

BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BTX UTILIZANDO BIOFILMES

J. M. M. DE MELLO^{1,2}, A. A. ULSON DE SOUZA¹, D. E. G. TRIGUEROS⁴, A. DA SILVA³, S. M. A. GUELLI ULSON DE SOUZA¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

² Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão da Inovação

³ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos

⁴ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas de Toledo
E-mails para contato: josimello@unochapeco.edu.br, selene@enq.ufsc.br

RESUMO – Os efluentes líquidos das indústrias químicas e petroquímicas contêm diversos contaminantes orgânicos tóxicos, dentre eles destacam-se os compostos benzeno, tolueno e xileno. Estes compostos apresentam um potencial de poluição elevado, devido a suas propriedades neurotóxicas, carcinogênicas e teratogênicas, representando um sério risco ao meio ambiente e ao ser humano. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar o processo de biodegradação dos compostos BTX individuais (em diferentes concentrações), utilizando-se biofilmes suportados em partículas de carvão. Testes de toxicidade dos compostos BTX também foram realizados após seu tratamento. A biodegradação dos compostos BTX foi adequadamente representada pelos modelos de Monod (para menor concentração) e Andrews (para a maior concentração). Os resultados obtidos demonstraram que o biofilme é capaz de biodegradar os compostos BTX, sendo o xileno o composto que apresentou maior tempo de degradação e maior toxicidade.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diversas atividades antrópicas responsáveis pela poluição, às indústrias químicas e de refino do petróleo acarretam na geração de uma quantidade significativa de resíduos potencialmente poluidores. Em especial, os efluentes líquidos destas indústrias, contêm diversos contaminantes orgânicos tóxicos, dentre eles destacam-se os compostos benzeno, tolueno e xileno, conhecidos coletivamente por BTX que, frequentemente, poluem o meio ambiente em consequência de descartes industriais e derramamentos de combustíveis. Estes compostos apresentam um potencial de poluição elevado, devido a suas propriedades neurotóxicas, carcinogênicas e teratogênicas, representando um sério risco ao meio ambiente e ao ser humano (Mathur *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2008). Eles são poderosos depressores do sistema nervoso central, apresentando toxicidade crônica e potencial mutagênico, mesmo em pequenas concentrações, sendo o benzeno o mais tóxico dentre os BTX, devido a sua confirmada ação carcinogênica, podendo causar leucemia e tumores em múltiplos

órgãos (Parisellia *et al.*, 2009; Jo *et al.*, 2008).

Considerando estes aspectos, estudos estão sendo realizados para desenvolver unidades de tratamentos de efluentes que apresentem um bom desempenho na remoção destes compostos tóxicos, e neste contexto os processos biológicos representam uma técnica eficaz, econômica e uma alternativa versátil, podendo ser utilizados como complemento às tecnologias convencionais (Guelli U. de Souza *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, os maiores avanços na área de tratamento biológico de efluentes foram alcançados através de processos que utilizam biofilmes suportados em materiais particulados. Os biorreatores com biofilme apresentam diversas vantagens quando comparados aos biorreatores convencionais, entre elas pode-se citar a maior concentração de biomassa retida com maior atividade metabólica; aplicação de maior carga orgânica; coexistência da atividade metabólica anóxica e aeróbia dentro do mesmo ecossistema de biomassa; elevada eficiência na remoção de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio); instalações mais compactas; possuem maior capacidade de tolerar poluentes recalcitrantes e tóxicos, bem como outras condições ambientais adversas que os processos convencionais (Xavier *et al.*, 2003; Massalha *et al.*, 2007).

