

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS
TÓXICOS: BENZENO, TOLUENO, ETILBENZENO, XILENO (BTEX) E FENOL**

Autora: Daniela Estelita Goes Trigueros

Toledo – PR – Brasil

Fevereiro de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS
TÓXICOS: BENZENO, TOLUENO, ETILBENZENO, XILENO (BTEX) E FENOL**

Autora: Daniela Estelita Goes Trigueros

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexander Dimitrov Kroumov

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área Desenvolvimento de Processos Químicos.

Toledo – PR – Brasil

Fevereiro de 2008

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

T828a	<p>Trigueros, Daniela Estelita Goes</p> <p>Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos : benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol / Daniela Estelita Góes Trigueros. -- Toledo, PR : [s. n.], 2008. 157 f.</p> <p>Orientador: Dr. Aparecido Nivaldo Módenes Co-orientador: Dr. Alexander Dimitrov Kroumov Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.</p> <p>1. Biodegradação 2. Hidrocarbonetos 3.BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno) 4. Cinética 5. Fenol 6. Poluição de água - Prevenção e controle 7. Compostos tóxicos - Cinética de biodegradação 8. Modelagem I. Módenes, Aparecido Nivaldo, Or. II. Kroumov, Alexander Dimitrov, Or. III.T</p> <p>CDD 20. ed. 660.2815 660.2994</p>
-------	---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Daniela Estelita Goes Trigueros perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 12 de fevereiro de 2008.

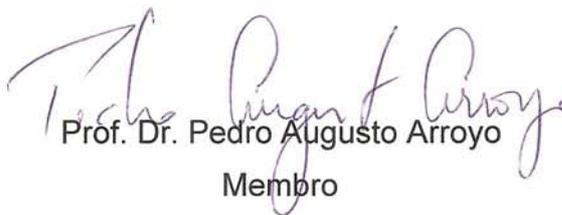
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes
Orientador



Prof. Dr. Mauro Antonio da Silva Sá Ravagnani
Membro



Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo
Membro



Prof. Dr. Sérgio Luiz de Lucena
Membro

*O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso,
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis. (Fernando Pessoa)*

Ao meu pai, José Miguel Trigueros, pelas sábias palavras

Dedico

Ao Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes pela orientação, pelo incentivo e apoio durante esta jornada,

Ao Prof. Dr. Alexander Dimitrov Kroumov por indicar o caminho e pela confiança depositada durante todo o desenvolvimento deste trabalho,

Ao Prof. Dr. Fernando Espinoza Quiñones pela solicitude e disposição em ajudar sempre,

A Cleusa e a Juliana pelo carinho, amizade e atenção durante os momentos mais difíceis,

A CAPES, pelo apoio financeiro,

E a todo o corpo docente do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química...

Meus agradecimentos

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	v
Lista de Ilustrações.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Nomenclatura.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
Capítulo 1	1
1.1. Contextualização do Tema.....	1
1.2. Objetivos da Pesquisa.....	1
1.3. Organização da Dissertação	2
Capítulo 2	3
2.1. Recursos Hídricos	3
2.2. Gasolina e Compostos Tóxicos	5
2.3. Compostos BTEX.....	8
2.4. Tecnologias de Remediação.....	9
2.5. Processos Biotecnológicos e a Biodegradação	14
Capítulo 3	16
3.1. Modelagem e Avaliação da Biodegradação dos Compostos BTEX	16
3.1.1. <i>Microorganismos utilizados na biodegradação de compostos tóxicos</i>	36
3.1.1.1. Utilização de cultura pura	36
3.1.1.2. Utilização de mistura de culturas	38
3.1.2. <i>Metabolismo aeróbico e anaeróbico dos compostos BTEX</i>	40
3.1.3. <i>Caminhos metabólicos</i>	41
3.2. Mecanismos de Regulação Gênica	45
Capítulo 4	48
4.1. Princípio da Análise de Sistema no Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos Sofisticados.....	48
4.2. Modelos Cinéticos de Crescimento Microbiano	50
4.2.1. <i>Classificação dos modelos cinéticos</i>	50
4.2.2. <i>Taxa de crescimento específico</i>	50
4.2.3. <i>Modelos para único substrato</i>	51
4.2.3.1. Modelo de Monod.....	51
4.2.3.2. Modelo de Andrews.....	53

4.2.4.	<i>Modelos para múltiplos substratos</i>	53
4.2.4.1.	Modelo de Inibição Competitiva	54
4.2.4.2.	Modelo de Inibição Não-Competitiva.....	55
4.2.4.3.	Modelo de Inibição Acompetitiva.....	55
4.2.4.4.	Modelo <i>SKIP</i>	55
4.3.	Balancos de Massa	56
4.3.1.	<i>Operação descontínua</i>	56
4.3.2.	<i>Operação contínua</i>	56
4.3.3.	<i>Operação contínua – com reciclo</i>	57
4.3.4.	<i>Processo aeróbico</i>	57
4.4.	Métodos de Identificação de Parâmetros	59
4.4.1.	<i>Enxame de Partículas ou Particle Swarm Optimization - PSO</i>	61
4.5.	Procedimento para Identificação dos Parâmetros	65
Capítulo 5	67	
5.1.	Biodegradação dos Compostos BTEX	67
5.1.1.	<i>Modelos cinéticos para a biodegradação de único substrato</i>	69
5.1.1.1.	Modelo de Monod.....	69
5.1.1.2.	Modelo de Andrews.....	70
5.1.1.3.	Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação individual dos substratos BTEX	70
5.1.2.	<i>Modelos cinéticos para a biodegradação de múltiplos substratos</i>	77
5.1.2.1.	Modelo de Inibição Competitiva	78
5.1.2.2.	Modelo de Inibição Não-Competitiva.....	78
5.1.2.3.	Modelo de Inibição Acompetitiva.....	79
5.1.2.4.	Modelo <i>SKIP</i>	79
5.1.2.5.	Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura BTEX	80
5.2.	Biodegradação dos Compostos BTF	87
5.2.1.	<i>Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação individual dos substratos BTF</i>	90
5.2.2.	<i>Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura benzeno-tolueno</i>	96
5.2.3.	<i>Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura benzeno-fenol</i>	104
5.2.4.	<i>Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura tolueno-fenol</i>	110
5.2.5.	<i>Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol</i>	116
Capítulo 6	122	
6.1.	Conclusões	122
6.2.	Sugestões	125
Referências	126	
Anexos	147	

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Porcentagem em massa dos compostos BTEX na gasolina.....	5
Figura 2.2 – Fenômenos que ocorrem durante o derramamento de gasolina.	8
Figura 2.3 – Estrutura química dos compostos BTEX.....	9
Figura 3.1 – Esquema da clivagem do catecol via <i>orto</i>	42
Figura 3.2 – Esquema da clivagem do catecol via <i>meta</i>	42
Figura 3.3 – Esquema do mecanismo de repressão catabólica.....	46
Figura 4.1 – Esquema do modelo completo matemático do biorreator.	48
Figura 4.2 – Trajetória de uma partícula do algoritmo <i>PSO</i>	61
Figura 4.3 – Esquema do algoritmo <i>PSO</i>	63
Figura 5.1 – Simulações do modelo de Monod e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o benzeno.	72
Figura 5.2 – Simulações do modelo de Andrews e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o benzeno.	72
Figura 5.3 – Simulações do modelo de Monod e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o tolueno.	72
Figura 5.4 – Simulações do modelo de Andrews e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o tolueno.	72
Figura 5.5 – Simulações do modelo de Monod e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o etilbenzeno.	72
Figura 5.6 – Simulações do modelo de Andrews e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o etilbenzeno.	72
Figura 5.7 – Simulações do modelo de Monod e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o xileno.	73
Figura 5.8 – Simulações do modelo de Andrews e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o xileno.	73
Figura 5.9 – Evolução dos melhores valores globais da função objetivo aplicando o modelo de Andrews na biodegradação do etilbenzeno.	74
Figura 5.10 – Simulações da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Monod para os compostos BTEX.	75
Figura 5.11 – Simulações da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Andrews para os compostos BTEX.	76
Figura 5.12 – Simulações do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o BTEX.	82

Figura 5.13 – Simulações do modelo de Inibição Competitiva e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o BTEX.	83
Figura 5.14 – Simulações do modelo de Inibição Não-Competitiva e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o BTEX.	84
Figura 5.15 – Simulações do modelo de Inibição Acompetitiva e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o BTEX.	84
Figura 5.16 – Evolução dos melhores valores globais da função objetivo aplicando o modelo <i>SKIP</i> na biodegradação do BTEX.	85
Figura 5.17 – Utilização dos compostos BTEX e simulação do crescimento da biomassa aplicando o modelo <i>SKIP</i>	86
Figura 5.18 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para o benzeno.	92
Figura 5.19 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	92
Figura 5.20 – Simulação do modelo de Monod e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para o benzeno.	92
Figura 5.21 – Simulação do modelo de Monod e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	92
Figura 5.22 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para o tolueno.	93
Figura 5.23 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	93
Figura 5.24 – Simulação do modelo de Monod e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para o tolueno.	93
Figura 5.25 – Simulação do modelo de Monod e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	93
Figura 5.26 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para o fenol.	94
Figura 5.27 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	94
Figura 5.28 – Simulação da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Andrews para o benzeno.	95
Figura 5.29 – Simulação da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Andrews para o tolueno.	95
Figura 5.30 – Simulação da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Andrews para o fenol.	95

Figura 5.31 – Simulação do modelo de inibição competitiva modificado e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno.....	98
Figura 5.32 – Simulação do modelo de inibição competitiva modificado e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	98
Figura 5.33 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno.	99
Figura 5.34 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.....	99
Figura 5.35 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno.	99
Figura 5.36 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	99
Figura 5.37 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno.	100
Figura 5.38 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	100
Figura 5.39 – Simulação do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno.....	100
Figura 5.40 – Simulação do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.....	100
Figura 5.41 – Rota metabólica do tolueno, benzeno e fenol por <i>Pseudomonas putida</i> F1.	101
Figura 5.42 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva modificado para o benzeno.	103
Figura 5.43 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva modificado para o tolueno.	103
Figura 5.44 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-fenol.	106
Figura 5.45 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.....	106
Figura 5.46 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-fenol.	107
Figura 5.47 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	107
Figura 5.48 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-fenol.	108
Figura 5.49 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	108

Figura 5.50 – Simulação do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-fenol.....	108
Figura 5.51 – Simulação do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.....	108
Figura 5.52 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva modificado para o benzeno.	110
Figura 5.53 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva modificado para o fenol.	110
Figura 5.54 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura tolueno-fenol.	111
Figura 5.55 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.....	111
Figura 5.56 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura tolueno-fenol.	112
Figura 5.57 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	112
Figura 5.58 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura tolueno-fenol.	113
Figura 5.59 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	113
Figura 5.60 – Simulação do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura tolueno-fenol.....	114
Figura 5.61 – Simulação do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.....	114
Figura 5.62 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva para o tolueno.....	115
Figura 5.63 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva para o fenol.....	115
Figura 5.64 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno-fenol.	118
Figura 5.65 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.....	118
Figura 5.66 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno-fenol.	119
Figura 5.67 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	119

Figura 5.68 – Simulação do Modelo de Inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno-fenol.	119
Figura 5.69 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.	119
Figura 5.70 – Simulação do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a mistura benzeno-tolueno-fenol.....	120
Figura 5.71 – Simulação do modelo <i>SKIP</i> e dados experimentais (HAMED <i>et al.</i> , 2003) para a biomassa.....	120

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Esquema da degradação aeróbica e anaeróbica dos compostos BTEX.....	147
Ilustração 2 – Caminhos metabólicos da biodegradação aeróbica do tolueno utilizando-se (a) <i>Pseudomonas putida</i> mt-2 e (b) <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1.	148
Ilustração 3 – Caminhos metabólicos da biodegradação aeróbica do tolueno utilizando-se (a) <i>Burkholderia</i> G4, (b) <i>Pseudomonas pickettii</i> PKO1 e (c) <i>Pseudomonas putida</i> F1.....	149
Ilustração 4 – Caminhos metabólicos da biodegradação aeróbica do etilbenzeno utilizando-se <i>Pseudomonas sp</i> NCIB.	150
Ilustração 5 – Caminho metabólico da biodegradação aeróbica do o-xileno utilizando-se <i>Burkholderia cepacia</i> MB2.	151
Ilustração 6 – Caminhos metabólicos da biodegradação aeróbica do p-xileno utilizando-se <i>Pseudomonas putida</i>	152
Ilustração 7 – Caminho metabólico da biodegradação aeróbica do m-xileno utilizando-se <i>Pseudomonas putida</i> mt-2.	153
Ilustração 8 – Caminho metabólico da biodegradação anaeróbica do tolueno utilizando-se <i>Azoarcus sp.</i> T ou <i>Thauera aromática</i>	154
Ilustração 9 – Caminho metabólico da biodegradação anaeróbica do etilbenzeno utilizando-se <i>Azoarcus sp.</i> EBN1 ou EB1.	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas dos compostos BTEX.....	6
Tabela 2.2 – Quantidades de postos de combustíveis nas regiões e estados brasileiros	7
Tabela 3.1 – Reações redox envolvidas na degradação dos compostos BTEX associadas à energia livre de Gibbs	41
Tabela 3.2 – Caminhos metabólicos caracterizados por microorganismos aeróbicos degradadores dos compostos BTEX	47
Tabela 4.1 – Modelos cinéticos não-estruturados para único substrato	52
Tabela 4.2 – Modelos cinéticos não-estruturados para múltiplos substratos	54
Tabela 4.3 – Valores dos parâmetros do método <i>PSO</i> utilizados nos modelos cinéticos.....	66
Tabela 5.1 – Dados experimentais do processo de biodegradação do BTEX	68
Tabela 5.2 – Dados experimentais do processo de biodegradação do benzeno.....	68
Tabela 5.3 – Dados experimentais do processo de biodegradação do tolueno.....	68
Tabela 5.4 – Dados experimentais do processo de biodegradação do etilbenzeno	68
Tabela 5.5 – Dados experimentais do processo de biodegradação do o-xileno	69
Tabela 5.6 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação dos compostos BTEX individualmente - Modelo de Monod	71
Tabela 5.7 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação dos compostos BTEX individualmente - Modelo de Andrews	71
Tabela 5.8 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos cinéticos de único substrato na biodegradação dos compostos BTEX.....	74
Tabela 5.9 – Valores da taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica dos compostos BTEX estimados aplicando o modelo de Andrews.....	77
Tabela 5.10 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação dos compostos BTEX	80
Tabela 5.11 – Valores dos parâmetros cinéticos e estequiométricos estimados para os compostos BTEX aplicando o Modelo <i>SKIP</i>	81
Tabela 5.12 – Valores dos parâmetros interativos estimados para os compostos BTEX aplicando o Modelo <i>SKIP</i>	81
Tabela 5.13 – Dados experimentais do processo de biodegradação do fenol.....	88
Tabela 5.14 – Dados experimentais do processo de biodegradação do benzeno.....	88
Tabela 5.15 – Dados experimentais do processo de biodegradação do tolueno.....	89
Tabela 5.16 – Dados experimentais do processo de biodegradação da mistura benzeno-tolueno	89

Tabela 5.17 – Dados experimentais do processo de biodegradação da mistura benzeno-fenol	89
Tabela 5.18 – Dados experimentais do processo de biodegradação da mistura tolueno-fenol	90
Tabela 5.19 – Dados experimentais do processo de biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol	90
Tabela 5.20 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação dos compostos BTF individualmente aplicando os modelos de único substrato.....	91
Tabela 5.21 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de único substrato na biodegradação dos compostos BTF.....	95
Tabela 5.22 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação da mistura benzeno-tolueno aplicando os modelos de múltiplos substratos	96
Tabela 5.23 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação da mistura benzeno-tolueno	97
Tabela 5.24 – Valores dos parâmetros estimados aplicando o Modelo de Inibição Competitiva modificado na biodegradação da mistura benzeno-tolueno	98
Tabela 5.25 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação da mistura benzeno-fenol aplicando os modelos de múltiplos substratos	104
Tabela 5.26 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação da mistura benzeno-fenol	105
Tabela 5.27 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação da mistura tolueno-fenol aplicando os modelos de múltiplos substratos	110
Tabela 5.28 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação da mistura tolueno-fenol	112
Tabela 5.29 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol aplicando os modelos de múltiplos substratos	116
Tabela 5.30 – Valores dos parâmetros interativos estimados para a cinética de biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol aplicando o modelo <i>SKIP</i>	117
Tabela 5.31 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol	117
Tabela 5.32 – Cinética de biodegradação de múltiplos substratos BTEX e BTF selecionados na literatura	121
Tabela 1 – Sumário da cinética de crescimento obtida em vários estudos de biodegradação de compostos tóxicos.....	156

NOMENCLATURA

TOD	caminho metabólico - enzima tolueno dioxigenase	
TOL	caminho metabólico - enzima mono-oxigenase	
TOM	caminho metabólico - tolueno 2 mono-oxigenase	
TBU	caminho metabólico - enzima tolueno 3 mono-oxigenase	
TMO	caminho metabólico - enzima tolueno 4 mono-oxigenase	
c_1	coeficiente de aceleração local	(-)
c_2	coeficiente de aceleração global	(-)
$C_{O_2}^*$	concentração de saturação de oxigênio dissolvido	(mg L ⁻¹)
C_{O_2}	concentração de oxigênio dissolvido	(mg L ⁻¹)
DR	taxa de diluição	(h ⁻¹)
FR	fluxo volumétrico ou taxa de alimentação	(L h ⁻¹)
$f(\vec{X}_{i^{melhor}}^{(k)})$	desempenho do vetor melhor posição atual da partícula i	(-)
$f(\vec{X}_i^{(k+1)})$	desempenho do vetor nova posição da partícula i	(-)
$f(\vec{X}_{i^{melhor}}^{(k+1)})$	desempenho do vetor nova melhor posição da partícula i	(-)
$f(\vec{X}_g^{(k)})$	desempenho do vetor melhor posição do grupo	(-)
I_{ji}	parâmetro de iteração do substrato j sobre o substrato i	(-)
K_s	constante de saturação	(mg L ⁻¹)
K_i	constante de inibição	(mg L ⁻¹)
$K_{s_{O_2}}$	constante de saturação do oxigênio;	(mg L ⁻¹)
Kla_{O_2}	coeficiente global de transferência de massa do oxigênio	(h ⁻¹)
K	número de iteração	(-)
OTR	taxa de transferência de massa do oxigênio	(mg L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR	taxa de consumo de oxigênio	(mg L ⁻¹ h ⁻¹)
R	resíduo mínimo ou função objetivo	(-)
\tilde{S}_i	valor simulado da variável substrato	(mg L ⁻¹)
S_i	valor experimental da variável substrato	(mg L ⁻¹)
$S_i^{máx}$	máximo valor experimental da variável substrato	(mg L ⁻¹)
S^*	concentração do substrato em que μ_x atinge o valor máximo	(mg L ⁻¹)
SGR	taxa de crescimento específico	(h ⁻¹)

S_i	concentração do substrato i	(mg L ⁻¹)
S_{i0in}	concentração inicial do substrato i na alimentação	(mg L ⁻¹)
V	volume do reator	(L)
$\vec{V}_i^{(k)}$	vetor velocidade atual da partícula i	(-)
$\vec{V}_i^{(k+1)}$	vetor velocidade de atualização da partícula i	(-)
X	concentração celular	(mg L ⁻¹)
\tilde{X}_i	valor simulado da variável biomassa	(mg L ⁻¹)
X_i	valor experimental da variável biomassa	(mg L ⁻¹)
$X_i^{máx}$	máximo valor experimental da variável biomassa	(mg L ⁻¹)
\vec{X}_{min}	limite mínimo da partícula	(-)
$\vec{X}_{máx}$	limite máximo da partícula	(-)
$\vec{X}_i^{(k)}$	vetor posição atual da partícula i	(-)
$\vec{X}_i^{(k+1)}$	vetor nova posição da partícula i	(-)
\vec{X}_i^k	vetor melhor posição visitada pela partícula i	(-)
$\vec{X}_g^{(k)}$	vetor melhor posição visitada pelo grupo	(-)
$Y_{X/S}$	coeficiente de rendimento	(mg mg ⁻¹)
Y_{x/O_2}	coeficiente de rendimento no oxigênio;	(mg mg ⁻¹)
k	iteração	(-)
λ_1	variável aleatória no intervalo de (0,1)	(-)
λ_2	variável aleatória no intervalo de (0,1)	(-)
μ_{x_i}	taxa de crescimento específico no substrato i	(h ⁻¹)
$\mu_{máx}$	taxa máxima de crescimento específico	(h ⁻¹)
μ_{xO_2}	taxa de crescimento específico no oxigênio;	(h ⁻¹)
$\mu_{máxO_2}$	taxa máxima de crescimento específico no oxigênio;	(h ⁻¹)
μ^*	valor máximo de μ quando a concentração é S^*	(h ⁻¹)
$\omega^{(k)}$	variável fator de inércia	(-)
ω_{final}	fator de inércia final	(-)
$\omega_{inicial}$	fator de inércia inicial	(-)

TRIGUEROS, Daniela Estelita Goes. Avaliação da Cinética de Biodegradação dos Compostos Tóxicos: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno (BTEX) e Fenol. 157p. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, coletivamente conhecidos como BTEX são compostos tóxicos presentes em derivados de petróleo, como a gasolina, e utilizados em larga escala nas indústrias químicas e petroquímicas. Estes compostos quando liberados no meio ambiente contaminam o solo e as águas subterrâneas, podendo inviabilizar a exploração de aquíferos, que atualmente representam uma fonte alternativa de água potável. Portanto, é fundamental a pesquisa de processos de biodegradação, particularmente quando múltiplos substratos estão presentes no sistema. Neste trabalho investigou-se a cinética de biodegradação dos compostos BTEX, individualmente e em mistura. Para tanto, o desempenho de diversos modelos não-estruturados de crescimento microbiano, baseado na cinética no nível da população, foi avaliado utilizando-se dados experimentais obtidos da literatura. As equações do balanço material em operação batelada foram numericamente resolvidas (método RKF45) aplicando os modelos de Monod e Andrews à cinética de biodegradação individual dos substratos. Igualmente, as equações aplicadas à cinética de biodegradação da mistura BTEX foram resolvidas considerando os modelos de inibição competitiva, acompetitiva e não-competitiva, bem como o modelo soma cinética dos parâmetros de interação (*sum kinetic interactions parameters – SKIP*). Para o entendimento dos mecanismos envolvidos na biodegradação de múltiplos substratos tóxicos, também foram investigadas a cinética de biodegradação dos compostos BTF (benzeno, tolueno e fenol), individualmente e em misturas binárias e ternária. Neste caso, algumas modificações nos modelos de inibição foram propostas para descrever a cinética de biodegradação das misturas benzeno-tolueno e benzeno-fenol. Os parâmetros cinéticos foram estimados por meio de um método de otimização global conhecido como Enxame de Partículas (*Particle Swarm Optimization – PSO*),

implementado no *software Maple*[®], utilizando a função dos mínimos quadrados como critério estatístico. Os parâmetros obtidos no presente trabalho mostraram-se coerentes com valores relatados na literatura. A biodegradação individual dos substratos BTEX foi adequadamente representada pelos modelos de Andrews e Monod. O modelo *SKIP* proporcionou a melhor representação da cinética de biodegradação da mistura BTEX, e conseguiu mostrar a existência de interações não específicas entre os substratos BTEX. Além do ótimo ajuste do modelo *SKIP*, inferências sobre o comportamento dos demais modelos avaliados indicam uma mistura de inibições competitiva e não-competitiva, concordando com o fato de que, a mistura de culturas microbianas utilizada na biodegradação, pode apresentar múltiplos caminhos metabólicos para a biodegradação dos compostos BTEX. Por meio do modelo *SKIP* estimou-se as interações entre os substratos BTEX, onde o etilbenzeno apresentou o maior efeito de inibição sobre os demais compostos, ao passo que o xileno mostrou o menor efeito. O modelo de inibição competitiva representou adequadamente a cinética de biodegradação dos substratos BTF, em misturas binárias e ternária, concordando com o fato de que estes compostos são catabolizados pelo mesmo caminho enzimático da *Pseudomonas putida* F1 utilizada na biodegradação. Além disso, as modificações propostas para os modelos de inibição, representaram melhor a cinética de biodegradação das misturas benzeno-tolueno e benzeno-fenol. Os resultados alcançados neste trabalho mostram que os melhores modelos podem ser aplicados com sucesso na otimização dos processos de biodegradação de compostos tóxicos em diferentes tipos de biorreatores e condições operacionais.

Palavras – Chave: biodegradação, PSO, modelagem, BTEX, fenol.

