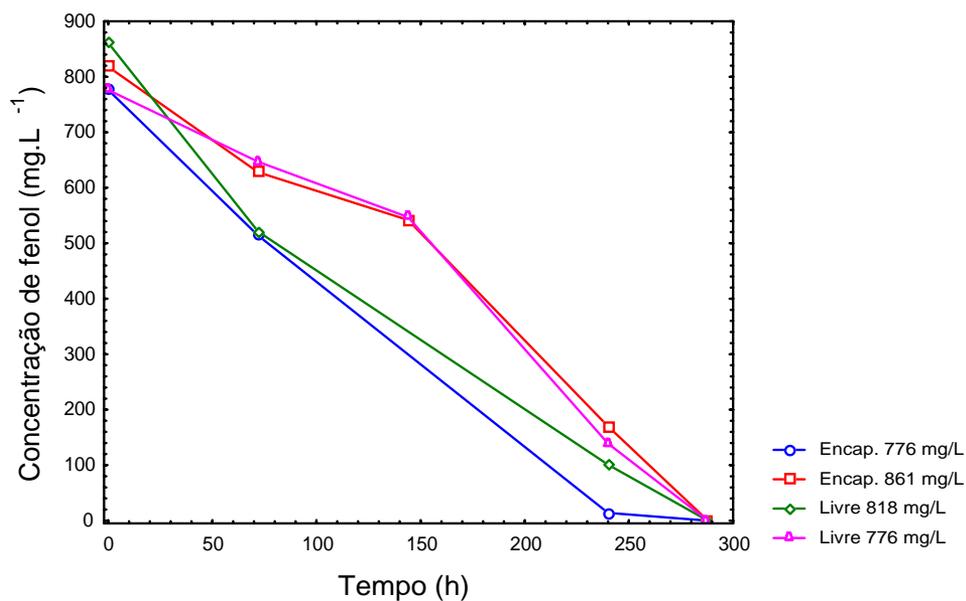


Figura 3: Ensaio de degradação de fenol ao longo do tempo utilizando células de forma livre e encapsuladas.

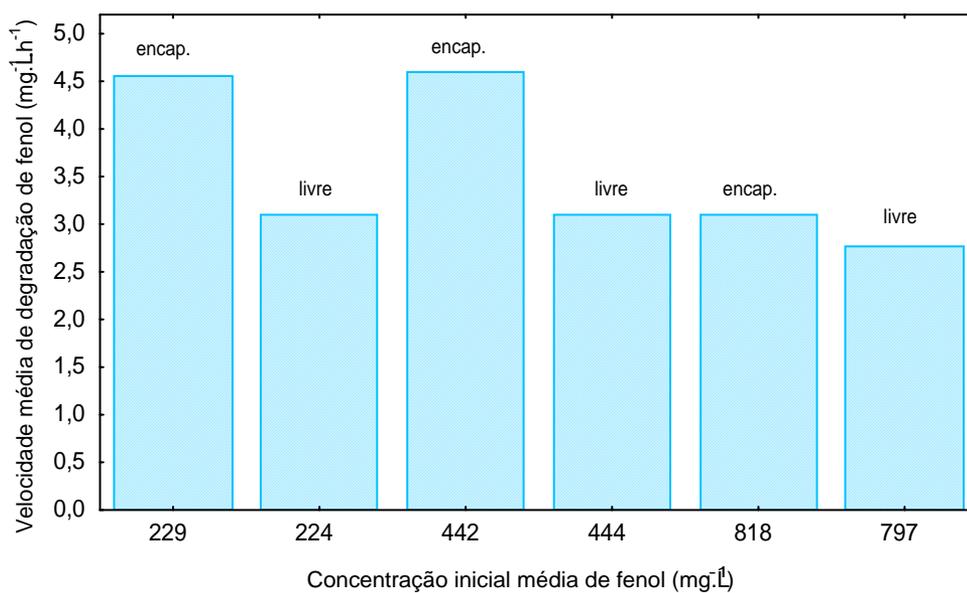


Figura 4: Valores médios para a velocidade de degradação utilizando *Aspergillus* sp. LEBM2 livre e encapsulado.