De acordo com Xavier *et al.*, (2003) e Massalha *et al.*, (2007), o desenvolvimento do biofilme proporciona, aos micro-organismos que o constituem, importantes benefícios, tais como: aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme, uma vez que a matriz polimérica favorece a adsorção de moléculas de nutrientes; proteção contra fatores ambientais agressivos, como flutuações de pH, forças de tensão de cisalhamento, substâncias químicas agressivas e predadores; possibilidade de troca de material genético; facilidade de desenvolvimento de microconsórcios que permitem o estabelecimento de relações de simbiose, bem como a utilização de substratos de difícil degradação e capacidade de estabelecer e colonizar nichos ecológicos.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo adaptar micro-organismos obtidos de uma estação de tratamento de esgoto doméstico a um meio contendo os compostos BTX; obter com base em experimentos, em processo batelada, os parâmetros cinéticos da biodegradação dos compostos BTX individuais, utilizando o biofilme suportado em carvão ativado; avaliar a toxicidade do efluente sintético contendo os compostos BTX, após seu tratamento biológico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios para a obtenção das cinéticas de biodegradação dos compostos BTX foram realizados utilizando-se biorreatores em batelada, constituídos por erlenmeyers de 250 mL vedados com tampa de politetrafluoretileno, com uma seringa acoplada para retirada das amostras. O material utilizado como suporte para imobilização da biomassa foi partículas de carvão ativado do tipo ECOCARBO 106-90, com diâmetro médio de 1,651 mm, cedidas pela Indústria Carbomafra. O meio de solução mineral (MSN), no qual a biomassa foi alimentada, foi preparado conforme descrito por Shim *et al.*, (2002). Como fonte de oxigênio adicionou-se peróxido de hidrogênio (30% em massa), e como fonte de carbono inicialmente adicionou-se glicose e posteriormente os compostos BTX. Os reatores foram inoculados com biomassa aeróbia procedente da Estação de Tratamento de Esgoto

Municipal de Florianópolis (CASAN), do bairro Lagoa da Conceição.

Todos os experimentos foram realizados em escala de bancada, utilizando-se benzeno padrão HPLC (99,5%), marca Fluka; tolueno padrão UV/HPLC – espectroscópico, marca Vetec; e *o*-xileno padrão HPLC (98%), marca Sigma-Aldrich. Para a determinação da concentração dos compostos BTX, utilizou-se um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência, HPLC, conectado a um detector UV/visível modelo CG 437-B e coluna Nucleosil C18 fase reversa de 250 mm, diâmetro interno de 4,6 mm. A fase móvel utilizada foi metanol padrão HPLC (Carlo Erba) e água MiliQ (80:20), a uma vazão de 1,0 mL.min⁻¹. Os compostos BTX foram identificados no comprimento de onda de 254 nm.

A adaptação da biomassa, procedeu-se adicionando 150 mL de MSM, 100 mL de lodo ativado, 5 g de partículas de carvão ativado seco, 180 mg.L⁻¹ de glicose e 30 µL de peróxido de hidrogênio. Os biorreatores foram agitados em uma Incubadora Shaker (Logen Scientific – modelo LS 4500), à temperatura de 25°C. Durante 20 dias alimentou-se periodicamente com a solução de meio mineral, peróxido de hidrogênio e glicose como fonte de carbono, para que ocorresse a fixação da biomassa no suporte. Decorrido este período, passou-se a adaptar os micro-organismos aos compostos BTX substituindo-se, de maneira gradativa, a cada 10 dias, a glicose pelos BTX. Após esse período de adaptação da biomassa, todos os biorreatores foram alimentados diariamente retirando-se a solução presente no biorreator e adicionando-se 280 mL da solução de meio mineral, 30 µL de peróxido de hidrogênio e 60 mg.L⁻¹ de cada composto BTX.

As curvas cinéticas foram obtidas durante o tempo em que era necessário para que todo o composto fosse biodegradado. Em intervalos regulares de tempo eram retiradas alíquotas de 0,5 mL para serem analisadas no HPLC. As curvas cinéticas monocomponentes foram determinadas nas concentrações iniciais de 20 e 60 mg.L⁻¹ de BTX. Os parâmetros cinéticos dos modelos de Monod e Andrews foram estimados através do método meta-heurístico conhecido como Otimização por Enxame de Partículas (PSO).

Para avaliar a toxicidade aguda dos BTX, depois de biodegradados, utilizou-se como organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*. Os testes foram realizados de acordo com a Norma DIN 38412 (DIN, 1989) pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após o período de adaptação, analisou-se o consumo dos compostos BTX pelos micro-organismos presentes no biofilme, através de curvas de concentração dos compostos BTX em função do tempo.

Os resultados das cinéticas de biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e *o*-xileno individuais, para as concentrações estudadas (20 e 60 mg.L⁻¹), estão apresentados na Figura 1. A Figura 2 apresenta as curvas de concentração dos compostos benzeno, tolueno e *o*-xileno, biodegradados individualmente, para a concentração de 60 e 20 mg.L⁻¹ de cada composto.