**TRIGUEROS, Daniela Estelita Goes. Evaluation of Biodegradation Kinetics of Toxics Compounds: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene (BTEX) and Phenol. 157p. 2008. Master dissertation in Chemical Engineering
West Paraná State University**

ABSTRACT

The aromatics hydrocarbons usually known as BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes isomers) are toxics compounds presented in many petroleum products, such as gasoline, and are also widely used in chemical and petrochemical industries. When these compounds are released in the environment a contamination of the soil and the groundwater took place. As a result, the use of the aquifers becomes impossible. Groundwaters nowadays represent an alternative potable water source in many countries. Therefore, it's crucially important to study the biodegradation process, in particular when multiple substrates are presented in the system. In this work, the kinetics of BTEX biodegradation was studied, individually and as in mixture. Hence, the performance of the different microbial growth unstructured models, based on the population level kinetics were investigated by using experimental data from literature. The equations of the material balances, for batch operation mode, were numerically solved (RKF45 method) applying the Monod and Andrews models to describe an individual substrates biodegradation kinetics. Similarly, the applied equations describing mixture substrates biodegradation kinetics were solved by using the competitive, noncompetitive and uncompetitive inhibitions models as well as the sum kinetic interactions parameters (SKIP) model. Moreover, in order to understand the mechanisms involved in the biodegradation process of the BTP toxics compounds (benzene, toluene, and phenol), individually and as the binary and ternary mixtures, were investigated. In this case, some inhibition models modifications were proposed in order to describe the biodegradation kinetics of the benzene-toluene and benzene-phenol mixtures. The kinetic parameters were estimated by using Particle Swarm global optimization method. The experimental data were taken from the literature and the programs were coded in Maple software. The least square method was used as a statistical criterion

of the search. The evaluated kinetic parameters values obtained in the present study were found to describe very well experimental data and to be in accordance with the values reported in the literature. The simple Monod and Andrews models accurately predict the BTEX individual biodegradation kinetics. The SKIP model provided the best description of BTEX biodegradation kinetics, showing the existence of non specific interactions between the BTEX substrates. The other models behavior indicated a presence of a competitive and a noncompetitive inhibition in the mixtures, agreeing with the reality that a mixture culture used in the biodegradation can have multiples metabolic pathways to the BTEX biodegradation. By applying the SKIP model, the interactions between BTEX substrates was estimated, where the ethylbenzene expressed a higher inhibitory effect in the mixtures, whereas the xylene shown a smaller one. The competitive inhibition model adequately described the BTP binary and ternary mixtures biodegradation process, because substrates biodegradation is catabolized via the same enzymatic pathway of *Pseudomonas putida* F1. Moreover, the inhibition models modifications proposed described better the biodegradation kinetics of benzene-toluene and benzene-phenol mixtures. Finally, the obtained results in this work have shown that the best models can be successfully applied for optimization of toxics compounds biodegradation process by applying different bioreactors types and operational conditions.

Keywords: biodegradation, PSO, modeling, BTEX, phenol.

Capítulo 1

1.1. Contextualização do Tema

Os hidrocarbonetos aromáticos conhecidos coletivamente como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto-meta-para-xileno*), presentes em produtos derivados de petróleo são extremamente tóxicos e frequentemente contaminam o meio ambiente em consequência de descargas industriais e derramamentos de combustíveis. Os impactos ambientais decorrentes da presença destes compostos em combustíveis, como a gasolina, têm sido objeto de crescente preocupação de órgãos ambientais em todo o mundo. Uma das grandes preocupações está relacionada à preservação dos recursos hídricos com ênfase às águas subterrâneas, cuja contaminação pode inviabilizar a exploração de aquíferos.

Frente à necessidade cada vez maior de preservação dos recursos hídricos, é crescente a busca por tecnologias que minimizem os impactos causados pela presença de compostos tóxicos no meio ambiente. Dentre as tecnologias utilizadas na remediação e tratamento de áreas impactadas por combustíveis derivados de petróleo, a biodegradação vem despontando como uma técnica bastante eficaz, podendo ser utilizada como complemento às tecnologias convencionais. A biodegradação de poluentes depende da atividade de microorganismos aeróbios e anaeróbios capazes de metabolizá-los e a utilização destes microorganismos em reatores, visando o tratamento dos mais diferentes tipos de águas residuárias, vem se tornando uma nova estratégia de biorremediação.

A realização de pesquisas que relatem a biodegradação de compostos tóxicos, como o BTEX, com o objetivo de restaurar a qualidade de águas subterrâneas até níveis previstos pelos órgãos de fiscalização ambiental, é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de remediação. Para isso, o conhecimento da cinética de biodegradação é crucial para a predição da taxa de remoção dos poluentes e alcance de tecnologias mais eficientes.

1.2. Objetivos da Pesquisa

O objetivo geral da pesquisa consiste na avaliação do desempenho de modelos cinéticos de crescimento microbiano em descrever a biodegradação dos

compostos BTEX, individualmente e em mistura, determinando a modelagem matemática que melhor descreve a cinética de biodegradação nas condições referentes aos dados experimentais obtidos da literatura.

Além disso, também serão avaliados os modelos para descrever a cinética de biodegradação dos compostos BTF (benzeno, tolueno e fenol), individualmente e em misturas binárias e ternária, com a finalidade de ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na biodegradação de compostos tóxicos em geral.

Para tanto, o trabalho tem como objetivo específico a implementação de um método de busca, conhecido como Enxame de Partículas, utilizando-o como ferramenta na estimativa dos parâmetros dos modelos cinéticos avaliados.

1.3. Organização da Dissertação

Este capítulo apresenta a justificativa do tema e objetivos a serem atingidos e mostra a estrutura da dissertação organizada nos capítulos subseqüentes:

O Capítulo 2 refere-se aos aspectos relevantes do tema proposto, tais como a importância da eliminação de compostos tóxicos do meio ambiente, tecnologias de remediação de áreas impactadas, entre outros assuntos pertinentes.

O Capítulo 3 traz uma revisão e análise da literatura, abordando os principais trabalhos relacionados à biodegradação de compostos BTEX e outros compostos tóxicos, bem como os microorganismos utilizados no processo, além de modelos cinéticos de crescimento microbiano adotados para descrever a biodegradação.

O Capítulo 4 apresenta a metodologia adotada, além de alguns conceitos fundamentais para a compreensão de processos de biodegradação. Além disso, apresenta o método Enxame de Partículas, implementado neste trabalho, para estimativa dos parâmetros dos modelos cinéticos.

O Capítulo 5 apresenta os resultados alcançados e a discussão sobre o desempenho de diversos modelos não-estruturados de crescimento microbiano, na descrição da biodegradação de compostos tóxicos BTEX e BTF, a partir do qual as modificações foram propostas.

O Capítulo 6 apresenta as conclusões e sugestões para futuros trabalhos.

Por fim, são apresentadas as Referências que contribuíram para a realização deste trabalho, e em Anexos tem-se algumas informações importantes para uma melhor compreensão do mesmo.

Capítulo 2

2.1. Recursos Hídricos

A deterioração da qualidade das águas superficiais vem gerando problemas de escassez dos recursos hídricos do planeta. Segundo a Organização das Nações Unidas, atualmente mais de um bilhão de pessoas vivem sob condições insuficientes de disponibilidade de água para consumo e, cerca de cinco bilhões e meio de pessoas estarão vivendo em áreas com moderada ou séria falta de água nos próximos 25 anos (SETTI *et al.*, 2001). Estima-se que o volume total de água no planeta seja de 1.385.984 km³, sendo que desse total 99,4% apresenta-se em oceanos, mares e geleiras, ou seja, inadequada e indisponível para o consumo humano. A parcela disponível na forma de água doce corresponde a 0,6%, dos quais 98,5% estão na forma de águas subterrâneas (REBOUÇAS, 2002). Água subterrânea é toda a água que ocorre abaixo da superfície da Terra, preenchendo os poros ou vazios intergranulares das rochas sedimentares, ou as fraturas, falhas e fissuras das rochas compactas, e que sendo submetida às forças de adesão e de gravidade desempenha um papel essencial na manutenção da umidade do solo, do fluxo dos rios, lagos e brejos (BORGUETTI *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas as águas subterrâneas vêm assumindo papel relevante como fonte de abastecimento doméstico, industrial e agrícola, tornando-se uma reserva estratégica de água doce para o abastecimento público no planeta. A Organização das Nações Unidas estima que entre 1,5 e 2,7 bilhões de pessoas no mundo são abastecidos pelas águas subterrâneas (MORRIS, 2003). Um levantamento realizado pelo IBGE (2003) determinou que aproximadamente 61% da população brasileira utilizam esta fonte de abastecimento para fins domésticos, dos quais 10% provêm de poços rasos (até 30 m de profundidade), 20% de nascentes ou fontes e 70% de poços profundos (acima de 50 m de profundidade). No estado de São Paulo, 72% dos municípios são, total ou parcialmente, abastecidos por águas subterrâneas (CETESB, 2007). A demanda de 70 a 90% do abastecimento público de países como, Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, França, Holanda, Hungria, Itália, Marrocos, Rússia e Suíça, provêm de águas subterrâneas e, na Arábia Saudita este fornecimento é de 100% (REBOUÇAS *et al.*, 2002).

Em geral, as águas subterrâneas são fontes potenciais de água de boa qualidade e baixo custo de exploração devido a sua potabilidade e não necessidade de pré-tratamento, pois a sua purificação ocorre durante a percolação no subsolo, por meio dos processos de filtração e depuração. Contudo, a qualidade das águas subterrâneas vem sendo questionada devido à contaminação por compostos tóxicos, e a maior preocupação está relacionada à possível inviabilização da exploração de aquíferos.

Visto que o armazenamento de combustíveis é realizado em tanques subterrâneos, os vários problemas decorrentes deste procedimento têm se tornado fonte de poluição ambiental relevante, afetando a qualidade do solo e das águas subterrâneas. Além disso, a contaminação também ocorre por meio dos poços da produção de petróleo, refinarias, tubulações e terminais de distribuição, atividades de mineração, utilização de defensivos agrícolas, esgotos, aterros sanitários e resíduos industriais. Dos diversos compostos orgânicos que estão presentes em tais atividades, os hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno, coletivamente conhecidos como BTEX, são os contaminantes mais preocupantes devido a sua extrema toxicidade. São altamente poluentes, em particular devido a sua alta toxicidade e solubilidade em água, além de o benzeno ser comprovadamente carcinogênico. Os compostos BTEX estão presentes em combustíveis derivados de petróleo e correspondem ao maior constituinte da gasolina.

No Brasil, o número alarmante de vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo não tem sido surpresa, já que no país a instalação de aproximadamente 160.000 tanques ocorreu na década de 70, para uma vida útil de 25 anos. Assim, a contaminação de aquíferos pelo derramamento de combustíveis derivados de petróleo tornou-se uma ameaça à qualidade das águas subterrâneas, e, portanto apresenta-se como um assunto de grande interesse nas últimas décadas. Dentre as diversas pesquisas referentes à compostos tóxicos BTEX existentes no Brasil e no mundo estão os trabalhos de LODAYA (1989), OLIVEIRA (1992), CAPUANO & JOHNSON (1996), CORSEUIL & ALVAREZ (1996a), CORSEUIL & MARINS (1997), SPILBORGS (1997), DOURADO (1998), FERREIRA (2000), MAXIMIANO (2001), SILVA *et al.* (2002), SCHREIBER & BAHR (2002), KOUSSIS *et al.* (2003), RICHNOW *et al.* (2003), KAIPPER (2003) e MINDRISZ (2006).

2.2. Gasolina e Compostos Tóxicos

A gasolina é um combustível derivado do petróleo, constituído por uma mistura de mais de cem hidrocarbonetos, primariamente alcanos de cadeia linear e cicloalcanos. A gasolina com características primárias, quando vaporizada em mistura com o ar, tende a sofrer ignição espontânea no cilindro de um motor de combustão interna. Isso ocorre antes que a gasolina seja comprimida e receba uma descarga elétrica para provocar sua ignição e, conseqüentemente, o motor perde potência. Para superar este problema, toda gasolina é formulada para conter substâncias antidetonantes, como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto-meta-para-xilenos*. Estes compostos correspondem aos indicadores específicos utilizados para se caracterizar a contaminação de áreas por gasolina (MINDRINSZ, 2006), pois são altamente solúveis em água e, portanto, são os poluentes que primeiro atingirão as águas subterrâneas. Os compostos BTEX são os hidrocarbonetos mais abundantes da gasolina, podendo representar uma parcela de 18% a 25% em massa (ANP, 2006). As porcentagens dos compostos BTEX na gasolina são apresentadas na Figura 2.1.

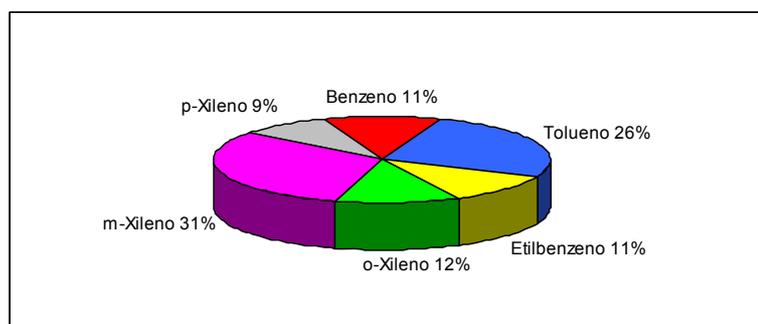


Figura 2. 1 – Porcentagem em massa dos compostos BTEX na gasolina. (ANP, 2006)

Além dos hidrocarbonetos aromáticos, existem outros compostos tóxicos presentes na gasolina, tais como os íons metálicos e compostos nitrogenados. A presença de compostos nitrogenados também indica o grau de contaminação e as condições higiênico-sanitárias de aquíferos (ALABURDA & NISHIHARA, 1998 *apud* SILVA *et al.*, 2002). O hidrocarboneto oxigenado metil terc-butil éter (MTBE) foi utilizado como aditivo da gasolina para reduzir as emissões de gases tóxicos, monóxido de carbono e compostos orgânicos voláteis, a partir da década de 80, mas a sua comercialização foi proibida no Brasil, em 1999, em virtude de sua toxicidade. No entanto, o estado do Rio Grande do Sul ainda possui o MTBE incorporado em

sua gasolina. Frente ao cenário ambiental atual enfatiza-se a importância do etanol, no Brasil e no mundo, como o oxigenado mais correto a ser utilizado como aditivo da gasolina, em substituição ao MTBE.

A mobilidade da gasolina na água e no solo são influenciadas pelas propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos presentes, dentre as quais as mais importantes são a solubilidade, a pressão de vapor, a densidade, a viscosidade dinâmica e o coeficiente de partição octanol-água (MILLER, 2001 *apud* TROVÃO, 2006). O coeficiente de partição octanol-água é definido como a razão da concentração de um composto orgânico dissolvido entre o octanol e a água, em equilíbrio, e descreve a tendência de partição de um composto entre a fase orgânica e a fase aquosa. Quanto maior esta razão, maior será a hidrofobicidade do composto. Na Tabela 2.1 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas dos compostos BTEX.

Tabela 2. 1 – Propriedades físico-químicas dos compostos BTEX

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Densidade (g cm ⁻³)	Solubilidade em água (25° C) (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (atm)	Constante de Henry K _h (10 ³) (atm m ³ mol ⁻¹)	Coeficiente de partição octanol/água Log K _{ow} (25° C)
Benzeno	C ₆ H ₆	78,10	0,880	1780	0,1250	5,5	2,13
Tolueno	C ₇ H ₈	92,10	0,867	515	0,0370	6,6	2,69
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,867	152	0,0125	8,7	3,13
p - Xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,860	198	0,00895	5,0	3,15
m - Xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,864	187	0,00803	5,0	3,20
o - Xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,880	175	0,00697	4,0	3,12

Fonte: KAIPPER (2003)

Além das diversas atividades que promovem a degradação ambiental, citadas anteriormente, também são freqüentes poluidores os derramamentos acidentais de combustíveis em postos de revenda (TROVÃO, 2006). Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) em 2005 existiam no Brasil 35.585 postos de combustíveis cadastrados, além de 13 refinarias, 24 terminais marítimos, 27 terminais terrestres, 551 bases de distribuição, 165 distribuidoras, e uma produção de aproximadamente 1,75 milhão barris/dia de petróleo (ANP, 2006). A Tabela 2.2 apresenta a quantidade de postos de combustíveis presentes nas regiões e estados brasileiros, segundo o anuário estatístico ANP (2006).

Tabela 2. 2 – Quantidades de postos de combustíveis nas regiões e estados brasileiros

Regiões estados	Quantidade de postos	Regiões estados	Quantidade de postos
Norte	2047	Nordeste	6963
Acre	103	Alagoas	391
Amapá	85	Bahia	1744
Amazonas	391	Ceará	1040
Pará	724	Maranhão	635
Rondônia	373	Paraíba	613
Roraima	85	Pernambuco	1235
Tocantins	286	Piauí	579
Sul	7352	Rio Grande do Norte	512
Paraná	2671	Sergipe	214
Santa Catarina	1878	Sudeste	15999
Rio Grande do Sul	2803	Espírito Santo	633
Centro-Oeste	3224	Minas Gerais	4335
Distrito Federal	317	Rio de Janeiro	2185
Goiás	1385	São Paulo	8846
Mato Grosso	921		
Mato Grosso do Sul	601	Total de postos	35585

Fonte: ANP - anuário estatístico 2006

Observa-se que a Região Sudeste apresenta-se com o maior número de postos de combustíveis, na qual o Estado de São Paulo possui 8.846 postos, quantidade maior que qualquer uma das regiões brasileiras. Os maiores problemas de contaminação surgiram nesta Região, onde as primeiras legislações foram estabelecidas, juntamente com o órgão ambiental do Estado de São Paulo, a CETESB (MINDRISZ, 2006). Segundo dados da CETESB (2007), dos acidentes ambientais que ocorreram em postos de revenda no Estado de São Paulo, 19,7% foram nas cidades do interior, 72% nos municípios da Região Metropolitana e 8,3% na região litorânea, sendo que os tanques de armazenamento subterrâneo foram responsáveis por 32% desses acidentes. Além disso, a gasolina foi o produto com maior vazamento representando uma parcela de 71,6% dos compostos.

No Estado do Paraná, o abastecimento de água das cidades de Cascavel e Campo Largo foi interrompido em 2001, devido à contaminação de mananciais fornecedores, por vazamentos em postos de combustíveis da região (MANZOCHI, 2001).

Os fenômenos envolvidos durante um derramamento de gasolina em subsuperfície são visualizados na Figura 2.2. Primeiramente, o fluido tende a migrar verticalmente, infiltrando-se na zona não saturada (solo) até atingir a zona saturada

(aqüíferos), controlado basicamente pelos processos de advecção e difusão, os quais correspondem ao transporte do fluido em função do gradiente e ao movimento de uma substância de uma área com alta concentração para uma área com baixa concentração, respectivamente. Durante este percurso, os diversos componentes da gasolina se particionam nas fases sólida, líquida e gasosa, e permanecem sujeitos à biodegradação. Uma fração da gasolina volatiliza-se e é transferida à atmosfera; outra permanece retida nos espaços vazios dos poros na zona não saturada; uma terceira fração fica aderida à matéria orgânica existente no meio e, finalmente, uma fração chega às águas subterrâneas, tornando-se uma ameaça em potencial para a saúde pública (FERREIRA, 2000).

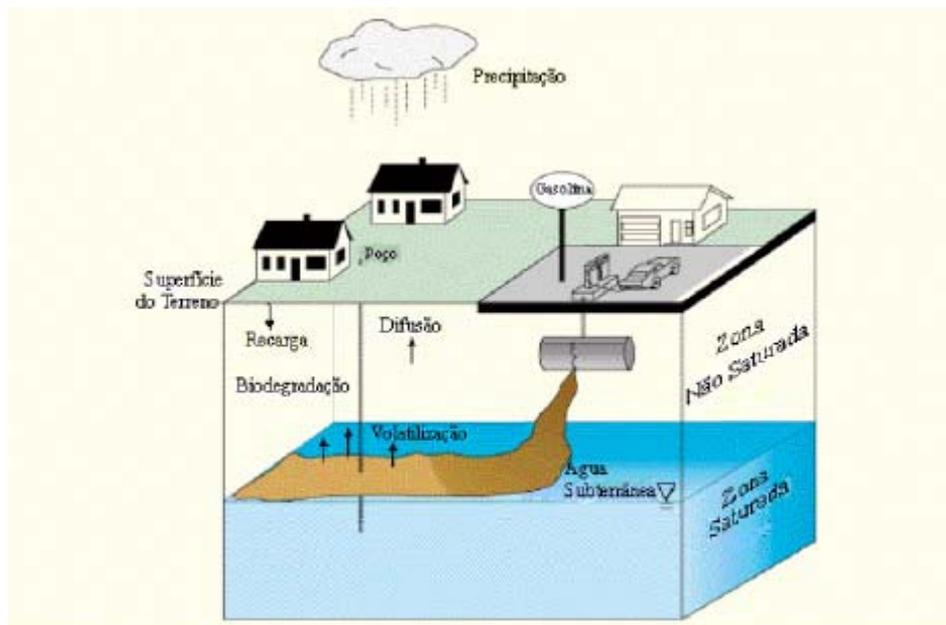


Figura 2. 2 – Fenômenos que ocorrem durante o derramamento de gasolina. (FERREIRA, 2000)

2.3. Compostos BTEX

Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX, além de serem encontrados em derivados de petróleo, também são largamente utilizados em indústrias químicas como matérias-primas para síntese de outros produtos (PHELPS & YOUNG, 2001; RIBEIRO, 2005). O benzeno é utilizado na produção de borrachas, plásticos, *Nylon*, pesticidas e tintas. O tolueno é um importante produto químico comercial usado geralmente como um agente de diluição de tintas e como solventes na produção de resinas, colas e óleos. O etilbenzeno é usado na produção do estireno e polímeros sintéticos. Os xilenos geralmente são usados como solventes em borrachas e nos

processos de tingimento de couro, além de serem utilizados na produção do anidrido ftálico, bactericidas, herbicidas, óleos lubrificantes e ácido *para*-ftálico. Na Figura 2.3 são apresentadas as estruturas químicas dos compostos BTEX.

Os compostos BTEX são considerados substâncias perigosas aos seres humanos principalmente por serem depressores do sistema nervoso central, além de causarem danos ao sistema respiratório, gastrointestinal, reprodutivo e outros efeitos.

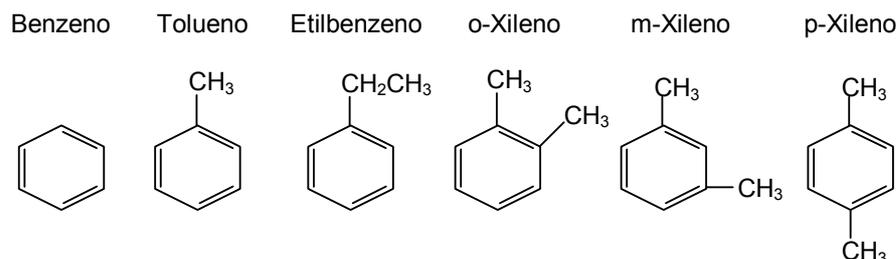


Figura 2. 3 – Estrutura química dos compostos BTEX.

O benzeno é comprovadamente o composto mais tóxico de todos os BTEX, pois se trata de uma substância carcinogênica e mutagênica (BONO *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2002), podendo causar leucemia, se ingerida, mesmo em baixas concentrações durante períodos não muito longos de tempo. Uma exposição à altas concentrações em curtos períodos, por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte (MENDES, 1993).

A portaria nº518/2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) determina que as concentrações máximas de BTEX permitidos para que a água seja considerada potável é de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o benzeno, $170 \mu\text{g L}^{-1}$ para o tolueno, $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para o etilbenzeno e $300 \mu\text{g L}^{-1}$ para os xilenos. Segundo Fernandes (1997), em qualquer vazamento, as concentrações de compostos tóxicos alcançam valores três mil vezes superiores.

2.4. Tecnologias de Remediação

Normalmente a remediação de sítios contaminados é uma tarefa complexa que exige o conhecimento de diversas tecnologias. Existem vários processos de remediação, físico-químicos e biológicos, usados para descontaminação de solo e tratamento de águas subterrâneas, incluindo, remoção da fase livre (SPILBORGHS, 1997; NOBRE & NOBRE, 2003), biodegradação utilizando diferentes receptores de

elétrons (HUTCHINS, 1991), extração de vapor do solo (CAPUANO & JOHNSON, 1996; RAHBEH & MOHTAR, 2007), remediação pela eletrocinética (MAINI *et al.*, 2000), adição de nitrato (HUTCHINS *et al.*, 1991; SHIM *et al.*, 2005), bioventilação pela injeção de ar no solo (SOO CHO *et al.*, 1997), utilização de lodo para promover subsídios à biodegradação anaeróbica (LODAYA *et al.*, 1991), adsorção em carvão ativado (KUHN *et al.*, 1985; MARTINS, 2004), torres de aeração ou *air-stripping* (SILVA, 2004), barreiras reativas permeáveis (LOURENÇO, 2006), dentre outros.

Contudo, a técnica de remediação adotada deve ser aplicada conforme as condições particulares de cada sítio contaminado, atendendo às características físico-químicas dos contaminantes envolvidos, às condições hidrogeológicas do local impactado, às limitações, como a dificuldade no transporte de nutrientes ou receptores de elétrons, e ao controle das condições para aclimatação e degradação dos contaminantes (CORSEUIL & WEBER, 1994; SPILBORGHS, 1997; NOBRE & NOBRE, 2003). Além disso, é necessário atender à legislação ambiental vigente e avaliar as relações custo e benefício do processo de tratamento escolhido, lembrando que a associação de diversas tecnologias de tratamento às vezes faz-se necessária, resultando processos caros e demorados, principalmente, pela complexidade das instalações.

A seguir, são descritas algumas técnicas utilizadas no tratamento de águas subterrâneas e solos contaminados por hidrocarbonetos derivados de petróleo.

A técnica denominada remoção da fase livre consiste em um bombeamento direto dos hidrocarbonetos de petróleo e a separação dos líquidos por meio de um separador água-óleo (MILLER, 2001 *apud* TROVÃO, 2006). Não é considerado efetivo na remediação de águas subterrâneas, visto que uma grande porcentagem dos hidrocarbonetos permanece adsorvida ao solo, atuando como uma fonte contínua de contaminação em fase dissolvida (SPILBORGHS, 1997; NOBRE & NOBRE, 2003).

