

ERNANI NISHIDA KATO

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO FENOL  
PROVENIENTE DE PROCESSOS INDUSTRIAIS

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo  
IPT, para obtenção de título de Mestre em  
Tecnologia Ambiental  
Área de Concentração: Mitigação de Aspectos  
Ambientais

Orientadora:  
Dra. LUIZIANA FERREIRA DA SILVA

Co-Orientador:  
Dr. JOSÉ GREGÓRIO CABRERA GOMEZ

São Paulo

2005

## **Dedicatória**

*Aos meus queridos pais Hideyo e Hosanna,  
que sempre foram a minha referência como pessoas e profissionais, e cujos passos  
sempre procurarei seguir,  
por sempre terem trilhado o caminho da correção, da honestidade, dos estudos e do  
trabalho;  
pela garra e obstinação com que sempre perseguiram seus objetivos;  
pelo amor incondicional que sempre dedicaram a nós, seus filhos;  
por todo apoio e ajuda recebida em tudo que precisamos, até os dias de hoje;  
pela força extraordinária que demonstram ter perante a vida.*

## **Agradecimentos**

À Prof. Dra. Luiziana Ferreira da Silva e ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez pela orientação, dedicação, amizade e paciência na condução do trabalho.

À Prof. Dra. Elisabeth de Fatima Pires Augusto e ao Prof. Dr. Gabriel Padilla pela orientação do caminho a ser seguido por ocasião do exame de qualificação.

À Jane Palugan dos Santos, estagiária do IPT, que esteve conosco na realização de todos os ensaios realizados. Com sua experiência no laboratório foi pessoa-chave para que o trabalho pudesse ter sido realizado.

À minha esposa Suely e aos meus filhos Jéssica e Régis, a quem direciono todos os meus esforços, com o objetivo de estruturarmos a nossa família, na amplitude maior dessa palavra.

À minha cunhada Denise Sanematsu Kato, ao jovem Vitor Giovanni Cominato de Amorim, ao amigo Eder Abensur e à revisora Dayane Cristina Pal pela ajuda recebida na finalização do trabalho.

Aos meus familiares em geral pelo apoio à minha iniciativa e pelo incentivo recebido.

Aos funcionários do IPT, em especial aos da Secretaria do Cenatec e do Agrupamento de Biotecnologia, pelo suporte recebido.

A todos os profissionais da empresa onde trabalho, que me deram total apoio para que o trabalho fosse realizado.

## RESUMO

O fenol é um elemento presente no resíduo de diversos processos industriais. Neste trabalho, avaliou-se a biodegradabilidade do fenol presente nos resíduos de rebolos orgânicos.

Inicialmente, fez-se uma análise do potencial de biodegradabilidade do fenol presente nesse resíduo através do ensaio de biodegradabilidade imediata pela medida do dióxido de carbono desprendido em sistema aberto. Esse ensaio inicial mostrou que esses resíduos não são facilmente biodegradáveis. Em seguida, realizou-se ensaio semelhante, porém com fenol e resinas fenólicas usadas como matéria-prima no processo de fabricação de rebolo. O ensaio mostrou-se satisfatório e as linhagens capazes de biodegradar fenol foram isoladas. Paralelamente, foram obtidos microrganismos relacionados na bibliografia como bons degradadores de fenol.

Realizou-se análise da evolução da densidade ótica a 610 nm para os microrganismos isolados e os comprados, na forma isolada e na forma de consórcios, em diversas concentrações de fenol para avaliação dos melhores degradadores. Posteriormente, realizou-se um ensaio com o resíduo industrial dos rebolos e os melhores degradadores, mas os resultados desse ensaio não foram conclusivos. Uma constatação desse ensaio foi a de que o fenol migra parcialmente do resíduo sólido para o líquido. Nesta etapa foi testado também como fonte de microrganismos, o lodo proveniente de uma estação de tratamento de efluentes com fenol.

Em uma última etapa foram determinadas as curvas de degradação do fenol em função do tempo e da evolução da densidade ótica a 610 nm para os microrganismos selecionados, de forma a permitir a definição dos melhores degradadores de fenol. Encontraram-se 2 microrganismos com potencial muito bom de degradação do fenol, denominados FC01 e RF01.