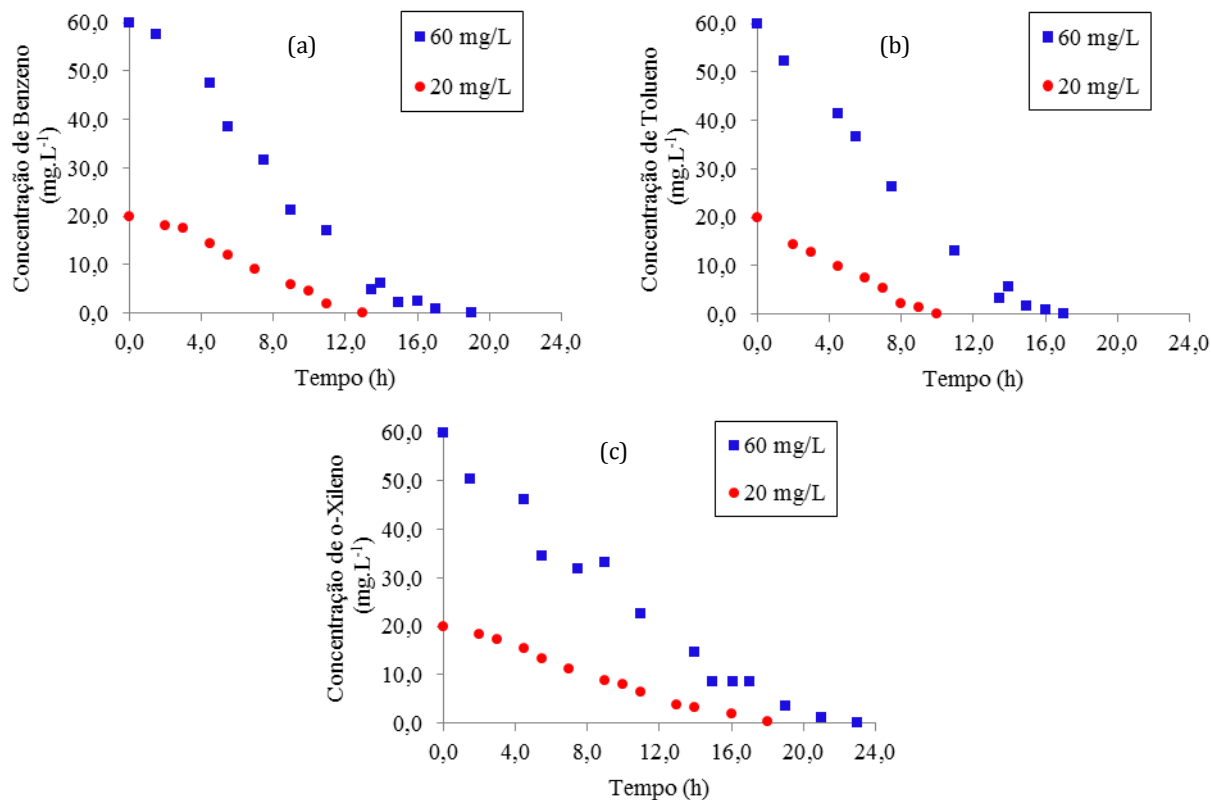


Figura 1 – Curva de concentração do benzeno (a), tolueno (b) e *o*-xileno (c), em relação ao tempo, para as concentrações iniciais de 20 e 60 mg.L⁻¹.

Através da Figura 1 é possível observar que a biomassa presente no biorreator foi capaz de consumir completamente cada um dos compostos BTX nas concentrações estudadas. Observa-se também que quanto maior a concentração de alimentação, maior é o tempo necessário para todo o composto em estudo seja biodegradado pelos micro-organismos presentes no biofilme.