A figura 4 mostra que para todas as concentrações estudadas houve aumento na velocidade de degradação de fenol para uma mesma concentração, quando comparara-se os microrganismos encapsulados em alginato de sódio com os microrganismos livres. Os incrementos nas velocidades de degradação variaram de 11,6 % a 49,2 %.

Também pode ser observado nesta figura que tanto para o *Aspergillus* sp. encapsulado como para o *Aspergillus* sp. livre, o aumento na concentração na faixa de 224 a 229 mg.L⁻¹.h⁻¹ para 442 a 444 mg.L⁻¹.h⁻¹ praticamente não altera as velocidades de degradação, similar ao observado em trabalhos anteriores, em que não houve diferença estatisticamente significativa nas velocidades de degradação para as concentrações iniciais de fenol de 320 e 581 mg.L⁻¹. No entanto, redução mais expressiva é observada para a concentração inicial de fenol na faixa de 797 a 818 mg.L⁻¹, pelo aumento do efeito inibitório do fenol em ambos os sistemas, como esperado.

A rede polimérica formada nas partículas atua como uma barreira difusional para o fenol, o que não acontece nas células livres, significando uma transferência de massa dificultada que, a princípio, ocasionaria uma redução na velocidade de degradação de fenol, mas esta redução seria compensada pela diminuição do efeito inibitório do fenol. Também o acúmulo de metabólitos ativos, como enzimas, na cápsula por um longo período, poderia favorecer a biodegradação.

Desta forma, o material polimérico atua como uma cobertura protetora contra a toxicidade do fenol, aumentando a velocidade de degradação do mesmo. Este efeito protetor é importante para aplicação em ambientes ou efluentes com altas concentrações de fenol, acelerando o processo pela redução do estresse abiótico, podendo até mesmo ampliar o limite de tolerância do microrganismo ao composto tóxico.

Resultados similares foram obtidos por CHEN *et al.* (2002), para concentrações iniciais entre 200 e 1500 mg.L⁻¹, em que *Candida tropicalis* encapsulada em gel de poliácridamida apresentou um desempenho superior em relação à levedura na forma livre, mostrando inclusive aumento da tolerância ao fenol.

Já no trabalho de LINARDI *et al.* (2002), o micélio livre de *Graphium* sp. FIB4 exibiu velocidades de degradação de fenol maiores em concentrações abaixo de 14 mM (1372 mg.L⁻¹), quando comparado ao encapsulado em alginato de cálcio. Acima desta concentração o desempenho de *Graphium* sp. encapsulado foi superior ao livre.

Os resultados obtidos permitem afirmar que o uso de *Aspergillus* sp. LEBM2 encapsulado em alginato de sódio é promissor para a aplicação em processos de bioaugmentação visando a degradação de fenol em solos, aquíferos e em estações de tratamento de efluentes.

4. CONCLUSÃO

A técnica de encapsulação mostrou-se promissora para aplicação em bioaugmentação, pois foi observado aumento na velocidade de degradação de fenol para todas as concentrações testadas quando se utilizou o *Aspergillus* sp. LEBM2 na forma encapsulada em alginato de sódio, indicando que a cápsula proporciona ao fungo a vantagem de formar um microambiente mais favorável para a biodegradação, pelo efeito protetor da matriz do gel, protegendo-o do estresse abiótico, o que possibilita a aplicação em solos, aquíferos e em estações de tratamento de efluentes.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro ao CNPq, o qual possibilitou a realização desse trabalho.

6. REFERÊNCIAS

AGATHOS, S.N., FANTROUSSI, S.E., Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?, **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 268-275, 2005.

BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J., SANZO, A. V. L., SANTOS, E. O., RIBEIRO, F., Fungos filamentosos degradadores de poluentes orgânicos: avaliação das velocidades de crescimento radial em diferentes hidrocarbonetos, **Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Curitiba-PR, setembro de 2004.

CHEN, K.C., LIN, Y.H., CHEN, W.H., LIN, Y.C., Degradation of phenol by PAA – immobilized *Candida tropicalis*, *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p. 490 – 497, 2002.

CHEN, K.N., CHEN, M.J., LIN, C.W., Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification, **Journal of Food Engineering**, Article in press, 2005.

CUNHA, C. D., ROSÁRIO, M., ROSADO, A. S., LEITE, S.G.F., Screening of microorganisms with potential to produce biosurfactants in the presence of gasoline, **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu-PR, p. 362, 2001.