Os resultados obtidos indicam haver uma possibilidade de tratamento dos resíduos industriais estudados. Os resíduos sólidos seriam submetidos à presença de um meio líquido com o objetivo de buscar a transferência do fenol para esse meio. Posteriormente esse líquido poderia ser tratado com os microrganismos selecionados.

**Palavras-chave:** biodegradabilidade; fenol; rebolo; microrganismo; resíduo industrial.

## ABSTRACT

### **Evaluation of phenol biodegradability from industrial processes**

Phenol is an element found in waste from several industrial processes. This study assesses phenol biodegradability in organic grinding wheel waste.

At first, the potential biodegradability of phenol found in waste was analyzed with an immediate biodegradability assay based on the amount of carbon dioxide released in an open system.

This early trial showed that such waste is not easily biodegradable.

A similar study was then conducted, this time with phenol and phenolic resins used as raw-materials in grinding wheel manufacturing. The results were satisfactory and phenol-biodegradable microorganisms were then isolated.

In parallel, microorganisms listed on the references as good phenol degraders agents were obtained for the purpose of this study.

Evolution of the optical density at 610 nm was analyzed for both isolated and obtained microorganisms, alone and in combination, at different phenol concentrations in order to assess the best degraders/degrading agents available.

A subsequent trial was then performed with industrial grinding waste and the best degraders/degrading agents, but the results were non-conclusive. One of the findings of this trial is that phenol partially migrates from solid to liquid waste. In this step, sludge from a wastewater/effluent treatment station containing phenol was also analyzed.

The last step involved phenol degradation curves through time, and evolution of the optical density at 610 nm for the microorganisms in question in order to identify the best phenol degraders.

Two microorganisms with excellent potential as phenol degraders were identified and referred to as FC01 and RF01.

The results reveal that the industrial waste used in this study can be treated by submitting solid waste in powder form to the presence of a liquid medium, allowing phenol to be transferred to such medium. Subsequently, this liquid could be treated with the microorganisms selected.

**Keywords:** biodegradability; phenol; grinding wheel; microorganism; industrial waste.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Foto 1 Exemplos de rebolos durante o processo de fabricação.....	2
Foto 2 Filtro de manga para coleta dos resíduos (partículas finas).....	3
Foto 3 Amostras dos resíduos A, B e C avaliados no trabalho.....	29
Foto 4 Frascos de ensaio de biodegradabilidade conectados ao sistema de absorção de CO <sub>2</sub> .....	31
Foto 5 Filtração do solo para preparo do inóculo dos testes de biodegradabilidade..	31
Foto 6 Determinação do número de microrganismos.....	32
Foto 7 Sistema de coleta por absorção de CO <sub>2</sub> em solução de Ba (OH) <sub>2</sub> para posterior quantificação por titulação.....	33
Foto 8 Titulação da solução de Ba (OH) <sub>2</sub> onde o CO <sub>2</sub> foi absorvido.....	34
Foto 9 Soluções de meio mineral e linhagens selecionadas para o ensaio.....	37
Foto 10 Remoção de colônias para o preparo do inóculo.....	37
Foto 11 Espectrofotômetro utilizado para ajustes dos inóculos por densidade ótica.....	38
Foto 12 Montagem das amostras para testes de biodegradação do resíduo C por diferentes linhagens.....	40
Foto 13 Lodo coletado da estação de tratamento de efluentes.....	41
Figura 1 Via catabólica do fenol em linhagens adaptadas de <i>C. testosteroni</i> TA441 propostas por Arai et al. ....	12
Figura 2 Principais enzimas que permitem diferenciar as etapas iniciais da degradação microbiana do fenol pela clivagem, na posição <i>meta</i> ou <i>orto</i> do catecol formado por ação da enzima fenol hidroxilase. ....	13
Figura 3 Vias de degradação para o fenol.....	13
Figura 4 Desenho esquemático do teste de biodegradabilidade pela medida do CO <sub>2</sub> formado por microrganismos a partir de uma amostra de material orgânico.....	30
Figura 5 Evolução de CO <sub>2</sub> desprendido no ensaio com resíduo A.....	45
Figura 6 Evolução de CO <sub>2</sub> desprendido no ensaio com resíduo B.....	46
Figura 7 Evolução de CO <sub>2</sub> desprendido no ensaio com resíduo C.....	47
Figura 8 Evolução de CO <sub>2</sub> desprendido no ensaio com fenol e resinas RF.....	50
Figura 9 Evolução de CO <sub>2</sub> desprendido no ensaio com resinas MD e FC.....	51