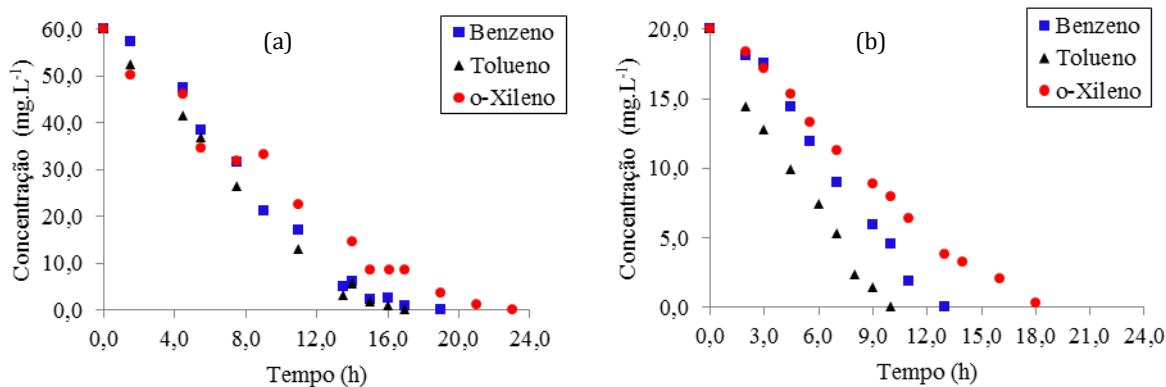


Figura 2 - Curva de concentração benzeno, tolueno e *o*-xileno, em relação ao tempo, para a concentração inicial de 60 mg.L⁻¹ (a) e 20 mg.L⁻¹ (b).

Analisando a Figura 2, verifica-se que o *o*-xileno é o composto que apresentou maior dificuldade de ser consumido, quando comparado com o benzeno e tolueno, visto que seu tempo de degradação foi de aproximadamente 24 h, frente a 19 h para o benzeno e 17 h para o tolueno, para a concentração inicial de 60 mg.L⁻¹. Isto se deve possivelmente ao fato deste composto gerar compostos intermediários, durante sua biodegradação, que acabam inibindo e, portanto desacelerando o processo, ou a afinidade que o biofilme tem com o tolueno e benzeno é maior quando comparado ao *o*-xileno. Este comportamento é observado para as concentrações estudadas. Verifica-se ainda, através da Figura 2, que o tolueno foi o composto que apresentou o menor tempo de biodegradação, aproximadamente 10 h e 16 h, para as concentrações de 20 e 60 mg.L⁻¹, respectivamente.

Para as cinéticas dos compostos benzeno, tolueno e *o*-xileno, biodegradados individualmente, avaliaram-se os modelos de Monod e Andrews, Equações 1 e 2, respectivamente.

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \frac{X}{Y_{X/S}} \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \frac{X}{Y_{X/S}} \quad (2)$$

Onde S é a concentração do substrato (mg.L⁻¹), t é o tempo (h), K_s é a constante de saturação do substrato (mg.L⁻¹), X é a concentração de micro-organismos (mg.L⁻¹), Y_{x/s} é o fator de conversão substrato a células (mg_{células}.mg_{substrato}⁻¹), μ_{max} é a velocidade máxima de crescimento específico (h⁻¹) e K_i é a constante pelo substrato (mg.L⁻¹).

Os parâmetros cinéticos e estequiométricos do modelo de Monod e Andrews, obtidos pelo ajuste são apresentados nas Tabelas 1 e 2, para a concentração de 20 e 60 mg.L⁻¹, respectivamente. A busca pelos valores dos parâmetros utilizando o método PSO foi guiada pelo significado microbiológico de cada parâmetro que serviu de base às variações do limite de busca, na qual a tendência dos melhores valores foi preservada (Trigueiros *et al.*, 2010).

Tabela 1 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação individual dos compostos BTX – concentração inicial 20 mg.L⁻¹ – Modelo Monod e Andrews

Parâmetros	BENZENO		TOLUENO		O-XILENO	
	Monod	Andrews	Monod	Andrews	Monod	Andrews
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,0480	0,0583	0,0500	0,0500	0,0049	0,0076
K _s (mg.L ⁻¹)	0,0100	0,0146	0,0717	0,1141	1,1749	4,3004
Y _{x/s}	0,6353	0,6029	0,5388	0,4013	0,0714	0,0500
K _i (mg.L ⁻¹)	-	45,920	-	79,804	-	12,000
F. Objetivo	0,0452	0,0966	0,4484	0,5750	0,1097	0,2141

Através da Tabela 1, verifica-se que a taxa máxima de crescimento específico, μ_{máx}, para o

modelo de Monod, é similar para o benzeno e o tolueno, entretanto para o *o*-xileno, esse valor é 10 vezes menor. O baixo valor de K_s indica que o biofilme apresentou maior afinidade com o benzeno e tolueno do que com o *o*-xileno, já que seu valor foi superior, resultando desta forma um menor valor para o coeficiente de rendimento, $Y_{x/s}$, para o *o*-xileno. Com relação ao modelo de Andrews, é possível observar que a taxa de crescimento específico é maior para o benzeno, seguindo do tolueno e o *o*-xileno. Para este modelo, o valor de K_s mostra que o biofilme apresentou maior afinidade para o benzeno, e menor para o *o*-xileno. Com relação a constante de inibição, K_i , verifica-se que o *o*-xileno é o composto que apresentou o menor valor, fisicamente pode-se dizer que este composto é que apresenta maior inibição pelo substrato que o benzeno e o tolueno.