DEGALDILLO, R., RODRIGUEZ-NOGALES, J.M., Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration-rehydration method, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.33, p. 15-21, 2005.

GARCÍA, I.G., PEÑA, P.R.J., VENCESLADA, J.L.B., MARTÍN, A.M., SANTOS, M.A.M., GÓMEZ E.R., Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*, **Process Biochemistry**, v. 35, p 751-758, 2000.

GHAZALI, F.M., Bioremediation of petroleum hydrocarbons by microbial consortia, **Process NSF Workshop**, Kuala Lumpur, 2001.

HEINARU E., MERIMAA, M., VIGGOR, S., LEHISTE, M., LEITO, I., TRUU, J., HEINARU, A., Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted área, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 363-373, 2005.

JÉZÉQUEL, K., PERRIN, J., LEBEAU, T., Bioaugmentation with a *Bacillus* sp. to reduce the phytoavailable Cd of an agricultural soil: comparison of free and immobilized microbial inocula, **Chemosphere**, v. 59, p. 1323-1331, 2005.

LAZZARETTI, 1998, [http:// biolimp.com.br](http://biolimp.com.br), consultado em 09 de outubro de 2004.

LINARDI, V.R., SANTOS, V.L., HEILBUTH, N.M., BRAGA, D.T., MONTEIRO, A.S., Phenol degradation by a *Graphium* sp. FIB4 isolated from industrial effluents, **Journal of Basic Microbiology**, v. 43/3, p. 238-248, 2002.

MOSLEMY, P., NEUFELD, R.J., MILLETTE, D., GUIOT, S.R., Transport of gellan gum microbeads through sand: an experimental evaluation for encapsulated cell bioaugmentation, **Journal of Environmental**, v. 69, p. 249-259, 2003.

MOSLEMY, P., NEUFELD, R.J., PEYMAN, M., GUIOT, S.R., Production of size-controlled gellan gum microbeads encapsulating gasoline-degrading bactéria, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 10-18, 2002.

SANTOS, E. O., ROSA, C. F. C., SANZO, A. V. L., KALIL, S. J., BURKERT, C. A. V., Fungos filamentosos degradadores de poluentes: avaliação das velocidades de crescimento radial em diferentes concentrações de fenol, **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Recife-PE, setembro de 2004.

SANZO, A. V. L. Estudo da Propagação do Inóculo de *Aspergillus niger* NRRL para a Produção de Amiloglicosidase por Fermentação Semi-sólida de Farelo

de Arroz. Rio Grande, 1998. **Dissertação** (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

SCOW, K.M., HICKS, K.A., Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 246-253, 2005.

WATANABE, K., Linking genetics, physiology and ecology: an interdisciplinary approach for advancing bioremediation, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94/6, p. 557-562, 2002.

YAN, J., JIANPING, W., HANGMEI, L., SOLIANG, Y., TONGDING, H., The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*, **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 243-247, 2005.

CAPÍTULO IV CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Foi possível estudar o comportamento do fungo *Aspergillus sp.* LEBM2, isolado de solo contaminado com hidrocarbonetos derivados de petróleo, pelo Laboratório de Microbiologia – FURG, comprovando a sua capacidade de degradar fenol, e ampliando sua velocidade de degradação e sua tolerância ao fenol.

Para os ensaios onde se testou o inóculo constatou-se que a adaptação do fungo *Aspergillus sp.* LEBM2 em meio contendo fenol e glicose, como fontes de carbono, possibilitou uma maior velocidade de degradação de fenol, tornando o processo mais eficiente. Em biorreator em batelada, as variáveis concentração de glicose e agitação, bem como a interação entre elas, apresentaram efeito positivo significativo sobre a velocidade de degradação. O estudo provou ainda que o fungo possui alta tolerância ao fenol, e que a velocidade de degradação do fenol não está relacionada a uma concentração específica do composto tóxico, mas sim a uma faixa de concentração.