Figura 10 Estimativa do crescimento de diferentes linhagens microbianas na presença de 1 g/L de fenol, medido pela densidade ótica a 610 nm (DO <sub>610</sub> ).....	58
Figura 11 Estimativa do crescimento de diferentes linhagens microbianas na presença de 5 g/L de fenol, medido pela densidade ótica a 610 nm (DO <sub>610</sub> ).....	58
Figura 12 Estimativa do crescimento de linhagens microbianas isoladas e na forma de consórcios na presença de 5 g/L de fenol, medido pela DO <sub>610</sub> .....	60
Figura 13 Medidas do teor de fenol ao longo do tempo nos experimentos com resíduo C, sem a adição de inóculo, na fração sólida e na fração líquida .....	64
Figura 14 Medidas do teor de fenol ao longo do tempo nos experimentos com o resíduo C, em presença do controle com o bactericida HgCl <sub>2</sub> , determinadas na fração sólida e na fração líquida do experimento .....	64
Figura 15 Medidas do teor de fenol ao longo do tempo nos experimentos com o resíduo C, em presença da linhagem bacteriana FC01, determinadas na fração sólida e na fração líquida do experimento .....	64
Figura 16 Medidas do teor de fenol ao longo do tempo nos experimentos com o resíduo C, em presença das linhagens bacterianas FC01 e RF01, determinadas na fração sólida e na fração líquida do experimento .....	65
Figura 17 Medidas do teor de fenol ao longo do tempo nos experimentos com o resíduo C, em presença das linhagens bacterianas FC01, RF01 e IPT036, determinadas na fração sólida e na fração líquida do experimento.....	65
Figura 18 Medidas do teor de fenol ao longo do tempo nos experimentos em que o resíduo C foi submetido aos microrganismos presentes no lodo de estação de tratamento de efluentes. As medidas foram feitas nas frações sólida e líquida do experimento .....	65
Figura 19 Curva-padrão relacionando a DO <sub>270</sub> com concentração de fenol.....	68
Figura 20 Gráfico da concentração de fenol em função do tempo para os inóculos selecionados. Concentração do fenol de 0,5 g/L.....	70

Figura 21 Evolução da DO <sub>610</sub> em função do tempo para fenol a 0,5 g/L para os diferentes inóculos.....	70
Figura 22 Curva da concentração de fenol em função do tempo para a linhagem FC01, com concentração a partir de 0,5 g/L.....	71
Figura 23 Curva da densidade ótica da linhagem FC01 em função do tempo com concentração de fenol a partir de 0,5 g/L .....	71
Figura 24 Curva da concentração de fenol em função do tempo para a linhagem RF01, com concentração a partir de 0,5 g/L.....	72
Figura 25 Curva da densidade ótica da linhagem RF01 em função do tempo, com concentração de fenol a partir de 0,5 g/L.....	72
Figura 26 Curva da concentração de fenol em função do tempo para a linhagem IPT598 <i>Candida tropicalis</i> , com concentração a partir de 0,5 g/L.....	73
Figura 27 Curva da densidade ótica da linhagem IPT598 <i>Candida tropicalis</i> em função do tempo, com concentração de fenol a partir de 0,5 g/L.....	73
Figura 28 Curva da concentração de fenol em função do tempo para a linhagem IPT036 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440, com concentração a partir de 0,5 g/L.....	74
Figura 29 Curva da densidade ótica da linhagem IPT036 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 em função do tempo, com concentração de fenol a partir de 0,5 g/L.....	74
Figura 30 Curva da concentração de fenol em função do tempo para o lodo da estação de efluentes fenólicos, com concentração a partir de 0,5 g/L.....	75
Figura 31 Curva da densidade ótica do lodo da estação de tratamento de efluentes fenólicos em função do tempo, com concentração de fenol a partir de 0,5 g/L.....	75
Figura 32 Evolução da concentração de fenol de diferentes microrganismos a partir de meio mineral contendo 5 g/L de fenol.....	76