No sistema de extração de vapores do solo (*soil vapor extraction* – SVE) o vácuo é aplicado para induzir o fluxo controlado de ar, promovendo fluxo contínuo de ar no solo e, conseqüentemente, a biodegradação *in-situ* dos contaminantes (SOO CHO *et al.*, 1997). A tecnologia é aplicada somente para compostos voláteis com constante de Henry acima de $1,315 \cdot 10^{-5} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ ou pressão de vapor maior que $6,58 \cdot 10^{-4} \text{ atm}$, como por exemplo, os compostos BTEX. O gás retirado segue para

uma estação de tratamento de vapores onde a concentração da emissão gasosa é controlada (NOBRE & NOBRE, 2003; RAHBEH & MOHTAR, 2007).

Outra tecnologia bastante utilizada em indústrias petroquímicas é o processo *air-stripping* (SILVA, 2004). A técnica fundamenta-se na remoção por aeração, permitindo que os contaminantes orgânicos voláteis sejam transferidos da fase líquida para a fase gasosa. Os métodos de aeração incluem *packed towers*, aeração por difusão, aeração por bandejas e por jateamento (NEGRÃO, 2002). Juntamente com o *air-stripping* deve ser utilizado um sistema de recuperação de vapor, como uma coluna de carvão ativado.

Na bioventilação o ar passa através do solo, mantendo as condições aeróbicas necessárias para que microorganismos presentes promovam a biodegradação natural de alguns derivados de petróleo (SOO CHO *et al.*, 1997). A técnica é aplicável em solos contaminados por compostos pouco ou não voláteis, como o petróleo, o diesel, solventes não-clorados, alguns pesticidas, dentre outros. Não promove o tratamento da zona saturada, isto é, no aquífero.

Na maioria das situações naturais, a biodegradação aeróbica de compostos biodegradáveis na zona saturada é limitada pela taxa de oxigênio dissolvido. Dessa forma, o processo denominado *biosparging* (RATHFELDER *et al.*, 2000; RAHBEH & MOHTAR, 2007) incrementa os níveis de oxigênio, por meio da injeção de ar no aquífero, contribuindo para um aumento na taxa de biodegradação dos contaminantes presentes. A aplicação do *biosparging* resulta elevação da taxa de oxigênio dissolvido de valores menores ou iguais a 4 mg L^{-1} (concentrações típicas em águas subterrâneas não contaminadas) para $6,0$ até $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (NOBRE & NOBRE, 2003).

A técnica de biopilhas envolve a disposição do solo contaminado em pilhas e a estimulação da atividade aeróbica microbiana por meio de aeração e/ou adição de nutrientes e aumento da umidade do solo. O aumento da atividade microbiana resulta degradação dos hidrocarbonetos de petróleo adsorvidos no material, por meio da respiração microbiana (NOBRE & NOBRE, 2003).

O sistema de extração multi-fase combina as técnicas de bioventilação e remoção de massa a vácuo, possibilitando a extração da fase livre, fase vapor, fase dissolvida na matriz do solo e estimulando o processo de biodegradação natural na zona não saturada (BERTÃO, 2007). O vapor extraído é direcionado para um sistema de carvão ativado e, então, lançado na atmosfera.

Pump-and-treat (MACKAY & CHERRY, 1989 *apud* KAIPPER, 2003) é um dos métodos mais comuns no tratamento de aquíferos contaminados por compostos voláteis. O processo consiste na extração de águas contaminadas e tratamento *ex-situ*, que pode ser realizado por diferentes processos como sistemas de *air-stripping* para a remoção dos compostos voláteis, extração por adsorção em carvão ativado para constituintes dissolvidos e sistemas biológicos para poluentes biodegradáveis. A reinjeção de águas tratadas no subsolo, além de reduzir custos na disposição de efluentes, pode promover maiores taxas de lavagem do solo, diminuindo o tempo de remediação (NOBRE & NOBRE, 2003; TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Existem também, os processos oxidativos avançados (TIBURTIUS *et al.*, 2005, RINALDI, 2006), os quais têm como principal característica a geração de radicais hidroxilas que reagem rapidamente com muitos compostos orgânicos, ou por adição à dupla ligação ou por abstração do átomo de hidrogênio em moléculas orgânicas alifáticas. O resultado é a formação de radicais orgânicos que reagem com oxigênio, dando início a uma série de reações de degradação que podem culminar em espécies inócuas, como dióxido de carbono e água. Vários processos de produção do radical hidroxila têm sido estudados, geralmente, utilizando ozônio, peróxido de hidrogênio, semicondutores e reagente de Fenton.

Dentre estas tecnologias, a atenuação natural surge como menos agressiva ao meio ambiente, sendo economicamente viável devido aos baixos custos energéticos necessários para as reações bioquímicas. O termo atenuação natural possui diversas denominações, tais como bioatenuação, biorremediação intrínseca, remediação natural, atenuação natural monitorada e intemperismo (FERNANDES, 2002; SCHNEIDER *et al.*, 2005). Existem inúmeros estudos de campo (KAO & WANG, 2000; SKUBAL *et al.*, 2001; ALVAREZ & HUNT, 2002; RICHNOW *et al.*, 2003; KOUSSIS *et al.*, 2003; NUNES & CORSEUIL, 2005; MAK *et al.*, 2006), os quais sugerem que muitos microorganismos presentes no sítio impactado degradam naturalmente alguns hidrocarbonetos de petróleo, até níveis aceitáveis de concentração, antes mesmo de alcançarem uma fonte de água potável. Os grupos alvos que sofrem a atenuação natural são os compostos orgânicos voláteis não halogenados, semi-voláteis e combustíveis derivados de petróleo. Segundo BORDEN *et al.* (1995) e CORSEUIL & ALVAREZ (1996a), o conceito de atenuação natural é o fenômeno que envolve o uso de microorganismos endógenos que possuem a capacidade de degradar compostos tóxicos, como o BTEX, dentro de

aquíferos, transformando-os em dióxido de carbono e água. A tecnologia baseia-se em um conjunto de mecanismos naturais combinados, como processos de diluição, volatilização, biodegradação, adsorção e reações químicas que permitem reduzir naturalmente a concentração dos contaminantes. A adição de outros compostos como nitrato e fosfato, pode acelerar a atividade biológica dos microorganismos (HUTCHINS *et al.*, 1991; BROHOLM & ARVIN, 2000; SCHREIBER & BAHR, 2002) facilitando a biorremediação. No entanto, a atenuação natural não é uma tecnologia que age sozinha, sem monitoramento ou acompanhamento. Seu monitoramento requer amostragens e análises químicas, dados para modelagem da evolução dos contaminantes e determinação das taxas de degradação para previsão do deslocamento da pluma de contaminação (emissão contínua do poluente a partir de uma fonte pontual). A remediação é demonstrada por meio da redução da pluma de contaminação e do incremento dos produtos de degradação dos compostos originais. Quando a taxa de biodegradação for igual, ou maior que a taxa de deslocamento dos contaminantes, a pluma deixará de se deslocar e diminuirá de tamanho. Portanto, se a fonte receptora não for atingida, não haverá a necessidade de implantação de tecnologias físico-químicas de remediação, tais como as mencionadas anteriormente, e a remediação natural seria a solução mais econômica de tratamento e recuperação do local contaminado (CORSEUIL & MARINS, 1997). Entretanto, se a atenuação natural não evitar o deslocamento da pluma até uma fonte potencial de água potável, é necessária a adoção de outras tecnologias que acelerem a transformação dos contaminantes.

Nem sempre uma determinada técnica implementada é suficiente para atingir o objetivo de restaurar a qualidade das águas subterrâneas até níveis de potabilidade requeridos pela legislação ambiental e, para tanto, novas tecnologias de remediação devem ser aplicadas em complemento às técnicas convencionas. Neste contexto, muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver modelos matemáticos de processos de biodegradação em biorreatores, como alternativa de simulação e de previsão de processos de biorremediação, visando à minimização de custos e a maximização da eficiência do tratamento.

2.5. Processos Biotecnológicos e a Biodegradação

A grande maioria dos processos biotecnológicos divide-se em reações de crescimento microbiano (reações microbiológicas) e as reações catalisadas por enzimas (reações bioquímicas). A utilização de microorganismos e/ou enzimas, capazes de sintetizar compostos químicos tais como proteínas, antibióticos e álcool, além de produzir biomassa e inúmeros alimentos é uma tecnologia antiga. Atualmente os processos biotecnológicos tornaram-se fundamentais também na produção de energia, como o biogás e o etanol. A utilização de culturas microbianas é importante não somente para produção de combustíveis a partir de biomassa e produção de metabólitos secundários em aplicações farmacêuticas, mas também na biodegradação de produtos químicos perigosos. Desta forma, os processos biotecnológicos têm sido largamente utilizados na biodegradação de compostos tóxicos, como no tratamento de efluentes municipais, industriais e tratamento de águas subterrâneas, revelando-se como uma tecnologia de tratamento relativamente econômica, se comparada aos processos físico-químicos, além de apresentar alta eficiência e menor efeito adverso ao ambiente (METCALF & EDDY, 1991 *apud* RODRIGUES, 2006).

A biodegradação em biorreatores proporciona menores tempos de tratamento, devido ao maior contato entre os microorganismos, nutrientes e compostos tóxicos. Além disso, todos os parâmetros do processo podem ser controlados e otimizados, reduzindo ou eliminando as limitações de transferência de massa. O crescimento de microorganismos em um reator biológico ocorre a partir do fornecimento de nutrientes adequados e substratos, como fonte de carbono e energia, na presença de condições favoráveis. Os microorganismos precisam de macronutrientes para síntese de componentes celulares, tais como nitrogênio para síntese de aminoácidos e enzimas, fósforo para síntese de ATP e DNA, enxofre para síntese de algumas co-enzimas, cálcio para estabilização da parede celular e magnésio para estabilização dos ribossomos. Também necessitam de micronutrientes, como traços de ferro, níquel, cobalto, molibdênio e zinco, para a realização de funções metabólicas. Além disso, o controle das condições favoráveis de temperatura, pH, aeração e agitação são fundamentais, pois estas variáveis também influenciam fortemente na atividade microbiana.

O processo de biodegradação baseia-se em reações de oxido-redução biológica, por meio de microorganismos, em presença de um acceptor de elétrons e nutrientes, capazes de decompor a matéria orgânica em substâncias mais simples. A transferência de elétrons é essencial para a respiração celular e libera a energia (ATP) necessária para funções vitais aos microorganismos. As bactérias aeróbicas utilizam oxigênio como acceptor de elétrons, produzindo gás carbônico e água, e as bactérias anaeróbicas utilizam outros compostos, como nitrato (NO_3^-), íon Fe (III) e sulfato (SO_4^{2-}), produzindo metano e água.

O metabolismo aeróbico corresponde ao mecanismo mais favorecido energeticamente pelos microorganismos que oxidam compostos orgânicos. Conseqüentemente, o oxigênio é preferencialmente utilizado sobre os aceptores de elétrons anaeróbicos, pois proporciona mais energia à comunidade microbiana resultando taxas mais rápidas de degradação do poluente. Dentre os aceptores de elétrons das reações anaeróbicas, o nitrato é um dos íons mais encontrados em águas naturais, ocorrendo geralmente em baixos teores nas águas superficiais, mas podendo atingir altas concentrações em águas subterrâneas (BORDEN *et al.*, 1995).

As características físico-químicas e estruturais da molécula contaminante, bem como as características físico-químicas do meio, tais como pH, temperatura, disponibilidade de água, luz e aceptores de elétrons, apresentam significativa influência na transformação e/ou quebra de um determinado composto.

Qualquer composto sofrerá biodegradação somente se houver uma enzima ou um sistema enzimático capaz de catalisá-lo. Se uma molécula não for decomposta em um determinado ambiente pode ser considerada persistente, mas se resistir à biodegradação em vários e diferentes ambientes, então o composto é conhecido como recalcitrante (MATHEUS, 1997).

Portanto, o termo biodegradação pode ser definido como um processo metabólico que envolve a quebra completa de um composto orgânico em seus componentes inorgânicos, referido comumente como mineralização. A biotransformação, por sua vez, consiste na alteração química da estrutura molecular do composto orgânico ou inorgânico, resultando em uma molécula com características diferentes da original, em geral pela perda de uma propriedade específica, porém com a complexidade inicial (WALTER & CRAWFORD, 1997 *apud* MONTENEGRO, 2001).

Capítulo 3

Os estudos sobre a biodegradação de compostos tóxicos vêm sendo realizados intensamente por vários pesquisadores. A biodegradação dos compostos BTEX tem sido extensamente estudada, tanto no solo e águas subterrâneas (MORGAN *et al.*, 1993; WILLIAMS *et al.*, 1997; MEIER-LOHR *et al.*, 1998; TSAO *et al.*, 1998; ESSAID *et al.*, 2003; NAKHLA, 2003; RICHNOW *et al.*, 2003; KOUSSIS *et al.*, 2003; MAK *et al.*, 2006), quanto em biorreatores (CHOI *et al.*, 1992; GOUDAR *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2000; MASON *et al.*, 2000; deNARDI, 2002; SHIM *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 2002; PRUDEN *et al.*, 2003; GUSMÃO *et al.*, 2006; ZEIN *et al.*, 2006; deNARDI *et al.*, 2007).

O conhecimento da cinética de crescimento microbiano em compostos tóxicos e das relações entre múltiplos substratos presentes no meio são fundamentais para a otimização e alcance de processos mais eficientes. Além disso, a identificação das interações presentes na degradação de misturas de substratos pode contribuir para o entendimento das razões que levam, por exemplo, um composto BTEX resistir à biodegradação, enquanto outros são mais facilmente consumidos.

Assim, a modelagem da cinética de biodegradação destes compostos possibilita o estudo da influência dos parâmetros do processo no crescimento da biomassa e consumo dos substratos, além da formação de produtos, sendo importante para a compreensão da fisiologia microbiana, bem como mecanismos de controle interno.

3.1. Modelagem e Avaliação da Biodegradação dos Compostos BTEX

Os primeiros relatos sobre a biodegradação dos compostos BTEX envolviam apenas o benzeno, o tolueno e um dos isômeros do xileno.

ARVIN *et al.* (1989) relataram a biodegradação aeróbica do benzeno, na presença de outros compostos aromáticos, utilizando duas associações microbianas. A biodegradação do benzeno foi estimulada pela presença de ambos os substratos, tolueno e *orto*-xileno, em mistura binária. Entretanto, quando tolueno e *orto*-xileno estiveram juntamente presentes com benzeno, um efeito contrário foi observado. As principais razões que levam a estes efeitos de interação (sinérgicos

e/ou antagônicos) durante a biodegradação dos compostos BTEX podem ser atribuídas a inibição competitiva (CHANG *et al.*, 1993; OH *et al.*, 1994; BIELEFELDT & STENSEL, 1999a,b), toxicidade (HAIGLER *et al.*, 1992) e formação de intermediários tóxicos por enzimas não específicas (WANG & LOH, 1999), além de indução enzimática (DEEB *et al.*, 2001) e repressão catabólica (NARANG, 2006).

ALVAREZ & VOGEL (1991) mediram as taxas de biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e *para*-xileno, individualmente e em misturas binária e ternária, utilizando duas culturas puras de bactérias (*Pseudomonas sp.* cepa CFS-215 e *Arthrobacter sp.* cepa HCB) e uma mistura de culturas, e observaram casos de não-interação, inibição competitiva e cometabolismo. No entanto, os autores não modelaram estes efeitos interativos. Em mistura de culturas, a presença do tolueno intensificou a taxa de degradação do *para*-xileno, porém, diminuiu drasticamente quando o tolueno foi completamente degradado. Este fenômeno é explicado pelo processo de degradação cometabólica do *para*-xileno. Em *Pseudomonas*, a presença do tolueno foi fundamental para a degradação do *para*-xileno e intensificou a degradação do benzeno. Logo, o crescimento de *Pseudomonas sp.* CFS-215 é melhor em tolueno, e sua presença ajuda na proliferação da bactéria, levando a um maior número de microorganismos capazes de degradar o benzeno e *para*-xileno. É possível também que o tolueno tenha provocado uma indução enzimática, sugerindo que *Pseudomonas sp.* cepa CFS-215 pode utilizar a mesma enzima (por ex.: enzima tolueno dioxigenase) para catalisar a degradação do tolueno e do benzeno. A degradação do tolueno ocorreu mais rapidamente quando esteve sozinho do que quando esteve junto com benzeno e/ou *para*-xileno, sugerindo a hipótese de que estes substratos utilizam-se da mesma enzima, isto é, da mesma rota metabólica, e assim ocorram efeitos de inibição competitiva. Por outro lado, *Arthrobacter* foi incapaz de degradar tolueno e *para*-xileno, individualmente e em misturas. A degradação destes compostos somente ocorreu na presença do benzeno, sugerindo que o cometabolismo seja responsável por este efeito benéfico. Já a degradação do benzeno foi afetada negativamente pela presença do tolueno e/ou *para*-xileno, sugerindo que efeitos de inibição competitiva tenham ocorrido.

O fenômeno do cometabolismo ocorre quando a presença de um substrato mais facilmente metabolizável, similar ao composto resistente à biodegradação, inicia o crescimento do microorganismo e promove a indução de enzimas que facilitam a degradação do substrato resistente. O cometabolismo é resultante da

inespecificidade de alguns complexos enzimáticos, e ocorre sem que exista, necessariamente, analogia estrutural entre a enzima induzida e o poluente (VENKATARAMANI, 1985; WANG & LOH, 2000).

CHANG *et al.* (1993) avaliaram os parâmetros cinéticos e estequiométricos de Monod ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_S e $Y_{x/s}$) na biodegradação do benzeno, tolueno e *para*-xileno, por duas culturas puras de *Pseudomonas* B1 e X1. Os experimentos conduzidos com cada substrato individualmente, possibilitaram a avaliação da cinética de degradação e medição dos parâmetros ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_S e $Y_{x/s}$). Os resultados mostraram que *Pseudomonas* B1 utiliza o benzeno e o tolueno, mas não o *para*-xileno, e *Pseudomonas* X1 é capaz de degradar o tolueno e o *para*-xileno, mas não o benzeno, sugerindo que *P.* B1 utiliza o caminho TOD (enzima tolueno dioxigenase), enquanto *P.* X1 utiliza o caminho TOL (enzima tolueno mono-oxigenase). Os autores realizaram a modelagem do processo, predizendo os efeitos de inibição competitiva (BAILEY & OLLIS, 1986) entre dois substratos, dada pela equação 3.1. Observaram que a presença do tolueno resultou inibição competitiva do benzeno e degradação cometabólica do *para*-xileno. As taxas de biodegradação da mistura benzeno-tolueno foram muito menores as respectivas taxas de biodegradação individual. Os valores das constantes de inibição do benzeno (Ki_b) e tolueno (Ki_t) foram determinados pelo ajuste do modelo, onde verificaram serem equivalentes aos valores das constantes de saturação (Ks_b e Ks_t), respectivamente.

$$\frac{dS_b}{dt} = - \frac{\mu_{m\acute{a}x_b} S_b}{Ks_b + S_b + \frac{Ks_b}{Ki_t} S_t} \frac{X}{Y_{x/sb}} \quad (3.1)$$

Sendo:

- $\mu_{m\acute{a}x_b}$ taxa máxima de crescimento específico no benzeno;
- Ks_b constante de saturação do benzeno;
- Ki_t constante de inibição do tolueno;
- $Y_{x/sb}$ coeficiente de rendimento no benzeno;
- X concentração de células;
- S_b concentração do benzeno;
- S_t concentração do tolueno.

Assim, nas condições experimentais avaliadas por CHANG *et al.* (1993) os parâmetros cinéticos do modelo de inibição competitiva podem ser obtidos a partir de experimentos da biodegradação individual dos substratos.

A continuação desta linha de pesquisa envolvendo três substratos foi feita por OH *et al.* (1994). Os autores estudaram os efeitos de interação entre benzeno, tolueno e *para*-xileno, utilizando uma associação microbiana e uma cultura pura de *Pseudomonas putida* O1. Além disso, conduziram os experimentos para avaliar as taxas de biodegradação de cada substrato individualmente e em misturas, a fim de obter a diferença quantitativa da fisiologia microbiana entre os dois casos. Os autores determinaram os valores dos parâmetros de Monod ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_S e $Y_{x/s}$) para a biodegradação do benzeno; utilizaram o modelo de Andrews no ajuste aos dados da biodegradação do tolueno e mostraram que o *para*-xileno não pôde ser utilizado como substrato por nenhuma das culturas. A biodegradação parcial do *para*-xileno ocorreu somente na presença do benzeno ou tolueno, sugerindo o fenômeno de cometabolismo. Os experimentos em misturas de substratos foram realizados com a mistura binária de benzeno-tolueno, e um modelo de inibição (BAILEY & OLLIS, 1986), dado pela equação 3.2, ajustou-se aos dados experimentais, resultando duas constantes de inibição (K_{bt} e K_{tb}). Neste caso, as taxas de biodegradação da mistura de substratos, não puderam ser avaliadas por meio de parâmetros cinéticos da biodegradação dos compostos individuais. Os parâmetros de inibição entre os dois substratos foram determinados a partir de um modelo de regressão não-linear, e os resultados mostraram que K_{bt} e K_{tb} são diferentes das razões $\frac{K_{S_b}}{K_{i_t}}$ e $\frac{K_{S_t}}{K_{i_b}}$, respectivamente. Logo, o modelo de inibição adotado por OH *et al.* (1994) é diferente do modelo de inibição utilizado por CHANG *et al.* (1993). Portanto, seus parâmetros cinéticos não podem ser obtidos por meio dos experimentos da biodegradação individual dos substratos.

$$\frac{dS_b}{dt} = -\frac{\mu_{m\acute{a}x_b} S_b}{S_b + K_{S_b} + K_{bt} S_t} \frac{X}{Y_{x/sb}} \quad (3.2)$$

Sendo:

- $\mu_{m\acute{a}x_b}$ taxa máxima de crescimento específico no benzeno;
- K_{S_b} constante de saturação do benzeno;

K_{bt}	constante de inibição do benzeno sobre o tolueno;
X	concentração de células;
S_b	concentração do benzeno;
S_t	concentração do tolueno;
$Y_{x/sb}$	coeficiente de rendimento no benzeno.

BIELEFELDT & STENSEL (1999a) foram os primeiros a relatarem a avaliação quantitativa da biodegradação de uma mistura de cinco substratos (BTEoXpX). Os experimentos foram conduzidos com mistura de culturas em testes batelada para determinar como a presença de múltiplos substratos poderia afetar a fisiologia microbiana, e conseqüentemente às taxas de biodegradação quando comparados às taxas de biodegradação dos substratos individuais. Deste modo, a cinética de degradação de compostos individuais foi comparada à cinética de degradação de compostos múltiplos. As taxas de biodegradação dos substratos benzeno, tolueno, etilbenzeno, *orto-para-xilenos* em misturas foram preditas através do modelo de inibição competitiva (BAILEY & OLLIS, 1986), e os autores concluíram que possivelmente efeitos de inibição competitiva na mistura dos cinco substratos estiveram presentes. As taxas de degradação dos compostos individuais foram preditas através do modelo de Monod e os parâmetros cinéticos ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_s e $Y_{x/s}$) foram determinados para cada composto. Os resultados das taxas de degradação mostraram que a cultura degradou os componentes mais rapidamente quando estiveram presentes sozinhos do que quando estiveram presentes em misturas. Os autores relacionaram o modelo de Monod e o modelo de inibição competitiva determinando um modelo simplificado, assumindo que a constante de inibição de cada substrato é equivalente a sua constante de saturação ($K_i \approx K_s$), e que a concentração inicial do substrato é muito maior que K_s . Este modelo simplificado relaciona a taxa de biodegradação de um componente da mistura com a taxa de biodegradação individual do mesmo, por meio da equação 3.3.

$$\frac{dS_i^{mistura} / dt}{dS_i / dt} = \frac{S_i}{\sum S_{BTEX}} \quad (3.3)$$

Assim, a taxa de biodegradação de um composto na presença de múltiplos substratos, nas condições avaliadas por BIELEFELDT & STENSEL (1999a), pode ser apresentada com parâmetros cinéticos da biodegradação individual dos

substratos e na proporção de sua concentração na mistura. O estudo mostra que tanto o modelo simplificado quanto o modelo de inibição competitiva se ajustou bem aos dados experimentais do processo de biodegradação dos compostos BTEX.

Tendo em vista que a biorremediação de lugares contaminados por gasolina requer a degradação microbiana de misturas complexas, é importante compreender os efeitos de intensificação ou inibição causada pela presença concorrente de múltiplos substratos. Desta forma, a biodegradação dos compostos BTEX também tem sido largamente investigada na presença de outros compostos aromáticos como o fenol. A biodegradação da mistura destes compostos aromáticos foi investigada por ROGERS & REARDON (2000), utilizando *Burkholderia species* JS150. Os autores observaram a utilização simultânea de ambos os substratos, fenol e tolueno, com o tolueno o primeiro a ser completamente degradado. O tolueno inibiu a biodegradação do fenol, enquanto o fenol apresentou pouco efeito na taxa de biodegradação do tolueno. Visto que *Burkholderia species* JS150 apresenta ambos os caminhos *orto* e *meta* para a biodegradação do fenol (HAIGLER *et al.*, 1992), e apenas o caminho *meta* é utilizado na biodegradação do tolueno, os resultados apresentados pelos autores, indicam que o caminho *meta* pode ter sido preferencialmente utilizado durante a biodegradação da mistura tolueno-fenol.