No estudo comparativo entre microrganismos livres e encapsulados, a técnica de encapsulação mostrou-se promissora para aplicação em bioaumentação, pois foi observado aumento na velocidade de degradação de fenol para todas as concentrações testadas, utilizando o *Aspergillus sp.* LEBM2 na forma encapsulada em alginato de sódio, indicando que a cápsula protege o microrganismo, pois proporciona a vantagem de formar um microambiente mais favorável para a biodegradação, pelo efeito protetor da matriz do gel, protegendo-o do estresse abiótico, o que possibilita a aplicação em solos, aquíferos e em estações de tratamento de efluentes.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Elucidar o mecanismo de degradação do fungo *Aspergillus* sp. LEBM2 e as enzimas envolvidas no processo;
- Estudar a encapsulação do fungo em diferentes matrizes poliméricas, testando-o em concentrações superiores a 1000 mg.L⁻¹;
- Utilizar o microrganismo em efluentes fenólicos reais, verificando seu comportamento;
- Clonar os genes responsáveis pela produção de enzimas responsáveis pela degradação, para produção de enzimas em larga escala, e otimização do tratamento dos compostos tóxicos, no ambiente;
- Produzir e purificar as enzimas envolvidas no processo de degradação para utilização direta em áreas impactadas com fenol.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATHOS, S.N., FANTROUSSI, S.E., Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?, **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 268-275, 2005.
- ALEMZADEH, I., VOSSOUGH, F., HOUSHMANDI, M., Phenol biodegradation by rotating biological contactor, **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, p. 19-23, 2002.
- ANTIZAR-LADISLAO, B., GALIL, N.I., Biosorption of phenol and chlorophenols by acclimated residential biomass under bioremediation conditions in a sandy aquifer, **Water Research**, v. 38, p. 267-276, 2004.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, **Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater**, 20^a ed., 1998.
- ASSAS, N., AYED, L., MAROUANI, L., HAMD, M., Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewater by *Geotrichum candidum*, **Process Biochemistry**, v. 38, p. 361-365, 2002.
- BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J., SANZO, A. V. L., SANTOS, E. O., RIBEIRO, F., Fungos filamentosos degradadores de poluentes orgânicos: avaliação das velocidades de crescimento radial em diferentes hidrocarbonetos, **Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Curitiba-PR, setembro de 2004.
- BURKERT, J.F.M.B., Otimização das Condições de Produção de Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL – Y552, Campinas, 2003. **Tese** (Doutorado em Engenharia de alimentos) – Universidade de Campinas, 2003, 172 p.

CAPREZ, M. A. C., BORGES, A. L. N., BISPO, M. G., PEREIRA, D., Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo, **Ciência Hoje**, v. 30/179, p 32-37, 2002.

CHEN, K.C., LIN, Y.H., CHEN, W.H., LIN, Y.C., Degradation of phenol by PAA – immobilized *Candida tropicalis*, *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p. 490 – 497, 2002.

CHEN, K.N., CHEN, M.J., LIN, C.W., Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification, **Journal of Food Engineering**, Article in press, 2005.

COLLERAN, E., Uses of bacteria in bioremediation, **Methods in Biotechnology, Bioremediation Protocols**, Totowa: Humana Press, v. 2, p. 3-22, 1997.

COLOMBO, J. C., CABELLO, M., ARAMBARRI, A. M., Biodegradation of aliphatic and lignolitic fungi, **Environmental Pollution**, v. 94/3, p. 355-362, 1996.

CUNHA, C. D., ROSÁRIO, M., ROSADO, A. S., LEITE, S.G.F., Screening of microorganisms with potential to produce biosurfactants in the presence of gasoline, *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia*, p. 362, Foz do Iguaçu-PR, 2001.

DEGALDILLO, R., RODRIGUEZ-NOGALES, J.M., Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration-rehydration method, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.33, p. 15-21, 2005.

DURÁN, N., ESPOSITO, E., Potencial applications of oxidative enzyme and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p 83-99, 2000.

ELMALEH, S., DEFRANCE, M.B., GHOMMIDH, C., Organic acids oxidation by *Candida utilis*: application to industrial waste water treatment, **Process Biochemistry**, v. 35, p. 441-449, 1999.

FADIL, K., CHAHLAOUI A., OUAHBI A., ZAID A., BORJA, R., Aerobic biodegradation and detoxification of wastewater from the olive oil industry, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p 37-41, 2002.

FÉLIX, J.P.L., SANTAELLA, S.T., NETO, M.A.F., Remoção de fenóis em águas residuárias de indústrias petrolíferas por fungos: influência da adição de glicose, **Anais do XV SINAIFERM**, Recife-PE, 2005.