Figura 33 Evolução da densidade de diferentes microrganismos medida por DO <sub>610</sub> a partir de meio mineral contendo 5 g/L de fenol.....	76
Figura 34 Esquema de uma estação proposta para tratamento dos resíduos sólidos industriais com objetivo de eliminação da contaminação do fenol do resíduo sólido e do efluente líquido.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise de resíduo de rebolo orgânico para caracterização de periculosidade.....	5
Tabela 2 Linhagens utilizadas e origem.....	26
Tabela 3 Teor de carbono contido nos resíduos submetidos ao teste de biodegradabilidade pela medida da produção de CO <sub>2</sub> a partir do carbono fornecido.....	43
Tabela 4 Dados de produção de CO <sub>2</sub> resultantes da avaliação do resíduo A.....	45
Tabela 5 Dados de produção de CO <sub>2</sub> resultantes da avaliação do resíduo B.....	46
Tabela 6 Dados de produção de CO <sub>2</sub> resultantes da avaliação do resíduo C.....	47
Tabela 7 Teor de carbono contido nas resinas ensaiadas.....	49
Tabela 8 Dados de produção de CO <sub>2</sub> resultantes da avaliação do fenol e da resina RF.....	50
Tabela 9 Dados de produção de CO <sub>2</sub> resultantes da avaliação da resina MD e da resina FC.....	51
Tabela 10 Valores de densidade ótica com DO <sub>610</sub> quando diferentes linhagens foram submetidas a diferentes concentrações de fenol e observadas após 7 dias de cultura a 30°C.....	54
Tabela 11 Avaliação da evolução do crescimento relativo com o tempo de linhagem em diferentes concentrações de fenol durante o ensaio de 7 dias a 30°C.....	55
Tabela 12 Valores de densidade ótica quando diferentes linhagens foram submetidas a diferentes concentrações de fenol e observadas durante 9 dias de cultura a 30°C.....	57
Tabela 13 Valores de D.O. para consórcios de linhagens submetidas a uma concentração de fenol de 5g/L e observadas durante 9 dias de cultura a 30°C.....	60
Tabela 14 Resultados da análise de fenol na fração sólida em mg/kg.....	62
Tabela 15 Resultados da análise de fenol na fração líquida em mg/L.....	63
Tabela 16 Resultado das medições de concentração do fenol (ppm) e crescimento celular (DO <sub>610</sub> ) para concentração do fenol de 0,5g/L.....	69
Tabela 17 Resultado das medições de concentração do fenol (ppm) e crescimento celular (DO <sub>610</sub> ) para concentração do fenol de 5,0 g/L.....	77

## Sumário

Resumo	
Abstract	
Lista de ilustrações	
Lista de tabelas	
Capítulo 1	
1 INTRODUÇÃO .....	1
Capítulo 2	
2 OBJETIVOS.....	8
2.1 Geral.....	8
2.2 Específico.....	8
Capítulo 3	
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
Capítulo 4	
4 ETAPAS PLANEJADAS.....	24
Capítulo 5	
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	26
5.2 Meios de cultura e soluções reagentes.....	27
5.3 Avaliação da biodegradabilidade imediata pela medida de CO <sub>2</sub> em sistema aberto (Etapas Planejadas A e B).....	29
5.4 Isolamento de microrganismos capazes de degradar fenol .....	36
5.5 Ensaio de biodegradabilidade do fenol com microrganismos específicos e consórcios (Etapa Planejada C).....	37
5.6 Ensaio de biodegradabilidade de resíduos industriais com microrganismos específicos e consórcios (Etapa Planejada D).....	39
5.7 Elaboração de curvas de degradação do fenol por microrganismos selecionados e curvas de evolução da densidade ótica (Etapa Planejada E).....	41

Capítulo 6	
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1 Ensaio de biodegradabilidade dos resíduos industriais com microrganismos do solo – Norma IBAMA E.1.1.2 (Etapa Planejada A).....	43
6.2 Ensaio de biodegradabilidade do fenol e resinas fenólicas com microrganismos do solo - Norma IBAMA E.1.1.2 (Etapa Planejada B).....	48
6.3 Ensaio de biodegradabilidade do fenol com microrganismos específicos e consórcios (Etapa Planejada C).....	53
6.4 Ensaio de biodegradabilidade de resíduos industriais com microrganismos específicos e consórcios (Etapa Planejada D).....	61
6.5 Elaboração de curvas de degradação do fenol por microrganismos selecionados e curvas de evolução da densidade ótica (Etapa Planejada E).....	67
6.6 Proposta para o tratamento dos resíduos.....	78
Capítulo 7	
7 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81