A primeira demonstração de que poluentes aromáticos podem ser utilizados simultaneamente na presença de substratos alternativos foi observado em 1985 por SCHMIDT & ALEXANDER, utilizando uma cultura pura de *Pseudomonas acidovorans*. Os autores observaram que fenol e acetato foram utilizados simultaneamente, resultando diminuição da biodegradação do fenol. O metabolismo de compostos aromáticos por membros do gênero *Pseudomonas* é frequentemente reprimido pela presença de compostos mais facilmente degradáveis, especialmente intermediários do ciclo de Krebs.

Outra linha da pesquisa estudada é como obter máximas taxas de biodegradação (fenômeno de aceleração) dos substratos tóxicos, projetando, modificando e controlando as condições dos biorreatores a partir do conhecimento sobre a fisiologia microbiana e princípios análogos de outros sistemas similares. Um exemplo é o trabalho de SHALABY (2003), no qual se investigou a habilidade do microorganismo *Burkholderia cepacia* G4 em utilizar compostos tóxicos na presença de compostos não tóxicos que comumente existem no ambiente e que afetam a degradação dos poluentes. Os autores mostraram que os substratos fenol, acetato e

benzoato, em mistura binária e ternária, são utilizados simultaneamente. Fenol e benzoato utilizam-se da mesma rota metabólica, e acetato é um dos intermediários formados durante o metabolismo. Os resultados mostraram uma inibição recíproca entre fenol e acetato, e a biodegradação simultânea do fenol e benzoato, em que nenhum efeito inibitório foi observado. Em mistura ternária, todos os compostos foram utilizados simultaneamente e nenhum comportamento diáuxico foi observado.

Recentemente, ABUHAMED *et al.* (2004) investigaram a possibilidade da biodegradação do benzeno, tolueno e fenol, em elevadas concentrações iniciais, e estudaram a cinética de crescimento de *Pseudomonas putida* F1 (ATCC700007) durante a biodegradação aeróbica individual dos substratos, bem como em misturas, determinando as interações entre os substratos. Para a biodegradação de um único substrato, o modelo de Andrews foi usado para descrever a taxa de crescimento específico, possibilitando a determinação dos parâmetros cinéticos ($\mu_{\text{máx}}$, K_s e K_i). Para as misturas benzeno-tolueno, benzeno-fenol e tolueno-fenol, um modelo de soma cinética, dado pela equação 3.4, similar ao modelo proposto por YOON *et al.* (1977) *apud* REARDON *et al.* (2000), foi usado e os parâmetros de interação entre os substratos (I_{ij}) foram determinados.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}1} S_1}{K_{S_1} + S_1 + \frac{S_1^2}{K_{i_1}} + I_{21} S_2} + \frac{\mu_{\text{máx}2} S_2}{K_{S_2} + S_2 + \frac{S_2^2}{K_{i_2}} + I_{12} S_1} \quad (3.4)$$

Sendo:

- μ taxa de crescimento específico;
- $\mu_{\text{máx}1}, \mu_{\text{máx}2}$ taxa máxima de crescimento específico nos substratos 1 e 2;
- S_1, S_2 concentração dos substratos 1 e 2;
- K_{S_1}, K_{S_2} constante de saturação dos substratos 1 e 2;
- I_{21} grau de inibição do substrato 2 sobre o substrato 1;
- I_{12} grau de inibição do substrato 1 sobre o substrato 2.

O parâmetro I_{ij} indica o grau que o substrato “*i*” afeta a biodegradação do substrato “*j*”. Os parâmetros cinéticos ($\mu_{\text{máx}}$, K_s e K_i) utilizados nesta equação são os mesmos obtidos a partir do modelo de Andrews para biodegradação individual do substrato. Os resultados mostraram que o tolueno inibiu a biodegradação do benzeno (OH *et al.*, 1994), e o fenol inibiu a biodegradação do tolueno e benzeno.

Por outro lado, a presença do benzeno ou tolueno intensificou a biodegradação do fenol. As células de *Pseudomonas putida* F1 foram adaptadas em 30 mg L⁻¹ de tolueno ou benzeno. Observou-se que a biodegradação do benzeno ou tolueno, em concentrações de 15, 30 e 90 mg L⁻¹, ocorreu mais rapidamente em células adaptadas do que em células não adaptadas. O tempo de biodegradação do benzeno, por exemplo, decresceu de 24 horas para 6 horas. Nenhum efeito significativo foi observado na biodegradação do fenol, utilizando células adaptadas no fenol. Contudo, a utilização de células adaptadas no benzeno ou tolueno diminuiu o tempo de degradação de 50 mg L⁻¹ de fenol, de 90 para 18 horas.

O crescimento de *Pseudomonas putida* F1 na presença de benzeno, tolueno e fenol foi estudado por REARDON *et al.* (2000). Os autores avaliaram a cinética de crescimento microbiano utilizando os substratos individuais, bem como em misturas binárias e ternária. Na mistura tolueno-fenol, o tolueno inibiu fortemente a biodegradação do fenol, e o fenol teve pouco efeito sobre a biodegradação do tolueno. O tolueno foi consumido antes que o fenol, e a biodegradação do fenol não começou até que o tolueno estivesse praticamente esgotado. Também, em mistura tolueno-benzeno, a presença do tolueno inibiu a biodegradação do segundo substrato. Na biodegradação da mistura benzeno-fenol, benzeno foi primeiramente utilizado e o consumo do fenol não começou antes que a concentração do benzeno atingisse valores próximos de zero. Finalmente, em mistura ternária, o tolueno foi o primeiro substrato a ser consumido e esgotado, e a biodegradação do benzeno iniciou-se mais tarde. O consumo significativo do fenol não começou antes que a concentração do tolueno estivesse aproximadamente igual a zero e a concentração do benzeno estivesse baixa. Este é um exemplo que mostra claramente os mecanismos regulatórios internos de utilização dos substratos, nos quais a repressão catabólica seria o mecanismo mais provável envolvido neste processo. Mas, apesar das aparências, este não é um caso de repressão catabólica, pois *P. putida* F1 utiliza o mesmo caminho (TOD) para metabolizar os substratos BTF. Este é um dos poucos trabalhos que apresentam o desempenho de modelos não-estruturados em descrever a cinética de crescimento microbiano. Os autores mostraram que os modelos de Monod e Andrews foram adequados para descrever os dados experimentais de crescimento da biomassa e utilização dos substratos individualmente. Baseados nos parâmetros cinéticos estimados a partir da biodegradação individual dos compostos, os autores avaliaram diferentes modelos

matemáticos para descrever a biodegradação dos múltiplos substratos, e concluíram que o modelo *SKIP* representa adequadamente a biodegradação das misturas binárias e ternária dos compostos BTF.

HAMED *et al.* (2003) investigaram as interações entre os substratos durante a biodegradação aeróbica do benzeno, tolueno e fenol utilizando *Pseudomonas putida* F1 ATCC (700007). Os testes foram conduzidos em reator batelada e mostraram que os microorganismos foram capazes de consumir completamente todos os substratos em concentrações elevadas. Os resultados mostraram que efeitos de inibição pelo substrato ocorreram acima de 30 mg L⁻¹ de benzeno, 28 mg L⁻¹ de tolueno e 50 mg L⁻¹ de fenol, quando estes foram utilizados individualmente. Os substratos benzeno e tolueno, quando presentes em mistura, foram utilizados simultaneamente, sendo que o tolueno inibiu a biodegradação do benzeno. Já durante a biodegradação das misturas binárias benzeno-fenol e tolueno-fenol os substratos, em ambos os casos, foram utilizados sequencialmente, sendo que o fenol foi o segundo substrato a ser consumido. Por fim, a biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol mostrou que o benzeno e o tolueno foram consumidos mais rapidamente do que o fenol. A presença do benzeno e/ou fenol não influenciou significativamente no tempo de biodegradação do tolueno. E a presença do tolueno e/ou benzeno afetou a biodegradação do fenol. Entretanto, nenhum dos comportamentos revelados foi representado matematicamente, até o presente.

BIELEFELDT & STENSEL (1999b) investigaram a biodegradação aeróbica do tricloroetano e de compostos aromáticos, como os compostos BTEX, por uma associação de microorganismos enriquecida no fenol. Todos os compostos BTEX foram utilizados simultaneamente, mas a uma taxa menor do que as taxas de biodegradação individual dos compostos. Os efeitos dos múltiplos substratos foram modelados pelo modelo de inibição competitiva (YOON *et al.*, 1977 *apud* BAILEY & OLLIS, 1986), representando satisfatoriamente a biodegradação dos compostos BTEoXpX em mistura, porém baseado nos parâmetros cinéticos da biodegradação individual dos compostos.

Outra linha de pesquisa fundamental para a busca de tecnologias eficientes no tratamento e preservação do meio ambiente consiste na obtenção de informações e compreensão dos efeitos da biodegradação dos compostos tóxicos BTEX na presença de MTBE (metil terc butil éter). A condução de experimentos e o projeto de biorreatores que operam com ambos os compostos (NA *et al.*, 2002;

SEDRAN, 2004; LIN *et al.*, 2007) não é uma tarefa fácil devido à complexidade do sistema, mas é crucial para o desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento e tem sido investigado em diversos estudos.

Geralmente, os compostos MTBE e BTEX coexistem em águas subterrâneas contaminadas por gasolina e elevadas concentrações de MTBE podem impedir potencialmente a biodegradação dos compostos BTEX. Por isso, é importante compreender se a presença do MTBE afeta ou não as taxas de biodegradação dos compostos BTEX, e se a presença dos compostos BTEX provoca repressão nas taxas de biodegradação do MTBE. Poucos estudos têm investigado os efeitos de interações entre as misturas de MTBE e BTEX. Na maioria destes estudos, MTBE não apresentou efeitos negativos nas taxas de biodegradação do BTEX por culturas incapazes de crescer no MTBE, sugerindo que a presença do MTBE não afeta a viabilidade das culturas degradadoras do BTEX (SALANITRO *et al.*, 1999; DEEB & ALVAREZ-COHEN, 2000). Por outro lado, as taxas de biodegradação do MTBE foram afetadas pela presença de compostos BTEX (EWEIS *et al.*, 1998; CHURCH *et al.*, 1999). A utilização de culturas puras pode ser útil na caracterização dos efeitos de interação, causados pela presença concorrente de múltiplos substratos. No entanto, uma cultura pura capaz de crescer em MTBE e BTEX ainda não foi encontrada.

DEEB & ALVAREZ-COHEN (2000) quantificaram o impacto que interações entre os substratos BTEX provocam em suas taxas de biodegradação, investigando, além disso, os efeitos da presença do MTBE. Durante a biodegradação foram realizadas a caracterização e a quantificação das interações positivas e negativas, em misturas dos compostos BTEX, e em misturas entre os compostos BTEX e MTBE. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se uma mistura de cultura derivada de um aquífero contaminado por gasolina, e duas culturas puras identificadas como *Rhodococcus rhodochrous* e *Rhodococcus bronchialis*. As três culturas foram capazes de biotransformar completamente os compostos BTEX individualmente e em misturas, em um grande intervalo de concentrações. Em uma concentração de 40 mg L⁻¹, a biodegradação de cada composto, individualmente, seguiu a ordem: tolueno, benzeno, etilbenzeno, *orto-para-meta*-xileno. Durante a biodegradação das misturas binárias dos compostos BTEX, a presença do etilbenzeno provocou um efeito inibitório nas biodegradações do benzeno, tolueno e xilenos, ao passo que, a presença desses compostos em mistura binária com o

etilbenzeno proporcionou efeitos desprezíveis na biodegradação do etilbenzeno (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999). Os autores utilizaram o modelo cinético de Lineweaver-Burk, na tentativa precoce de caracterizar os efeitos inibitórios do etilbenzeno, e revelaram uma mistura de inibição competitiva e não-competitiva. Os autores sugerem que o tolueno e o etilbenzeno são degradados pelo mesmo caminho metabólico, ou seja, *Rhodococcus sp.* RR1 utiliza-se da mesma enzima para metabolizar ambos os substratos; o mesmo resultado encontrado pelos autores em 1999. A biodegradação cometabólica dos xilenos, neste estudo, é consistente com os relatos de ALVAREZ & VOGEL (1991), CHANG *et al.* (1993) e OH *et al.* (1994). Além disso, os autores investigaram a mineralização dos compostos BTEX a CO₂. Apesar da presença do etilbenzeno afetar negativamente a biodegradação do BTX, isto não ocorreu durante a mineralização. Os autores concluíram que a mistura de culturas é mais eficiente do que as culturas puras na mineralização dos compostos BTEX, e isto pode ser atribuída à presença de diferentes espécies microbianas, possibilitando a utilização de diversos caminhos metabólicos, e aos efeitos de interações entre as espécies. Quanto à presença do MTBE, nenhuma das culturas foi capaz de crescer no MTBE. Os autores concluíram que este composto não afetou as taxas de biodegradação dos compostos BTEX.

Com a finalidade de determinar se a presença do MTBE afeta negativamente as taxas de biodegradação dos compostos BTEX, DEEB *et al.* (2001) avaliaram as interações entre os substratos MTBE e BTEX durante uma biotransformação aeróbica por uma cultura pura em reator batelada. A cultura pura, designada PM1, membro da *Leptothrix* do grupo β -Proteobacteria, foi capaz de crescer no MTBE como única fonte de carbono e energia e de mineralizar o composto MTBE a CO₂. A biodegradação do MTBE foi avaliada quando esteve presente sozinho e quando esteve em mistura binária com cada um dos compostos BTEX. Observou-se que a presença do MTBE intensifica a taxa de biodegradação do benzeno (20 mg L⁻¹), provavelmente por indução enzimática. Para provar a hipótese de que MTBE promove a biodegradação do benzeno por geração de energia que acelera esta indução enzimática, foram conduzidos as biodegradações da mistura benzeno-piruvato e benzeno-etanol. Assim, o mesmo efeito estimulatório encontrado pela presença do MTBE, também foi observado quando o benzeno esteve presente em mistura binária, em concentrações de 20 mg L⁻¹, com piruvato ou etanol. Portanto, isto sugere que a presença de um “gerador de energia” foi o fator que governou a

intensificação de enzimas necessárias à biodegradação do benzeno. Seguindo a biodegradação do benzeno em mistura com piruvato, uma adição de tolueno foi degradada sem fase de adaptação, sugerindo que o benzeno e tolueno são metabolizados pelo mesmo caminho. Por outro lado, a presença do benzeno retardou a biodegradação do MTBE, em uma concentração de 20 mg L⁻¹. A biodegradação do MTBE também foi severamente inibida pela presença do tolueno, etilbenzeno, *meta*-xileno ou *para*-xileno. Logo, os resultados encontrados pelos autores mostram que o BTEX interfere diretamente a biodegradação do MTBE, utilizando PM1, sugerindo inibição enzimática como provável causa, ao passo que a presença do MTBE promove a intensificação da biodegradação dos compostos BTEX, provavelmente por indução enzimática.

PRUDEN (2002) investigou o efeito do BTEX na biodegradação do MTBE e TBA (terc butil álcool), comparando as taxas de biodegradação do MTBE juntamente com BTEX, às taxas de biodegradação do MTBE como única fonte de carbono. Os autores utilizaram uma mistura de cultura enriquecida no MTBE e BTEX. Sob regime contínuo, todos os compostos foram utilizados simultaneamente. Em operação batelada, a presença do BTEX não teve efeito significativo na biodegradação do MTBE, mas teve um leve efeito na biodegradação do TBA. Na presença insignificante do BTEX, o TBA foi utilizado em uma taxa mais rápida do que o MTBE.

Os efeitos dos múltiplos substratos BTEX na biodegradação do MTBE também foram investigados por PRUDEN & SUIDAN (2004), SEDRAN *et al.* (2002) e LIN *et al.* (2007). PRUDEN & SUIDAN (2004) não encontraram nenhum efeito negativo da presença dos compostos BTEX na taxa de biodegradação do MTBE, utilizando uma cultura pura, designada UC1. A bactéria UC1 apresentou alta similaridade (99%) com a PM1, ou seja, também do grupo da β -Proteobacteria. Por outro lado, LIN *et al.* (2007) encontraram significativa inibição dos compostos BTEX sobre o MTBE, utilizando *Pseudomonas aeruginosa*, representando os efeitos por meio dos modelos de inibição competitiva e não-competitiva.

O principal motivo da adição de compostos oxigenados na gasolina, como MTBE e etanol, está relacionada ao aumento da octanagem do motor, isto é, aumento da resistência à auto-ignição, além de diminuir a emissão de monóxido de carbono na atmosfera (FERNANDES, 1997). Entretanto, a ocorrência de um derramamento de gasolina aditivada no ambiente pode agravar o impacto ambiental devido ao comportamento de co-solvência do etanol (FERNANDES & CORSEUIL,

1996; FERNANDES, 1997). O efeito da co-solvência do etanol, que representa a capacidade do etanol em aumentar a solubilidade da gasolina em água (CORSEUIL & FERNANDES, 1999), aumenta a solubilização dos compostos BTEX em água, provocando conseqüentemente aumento da velocidade de deslocamento das plumas de contaminação em águas subterrâneas. CORSEUIL & FERNANDES (1999) constataram que frações de etanol na fase aquosa na faixa de 10% aumentam em 30% a massa total dos compostos BTX, sendo que o efeito foi maior para o xileno, composto menos solúvel em água dentre os BTX.

A biodegradação aeróbica e anaeróbica do BTEX, com relação à presença de etanol, tem sido bastante investigada no Brasil (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996b; CORSEUIL *et al.*, 1998; CORSEUIL & FERNANDES, 1999; LOVANH *et al.*, 2002; KAIPPER, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2005; NUNES & CORSEUIL, 2005).

Frequentemente, os compostos BTEX são biodegradados por enzimas induzíveis, as quais podem ser reprimidas quando substratos facilmente degradáveis estão presentes em concentrações elevadas (DUETZ *et al.*, 1994; DUETZ *et al.*, 1996), exercendo provavelmente um efeito diáuxico que inibe a diversidade metabólica dos microorganismos, impossibilitando, por repressão catabólica, a biodegradação do BTEX.

Os estudos de CORSEUIL *et al.* (1998) demonstraram que, em condições aeróbicas, o etanol retarda a biodegradação dos compostos BTEX, devido à utilização preferencial de etanol pelos microorganismos. MALAMUD *et al.* (2005) também observaram que o etanol foi o primeiro contaminante a ser biodegradado e os compostos BTEX apresentaram decréscimo de massa significativo somente após o desaparecimento do etanol, evidenciando a biodegradação preferencial do etanol em relação aos compostos BTEX.

No entanto, NUNES & CORSEUIL (2005) avaliaram a biodegradação anaeróbica da gasolina, aditivada com 23 a 25% de álcool, e observaram aspectos positivos da presença do etanol. A redução da massa dos compostos BTEX e etanol foram avaliados como conseqüência do uso de receptores de elétrons (oxigênio dissolvido) e o aparecimento de subprodutos metabólicos (acetato, íon ferro *II* e metano). Os autores constataram que as massas de metano e íon ferro foram muito superiores àquela do oxigênio dissolvido, e a biomassa remanescente, gerada durante a biodegradação anaeróbica do etanol, passou a utilizar os compostos BTEX como substrato principal, intensificando suas taxas de biodegradação. O

mesmo foi encontrado por SCHNEIDER *et al.* (2005), os quais observaram que, em seis anos de monitoramento de uma área contaminada por gasolina, as massas do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos foram reduzidas em 99, 96, 76 e 80%, respectivamente. Entretanto, mesmo havendo uma remoção significativa da massa de poluentes da fonte, a extensão das plumas não foi reduzida na mesma proporção. Isto indica que o etanol inibe a biodegradação dos compostos BTEX, aumentando a extensão das plumas de contaminação.

Observa-se que diversos pesquisadores têm mostrado que o metabolismo microbiano para um composto de uma determinada mistura pode ser fortemente impactado pela presença dos outros compostos da mesma (YOON *et al.*, 1977; MEYER *et al.*, 1984; KLEČKA & MAIER, 1988; SMITH *et al.*, 1991; GUHA *et al.*, 1999 *apud* REARDON *et al.*, 2000). Essa interação é observada não apenas em processos de biodegradação, nos quais misturas de compostos tóxicos são comumente encontradas, mas em misturas de açúcares em processos fermentativos (LENDENMANN *et al.*, 1996) e misturas de compostos degradáveis em tratamentos de efluentes.

A fim de compreender os efeitos das misturas de substratos é necessário considerar o caminho metabólico de cada composto para o microorganismo. HARDER & DIJKHUIZEN (1982) propuseram as definições “*homologous*” e “*heterologous*” para compostos que se utilizam do mesmo caminho metabólico e de diferentes caminhos metabólicos, respectivamente. A presença de outro composto em uma mistura de substratos “*homologous*” pode acarretar em efeitos positivos, como o aumento da biomassa (SCHMIDT & ALEXANDER, 1985 *apud* REARDON *et al.*, 2000), e a indução de enzimas degradativas (ALVAREZ & VOGEL, 1991; DEEB *et al.*, 2001). Entretanto, têm sido mais comumente relatados efeitos negativos, como inibição competitiva (CHANG *et al.*, 1993; OH *et al.*, 1994; BIELEFELDT & STENSEL, 1999a,b; REARDON *et al.*, 2000), diminuindo as taxas de biodegradação dos substratos em misturas.

Apesar da biodegradação individual dos compostos benzeno, tolueno e xileno estar bem compreendida, nota-se que poucos estudos relatam a biodegradação da mistura dos seis compostos BTEX, ou seja, envolvendo o etilbenzeno e todos os isômeros do xileno. As interações entre os seis compostos provavelmente levam a resultados diferentes de estudos anteriores. Assim, visto que os caminhos metabólicos da biodegradação do etilbenzeno foram raramente investigados, DEEB

& ALVAREZ-COHEN (1999) focaram seus estudos na caracterização dos efeitos do etilbenzeno na biodegradação do benzeno, tolueno e isômeros do xileno. Os experimentos foram conduzidos para identificar as interações entre os substratos, causadas pela presença concorrente de múltiplos compostos BTEX, durante a biodegradação aeróbica por duas associações microbianas e por uma cultura pura identificada como *Rhodococcus rhodochrous*. Além disso, os estudos também foram conduzidos para determinar a temperatura ótima para a atividade microbiana e degradação dos compostos BTEX. As três culturas foram capazes de utilizar todos os compostos individualmente e em misturas. Os autores observaram interações negativas e positivas, e sugeriram a presença de não-interação, inibição competitiva, inibição não-competitiva, estimulação e cometabolismo. As taxas de biodegradação individuais dos seis compostos (BTEo-*p-mX*), foram comparadas às taxas de biodegradação em misturas binárias e ternária. Individualmente, tolueno foi mais rapidamente consumido, seguido pelo benzeno, etilbenzeno e, finalmente, os isômeros do xileno, todos em concentração de 20 mg L⁻¹. Com a associação microbiana, as taxas de biodegradação do benzeno e tolueno, em mistura binária com *o*-xileno, em concentrações de 20 mg L⁻¹, foram levemente intensificadas pela presença do *o*-xileno; efeito contrário aos relatos de que xilenos são fortes inibidores de benzeno e tolueno (ALVAREZ & VOGEL, 1991; OH *et al.*, 1994). Por outro lado, a presença do benzeno, tolueno ou etilbenzeno afetaram negativamente as taxas de biodegradação do *o*-xileno, em concentração de 40 mg L⁻¹. Na degradação dos múltiplos substratos, em concentração total de 20 mg L⁻¹, etilbenzeno foi consumido mais rapidamente, seguido pelo tolueno, benzeno e xilenos. A avaliação das taxas de biodegradação, de todas as possíveis combinações de misturas BTEX, revelou que, em cada uma destas misturas, os isômeros do xileno foram sempre os últimos a serem consumidos, ao passo que o etilbenzeno foi o primeiro. Assim, os autores concluíram que o etilbenzeno é o inibidor mais potente em todas as suas possíveis misturas, tanto em associação microbiana quanto em *R. rhodochrous*, e os isômeros do xileno são cometabolicamente degradados (ALVAREZ & VOGEL, 1991, CHANG *et al.*, 1993, OH *et al.*, 1994). As taxas de biodegradação do tolueno, em diferentes concentrações de etilbenzeno, (8, 15, 23 e 30 mg L⁻¹ com associação microbiana; 5, 10 e 15 mg L⁻¹ com *R. rhodochrous*), sugeriram que uma combinação de inibição competitiva e não-competitiva ocorreu entre ambos os substratos. Outro efeito de inibição observado inclui a retardação da biodegradação do benzeno e do tolueno na

presença do tolueno e do benzeno, respectivamente. Contudo, os autores não modelaram estes efeitos de inibição encontrados durante os experimentos.

Como apresentado no início deste capítulo, a modelagem da biodegradação de compostos tóxicos pode seguir modelos cinéticos simples como Monod e Andrews. Mas, segundo BALOO & RAMKRISHNA (1991a,b) o modelo de Monod descreve bem o crescimento de microorganismos e a taxa de consumo de um único substrato sob condições estacionárias, e falha ao descrever o estado transiente do processo. Segundo os autores, o principal motivo da existência desta diferença é causado pela regulação metabólica, na qual o controle de todas as reações e funções microbianas em nível molecular não é incorporado na descrição do crescimento microbiano.