FIALOVÁ, A., BOSHKE, E., BLEY, T., Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p 69-76, 2004.

FURTADO, <http://www.biolimp.com.br>, 2001, consultado em 5 de novembro de 2004.

GARCÍA, I.G., PEÑA, P.R.J., VENCESLADA, J.L.B., MARTÍN, A.M., SANTOS, M.A.M., GÓMEZ E.R., Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*, **Process Biochemistry**, v. 35, p. 751-758, 2000.

GARCÍA, I.G., VENCESLADA, B., PEÑA, P.R.J., GOMÉZ, E.R., Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*, **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 2005-2011, 1997.

GHAZALI, F.M., Bioremediation of petroleum hydrocarbons by microbial consortia, **Process NSF Workshop**, Kuala Lumpur, 2001.

- GUIOURELIOTIS M., NICELL, J.A., Assessment of soluble products of peroxidase-catalyzed polymerization of aqueous phenol, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 185-193, 1999.
- HAMED, T.A., BAYRAKTAR, E., MEHMETOGLU, U., MEHMETOGLU, T., The biodegradation of benzene, toluene and phenol in a two-phase system, **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 137-146, 2004.
- HEINARU, E., MERIMAA, M., VIGGOR, S., LEHISTE, M., LEITO, I., TRUU, J., HEINARU, A., Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol-and oil-polluted area, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 363-373, 2005.
- HIDALGO, A., JAUREGUIBEITIA, A., PRIETO, M.B., RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, C., SERRA, J.L., LLAMA, M.J., Biological treatment of phenolic industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV – 1, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 221-226, 2002.
- HOYOS, S.E.G., NIETO, L.M., RUBIO F.C., CORMENZANA, A.R., Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*, **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1169-1176, 2002.
- JÉZÉQUEL, K., PERRIN, J., LEBEAU, T., Bioaugmentation with a *Bacillus* sp. to reduce the phytoavailable Cd of an agricultural soil: comparison of free and immobilized microbial inocula, **Chemosphere**, v. 59, p. 1323-1331, 2005.
- JIMÉNEZ, A.M., BORJA, R., MARTÍN, A., Aerobic-anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater, **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1275-1284, 2003.
- KACHOURI; F., HAMDI, M., Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*, **Process Biochemistry**, v. 39, p. 841-845, 2003.

KNAEBEL D. B., STORMO, K. E., CRAWFORD, R. L., Immobilization of bacteria in macro and microparticles, **Methods in Biotechnology, Bioremediation Protocols**, Totowa: Humana Press, v. 2, p. 3-22, 1997.

LAZZARETTI, 1998, [http:// biolimp.com.br](http://biolimp.com.br), , consultado em 09 de outubro de 2004.

LEIFA, F., SCCOL, C.R., Detoxificação e bioaugmentação de casca de café utilizando o fungo *Pleurotus* In: MELO, I.S., SILVA, C.M.M.S., SCRAMIU, S., SPESSOTO, A., **Biodegradação**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 265-275, 2001.

LEITE, J.V., Avaliação da Toxicidade do Fenol em Sistemas de Lodos Ativados – Utilização do Método Fed-Batch-Reator (FBR) modificado, **Dissertação de Mestrado**, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

LI, G. F., HUANG, W., LEARNER, D. N., ZHANG X., Enrichment of degradation microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil, **Pergamon**, v. 34/15, p. 3845-3853, 2000.

LINARDI, V.R., SANTOS, V.L., HEILBUTH, N.M., BRAGA, D.T., MONTEIRO, A.S., Phenol degradation by a *Graphium* sp. FIB4 isolated from industrial effluents, **Journal of Basic Microbiology**, v. 43/3, p. 238-248, 2002.

MANFIO, G.P., GAYLARDE, C.C., BELLINASO, M.D.L., Biorremediação, **Biociência e Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, janeiro/junho, 2005.

MÁSTER, E. R., MOHN, W. W., Psychrotolerant bacteria isolated from arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64/12, p. 4823-4829, 1998.

MILLER, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHARIKAR, A., PUROHIT, H.J., Specific ratio and survival of *Pseudomonas* CF600 as co-culture for phenol degradation in continuous cultivation, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 255-260, 2003.