Uma forma de avaliar qual modelo cinético representa melhor os dados experimentais, é através da análise do resíduo mínimo obtido durante a estimativa dos parâmetros pelo método PSO (Trigueros *et al.*, 2010), ou seja, avaliar a função objetivo. A função objetivo é uma medida da distância entre os dados experimentais e as predições do modelo (Schwaab *et al.*, 2008). Então quanto menor for seu valor, menor os desvios entre o modelo e os dados experimentais.

Avaliando-se o melhor modelo, pode-se dizer que tanto o modelo de Monod quanto o modelo de Andrews, mostraram bons ajustes (maiores detalhes podem ser obtidos em Mello, 2012).

Tabela 2 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação individual dos compostos BTX – Concentração inicial 60 mg.L⁻¹ – Modelo Monod e Andrews.

Parâmetros	BENZENO		TOLUENO		O-XILENO	
	Monod	Andrews	Monod	Andrews	Monod	Andrews
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,0847	0,0302	0,0298	0,136	0,0295	0,0281
K_s (mg.L ⁻¹)	11,786	50,01	7,866	12,64	17,594	10,218
$Y_{x/s}$	0,34	0,086	0,10	0,33	0,1181	0,11
K_i (mg.L ⁻¹)	-	198,0	-	100,04	-	150,0
F. Objetivo	0,0103	0,0087	0,0029	0,0020	0,0274	0,0038

Pela Tabela 2 pode-se verificar que os ajustes foram melhor quando se utilizou o modelo cinético de Andrews, que considera o termo de inibição. A constante de inibição apresentou valor maior para o benzeno. Observa-se também que o *o*-xileno apresentou o menor valor da taxa de crescimento específico para a concentração de 60 mg.L⁻¹, e o tolueno o composto que apresentou maior valor. Para as concentrações iniciais mais elevadas (acima de 40 mg.L⁻¹), Bielefeldt e Stensel (1999) e Shim *et al.* (2005), relatam que o modelo de Andrews fornece os coeficientes cinéticos e estequiométricos de forma mais favorecida, pois segundo os autores, este modelo fornece maior informações sobre o sistema que apresenta efeitos inibitórios, quando a concentração dos substratos encontra-se próximo dos valores tóxicos ao crescimento celular. O valor de X_0 , concentração celular no instante inicial, também foi estimado, juntamente com os demais parâmetros, e seu valor médio foi de 17 mg_{ssv}.L⁻¹.

A portaria 17, criada em 24 de abril de 2002, pela FATMA (Fundação do Meio Ambiente) estabeleceu os limites do fator de diluição (FD) de diferentes efluentes para a *Daphnia magna*. Para os efluentes de origem de atividade química e subcategoria de atividade petroquímicos, o fator de diluição deve ser 2 para que não seja evidenciado nenhum efeito tóxico (imobilidade), nos organismos expostos. Os ensaios foram realizados com o tempo de 48 h de exposição. E os resultados obtidos do fator de diluição sem efeito, para o benzeno, tolueno e *o*-xileno foram 2, 2 e 8, respectivamente. Estes resultados mostram que, as amostras da solução após a biodegradação individual do benzeno e do tolueno, para o processo em batelada, atendem ao limite da Portaria 017/02 FATMA a qual estabelece um FD limite máximo igual a 2. Enquanto que o *o*-xileno não atende o limite da portaria 017/02 FATMA, ou seja, apresentaram toxicidade aguda acima do limite máximo permitido (LMP). Este resultado é coerente, visto que este composto foi o que apresentou maior dificuldade em ser biodegradado, possivelmente ao fato de estar formando compostos intermediários, que apresentam toxicidade ao biofilme. No entanto este valor, 8 de FD, apesar de estar acima do LMP, apresentaram baixa toxicidade aguda se forem consideradas as diluições necessárias para enquadrá-lo nos limites impostos pela Resolução 357 de 17 de março de 2005 do CONAMA, caso não estivesse sido tratado, mostrando que houve redução da toxicidade após o tratamento microbiológico.