Quando a biodegradação ocorre na presença de múltiplos substratos, a descrição quantitativa dos efeitos biocinéticos de interações devem seguir modelos mais elaborados, como os modelos de inibição incompetitiva, não-competitiva (SEGEL, 1975 *apud* REARDON *et al.*, 2000) e competitiva (YOON *et al.*, 1977 *apud* REARDON *et al.*, 2000). YOON *et al.* (1977) também propuseram o modelo SKIP (*apud* REARDON *et al.*, 2000) que incorpora parâmetros de interação entre os substratos, mas não qualifica o tipo de interação presente. Contudo, estes modelos também falham ao descrever complexos mecanismos de regulação interna.

A modelagem cinética utilizando modelos não-estruturados, como os clássicos modelos de Monod e Andrews e os modelos utilizados para descrever o crescimento microbiano em múltiplos substratos (SEGEL, 1975; YOON *et al.*, 1977), parte da hipótese de que os dados experimentais são baseados somente na fisiologia microbiana, e apesar de serem inadequados para descrever os mecanismos complexos de regulação interna, são fundamentais para o entendimento da cinética no nível da população microbiana.

Um dos fenômenos que deve ser considerado quando microorganismos utilizam muitos substratos corresponde ao fenômeno diáuxico e os mecanismos internos de controle envolvidos em nível molecular, como a repressão catabólica que geralmente ocorre quando dois ou mais substratos estão sendo utilizados. O fenômeno diáuxico pode envolver a utilização seqüencial ou simultânea dos substratos presentes (TURNER & RAMKRISHNA, 1986; BALOO & RAMKRISHNA, 1991a,b; KROUMOV, 1999; PATNAIK, 2000, NARANG, 2006).

Durante a utilização seqüencial das rotas metabólicas, caracterizada pelo fenômeno diáuxico, um substrato pode inibir a biodegradação de outro por toxicidade, repressão catabólica, inibição enzimática, depreciação de elétrons receptores ou formação de intermediários metabólicos. Por outro lado, através da utilização simultânea de rotas metabólicas, a eficiência de biodegradação é intensificada em comparação às taxas de crescimento durante a biodegradação individual dos substratos. Esta intensificação tem sido atribuída à promoção de elevadas taxas de crescimento (KLEČKA & MAIER, 1988) e ocorre devido à indução não-específica de enzimas para biodegradação de substratos similares ou a convergência de rotas metabólicas para utilização de múltiplos substratos. Porém, mesmo que os compostos sejam utilizados simultaneamente, algumas vezes eles não são catabolizados pela mesma rota metabólica, necessitando compreender quais outros mecanismos de regulação gênica estão envolvidos na biodegradação.

A repressão catabólica é o mecanismo que regula a utilização preferencial de um substrato, ao invés de outros disponíveis (NARANG, 2006). Este fenômeno ocorre quando fontes de carbono rapidamente metabolizáveis reprimem a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono.

Os mecanismos regulatórios, que causam as preferências microbianas por determinado substrato e consumo destes sequencialmente e/ou simultaneamente, foi aplicado por KROUMOV (1999), baseando-se na teoria *operon lac* de Jacob-Monod, para desenvolver um modelo para utilização de dois substratos (celobiose e xilose) por *Ruminococcus albus*. O modelo considera os mecanismos regulatórios do processo de indução-repressão avaliando os caminhos metabólicos e as mudanças de atividade na enzima chave, a qual é considerada como o passo de controle para a utilização do substrato preferencial, neste caso a xilose. O autor discute em seu trabalho os possíveis mecanismos pelos quais a celobiose afeta a utilização da xilose. Em um dos casos, provavelmente a celobiose compete com a xilose, por meio de inibição competitiva, pelo sítio ativo da enzima responsável pelo transporte ou catabolismo destes açúcares. Por outro lado, o autor diz que a celobiose pode reprimir a formação da enzima chave requerida para o catabolismo da xilose. Segundo o autor, o aparecimento de uma segunda fase lag é manifestado pela repressão da xilose, e, portanto o controle da utilização da xilose por repressão

catabólica, em nível molecular, é a hipótese mais provável para descrever o comportamento da celobiose na utilização da xilose.

Segundo MONOD (1947) *apud* NARANG (2006), o crescimento diáuxico é caracterizado pelo aparecimento de duas fases de crescimento exponencial separados por uma fase de adaptação chamada de adaptação diáuxico. Durante o crescimento diáuxico, o consumo do primeiro substrato é seguido por um período de adaptação dos microorganismos ao segundo substrato.

Diversos modelos estruturados têm sugerido diferentes perspectivas de como os microorganismos utilizam de maneira ótima suas fontes de energia, e são desenvolvidos a fim de avaliar os mecanismos de regulação interna envolvidos no crescimento microbiano em sistemas com múltiplos substratos. Desde 1982 diferentes modelos cibernéticos têm sido apresentados na literatura (KOMPALA *et al.*, 1984; KOMPALA *et al.*, 1986; TURNER & RAMKRISHNA, 1988; RAMKRISHNA *et al.*, 1996; NARANG, 1997; JONES & KOMPALA, 1999; HAMILTON *et al.*, 2005; NARANG, 2006). Estes modelos cibernéticos avaliam a regulação genética de tais sistemas, especialmente sistemas que apresentam crescimento diáuxico, considerando os microorganismos como “*optimal strategists*”. Além disso, tais modelos cibernéticos também têm sido desenvolvidos para simular a fase de adaptação diáuxico (LIU *et al.*, 1998; BRANDT *et al.*, 2004; CASASÚS *et al.*, 2005; HAMILTON *et al.*, 2005). O trabalho de Patnaik (2000) apresenta uma revisão do desenvolvimento da modelagem cibernética.

KOMPALA *et al.* (1984) desenvolveram um modelo cibernético para o crescimento de uma população microbiana em múltiplos substratos. O modelo, baseado em equações de balanço para a enzima chave, substratos e biomassa, foi capaz de simular o crescimento diáuxico, sugerindo que os microorganismos maximizam suas taxas de crescimento total a cada instante. A enzima chave é a enzima responsável pela utilização do substrato preterido e quando esta enzima não é sintetizada significa que a informação da seqüência de aminoácidos que formam esta enzima não pode ser lida em nível molecular e então, tem-se a repressão catabólica. No entanto, o modelo apresentado pelos autores possui algumas limitações, as quais puderam ser anuladas (KOMPALA *et al.*, 1986) em trabalhos subseqüentes.

TURNER & RAMKRISHNA (1988) utilizaram o modelo cibernético de KOMPALA *et al.* (1984) de maneira modificada, para simular o crescimento de

microorganismos na presença de dois substratos (glucose e xilose). Os autores observaram que, após um momento inicial transiente, apenas um único estágio estacionário foi atingido. Então, a modificação foi feita pela incorporação, na expressão da taxa da enzima chave, de um termo de contribuição de indução para a síntese da enzima e outro termo de contribuição constitutiva. Desta forma, a simulação mostrou a presença de duas fases estacionárias na concentração celular. Isto aconteceu devido à presença de um número suficiente de enzimas, devido à incorporação do termo de contribuição constitutiva, para consumir o substrato adicional e com isto o novo estágio estacionário foi estabelecido.

CASASÚS *et al.* (2005) desenvolveram um modelo para simular o crescimento diáuxico de bactéria desnitrificante. Os processos incluídos no modelo são: o crescimento aeróbico de biomassa heterotrófica; o crescimento anaeróbio de biomassa heterotrófica; a deterioração de biomassa; a taxa de síntese da enzima oxigenase (associada com crescimento aeróbio); a taxa de síntese da enzima reductase (associada com crescimento anaeróbio); e a deterioração das enzimas oxigenase e reductase. O modelo apresentou o surgimento de duas fases de crescimento exponencial separados por uma fase de adaptação. A diferença, neste caso, foi o emprego da modelagem de crescimento diáuxico na presença de duas condições diferentes de operação no mesmo sistema, uma aeróbica e outra anaeróbica.

O trabalho de NARANG (2006) solidifica todas as definições apresentadas sobre crescimento diáuxico e efeitos do mecanismo de repressão catabólica. O autor define a fase de adaptação diáuxico como sendo o tempo necessário às células para configurar as enzimas periféricas a níveis suficientemente altos para o substrato em excesso e, após esta fase, haverá o consumo deste substrato. Segundo NARANG (2006), o fenômeno de crescimento microbiano em múltiplos substratos é um exemplo de mecanismos pelos quais as expressões de genes são controladas.

Além da presença de substratos concorrentes, também se deve considerar o efeito de intermediários metabólicos produzidos, os quais podem prejudicar a biodegradação dos contaminantes. Os subprodutos metabólicos podem ser tóxicos aos microorganismos ou podem ser degradados preferencialmente aos contaminantes. Avaliar a relação entre o acúmulo de subprodutos metabólicos e a cinética de biodegradação é muito importante para o melhor entendimento do processo. WANG & LOH (1999) desenvolveram e aplicaram com sucesso um

modelo incorporando o efeito de intermediários metabólicos na degradação do fenol, utilizando cultura pura. Recentemente, NUHOGLU & YALCIN (2005) adaptaram e aplicaram satisfatoriamente o modelo de WANG & LOH (1999) na degradação do fenol, utilizando mistura de culturas, mostrando que em concentrações de fenol maiores do que 100 mg L^{-1} , o modelo de Andrews não se ajustou aos dados experimentais.

Logo, a pesquisa na área da modelagem dos fenômenos de controle e regulação interna de utilização de múltiplos substratos é uma tentativa de incorporar o conhecimento sobre caminhos metabólicos aos balanços de componentes mensuráveis no nível da população. Os primeiros modelos não-estruturados, como o modelo de Monod, são tentativas de descrever a fisiologia microbiana no nível da população, quando o substrato é limitante. No ambiente em que existem misturas de vários substratos é fundamental compreender como ocorre a regulação gênica e a adaptação dos microorganismos, as quais promovem uma seqüência de utilização preferencial dos substratos.

Portanto, o mais importante é saber como unificar os processos no nível molecular (controle interno) com processos no nível da população (fisiologia microbiana). Para isso, o futuro da área da modelagem e desenvolvimento de modelos estruturados depende de métodos analíticos disponíveis para determinar os intermediários metabólicos e a atividade enzimática envolvidos nos caminhos metabólicos do processo de biodegradação. Todas estas informações devem ser conhecidas para, então, serem utilizadas na otimização e controle de processos de biodegradação de compostos tóxicos utilizando modelos estruturados.

Embora o crescimento microbiano em mistura de substratos BTEX, e outros compostos tóxicos, seja comumente encontrado na literatura, a modelagem matemática da cinética ainda se encontra limitada, se comparada aos modelos cinéticos de um único substrato. Como exemplos, os trabalhos de DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) e HAMED *et al.* (2003), citados anteriormente, não apresentaram a modelagem cinética do processo. Os autores mostraram o estudo da biodegradação de compostos tóxicos, focando nas interações entre os substratos e na habilidade dos microorganismos durante a biotransformação de tais compostos.

Assim, o presente trabalho vem contribuir com os avanços na área da modelagem de processos de biodegradação, pois tem por objetivo a avaliação de modelos cinéticos de crescimento microbiano que representem adequadamente os

processos de biodegradação dos compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e BTF (benzeno, tolueno e fenol), individualmente e em misturas.

3.1.1. Microorganismos utilizados na biodegradação de compostos tóxicos

A habilidade de alguns microorganismos em utilizar compostos BTEX, como única fonte de carbono, foi estabelecida em 1908 quando STORMER isolou a bactéria *Bacillus hexavarbovorum* e verificou sua capacidade de crescer aerobicamente em tolueno e xileno (GIBSON & SUBRAMANIAN, 1984 *apud* ALVAREZ & HUNT, 2002). A capacidade de bactérias do solo metabolizar compostos aromáticos sob condições aeróbicas foi demonstrada em 1928 por GRAY & THORNTON, os quais relataram que em 146 das 245 amostras de solo contaminado, as bactérias foram capazes de metabolizar naftaleno, fenol e cresol.

Segundo DEL 'ARCO (1999), produtos importados, constituídos por microorganismos liofilizados têm sido utilizados no Brasil para solucionar problemas causados por derramamentos de petróleo e derivados, com uma eficiência nem sempre satisfatória. A falta de especificidade destes microorganismos e a ausência de adaptação a fatores como temperatura, nutrientes e microbiota, são as causas da ineficiência. Logo, existe a necessidade de obter culturas microbianas capazes de degradar compostos tóxicos, sob condições físico-químicas e biológicas específicas, implementando processos que minimizem os impactos provocados pelos mesmos.

Inúmeros microorganismos são citados na literatura como sendo capazes de utilizar hidrocarbonetos aromáticos em seu metabolismo. A maioria é constituída por bactérias (DOURADO, 1998; NOCENTINI *et al.*, 2000; SRACEK *et al.*, 2001; MEYSAMI & BAHARI, 2003; NICHOLSON & FATHEPURE, 2004; SHINODA *et al.*, 2004; SHIM *et al.*, 2005), havendo, também, actinomicetos, fungos e leveduras (YADAV & REDDY, 1993; MARTIRANI *et al.*, 1996; MATHEUS, 1997; KOTTERMAN, 1998; GARCÍA *et al.*, 2000; PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2002; SANTOS & LINARDI, 2004; RODRIGUES, 2006).

3.1.1.1. Utilização de cultura pura

Inúmeras culturas bacterianas puras têm sido relatadas por crescerem aerobicamente em compostos BTEX, como única fonte de carbono, incluindo gêneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Burkholderia*,

Corynebacterium, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Norcardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Ralstonia*, dentre outros. Estudos recentes também têm mostrado a habilidade de culturas puras, conhecidas como UC1 e PM1, ambos pertencentes ao grupo β -proteobacteria, em utilizar compostos tóxicos como BTEX, MTBE e TBA (DEEB *et al.*, 2001; PRUDEN, 2002).

O gênero *Acinetobacter* está amplamente citado na literatura como potencial assimilador de hidrocarbonetos de petróleo (CHAÎNEAU, *et al.*, 1999; GALLEGO *et al.*, 2001). DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) apresentaram a habilidade de *Rhodococcus rhodochrous* na biodegradação dos seis compostos BTEX. Posteriormente, DEEB & ALVAREZ-COHEN (2000) isolaram *Rhodococcus sp.* RR1 e RR2 a partir de uma mistura de culturas, e as utilizaram na biodegradação dos compostos BTEX, observando a mineralização de cinco dos seis compostos BTEX em um amplo intervalo de concentrações. Mais adiante, JUNG & PARK (2004) mostraram a capacidade de *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 em degradar misturas de benzeno, tolueno e *m*-xileno, bem como os compostos individuais.

GUSMÃO (2005) identificou a presença de diferentes microorganismos, envolvidos com o processo de remoção do BTEX, presentes em biofilme em reator anaeróbico horizontal de leito fixo, entre os quais estão membros do gênero *Paracoccus*, *Bacteroides* e *Pseudomonas*. Os membros do gênero *Pseudomonas* são caracterizados por degradar centenas de compostos orgânicos diferentes, como hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas, inseticidas, herbicidas e plásticos. A habilidade de espécies *Pseudomonas* na biodegradação dos compostos BTEX é bastante conhecida (CAVALCA *et al.*, 2000; REARDON *et al.*, 2000; REARDON *et al.*, 2002; HAMED *et al.*, 2003; SHIM *et al.*, 2005). Duas espécies de *Pseudomonas* redutoras de nitrato (*Pseudomonas sp.* BS2201 e BS2203), isolados de um solo contaminado por petróleo, também foram capazes de degradar os hidrocarbonetos (GRISHCHENKOV *et al.*, 2000). Além disso, diferentes espécies de *Pseudomonas*, tais como *aeruginosa*, *oleovorans*, *boropolis*, *putida*, foram utilizadas na investigação da cinética de crescimento microbiano em presença de BTEX (REARDON *et al.*, 2002; ALAGAPPAN & COWAN, 2004; ABUHAMED *et al.*, 2004), nas interações entre os substratos BTEX (HAMED *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2007) e em estudos sobre a dinâmica da comunidade microbiana na presença de BTEX (SHIM & YANG, 1999).

Particularmente, *Pseudomonas putida* F1 é capaz de crescer em tolueno, benzeno, fenol, etilbenzeno e outros aromáticos, como única fonte de carbono e

energia (REARDON *et al.*, 2000, ABUHAMED *et al.* 2004; SHIM *et al.* 2005), e igualmente a outras *Pseudomonas*, muitas de suas enzimas induzíveis são não específicas, permitindo uma utilização simultânea de vários substratos similares, sem excesso de codificação genética. Além disso, seus caminhos metabólicos possuem um elevado grau de convergência, possibilitando uma eficiente utilização de um grande intervalo de substratos.

Contudo, culturas puras não podem utilizar, simultaneamente e eficientemente, todos os compostos BTEX, além de outros compostos como o MTBE (UTKIN *et al.*, 1992; PAJE & COUPERWHITE, 1996; DEEB & ALVAREZ-COHEN, 2001). A grande motivação de pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação é a busca por microorganismos versáteis capazes de degradarem, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional. Esforços relativos à modificação genética de bactérias (BERTONI *et al.*, 1996; APPLGATE *et al.*, 1998) têm sido desenvolvidos a fim de encontrarem microorganismos que incorporem caminhos metabólicos para mineralizar todos os seis compostos BTEX e suas misturas. A completa mineralização da mistura dos compostos BTpX por *P. putida* é possível a partir modificações genéticas que combinam os caminhos TOD e TOL (LEE *et al.*, 1995a; LEE *et al.*, 1995b; OH & BARTHA, 1997).

Portanto, os avanços na engenharia genética têm proporcionado o direcionamento dos caminhos metabólicos, por meio do isolamento de genes de diferentes microorganismos, com a finalidade de construir microorganismos recombinantes capazes de codificar a degradação de uma variedade de compostos tóxicos com grande eficiência.

3.1.1.2. Utilização de mistura de culturas

Tendo em vista que uma única espécie microbiana dificilmente será capaz de realizar a mineralização de uma variedade de compostos tóxicos, metabolizando apenas frações restritas de substratos, a biodegradação de misturas complexas de hidrocarbonetos torna-se mais efetiva quando envolve a ação de culturas mistas capazes de catabolizar uma variedade de reações.

O crescimento de microrganismos em cultura pura é substancialmente diferente do crescimento em uma mistura de culturas, devido às diversas interações existentes entre as espécies. Estas interações podem intensificar (interações

sinérgicas) ou inibir (interações antagônicas) a proliferação dos microorganismos (JO *et al.*, 2007). Em processos fermentativos, as interações antagônicas representam um mecanismo de controle de microorganismos patogênicos. Já em processos de biodegradação, as interações sinérgicas intensificam as taxas de degradação de compostos tóxicos.

Quando uma associação microbiana cresce em mistura de substratos, qualquer um dos substratos pode ser utilizado como fonte de carbono e energia, e portanto, vários caminhos metabólicos podem ser observados.

DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999, 2000) conduziram experimentos para testar a biodegradação dos compostos BTEX utilizando-se uma associação microbiana originária de um aquífero contaminado por gasolina, no qual *Rhodococcus sp.* foi identificada como uma das culturas presentes no meio.

SHIM & YANG (1999) e SHIM *et al.* (2002) verificaram a biodegradação dos compostos BTEX por uma mistura de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* em um biorreator com leito de fibras. Esta mistura também foi utilizada por SHIM *et al.* (2005) com o objetivo de estudar a cinética de biodegradação dos compostos BTEX em condições aeróbicas, utilizando-se peróxido de hidrogênio, e em condições anaeróbicas com a utilização de nitrato.

REARDON *et al.* (2002) investigaram a habilidade da mistura de cultura *P. putida* F1 e *Burkholderia sp.* J150 em degradar os hidrocarbonetos aromáticos, benzeno, tolueno e fenol, individualmente e em mistura binária. Os autores concluíram que interações entre as duas espécies tiveram um impacto significativo na cinética de degradação dos substratos.

Recentemente, HEKMAT *et al.* (2006) desenvolveram uma modelagem matemática para representar a biodegradação de compostos orgânicos voláteis, utilizando múltiplos substratos e múltiplas espécies, no qual proto-cooperação e competição foram identificados como interações entre as espécies.

Outros exemplos de interações metabólicas entre as espécies de uma associação microbiana são apresentados por MØLLER *et al.* (1998) e CHRISTENSEN *et al.* (2002). Estes trabalhos mostram que os processos de biodegradação com múltiplas espécies representam sistemas dinâmicos bastante complexos e, portanto, seu entendimento é limitado.

3.1.2. Metabolismo aeróbico e anaeróbico dos compostos BTEX

Os microorganismos utilizam os elétrons aceptores de acordo com princípios termodinâmicos. Quanto maior a energia livre de Gibbs liberada na reação, maior será a eficiência da população microbiana em catalisar a reação. Na Tabela 3.1 são apresentadas as reações redox envolvidas na degradação dos compostos BTEX.

Segundo CHRISTENSEN *et al.* (2000), termodinamicamente a preferência dos microorganismos pelos elétrons aceptores segue a seguinte ordem: oxigênio, nitrato, manganês, ferro e sulfato.

Em processos anaeróbicos, a bioquímica e a microbiologia mostram-se mais complexas do que em processos aeróbicos, devido a grande variedade de rotas metabólicas disponíveis (WIDDEL & RABUS, 2001; SHINODA *et al.*, 2004). A degradação da matéria orgânica até metano e dióxido de carbono, envolve uma cadeia seqüencial de caminhos metabólicos, e requer ação combinada e coordenada de diferentes grupos de bactérias anaeróbias.

Até 1984, acreditava-se que a biodegradação de compostos aromáticos não era possível na ausência de oxigênio molecular. Posteriormente, vários estudos demonstraram a capacidade de culturas em utilizar anaerobicamente os compostos BTEX, sob condições desnitrificantes, manganês-redução, ferro-redução, sulfato-redução e condições metanogênicas (HUTCHINS *et al.*, 1991; HOLLIGER & ZEHNDER, 1996; LOVLEY, 1997; NALES *et al.*, 1998; PHELPS & YOUNG, 1999; HEIDER *et al.*, 1999; GRISHCHENKOV *et al.*, 2000; WIDDEL & RABUS, 2001; NAKAGAWA *et al.*, 2002; VILLATORO-MONZÓN *et al.*, 2003; HEIDRICH *et al.*, 2004; MALIYEKKAL *et al.*, 2004; GUSMÃO *et al.*, 2006; deNARDI *et al.*, 2007).

Evidências da biodegradação anaeróbica do benzeno têm sido relatadas em condições metanogênicas (WEINER & LOVLEY, 1998), sulfato-redução (PHELPS *et al.* 1998; ANDERSON & LOVLEY, 2000), ferro-redução (LOVLEY *et al.*, 1996; ROONEY-VARGA *et al.*, 1999) e nitrato-redução (BURLAND & EDWARDS, 1999).

Entretanto, algumas investigações também têm considerado o benzeno um composto recalcitrante em condições anaeróbicas (COLBERG & YOUNG, 1995). Este comportamento geralmente é explicado devido a estabilização das ligações carbono-carbono e a estrutura simétrica do anel que tornam o benzeno altamente resistente à quebra, além de outros fatores.

Tabela 3. 1 – Reações redox envolvidas na degradação dos compostos BTEX associadas à energia livre de Gibbs

Reações redox	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
Benzeno	
$C_6H_6 + 7,5O_2 + 3H_2O \rightarrow 6H^+ + 6HCO_3^-$	-3066
$C_6H_6 + 6NO_3^- \rightarrow 6HCO_3^- + 3N_2$	-3002
$C_6H_6 + 30FeOOH + 54H^+ \rightarrow 42H_2O + 6HCO_3^- + 30Fe^{2+}$	-1370
$C_6H_6 + 3,754SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow 2,25H^+ + 6HCO_3^- + 3,75HS^-$	-105
Tolueno	
$C_7H_8 + 9O_2 + 3H_2O \rightarrow 7H^+ + 7HCO_3^-$	-3670
$C_7H_8 + 7,2NO_3^- + 0,2H^+ \rightarrow 0,6H_2O + 7HCO_3^- + 3,6N_2$	-3593
$C_7H_8 + 36FeOOH + 65H^+ \rightarrow 51H_2O + 7HCO_3^- + 36Fe^{2+}$	-1635
$C_7H_8 + 4,5SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow 2,5H^+ + 7HCO_3^- + 4,5HS^-$	-118
Etilbenzeno/Xilenos	
$C_8H_{10} + 10,5O_2 + 3H_2O \rightarrow 8H^+ + 8HCO_3^-$	-4291/-4307
$C_8H_{10} + 8,4NO_3^- + 0,4H^+ \rightarrow 1,2H_2O + 8HCO_3^- + 4,2N_2$	-4201/-4217
$C_8H_{10} + 42FeOOH + 76H^+ \rightarrow 60H_2O + 8HCO_3^- + 42Fe^{2+}$	-1917/-1933
$C_8H_{10} + 5,25SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow 2,75H^+ + 8HCO_3^- + 5,25HS^-$	-146/-162

Fonte: ROYCHOUDHURY & MERRETT (2006)

O tolueno é o composto mais relatado a degradar sob condições anaeróbicas (ALVAREZ & VOGEL, 1995; HEIDER *et al.*, 1999; SHINODA *et al.*, 2004). Recentemente, Shinoda *et al.* (2004) identificaram a *Thauera sp.* DNT-1 como uma espécie degradadora do tolueno sob ambas as condições aeróbicas e anaeróbicas.

A biodegradação do etilbenzeno sob condições anaeróbicas também tem sido apresentada (RABUS & WIDDEL, 1995; BALL *et al.*, 1996; VERMACE *et al.*, 1996).

HUTCHINS (1993) mostrou que *o*-xileno, presente como a única fonte de carbono foi recalcitrante. Entretanto, uma vez que se adicionou tolueno, *o*-xileno foi então biodegradado, e os autores concluíram que possivelmente *o*-xileno seja utilizado por meio de mecanismos cometabólicos.