MORAES, S.G.I., RODRIGUES, C.H., ASSALIN, M.R., DURÁN, N., Biodegradação de compostos fenólicos de efluente papaleiro, In: **Biodegradação**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001.

MOSLEMY, P., NEUFELD, R.J., MILLETTE, D., GUIOT, S.R., Transport of gellan gum microbeads through sand: an experimental evaluation for encapsulated cell bioaugmentation, **Journal of Environmental**, v. 69, p. 249-259, 2003.

MOSLEMY, P., NEUFELD, R.J., GUIOT, S.R., Production of size-controlled gellan gum microbeads encapsulating gasoline-degrading bacteria, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 10-18, 2002.

OU DOT. O., DUPONT, J., HOLOUI, S., ROQUEBERT, M.F., Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi, **Soil Biologic and Biochemistry**, v. 25/9, p. 1167-1173, 1993.

POTIN, O., RAFIN, C., VEIGNIE, E., Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) – contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 45-52, 2004.

RIBEIRO, F., SANZO, A.V.L., KALIL, S.J., BURKERT, C.A.V., Cepas bacterianas com uso potencial em biorremediação: estudo do crescimento

microbiano em óleo diesel, **Anais do II Encontro de Qualidade de Alimentos e Meio Ambiente**, Rio Grande – RS, outubro de 2004.

RIGO, M., ALEGRE, R.M., Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from industrial wastewaters and kinetics of the biodegradation, **Folia Microbiologica**, v. 49/1, p. 41-45, 2004.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F., **Planejamento de Experimentos e Otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Casa do Pão Editora, 326 p., Campinas – SP, 2005.

RODRIGUES, K.A., SANTAELLA, S.T., SAMPAIO, G.M.M.S., ZAIAT, M., Remoção de fenol de água residuária sintética por uso de reator com fungos, **Anais do XV SINAFERM**, Recife-PE, 2005.

SANCINETTI, G.P., MARTINELLI, F.R., VARESCHE, M.B.A., SILVA, E.L., Degradação de fenol em reator anaeróbico operado em batelada, **Anais do XIV SINAFERM**, 2003.

SANTOS, V.L., LINARDI, V.R., Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potencial, **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1001-1006, 2004.

SANTOS, E. O., ROSA, C. F. C., SANZO, A. V. L., KALIL, S. J., BURKERT, C. A. V., Fungos filamentosos degradadores de poluentes: avaliação das velocidades de crescimento radial em diferentes concentrações de fenol, **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Recife-PE, setembro de 2004.

SANZO, A. V. L. Estudo da Propagação do Inóculo de *Aspergillus niger* NRRL para a Produção de Amiloglicosidase por Fermentação Semi-sólida de Farelo de Arroz. Rio Grande, 1998, **Dissertação** (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

SCHIE, P.M., YOUNG, L.Y., Biodegradation of phenol: Mechanisms and applications, **Bioremediation Journal**, v. 4/1, p. 1-18, 2000.

SCOW, K.M., HICKS, K.A., Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 246-253, 2005.

THASSITOU; P.K., ARVANITTOYANNIS, I.S., Bioremediation: a novel approach to food waste management, **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 185-196, 2001.

TONG, Z., QINGXIANG, Z., HUI, H., QIN, L., YI, T., Kinetic study on the removal of toxic phenol and chlorophenol from wastewater by horseradish peroxidase, **Chemosphere**, v. 37/8, p. 1571-1577, 1998.

VOGEL, T.M., Bioaugmentation as a soil bioremediation approach, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 311-315, 1996.

WARD, C.H., DUSTON, K.L., HUGHES, J.B., **Engineer and Bioremediation**, Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston, 2002.

WATANABE, K., Linking genetics, physiology and ecology: an interdisciplinary approach for advancing bioremediation, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94/6, p. 557-562, 2002.

YAN, J., JIANPING, W., HANGMEI, L., SOLIANG, Y., TONGDING, H., The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*, **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 243-247, 2005.

ZIINO, M., CURTO, R.B.L., SALVO, F., SIGNORINO, D., CHIOFALO B., GIUFFRIDA, D., Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture, **Bioresource Technology**, v. 67, p. 7-11, 1999.