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados alcançados neste trabalho, pode-se concluir que a biomassa, presente no biofilme, estava apta a degradar os compostos BTX, fato este demonstrado pelo consumo completo dos compostos, em um intervalo de concentração de 20 e 60 mg.L⁻¹. Os resultados da biodegradação monocomponente mostraram que, o *o*-xileno é o composto que foi consumido mais lentamente, seguido do benzeno e do tolueno. A cinética de biodegradação individual dos compostos benzeno, tolueno e *o*-xileno foi adequadamente descrita pelos modelos de Monod e Andrews, pois o valor da função objetivo para cada cinética foi pequeno, demonstrando que qualquer um dos modelos poderia ser utilizado. Os resultados obtidos pelo teste de toxicidade aguda realizado com *Daphnia magna* mostraram que os compostos benzeno e tolueno, após o tratamento nos biorreatores, não apresentaram toxicidade, ou seja, atendem ao limite exigido pela FATMA. Somente o *o*-xileno apresentou toxicidade, porém seu valor está bem abaixo do valor caso não houvesse o tratamento.

Com base nos resultados obtidos para a remoção dos compostos BTX por biodegradação, pode-se concluir que o biofilme formado no carvão ativado foi capaz de degradar os compostos BTX, demonstrando que o carvão ativado é uma alternativa eficaz para a imobilização de biomassa. Os resultados apresentados apontam para a forte potencialidade da utilização industrial do sistema de biodegradação aqui descrito, composto por biofilme bacteriano, metabolicamente ativo, suportado em carvão ativado, pois houve o consumo dos compostos BTX por essa biomassa.

6. REFERÊNCIAS

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

CONAMA Resolução CONAMA nº 357/2005. Brasília, 2005.

DIN 38412 Teil 30: Determination of the non-acute poisonous effect of wastewater to *Daphnia magna* by the dilution limits (L30). *Deutsches Institut Fur Normung*, Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber über Verdunstungsstufen, 1989.

FATMA, Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens. *PORTARIA Nº 017/02 – 18 abr. 2002*.

GUELLI U. de SOUZA, S.M.A.; DERVANOSKI, A.; MELLO, J.M.M.; SOUZA, A.A.U. *Removal of Toxic Contaminants from Petrochemical Effluents using Adsorption and Biodegradation Processes*. Sustainable water management in the tropics and subtropics: University of Kassel, v.1, p.1-20, 2010.

JO, M.S.; RENE, E.R.; KIM, S.H.; PARK, H.S. An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology. *J. Hazard. Mater.*, v. 152, n. 3, p. 1276-1284, 2008.

MASSALHA, N.; BASHERR, S.; SABBAAH, I. Effect of Adsorption and Bead Size of Immobilized Biomass on the Rate of Biodegradation of Phenol at High Concentration Levels. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 46, n. 21, p. 6820-6824, 2007.

MATHUR, A.K.; MAJUMDER, C.B.; CHATTERJEE, S. Combined removal of BTEX in air stream by using mixture of sugar cane bagasse, compost and GAC as biofilter media. *J. Hazard. Mater.*, v. 148, n. 1-2, p. 64-74, 2007.

MELLO, J. M. M. *Modelagem matemática, simulação numérica e ensaios experimentais da biodegradação dos compostos BTX em um reator com biofilme*. jul. 2012. 434p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

PARISELLIA, F.; SACCOA, M. G.; PONTIB, J.; REMBGESA, D. Effects of Toluene and Benzene air Mixtures on Human Lung Cells (A549). *Exp. Toxicol. Pathol.*, v. 61, n. 4, p. 381-386, 2009.

SCHWAAB, M.; BISCAIA, E.C.; MONTEIRO, J.L.; PINTO, J.C. Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. *Chem. Eng. Sci.*, v. 63, n. 6, p. 1542-1552, 2008.

SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S.-S.; KONG, S.-H. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions *Biodegrad.*, v. 16, n. 4, p. 319-327, 2005.

SHIM, H.; SHIN, E.; YANG, S.T. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Adv. Environ. Res.*, v. 7, n. 1, p. 203-216, 2002.

TRIGUEROS, D.E.G.; MÓDENES, A.N.; ESPINOZA-QUINONES, F.R.; KROUMOV A.D. The evaluation of benzene and phenol biodegradation kinetics by applying non-structured models. *Water Sci. Technol.*, v. 61, n. 5, p. 1289-1298, 2010.

XAVIER, J.B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J.S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim Biotecnol.*, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2003.