3.1.3. Caminhos metabólicos

Os caminhos metabólicos bacterianos dos compostos BTEX e de outros compostos aromáticos podem ser divididos em duas categorias principais: caminhos metabólicos periféricos e centrais. Os caminhos periféricos transformam um composto original em um composto comum a muitos caminhos metabólicos. Como

exemplos tem-se a formação do catecol durante a biodegradação aeróbica, e a produção de benzoil-CoA, durante a biodegradação anaeróbica de compostos aromáticos (HARWOOD & GIBSON, 1997). Estes são chamados de metabólitos centrais, e são, por sua vez, metabolizados por enzimas de caminhos centrais, sendo utilizado como subproduto de crescimento, resultando em intermediários durante a reação. Por fim, estes intermediários sofrem a quebra do anel, por meio do ciclo de Krebs, para formar compostos tais como, o ácido pirúvico, acetaldeído, ácido succínico e acetil CoA.

A ação das enzimas oxigenase consiste na primeira etapa da respiração aeróbica e promove a introdução do oxigênio na molécula de hidrocarboneto. Os compostos aromáticos são convertidos em dihidroxi-aromáticos, tais como: catecol, *gentisate* e *protocatechuate*. O catecol é o intermediário mais comumente formado durante a degradação de hidrocarbonetos aromáticos, e pode ser completamente degradado pela clivagem do anel aromático, por meio da via *meta* ou via *orto* (FARRELL & QUILTY, 1999). A via *orto* (β -ceto adipato), apresentada na Figura 3.1, envolve a quebra de ligação entre os átomos de carbono ligados aos grupos hidroxila do catecol, por meio da enzima catecol 1,2-dioxigenase, levando a formação de cis-muconato, e subseqüentemente acetil-CoA e succinato. Por outro lado, catecois clivados pela via *meta* (α -ceto adipato) sofrem a quebra de ligação entre o átomo de carbono adjacente ao grupo hidroxila, através da enzima catecol 2,3-dioxigenase (HENDRICKX *et al.*, 2006), formando semialdeído 2-hidroxi-mucônico (2HMS) e, posteriormente, piruvato e acetaldeído, como pode ser visto na Figura 3.2.

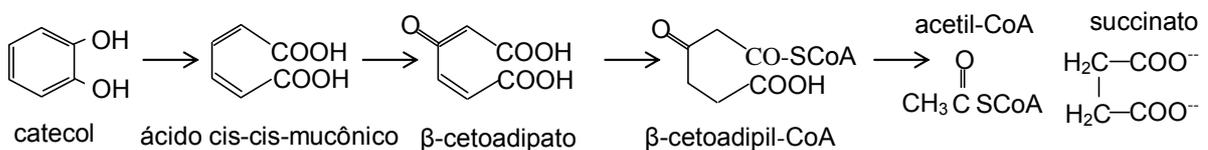


Figura 3. 1 – Esquema da clivagem do catecol via *orto*.

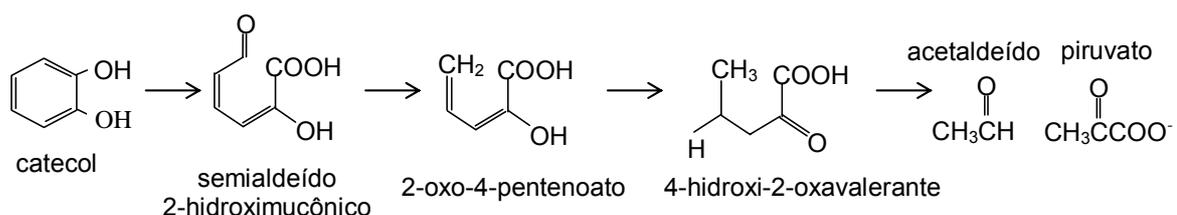


Figura 3. 2 – Esquema da clivagem do catecol via *meta*.

Qualquer uma das cinco rotas metabólicas primárias (TOD, TOL, TOM, TBU e TMO) caracterizadas até o presente momento, pode ser utilizada para a degradação de no mínimo três dos compostos BTEX (ZYLSTRA, 1994 *apud* BIELEFELDT & STENSEL, 1999a), por uma variedade de bactérias aeróbicas. *Pseudomonas putida* F1 possui o gene TOD e ataca o anel aromático utilizando a enzima tolueno dioxigenase. *Burkholderia cepacia* G4 possui o gene TOM que codifica a enzima tolueno 2-mono-oxigenase. *Pseudomonas pickettii* PKO1 possui o gene TBU que codifica a enzima tolueno 3-mono-oxigenase. *Pseudomonas mendocina* KR1 apresenta o gene TMO que expressa a enzima tolueno 4-mono-oxigenase. *Pseudomonas putida* mt-2 possui o plasmídeo TOL responsável pelo ataque do grupo metil de aromáticos. A Tabela 3.2 apresenta as rotas metabólicas envolvidas na biodegradação dos compostos BTEX, por meio de bactérias aeróbicas, as quais podem ser visualizadas com maiores detalhes, em anexos, nas Ilustrações 1 a 7.

CAVALCA *et al.* (2000), em estudos conduzidos para selecionar bactérias degradadoras de compostos aromáticos, caracterizaram nas cepas a presença de genes que codificam as enzimas tolueno-dioxigenase, xileno-mono-oxigenase e catecol 2,3-dioxigenase. Quinze das cinquenta cepas isoladas foram identificadas como *P. putida*, *P. aureofaciens*, *P. aeruginosa* e *Alcaligenes xiloxidans*. Estas espécies foram crescidas em vários hidrocarbonetos aromáticos, dentre os quais estão os compostos BTEX. O benzeno, *m*-xileno e *p*-xileno foram utilizados por 53,3% das quinze espécies, seguida pelo etilbenzeno com utilização de 66,7%. Todas as quinze espécies foram capazes de utilizar o tolueno, e nenhuma cresceu no *o*-xileno. O caminho TOL foi detectado quando a utilização dos substratos ocorre com *P. putida* e *A. xiloxidans*, enquanto o caminho TOD foi encontrado com *P. aureofaciens*, *A. xiloxidans* e *P. putida*. O crescimento da *P. putida* CM23 no benzeno, tolueno e *m-p*-xileno sugeriu a presença das rotas metabólicas TOD e TOL, os quais se referem ao ataque dioxigenase (ZYLSTRA & GIBSON, 1989 *apud* REARDON *et al.*, 2000) e mono-oxigenase (KAHNG *et al.*, 2001) do anel aromático, respectivamente.

Por outro lado, os mecanismos anaeróbicos de utilização de hidrocarbonetos têm sido completamente diferentes das reações de oxigenase. Segundo WIDDEL & RABUS (2001) o mecanismo de reação inicial da degradação do benzeno na ausência de oxigênio molecular é desconhecida.

Vários caminhos de transformação anaeróbica têm sido relatados para o tolueno, incluindo a oxidação do grupo metila com a formação de ácido benzóico; carboxilação do anel aromático formando ácido toluico; hidroxilação do grupo metila formando álcool benzílico e para-hidroxilação do anel aromático formando *p*-cresol (COLBERG & YOUNG, 1995). Frequentemente, a biodegradação anaeróbica do tolueno ocorre pela adição do fumarato ao grupo metila (KANE *et al.*, 2002), até a formação do subproduto benzoil-CoA. Este caminho metabólico foi primeiramente elucidado utilizando *Azoarcus sp. T* (BELLER & SPORMANN, 1998) e *Thauera aromática* (BIEGERT *et al.*, 1996), e pode ser visualizado em Anexos, Ilustração 8. Inicialmente, fumarato é adicionada ao grupo metil, catalizada pela enzima benzilsuccinato sintase, resultando em benzilsuccinato, o qual é convertido em fenilitaconil-CoA, sendo ambos identificados como intermediários. Maiores detalhes são revisados em SPORMANN & WIDDEL (2001).

SHINODA *et al.* (2004) concluíram que *Thauera sp. DNT-1* utiliza o tolueno por meio de ambas as enzimas, tolueno dioxigenase (caminho metabólico aeróbico-TOD) e benzilsuccinato sintase (caminho metabólico anaeróbico). Ambos são apresentados no Anexo, Figuras 8.3 e 8.8, respectivamente.

A biodegradação anaeróbica do etilbenzeno sob condições desnitrificantes foi demonstrada para culturas bacterianas puras por RABUS & WIDDEL (1995) e BALL *et al.* (1996), utilizando bactérias desnitrificantes *Azoarcus sp.* strain EBN1 e EB1, respectivamente, ambas pertencentes ao grupo β -Proteobacteria. O processo pode ser visualizado em Anexos, Ilustração 9, sendo iniciado por desidrogenação do etilbenzeno até 1-fenil-etanol, e pela subsequente conversão até benzoil-CoA, que consiste no intermediário central na degradação anaeróbica de uma variedade de hidrocarbonetos aromáticos. Como intermediários foram identificados o 1-fenil-etanol, acetofenona, benzoil-CoA e acetil-CoA.

Poucas culturas puras são capazes de metabolizar anaerobicamente os isômeros do xileno (RABUS & WIDDEL, 1995; HARMS *et al.* 1999), e os caminhos anaeróbicos, envolvidos na degradação, ainda não são bem conhecidos e estão sendo avaliados. Recentemente, MORASCH *et al.* (2004) apresentaram a primeira bactéria anaeróbica, membro do gênero *Desulfotomaculum*, capaz de degradar ambos os isômeros *orto-meta*-xileno.

3.2. Mecanismos de Regulação Gênica

Algumas enzimas, como aquelas que participam de caminhos metabólicos centrais, são sempre produzidas independentemente das condições ambientais, sendo conhecidas como enzimas constitutivas. A indução de enzimas degradativas envolve a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano, conforme a teoria *operon lac* de Jacob-Monod. As enzimas que iniciam a utilização dos compostos BTEX são geralmente induzíveis. Tais enzimas somente são produzidas quando um indutor, como por exemplo, o tolueno, está presente em uma concentração mais elevada do que a concentração inicial mínima para a indução (LINKFIELD *et al.*, 1989 *apud* ALVAREZ & HUNT, 2002). Geralmente, esta concentração inicial é muito baixa, na ordem de alguns microgramas por litro (ROBERTSON & BUTTON, 1987 *apud* ALVAREZ & HUNT, 2002).

O tolueno é geralmente um bom indutor de enzimas oxigenase e a sua presença tem sido relatada por intensificar a biodegradação do benzeno, etilbenzeno e isômeros do xileno (ARVIN *et al.*, 1989; ALVAREZ & VOGEL, 1991; GÜLENSOY & ALVAREZ, 1999), apesar de outros estudos mostrarem que o tolueno pode inibir a biodegradação do benzeno e fenol (OH *et al.*, 1994; ROGERS & REARDON 2000; HAMED *et al.*, 2003; ABUHAMED *et al.*, 2004).

Regular os tipos e quantidades de compostos que serão sintetizados é muito efetivo para a otimização do crescimento de uma população microbiana. A expressão de genes que não estavam se manifestando resulta síntese de enzimas, até então ausentes. A presença de novas enzimas significa a ocorrência de novas reações químicas, e portanto alterações no metabolismo celular, permitem à célula sintetizar novas moléculas orgânicas ou utilizar outras fontes de nutrientes, mantendo sua sobrevivência dentro das condições ambientais a que esta submetida.

Segundo BRANDT *et al.* (2004), este fenômeno, denominado adaptação fisiológica, envolve a síntese de enzimas especificamente necessárias para a adaptação a uma determinada condição ambiental, e conseqüentemente envolve a expressão de genes específicos.

A expressão gênica, por sua vez, é controlada pelos mecanismos de regulação gênica, os quais podem afetar qualquer passo da expressão gênica, incluindo o início ou término da transcrição, a tradução ou a atividade dos produtos

gênicos. A indução da expressão gênica, a repressão da expressão gênica e a repressão catabólica são as três categorias de regulação gênica.

Segundo a teoria do *operon lac* de Jacob-Monod (JACOB & MONOD, 1961 *apud* NARANG, 2006), na ausência de um indutor, o gene regulador codifica uma molécula repressora que se liga ao gene operador. Assim, o gene responsável pela codificação da síntese de enzimas induzíveis permanece reprimido. A presença de um substrato indutor converte a molécula repressora a uma forma inativa incapaz de se ligar ao gene operador, liberando a síntese da respectiva enzima. Desta forma, a indução da expressão de um ou mais genes resulta síntese de enzimas em resposta à presença, no meio, de um substrato para uma determinada via catabólica. Este mecanismo pode ser visualizado na Figura 3.3. Por outro lado, a repressão da expressão gênica bloqueia a síntese de uma ou mais enzimas, atuando em uma via biossintética, porque o produto da atividade enzimática atingiu uma concentração ideal ou limitante na célula. Dentro dessas duas categorias de regulação gênica, existem vários mecanismos reguladores que vão determinar se um produto gênico em particular será ou não sintetizado.

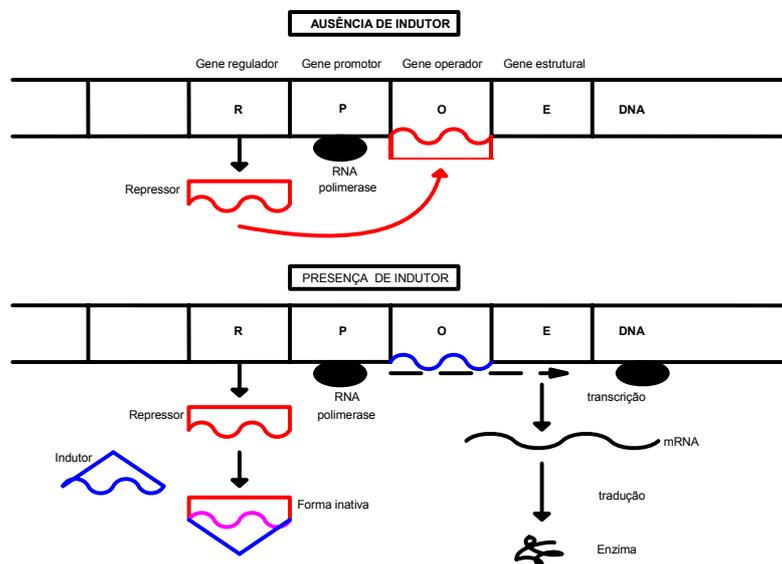


Figura 3. 3 – Esquema do mecanismo de repressão catabólica.

Tabela 3. 2 – Caminhos metabólicos caracterizados por microorganismos aeróbicos degradadores dos compostos BTEX

Substrato	Microorganismo	Enzima	Caminho metabólico	Subproduto Intermediário	Metabólito Central	Referência
B	<i>P. putida</i> F1	tolueno dioxigenase	TOD	benzeno cis-dihidrodiol	catecol	GIBSON <i>et al.</i> (1968) <i>apud</i> LOVANH <i>et al.</i> (2002)
T	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	tolueno 2 mono-oxigenase	TOM	o-cresol	3 metilcatecol	NEWMAN & WACKETT (1995)
T	<i>P. pickettii</i> PKO1	tolueno 3 mono-oxigenase	TBU	m-cresol	3 metilcatecol	KUKOR & OLSEN (1991); OLSEN <i>et al.</i> (1994); BYME <i>et al.</i> (1995)
T	<i>P. mendocina</i> KR1	tolueno 4 mono-oxigenase	TMO	p-cresol	4-hidroxi benzoato	WHITED & GIBSON (1991); YEN <i>et al.</i> (1991)
T	<i>P. putida</i> F1	tolueno dioxigenase	TOD	tolueno cis-dihidrodiol	3 metilcatecol	ZYLSTRA & GIBSON (1989) <i>apud</i> CAVALCA <i>et al.</i> (2000)
T	<i>P. putida</i> mt-2	tolueno mono-oxigenase	TOL	benzil álcool	benzoato	WILLIAMS & MURRAY (1974) <i>apud</i> LOVANH <i>et al.</i> (2002); BURLAGE <i>et al.</i> (1989) <i>apud</i> HENDRICHX <i>et al.</i> (2006)
E	<i>P. sp</i> NCIB	naftaleno dioxigenase		estireno ou 2-hidroxiacetofenona		LEE & GIBSON (1996)
E	<i>P. sp</i> NCIB	etilbenzeno dioxigenase		cis 2-3, dihidroxi 2,3 dihidroetilbenzeno	3 etilcatecol	
o-X	<i>Burkholderia cepacia</i> MB2	xileno mono-oxigenase	TOL	o-metil-benzil álcool	3 metilcatecol	JORGENSEN <i>et al.</i> (1995)
m-X	<i>P. putida</i> mt-2	xileno mono-oxigenase	TOL	m-metil-benzil álcool	3 metilcatecol	DAVEY & GIBSON (1974) <i>apud</i> JO <i>et al.</i> (2007)
p-X	<i>P. putida</i>	xileno mono-oxigenase	TOL	p-metil-benzil álcool	4 metilcatecol	DUETZ <i>et al.</i> (1998)
o-p-X	<i>P. putida</i> PPO1	tolueno dioxigenase	TOD		3-6-dimetilcatecol	GIBSON <i>et al.</i> (1974) <i>apud</i> TSAO <i>et al.</i> (1998); TSAO <i>et al.</i> (1998)

Capítulo 4

4.1. Princípio da Análise de Sistema no Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos Sofisticados

A revisão da literatura mostra que o desenvolvimento de processos biotecnológicos não é uma tarefa fácil, pois muitos processos físico-químicos e bioquímicos estão envolvidos. Obviamente, o estudo de sistemas biotecnológicos tão sofisticados, em escala real, não é possível. Assim, KAFFAROV *et al.* (1985) sugerem que o conhecimento sobre o desempenho e projeto de biorreatores podem ser sumarizados utilizando um princípio de decomposição de análise de sistema, que consiste na divisão do sistema em subsistemas, os quais podem ser estudados e modelados separadamente, e mais adiante, todos os conhecimentos avaliados a partir dos subsistemas, são unificados para formar o modelo completo do biorreator.

Portanto, seguindo esta estratégia, a modelagem matemática completa de biorreatores pode ser construída a partir de cinco níveis hierárquicos de conhecimento, como apresentados na Figura 4.1.

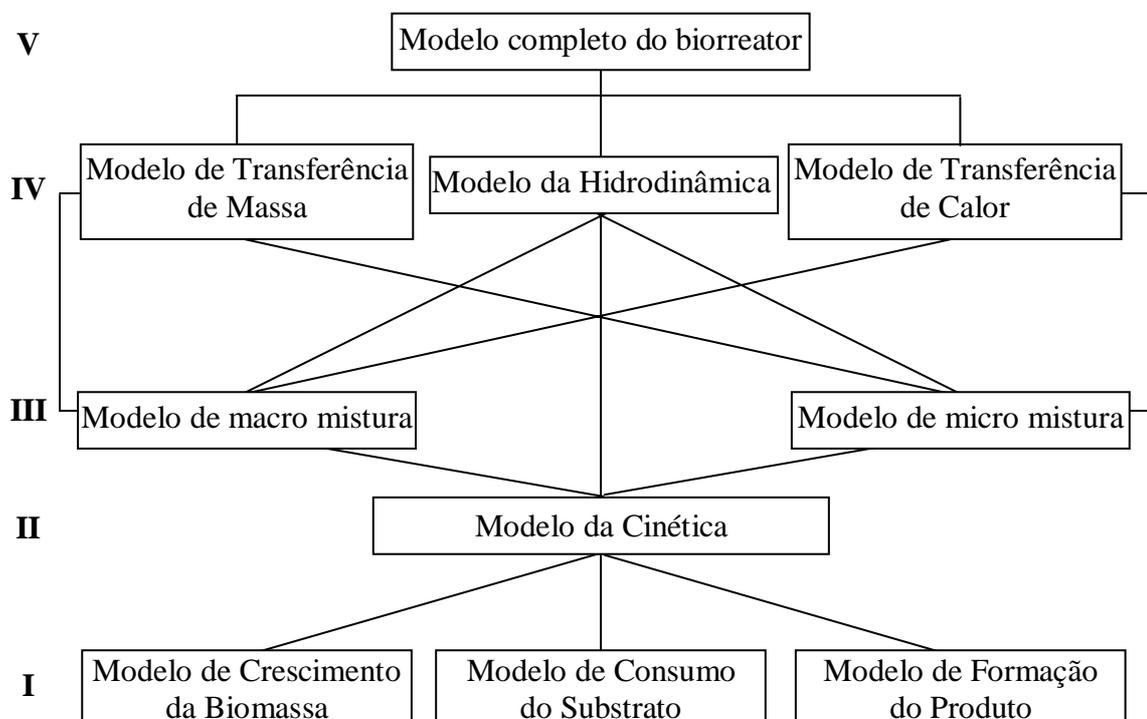


Figura 4. 1 – Esquema do modelo completo matemático do biorreator.

O primeiro nível hierárquico é o estágio chave no desenvolvimento do processo e requer experimentos cinéticos para obtenção de informações sobre o crescimento microbiano, utilização de substratos, síntese da enzima chave e formação de produtos.

O segundo nível hierárquico utiliza informações obtidas no primeiro nível de conhecimento para completar o modelo cinético. É importante lembrar que o modelo cinético deve ser bastante realístico, representando apenas parâmetros chaves mensuráveis envolvidos na referido processo.

O terceiro nível hierárquico tem uma correlação direta com processos físicos de distribuição gás e líquido no vaso do reator. Utilizando os princípios análogos às propriedades de mistura de sistema gás-líquido-sólido é possível modelar qualquer desempenho de biorreator em função de efeitos de mistura e dinâmica de fluidos e produtividade total do biorreator em processos cinéticos microbianos.

O quarto nível hierárquico combina processos de transferência de massa, transferência de calor e hidrodinâmica a partir de suas influências e relações com a cinética microbiana. Completando este nível de conhecimento pode-se desempenhar análises do sistema apenas por meio de simulações no computador sem conduzir experimentos em escala real. A validação do modelo pode ser feita apenas com o projeto de poucos experimentos em pontos críticos onde os resultados das simulações divergem significativamente de todo o experimento. Isto é particularmente verdadeiro quando o desempenho de um novo biorreator é aplicado com características hidrodinâmicas desconhecidas.

O quinto nível hierárquico corresponde à etapa final no procedimento para o desenvolvimento do modelo, no qual os conhecimentos de todos os cinco níveis são combinados para completar a modelagem matemática do biorreator. A validação deste nível tem sido feita com base em experimentos em planta piloto ou escala industrial, em que limitações à transferência de massa e distribuição do tempo de residência são responsáveis pela deformação dos valores dos parâmetros cinéticos e decréscimo da produtividade total do biorreator. Simulações com o modelo matemático completo do biorreator economizam tempo e dinheiro e, além disso, eliminam possíveis erros durante o desenvolvimento dos processos e projeto do reator, resultando interpretação final de sistemas biotecnológicos sofisticados.

Assim, a modelagem matemática e simulação de biorreatores têm como principal objetivo prever o comportamento estacionário e dinâmico do processo,

possibilitando a determinação das condições operacionais ótimas, representando uma ferramenta moderna e poderosa no desenvolvimento de processos biotecnológicos.

4.2. Modelos Cinéticos de Crescimento Microbiano

4.2.1. Classificação dos modelos cinéticos

Os modelos cinéticos de processos biotecnológicos, em geral, podem ser classificados, quanto ao número de componentes usados na representação celular, em modelos não-estruturados e modelos estruturados. Os modelos não-estruturados avaliam o comportamento cinético do processo, admitindo que o material celular seja representado por uma única variável, e não existem variações de componentes intracelulares. Já os modelos estruturados permitem descrever o estado das células com maiores detalhes, considerando os componentes intracelulares.

Quanto à heterogeneidade da população microbiana, os modelos cinéticos também são classificados em duas categorias. Neste caso, existem os modelos não-segregados que admitem uma população homogênea, nos quais todas as células apresentam o mesmo comportamento; e os modelos segregados, que consideram uma população heterogênea, nos quais as células possuem distribuição de idade, tamanho, dentre outras propriedades.

4.2.2. Taxa de crescimento específico

A equação cinética para um substrato “*i*” descreve a influência de sua concentração e de outros compostos (inibidores ou ativadores) na taxa de crescimento específico μ_{x_i} . A taxa de crescimento específico pode ser afetada pela presença de inibidores no meio de cultura, como alguns substratos, intermediários e produtos formados.

A expressão para a taxa de crescimento específico é função do modelo cinético, além do microorganismo. Quando a biodegradação ocorre na presença de múltiplos substratos, a taxa de crescimento específico celular pode ser apresentada por meio da forma aditiva (equação 4.1) e da forma multiplicativa (equação 4.2):

$$SGR = \sum_{i=1}^n \mu_{x_i} \quad (4.1)$$

$$SGR = \prod_{i=1}^n \mu_{x_i} \quad (4.2)$$

Dentre os modelos cinéticos não-estruturados tem-se o clássico modelo de MONOD (1942) *apud* REARDON *et al.* (2000), a partir do qual surgiram diversos outros modelos que descrevem o consumo de substratos, formação dos produtos e crescimento da biomassa. Além disso, alguns também incorporam a influência de componentes tais como, inibidores e ativadores. As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam alguns modelos não-estruturados para o crescimento celular em único substrato e múltiplos substratos, respectivamente.

4.2.3. Modelos para único substrato

4.2.3.1. Modelo de Monod

O trabalho fenomenológico mais importante sobre cinética de crescimento microbiano foi desenvolvido em 1942 por MONOD. O modelo de Monod aplica-se para a população microbiana e representa características cinéticas integrais da biomassa. Este fato é crucial para entender a fisiologia microbiana no nível da população e acelerou o desenvolvimento de outros modelos cinéticos, tais como Tessier, Moser e Contois (BAILEY & OLLIS, 1986).

Monod admite que todos os componentes do meio de cultura, menos um, estão presentes em altas concentrações balanceadas, tal que mudanças nestas condições não afetam significativamente a taxa de crescimento celular. Assim, um simples componente torna-se limitante (substrato), e somente as variações na concentração deste componente causariam alterações no comportamento do meio de cultura.

A equação de Monod, conforme a Tabela 4.1, relaciona a taxa de crescimento em função da concentração do substrato. A constante de Monod K_S , denominada constante de saturação, representa o valor da concentração de substrato S no qual a taxa de crescimento específico é igual a metade do seu valor máximo, e indica especialmente a afinidade do microorganismo ao substrato.

Tabela 4. 1 – Modelos cinéticos não-estruturados para único substrato

Modelo	Equação	Referência
Limitação e Inibição pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_S}{S} + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n}$	WU <i>et al.</i> (1988) <i>apud</i> LIMA <i>et al.</i> (2001)
Limitação pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_S + S}$	MONOD (1942) <i>apud</i> REARDON <i>et al.</i> (2000)
	$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x}(1 - e^{-KS})$	TESSIER (1942) <i>apud</i> BAILEY & OLLIS (1986)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S^n}{K_S + S^n}$	MOSER (1958) <i>apud</i> BAILEY & OLLIS (1986)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_{sx}X + S}$	CONTOIS (1959) <i>apud</i> BAILEY & OLLIS (1986)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S\left(1 + \frac{S}{K}\right)}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}$	WEBB (1963) <i>apud</i> NUHOGLU & YALCIN (2005)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{\left(K_S + S + \frac{S^2}{K_i}\right)\left(1 + \frac{S}{K}\right)}$	YANO <i>et al.</i> (1966) <i>apud</i> NUHOGLU & YALCIN (2005)
Inibição pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}$	ANDREWS (1968) <i>apud</i> REARDON <i>et al.</i> (2000)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_S + S} e^{\left(\frac{-S}{K_i}\right)}$	AIBA (1968) <i>apud</i> NUHOGLU & YALCIN (2005)
	$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{\left(K_S + S + S \sum_{j=1}^p \left(\frac{S}{K_i}\right)^j\right)}$	YANO & KOGA (1969) <i>apud</i> SHALABY (2003)
	$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \left[e^{\left(\frac{-S}{K_i}\right)} - e^{\left(\frac{-S}{K_S}\right)} \right]$	EDWARDS (1970) <i>apud</i> NUHOGLU & YALCIN (2005)

4.2.3.2. Modelo de Andrews

A inibição pelo substrato é freqüentemente expressa pelo modelo de Andrews (ANDREWS, 1968 *apud* REARDON *et al.*, 2000), similar à equação de Haldane para cinética enzimática. Conforme SHALABY (2003) o modelo de Andrews é baseado na taxa de crescimento específico (ALLSOP *et al.*, 1993), mas também pode ser relatada para taxa de consumo específico de substrato (SOKOL, 1988).

Uma equação bastante versátil para inibição pelo substrato foi proposta por YANO & KOGA (1969), como apresentada na Tabela 4.1. A equação de Yano & Koga foi utilizada por SCHRÖDER *et al.* (1997) para descrever a degradação do fenol por *Burkholderia cepacia* G4 em operação contínua, ajustando-se melhor aos dados do que várias outras equações testadas. A equação de Andrews pode ser obtida a partir da equação de Yano & Koga quando $j = 1$.

Dos vários modelos de inibição pelo substrato, a equação de Andrews tem sido extensamente utilizada para descrever a biodegradação do fenol (KOTTURI *et al.*, 1991; SEKER *et al.*, 1997; ABUHAMED *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005; NUHOGLU & YALCIN, 2005; JIANG *et al.*, 2007).

4.2.4. Modelos para múltiplos substratos

A modelagem matemática da cinética microbiana em múltiplos substratos é bastante complexa. Os microorganismos crescidos em múltiplos substratos mostram preferência por muitos dos compostos presentes no meio, favorecendo suas biodegradações (PATNAIK, 2000) em detrimento da biodegradação dos compostos preteridos. Vários fenômenos devem ser considerados quando microorganismos utilizam muitos substratos, tais como a repressão catabólica, indução e repressão enzimática, os quais promovem a utilização seqüencial ou simultânea dos substratos. A Tabela 4.2 apresenta alguns modelos não-estruturados adequados para sistemas com múltiplos substratos.

Tabela 4. 2 – Modelos cinéticos não-estruturados para múltiplos substratos

Modelo	Equação	Referência
Limitação por múltiplos substratos	$\mu_x = \frac{\mu_{\max} S_1 S_2}{(K_{S_1} + S_1)(K_{S_2} + S_2)}$ (utilização simultânea de S ₁ e S ₂)	MEGEE <i>et al.</i> (1972) <i>apud</i> LIMA <i>et al.</i> (2001)
	$\mu_x = \left(\mu_0 + \frac{\mu_{\max 1} S_1}{K_{S_1} + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} S_2}{K_{S_2} + S_2} \right) \left(\frac{S_3}{K_{S_3} + S_3} \right)$ (utilização simultânea de S ₁ e S ₂)	TSAO & HANSON (1975) <i>apud</i> LIMA <i>et al.</i> (2001)
Inibição Não-Competitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + S_j \left(\frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) + \frac{S_i S_j}{K_{S_j}} \right)}$	SEGEL (1975) <i>apud</i> REARDON <i>et al.</i> (2000)
Inibição Acompetitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + \frac{S_i S_j}{K_{S_j}} \right)}$	
Inibição Competitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + S_j \left(\frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) \right)}$	YOON <i>et al.</i> (1977) <i>apud</i> REARDON <i>et al.</i> (2000)
SKIP	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{\max_i} S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + S_j I_{ji} \right)}$	
Limitação e Inibição por múltiplos substratos	$\mu_x = \frac{\mu_{\max 1} S_1}{K_{S_1} + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} S_2}{K_{S_2} + S_2 + \frac{S_1^2}{K_i}}$ (utilização preferencial de S ₁)	DUNN <i>et al.</i> (1992) <i>apud</i> LIMA <i>et al.</i> (2001)

4.2.4.1. Modelo de Inibição Competitiva

A utilização simultânea, observada durante a biodegradação de mistura de substratos, suporta a hipótese de que estes são utilizados pela mesma rota metabólica, o que sugere a presença de inibição competitiva entre os substratos.

Durante a inibição competitiva o inibidor e o substrato, os quais geralmente possuem estrutura química similar, competem pelo mesmo sítio ativo da enzima responsável pela metabolização dos compostos. O modelo de inibição competitiva, proposto por YOON *et al.* (1977) *apud* REARDON *et al.* (2000), apresentado na Tabela 4.2, representa a taxa de crescimento específico do substrato “i” na

presença de um substrato “j”. O modelo pode ser facilmente estendido para vários substratos presentes no sistema, como apresentado na equação 4.3:

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{m\acute{a}x_i} S_i}{Ks_i + S_i + \sum_{j \neq i} S_j \left(\frac{Ks_i}{Ks_j} \right)} \quad (4.3)$$

4.2.4.2. Modelo de Inibição Não-Competitiva

O modelo de inibição não-competitiva, proposto por SEGEL (1975) *apud* REARDON *et al.* (2000), pode ser adequado quando o substrato inibidor liga-se tanto ao complexo enzima-substrato, quanto à enzima livre, inativando-os. O modelo, apresentado na Tabela 4.2, representa o taxa de crescimento específico no substrato “i” na presença de um substrato “j”. Também pode ser representada pela equação (4.4), quando mais substratos estão envolvidos no processo:

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{m\acute{a}x_i} S_i}{Ks_i + S_i + \sum_{j \neq i} \left(S_j \left(\frac{Ks_i}{Ks_j} \right) + \frac{S_i S_j}{Ks_j} \right)} \quad (4.4)$$

4.2.4.3. Modelo de Inibição Acompetitiva

O modelo de inibição incompetitiva, apresentado por SEGEL (1975) *apud* REARDON *et al.* (2000), pode ser utilizado quando o substrato inibidor se liga ao complexo enzima-substrato, inativando-o, e não a enzima livre. A taxa de crescimento específico dada pela inibição incompetitiva entre dois substratos “i” e “j” é apresentada na Tabela 4.2, para o substrato “i”. Estendendo o modelo para mais do que dois substratos presentes no processo, a taxa de crescimento específico no substrato “i” pode ser representado pela equação (4.5):

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{m\acute{a}x_i} S_i}{Ks_i + S_i + \sum_{j \neq i} \frac{S_i S_j}{Ks_j}} \quad (4.5)$$

4.2.4.4. Modelo SKIP

Quando as interações entre os substratos não correspondem à inibição enzimática, então um modelo alternativo pode ser utilizado, conhecido como modelo SKIP (*sum kinetics interactions parameters*). Este modelo foi proposto por YOON *et*

al. (1977) *apud* REARDON *et al.* (2000), sendo adequado para ajustar interações não-específicas entre dois substratos, pela incorporação do parâmetro de interação I_{ji} , que indica o grau que o substrato “j” afeta a biodegradação do substrato “i”. Neste caso, a taxa de crescimento específico para o substrato “i” pode ser apresentada pela equação, dada na Tabela 4.2. O modelo também pode ser estendido para vários substratos presentes no sistema, como apresentado na equação 4.6:

$$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{máx_i} S_i}{K S_i + S_i + \sum_{j \neq i} S_j I_{ji}} \quad (4.6)$$

4.3. Balanços de Massa

4.3.1. Operação descontínua

O cultivo batelada é caracterizado pela vazão volumétrica nula. O balanço de massa para a biomassa e para o substrato “i” em um reator batelada pode ser expresso pelas equações (4.7) e (4.8), respectivamente:

$$\frac{dX(t)}{dt} = SGR \cdot X(t) = \sum_{i=1}^n \mu_{x_i} X(t) \quad (4.7)$$

$$\frac{dS_i(t)}{dt} = - \frac{\mu_{x_i}}{Y_{X/S_i}} X(t) \quad (4.8)$$

4.3.2. Operação contínua

Em operação contínua a vazão volumétrica de entrada e saída são iguais, mantendo o volume do reator constante. Estes biorreatores são caracterizados por um parâmetro chamado taxa de diluição (DR) definido pela equação (4.9):

$$DR = \frac{FR}{V} \quad (4.9)$$

As expressões para o balanço de massa para biomassa e para o substrato “i” são dadas pelas equações (4.10) e (4.11):

$$\frac{dX(t)}{dt} = (-DR + SGR)X(t) \quad (4.10)$$

$$\frac{dS_i(t)}{dt} = DR(S_{i0in} - S_i(t)) - \frac{\mu_{x_i}}{Y_{X/S_i}} X(t) \quad (4.11)$$

Se $DR > SGR$, então a taxa de crescimento celular torna-se negativa e a concentração celular decrescerá até que ocorra o fenômeno conhecido como “wash out” ou arraste de células. O “wash out” pode ser usado para calcular a taxa de crescimento máximo ou a taxa de conversão do substrato, sendo uma técnica utilizada para avaliar o comportamento do microorganismo (ESENER *et al.*, 1981 *apud* SHALABY, 2003).

Em condições estacionárias, as equações diferenciais (4.10) e (4.11) são iguais a zero e se transformam nas equações (4.12) e (4.13), respectivamente:

$$DR = SGR \quad (4.12)$$

$$DR(S_{i0in} - S_i(t)) = \frac{\mu_{x_i}}{Y_{X/S_i}} X(t) \quad (4.13)$$

A equação (4.12) mostra que a taxa de crescimento específico das células pode ser controladas por meio da taxa de diluição.

4.3.3. Operação contínua – com reciclo

A operação do sistema contínuo com recirculação tem como objetivo a obtenção de alta densidade celular no reator, aumentando-se as taxas de crescimento celular e consumo de substrato e, portanto, aumentando-se a eficiência total no biorreator. O reciclo externo torna-se uma alternativa viável em processos como tratamento biológico, os quais não requerem preocupação com assepsia.

O balanço para biomassa é dado pela equação (4.14) e para o substrato “i” é dado pela equação (4.15):

$$\frac{dX(t)}{dt} = -DR.X(t) + \frac{FR}{V}(X_{Nreatores} - X(t)) + SGR.X(t) \quad (4.14)$$

$$\frac{dS_i(t)}{dt} = DR(S_{i0in} - S_i(t)) + \frac{FR}{V}(S_{iNreatores} - S_i(t)) - \frac{\mu_{x_i}}{Y_{X/S_i}} X(t) \quad (4.15)$$

4.3.4. Processo aeróbico

O oxigênio é necessário para todos os processos aeróbicos por definição. A taxa de crescimento específico microbiano relativo ao consumo de oxigênio, segue a cinética de Monod, conforme apresentada pela equação (4.16):

$$\mu_{xO_2} = \frac{\mu_{\max O_2} C_{O_2}(t)}{K_{S_{O_2}} + C_{O_2}(t)} \quad (4.16)$$

Desta forma, a taxa de consumo do oxigênio é dada pela equação (4.17):

$$OUR = \frac{dC_{O_2}(t)}{dt} = -\frac{\mu_{xO_2}}{Y_{x/O_2}} X(t) \quad (4.17)$$

A taxa de transferência de oxigênio na fase vapor é apresentada pela equação (4.18), e deve ser igual ou superior à taxa de consumo de oxigênio pelos microorganismos:

$$OTR = \frac{dC_{O_2}(t)}{dt} = K_{la_{O_2}} (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t)) \quad (4.18)$$

Sendo:

- μ_{xO_2} taxa de crescimento específico no oxigênio;
- OUR taxa de consumo do oxigênio;
- OTR taxa de transferência de massa do oxigênio;
- $\mu_{\max O_2}$ taxa máxima de crescimento específico no oxigênio;
- $K_{S_{O_2}}$ constante de saturação do oxigênio;
- Y_{x/O_2} coeficiente de rendimento no oxigênio;
- X concentração de células;
- C_{O_2} concentração do oxigênio dissolvido no meio;
- $C_{O_2}^*$ concentração de saturação do oxigênio dissolvido;
- $K_{la_{O_2}}$ coeficiente global de transferência de massa do oxigênio.

Na maioria dos experimentos batelada, encontrados na literatura, verifica-se que os mesmos são conduzidos sob condições operacionais (agitação e aeração) em que é mantida uma alta taxa de transferência de massa do oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Neste caso, os modelos cinéticos de crescimento microbiano não consideram o oxigênio como um substrato limitante, assumindo uma adequada aeração do meio.

Desta forma, o oxigênio dissolvido não limita a taxa de crescimento microbiano, podendo ser desconsiderada durante a modelagem do processo de biodegradação em operação batelada.

4.4. Métodos de Identificação de Parâmetros

A etapa de identificação de parâmetros é fundamental para o desenvolvimento e aplicação de modelos matemáticos de diversas áreas do conhecimento. Uma das ferramentas utilizadas nesta etapa consiste nos métodos de otimização numérica, os quais podem ser divididos em métodos determinísticos e estocásticos. Os métodos determinísticos são técnicas específicas utilizados para resolver um limitado grupo de problemas, dentre os quais se enquadra as técnicas de programação matemática.

A identificação de parâmetros em processos químicos e biotecnológicos é uma tarefa bastante complexa, dependendo do número de compostos envolvidos no processo, resultando um elevado número de parâmetros a serem determinados. Além disso, estes processos geralmente resultam modelos não-lineares, necessitando de métodos de otimização não convencionais, como as técnicas metaheurísticas. Ao contrário das heurísticas convencionais, as metaheurísticas são de caráter geral e têm condições de escapar de ótimos locais, onde os mecanismos utilizados para este fim são responsáveis pela caracterização e diferenciação dos diversos métodos desta categoria. Exemplos clássicos são os algoritmos genéticos, enxame de partículas, redes neurais e recozimento simulado, além da busca tabu e colônia de formigas, dentre outros.

De acordo com o princípio utilizado para explorar o espaço de soluções, as técnicas metaheurísticas dividem-se em métodos de busca local e métodos de busca global. Os métodos recozimento simulado e a busca tabu são exemplos de métodos de busca local. A exploração do espaço de soluções é feita por meio de movimentos, os quais são aplicados a cada passo sobre a solução corrente, gerando outra solução promissora em sua vizinhança. Os métodos baseados em busca global, tais como algoritmos genéticos e enxame de partículas, consistem em manter um conjunto de boas soluções e combiná-las com o objetivo de alcançar soluções ainda melhores.

Genetic Algorithm (GA) foi originariamente proposto por HOLLAND (1975) e baseia-se na teoria evolucionária das espécies. Assim, aplicam-se operadores genéticos (seleção natural, cruzamento e mutação) sobre uma população inicial e suas próximas gerações. Cada indivíduo da população é codificado em um cromossomo, que representa uma possível solução ao problema. A adaptação de

um indivíduo é então avaliada pelo valor da função objetivo (seleção natural) e os indivíduos altamente adaptados são permitidos a se reproduzirem pela troca de informação genética (cruzamento) com outro indivíduo altamente adaptado, produzindo indivíduos ainda melhores, ou seja, filhos com características de ambos os pais. As mutações são freqüentemente permitidas pela alteração de alguns genes dos cromossomos. Os melhores indivíduos podem substituir toda a geração anterior ou substituir apenas os indivíduos menos adaptados. Geralmente, os algoritmos genéticos proporcionam excelentes resultados na procura de ótimos globais, embora sua convergência seja considerada relativamente lenta.

Simulated Annealing (SA) é uma técnica de busca local probabilística, proposta originalmente por KIRKPATRICK *et al.* (1983). Fundamenta-se em uma analogia com a termodinâmica, ao simular o resfriamento de um conjunto de átomos aquecidos, operação conhecida como recozimento. O método faz analogia com o seguinte processo: um sólido é aquecido a altas temperaturas e gradualmente resfriado para permitir a sua cristalização. Como o processo de aquecimento permite que os átomos se movimentem aleatoriamente, se o resfriamento não é realizado muito rapidamente, então os átomos terão tempo suficiente para se alinharem de modo a atingir um estado de mínima energia. Desta forma, o estado do sólido corresponde a uma solução viável e a energia de cada estado corresponde ao valor da função objetivo. Neste procedimento, a busca é permitida a prosseguir mesmo se o movimento causar um aumento na função objetivo, pelo uso de um parâmetro chamado temperatura. O valor da temperatura é controlado pelo processo de resfriamento, sendo que valores baixos resultam em um algoritmo de busca local, ao passo que valores altos reduzem a velocidade de convergência.

Tabu Search (TS) (GLOVER, 1986) é um método de busca local que consiste em explorar o espaço de soluções movendo-se de uma solução para outra que seja seu melhor vizinho. Esta estratégia, juntamente com uma estrutura de memória para armazenar as soluções geradas (lista tabu) possibilita escapar dos ótimos locais (LIN & MILLER, 2004).

Particle Swarm Optimization (PSO) (KENNEDY & EBERHART, 2001) tem sido bastante aplicado em diversas áreas da ciência. A otimização por enxame de partículas, é um método de busca global criado por KENNEDY & EBERHART em 1995, baseado na simulação do comportamento social de animais, os quais observaram que estes apresentavam movimento localmente aleatório, mas

globalmente determinado. Este método é utilizado em problemas de otimização não-lineares sem restrições, e similar aos algoritmos evolucionários, o método *PSO* também é baseado em uma população de indivíduos, denominada enxame de partículas. Entretanto, a única modificação sofrida pelo indivíduo (partícula) é sua localização no espaço por meio do operador velocidade, diferentemente de algoritmos evolucionários, tais como em algoritmos genéticos, nos quais os indivíduos sofrem alterações genéticas por meio dos operadores cruzamento, mutação e seleção.

4.4.1. Enxame de Partículas ou *Particle Swarm Optimization - PSO*

No método de otimização conhecido como enxame de partículas (*PSO*), a cada indivíduo da população (partícula) é atribuído um vetor que corresponde a uma possível solução do problema. Cada partícula possui uma posição e uma velocidade no espaço de busca, de dimensão igual ao número de parâmetros do problema, resultando em um enxame de tamanho igual ao número de partículas. As partículas atuam sob três influências que se combinam vetorialmente, atualizando sua velocidade e posição no espaço: (i) vetor posição atual; (ii) vetor melhor posição visitada pela partícula e (iii) vetor melhor posição visitada pelo enxame.

A posição atual da partícula é dada pela equação (4.19):

$$\vec{X}_i^{(k)} = \vec{X}_{min} + \lambda \left(\vec{X}_{max} - \vec{X}_{min} \right) \tag{4.19}$$

A Figura 4.2 mostra como a trajetória de uma partícula, que inicialmente encontra-se em repouso, é ajustada a cada iteração.

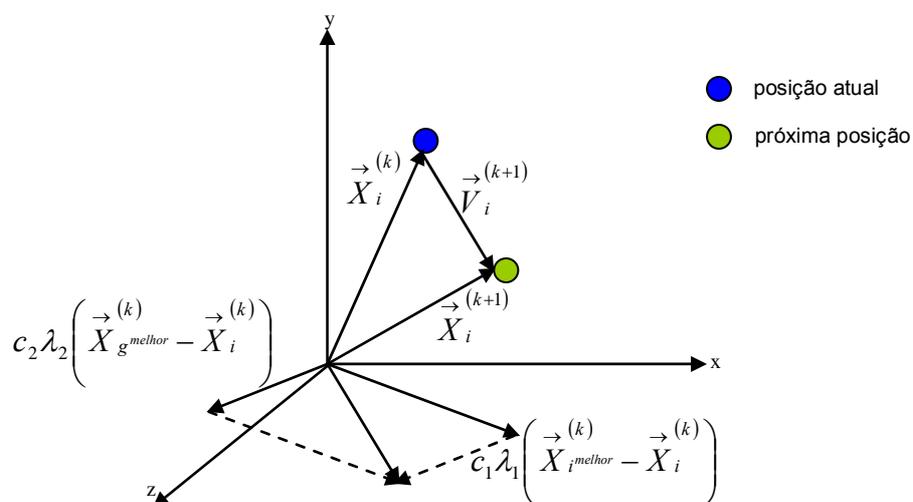


Figura 4. 2 – Trajetória de uma partícula do algoritmo *PSO*.

A cada iteração são atualizadas as velocidades das partículas e consequentemente, as posições das partículas. A equação (4.20) é usada para calcular as novas velocidades das partículas de acordo com suas velocidades anteriores e componentes que direcionam para a melhor posição da partícula e a melhor posição do enxame:

$$\vec{V}_i^{(k+1)} = \omega^{(k)} \vec{V}_i^{(k)} + c_1 \lambda_1 \left(\vec{X}_{i^{melhor}}^{(k)} - \vec{X}_i^{(k)} \right) + c_2 \lambda_2 \left(\vec{X}_{g^{melhor}}^{(k)} - \vec{X}_i^{(k)} \right) \quad (4.20)$$

Sendo:

- $\vec{V}_i^{(k+1)}$ vetor próxima velocidade da partícula i ;
- $\vec{V}_i^{(k)}$ vetor velocidade atual da partícula i ;
- $\vec{X}_i^{(k)}$ vetor posição atual da partícula i ;
- $\vec{X}_i^{(k+1)}$ vetor próxima posição da partícula i ;
- $\vec{X}_{i^{melhor}}^{(k)}$ vetor melhor posição visitada pela partícula i ;
- $\vec{X}_{g^{melhor}}^{(k)}$ vetor melhor posição visitada pelo grupo;
- c_1 constante de aceleração local;
- c_2 constante de aceleração global;
- λ variável aleatória.
- ω fator de inércia;
- k iteração;

A primeira parcela da equação 4.20 mantém cada partícula na direção prévia; a magnitude deste vetor depende do fator de inércia (ω). A segunda e terceira parcelas representam a influência da melhor posição individual e da melhor posição do enxame, respectivamente, sendo que suas magnitudes dependem das constantes de aceleração (c_1 e c_2) e variáveis aleatórias (λ_1 e λ_2).

Neste trabalho um valor apropriado para o fator de inércia (ω) foi conseguido pela equação (4.21):

$$\omega^{(k)} = \omega_{inicial} + (\omega_{final} - \omega_{inicial}) \left(\frac{k-1}{K-1} \right) \quad (4.21)$$

Sendo: K número de iterações.

A utilização da equação (4.21) refina a busca da solução encontrada, evitando que nas últimas iterações o método escape dos valores ótimos. Existem alguns trabalhos que utilizam o fator de inércia como uma constante, no entanto, a diferenciação na utilização deste parâmetro depende do problema a ser otimizado.

A Figura 4.3 apresenta o algoritmo para a implementação do método de busca *PSO*. Para a inicialização da população são pré-definidos: o número de indivíduos ou partículas, o número de iterações, o número de parâmetros, o limite de busca (\vec{X}_{min} e \vec{X}_{max}), os fatores de inércia e as constantes de aceleração.

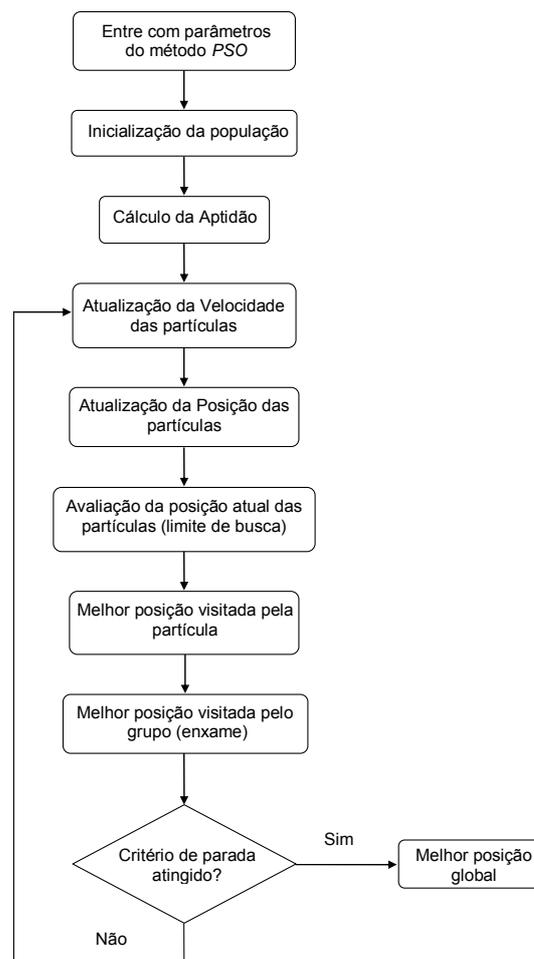


Figura 4. 3 – Esquema do algoritmo *PSO*.

A partir daí, as partículas “voam” para novas posições de acordo com a equação (4.22). O desempenho de cada partícula é medido de acordo com uma função de aptidão pré-definida que é relacionada ao problema a ser resolvido.

$$\vec{X}_i^{(k+1)} = \vec{X}_i^{(k)} + \vec{V}_i^{(k+1)} \quad (4.22)$$

O desempenho de cada partícula é medido de acordo com a função objetivo pré-estabelecida como critério estatístico, avaliando-se, neste trabalho, o mínimo global. Após um número especificado de iterações, a melhor solução encontrada é utilizada como informação no processo de restrição do espaço de busca, sendo restringidos apenas os parâmetros de maior sensibilidade sobre a função objetivo global. Essa avaliação da sensibilidade dos parâmetros é possível por meio do diálogo gráfico, utilizando o *software Maple*[®].

Partindo dos conceitos básicos de um algoritmo metaheurístico, se faz necessário realizar uma análise comportamental do algoritmo. Desta forma, necessita-se distinguir os fatores e constantes do método para a obtenção de melhores resultados.

O fator de inércia (ω) controla o grau de convergência da busca e, neste trabalho, decresce linearmente de $\omega_{inicial} = 0,9$ a $\omega_{final} = 0,4$.

Os valores de λ_1 e λ_2 são variáveis aleatórias sorteadas no intervalo (0,1), as quais modificam as velocidades das partículas em cada iteração, perturbando suas trajetórias a fim de atingir um ótimo global, evitando ótimos locais.

As constantes c_1 e c_2 são denominadas coeficientes de aceleração local e global, respectivamente, e seus valores devem ser $c_1 > 0$ e $c_2 \leq 2$. Segundo OLIVEIRA (2005), o algoritmo tende a convergir mais lentamente se valores altos de c_1 são adotados, mas atinge melhores desempenhos. Por outro lado, valores baixos de c_1 , apesar de diminuir o desempenho do algoritmo, resultam em convergência mais rápida. O aumento de c_2 implica uma maior velocidade de convergência, pois este fator é responsável pela velocidade parcial relativa à melhor posição global. Contudo, a ponderação alta para essa parcela da velocidade implica em diminuição da diversificação do algoritmo, uma vez que todas as partículas tendem para a mesma posição. Isso resulta obtenção de ótimos locais, ao invés de ótimos globais, diminuindo a eficiência do algoritmo. Valores de $c_2 < c_1$ aumentam a chance de escapar de ótimos locais, porém atrasam o encontro dos ótimos globais.

Atingido o critério de parada, conforme o desempenho da função objetivo, dado pelas expressões (4.23) e (4.24), tem-se a melhor posição global, isto é, a melhor posição visitada pelo enxame:

$$\vec{X}_{i^{melhor}}^{(k+1)} = \vec{X}_i^{(k+1)} \quad \text{se} \quad f(\vec{X}_i^{(k+1)}) < f(\vec{X}_{i^{melhor}}^{(k)}) \quad (4.23)$$

$$\vec{X}_{g^{melhor}}^{(k+1)} = \vec{X}_{i^{melhor}}^{(k+1)} \quad \text{se} \quad f(\vec{X}_{i^{melhor}}^{(k+1)}) < f(\vec{X}_{g^{melhor}}^{(k)}) \quad (4.24)$$

É importante lembrar que métodos de otimização mais complexos, como os citados anteriormente, podem ser utilizados para resolução de modelos não-lineares. Contudo, adotou-se o método de otimização por enxame de partículas, pois converge para um ótimo global, de maneira relativamente rápida, sem “cair” em ótimos locais e, geralmente, fornece resultados próximos aos obtidos por algoritmos genéticos, porém são mais rápidos e mais simples de programar.

4.5. Procedimento para Identificação dos Parâmetros

Os parâmetros cinéticos, estequiométricos e interativos dos modelos avaliados são estimados utilizando o método enxame de partículas (*PSO*), com dados experimentais extraídos da literatura (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999; HAMED *et al.*, 2003). O procedimento também inclui o diálogo gráfico utilizando o *software Maple*[®], possibilitando a análise de sensibilidade dos parâmetros e avaliação da resposta do sistema.

A busca pelos valores dos parâmetros pelo método *PSO* foi guiada pelo significado microbiológico de cada parâmetro e serviu de base às variações do limite de busca, em que a tendência dos melhores valores foi preservada. A determinação do intervalo de possibilidades dos parâmetros inicia-se por meio de uma estimativa inicial, baseada no conhecimento da fisiologia microbiana, além de valores apresentados na literatura. Em seguida, por meio de repetidas buscas e análises dos resultados obtidos, é possível a diminuição até um espaço de busca pequeno que restringe os valores ótimos baseados nos parâmetros com maior sensibilidade do processo. Os dados experimentais são graficados juntamente com as simulações dos modelos avaliados, utilizando as mesmas condições iniciais e o mesmo número de iterações. Na Tabela 4.3 são apresentados os valores utilizados para os parâmetros do método *PSO*.

A avaliação da eficiência dos modelos é feita por meio do valor mínimo da função objetivo global, dada pelos mínimos quadrados, encontrada para o mesmo número de iterações em cada caso estudado. Para as variáveis substrato (S) e

biomassa (X), o cálculo da função objetivo é dado pelas equações 4.25 e 4.26, respectivamente:

$$R = \sum_i \left(\frac{\tilde{S}_i}{S_i^{máx}} - \frac{S_i}{S_i^{máx}} \right)^2 \quad (4.25)$$

$$R = \sum_i \left(\frac{\tilde{X}_i}{X_i^{máx}} - \frac{X_i}{X_i^{máx}} \right)^2 \quad (4.26)$$

Tabela 4. 3 – Valores dos parâmetros do método PSO utilizados nos modelos cinéticos

Parâmetros do Método PSO	Modelos para Único Substrato	Modelos para Múltiplos Substratos		
		BTEX	BTF	
			binária	ternária
n° indivíduos	300	300	300	
n° iterações	25	25	25	
n° parâmetros	3 ^(a) , 4 ^(b)	12 ^(c) , 24 ^(d)	6 ^(c) , 8 ^(d)	9 ^(c) , 15 ^(d)
C ₁	1	1	1	
C ₂	2	2	2	
ω _{final}	0,9	0,9	0,9	
ω _{inicial}	0,4	0,4	0,4	

(a) Modelo de Monod.

(b) Modelo de Andrews.

(c) Modelos Inibição Competitiva, Não-Competitiva e Acompetitiva.

(d) Modelo SKIP.

Verifica-se que é bastante elevado o número de parâmetros a serem determinados nos modelos para múltiplos substratos. Segundo KROUMOV *et al.* (2006), uma das grandes dificuldades encontradas na identificação dos parâmetros de modelos complexos consiste na diferença de sensibilidade de cada parâmetro. Quanto maior o número de parâmetros a serem identificados, mais elevado será o trabalho computacional e a dificuldade em encontrar o valor ótimo global.

Os resultados alcançados com o método PSO e a utilização da equação dos mínimos quadrados para cálculo da função objetivo mostraram-se bastante satisfatórios e são apresentadas no capítulo seguinte.

Capítulo 5

Neste capítulo são avaliados os modelos cinéticos não-estruturados de crescimento microbiano para a biodegradação de único e múltiplos substratos, BTEX e BTF, em operação batelada.

5.1. Biodegradação dos Compostos BTEX

Os dados experimentais utilizados para a avaliação dos modelos cinéticos propostos foram extraídos de DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) e são apresentados na Tabela 5.1 para a biodegradação da mistura dos compostos BTEX, e nas Tabelas 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5 para a biodegradação individual destes compostos.

Os experimentos de DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) testando a biodegradação dos compostos BTEX, individualmente e em mistura, foram conduzidos em reator batelada a 35 °C, no qual duas associações microbianas e uma cultura pura foram capazes de degradar todos os compostos BTEX. As associações de culturas, derivadas de um aquífero contaminado por gasolina, foram enriquecidas no tolueno a 20 °C e 35 °C, respectivamente. A cultura pura caracterizada como *Rhodococcus rhodochrous* foi isolada a partir da associação microbiana enriquecida no tolueno a 35 °C. *Rhodococcus rhodochrous* foi capaz de degradar cada um dos compostos BTEX, individualmente e em mistura.

Os reatores foram operados a uma taxa de mistura de 175 rpm, na qual as limitações por transferência de massa do oxigênio são superadas segundo CHANG & ALVAREZ-COHEN (1995). O oxigênio foi necessário para manter 15 a 21% de oxigênio na fase líquida constante no *headspace*. Totalizando o volume de 250 mL, cada um dos reatores apresentaram 125 mL de líquido (sais minerais e células), 123 mL de *headspace* e 2 mL para promover a mistura e preservar a agregação das células. Os microorganismos foram mantidos no intervalo de pH 6,8 a 7. As massas de aromáticos adicionadas foram calculadas usando as constantes da lei de Henry, volume do líquido e do gás no reator e concentrações dos substratos na fase líquida e gasosa. Os valores das constantes da lei de Henry para os compostos BTEX foram determinados a 35 °C e calculadas como descrito por ASHWORTH *et al.* (1987) *apud* DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999).

Tabela 5. 1 – Dados experimentais do processo de biodegradação do BTEX

Tempo (h)	Benzeno (mg L ⁻¹)	Tolueno (mg L ⁻¹)	Etilbenzeno (mg L ⁻¹)	o-Xileno (mg L ⁻¹)
0	20,00	20,00	20,00	20,00
2,00	18,80	16,70	13,00	19,10
2,50	18,00	14,20	9,50	18,50
3,00	17,50	12,00	6,40	18,00
3,50	16,25	9,00	3,20	17,25
4,25	10,50	1,00	0,50	15,70
5,50	0	0	0	8,00
6,00	-	-	-	5,50
6,50	-	-	-	4,10
6,80	-	-	-	3,20
8,20	-	-	-	0

Fonte: DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999)

Tabela 5. 2 – Dados experimentais do processo de biodegradação do benzeno

Tempo (h)	Benzeno (mg L ⁻¹)
0	20,00
1,20	14,00
2,00	7,50
2,75	3,00
3,00	1,00
3,25	0

Fonte: DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999)

Tabela 5. 3 – Dados experimentais do processo de biodegradação do tolueno

Tempo (h)	Tolueno (mg L ⁻¹)
0	20,00
1,20	15,00
2,00	8,20
2,70	1,00
2,80	0,10

Fonte: DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999)

Tabela 5. 4 – Dados experimentais do processo de biodegradação do etilbenzeno

Tempo (h)	Etilbenzeno (mg L ⁻¹)
0	20,00
1,23	15,00
1,98	10,00
2,65	5,65
3,23	1,50
3,65	0

Fonte: DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999)

Tabela 5. 5 – Dados experimentais do processo de biodegradação do o-xileno

Tempo (h)	o-Xileno (mg L ⁻¹)
0	20,00
1,20	16,85
2,10	14,50
2,85	7,50
3,80	2,00
4,00	1,75
4,40	0

Fonte: DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999)

Os balanços de massa em reator batelada para a biomassa e para o composto “*i*” são expressos pelas equações (4.7) e (4.8), respectivamente. Admite-se que não existe consumo de substrato para a manutenção celular. Assume-se que a taxa de crescimento específico (*SGR*) pode ser expressa na forma aditiva, descrita pela equação (4.1). Assume-se uma adequada aeração do meio e assim o oxigênio dissolvido não é considerado um substrato limitante e, portanto, não limita a taxa de crescimento microbiano, podendo ser desconsiderado durante a modelagem do processo de biodegradação.

5.1.1. Modelos cinéticos para a biodegradação de único substrato

No estudo da biodegradação de único substrato avaliaram-se os modelos de Monod e Andrews, modelos fundamentais, que posteriormente servirão de base para uma melhor avaliação dos modelos sofisticados. Esta etapa mostra que estes modelos simples também podem ser utilizados com sucesso na representação de dados experimentais e, portanto, a avaliação de outros modelos pode ser descartada, facilitando a avaliação da cinética de crescimento microbiano e o projeto de biorreatores.

5.1.1.1. Modelo de Monod

Os balanços individuais para os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto*-xileno são expressos pelas equações (5.1), (5.2), (5.3) e (5.4), respectivamente:

$$\frac{dS_b(t)}{dt} = - \frac{\mu_{máx_b} S_b(t)}{K_{S_b} + S_b(t)} \frac{X(t)}{Y_{x/sb}} \quad (5.1)$$

$$\frac{dS_t(t)}{dt} = -\frac{\mu_{máx_t} S_t(t)}{K_{S_t} + S_t(t)} \frac{X(t)}{Y_{x/st}} \quad (5.2)$$

$$\frac{dS_e(t)}{dt} = -\frac{\mu_{máx_e} S_e(t)}{K_{S_e} + S_e(t)} \frac{X(t)}{Y_{x/se}} \quad (5.3)$$

$$\frac{dS_x(t)}{dt} = -\frac{\mu_{máx_x} S_x(t)}{K_{S_x} + S_x(t)} \frac{X(t)}{Y_{x/sx}} \quad (5.4)$$

5.1.1.2. Modelo de Andrews

Os balanços individuais para os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto*-xileno são expressos pelas equações (5.5), (5.6), (5.7) e (5.8), respectivamente:

$$\frac{dS_b(t)}{dt} = -\frac{\mu_{máx_b} S_b(t)}{K_{S_b} + S_b(t) + \frac{S_b^2(t)}{K_{i_b}}} \frac{X(t)}{Y_{x/sb}} \quad (5.5)$$

$$\frac{dS_t(t)}{dt} = -\frac{\mu_{máx_t} S_t(t)}{K_{S_t} + S_t(t) + \frac{S_t^2(t)}{K_{i_t}}} \frac{X(t)}{Y_{x/st}} \quad (5.6)$$

$$\frac{dS_e(t)}{dt} = -\frac{\mu_{máx_e} S_e(t)}{K_{S_e} + S_e(t) + \frac{S_e^2(t)}{K_{i_e}}} \frac{X(t)}{Y_{x/se}} \quad (5.7)$$

$$\frac{dS_x(t)}{dt} = -\frac{\mu_{máx_x} S_x(t)}{K_{S_x} + S_x(t) + \frac{S_x^2(t)}{K_{i_x}}} \frac{X(t)}{Y_{x/sx}} \quad (5.8)$$

O *software Maple*[®] foi utilizado para obter a solução numérica das equações diferenciais, o ajuste de parâmetros e as simulações dos modelos. Adotou-se o método de Runge-Kutta-Fehlberg de 4ª e 5ª ordens para a resolução numérica das equações diferenciais, utilizando-se as seguintes condições iniciais: 20 mg L⁻¹ para a concentração inicial de substrato e 11,925 mg L⁻¹ para a concentração inicial de células. O valor da concentração inicial de células foi estimado pelo método *PSO*, juntamente com os parâmetros de cada modelo.

5.1.1.3. Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação individual dos substratos BTEX

As Figuras 5.1 a 5.8 apresentam as simulações dos modelos de Monod e Andrews à biodegradação dos compostos BTEX individualmente, juntamente com os

dados experimentais conduzidos em reator batelada, utilizando uma mistura de culturas microbianas (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999).

Os parâmetros cinéticos e estequiométricos dos modelos de Monod e Andrews utilizados nas simulações são apresentados nas Tabelas 5.6 e 5.7, 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.

Tabela 5. 6 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação dos compostos BTEX individualmente - Modelo de Monod

Parâmetros	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	Xileno
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0,30	0,33	0,27	0,24
K_s (mg L ⁻¹)	1,25	0,64	0,85	0,58
$Y_{x/s}$ (mg mg ⁻¹)	0,73	0,82	0,81	0,95

Utilizando-se o modelo de Monod verifica-se que a taxa máxima de crescimento específico $\mu_{m\acute{a}x}$ mostra-se similar para os compostos BTEX e o baixo valor de K_s indica que a cultura apresentou maior afinidade com o xileno e desta forma resultou maior valor para o coeficiente de rendimento $Y_{x/s}$ no xileno.

Tabela 5. 7 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação dos compostos BTEX individualmente - Modelo de Andrews

Parâmetros	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	Xileno
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0,22	0,46	0,26	0,19
K_s (mg L ⁻¹)	0,92	0,65	1,50	2,55
$Y_{x/s}$ (mg mg ⁻¹)	0,48	0,95	0,40	0,15
K_i (mg L ⁻¹)	150	45	20	5

Aplicando o modelo de Andrews verifica-se que a taxa máxima de crescimento específico $\mu_{m\acute{a}x}$ é maior no tolueno e os dados experimentais mostram que este foi utilizado mais rapidamente, ao passo que a utilização do xileno foi mais demorada e proporcionou menor valor de $\mu_{m\acute{a}x}$. Neste caso, o valor de K_s mostra que a cultura apresenta maior afinidade com o tolueno e desta forma resulta maior valor do coeficiente de rendimento $Y_{x/s}$ no tolueno.

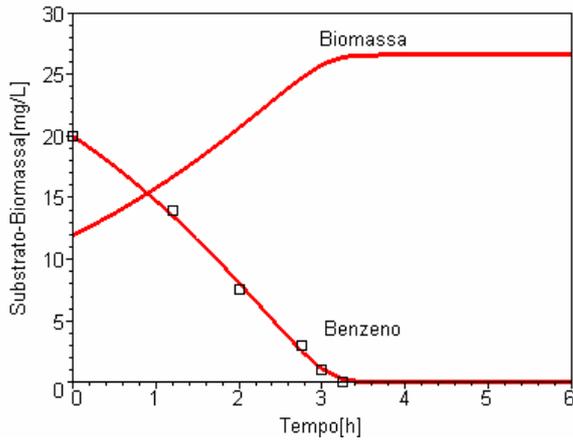


Figura 5. 1 – Simulações do modelo de Monod e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o benzeno.

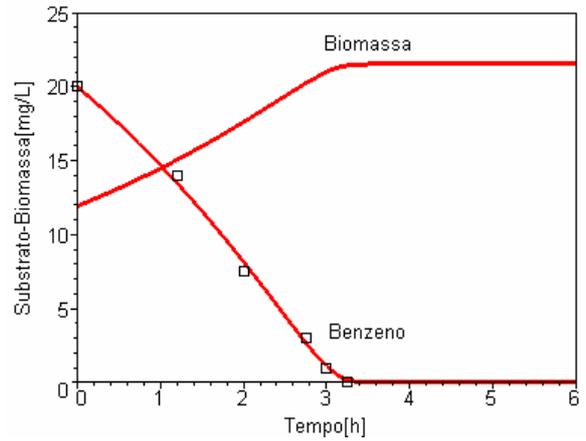


Figura 5. 2 – Simulações do modelo de Andrews e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o benzeno.

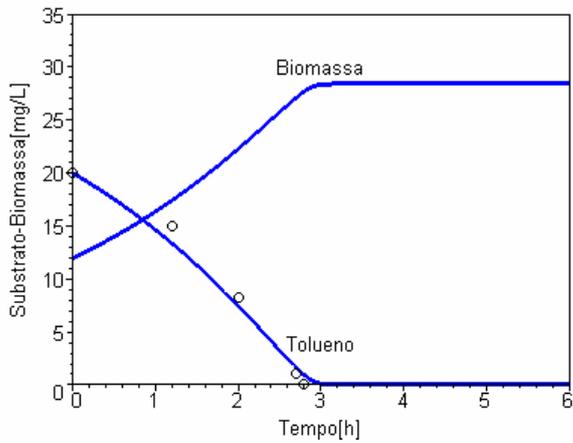


Figura 5. 3 – Simulações do modelo de Monod e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o tolueno.

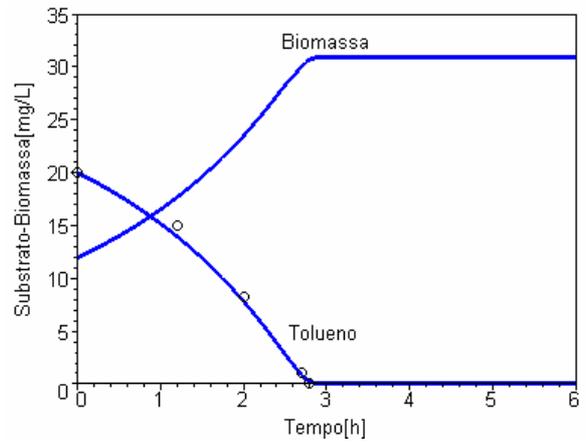


Figura 5. 4 – Simulações do modelo de Andrews e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o tolueno.

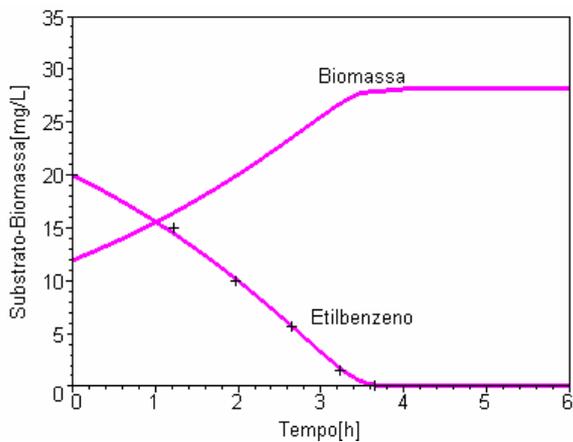


Figura 5. 5 – Simulações do modelo de Monod e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o etilbenzeno.

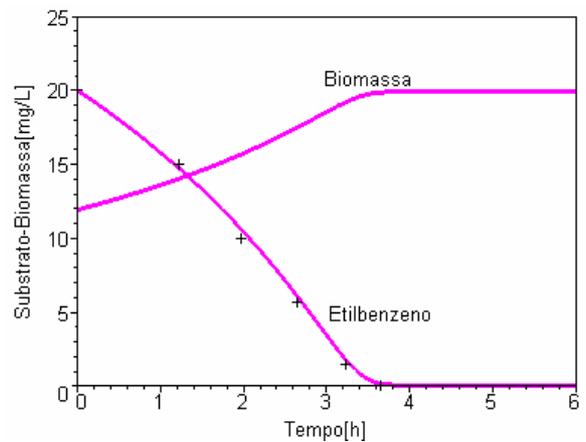


Figura 5. 6 – Simulações do modelo de Andrews e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o etilbenzeno.

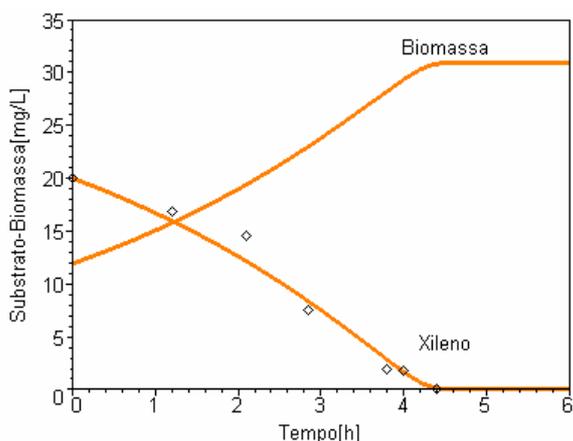


Figura 5. 7 – Simulações do modelo de Monod e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o xileno.

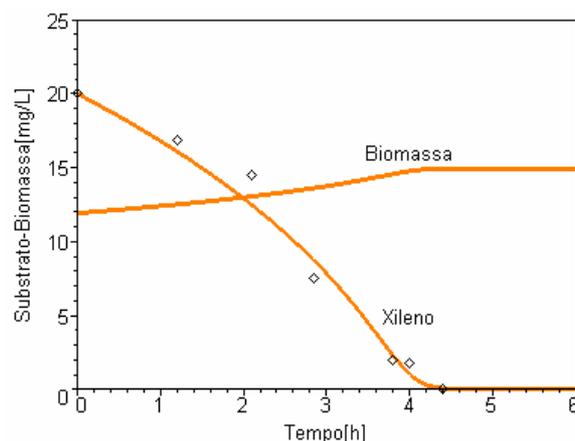


Figura 5. 8 – Simulações do modelo de Andrews e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o xileno.

Nas Figuras 5.1, 5.3, 5.5 e 5.7 observa-se um ótimo ajuste entre as simulações do modelo de Monod e os dados experimentais. Verifica-se que o modelo de Monod prediz satisfatoriamente a cinética de biodegradação individual dos compostos BTEX, principalmente em baixas concentrações (CHANG *et al.*, 1993). O modelo de Andrews também se ajustou bem aos dados experimentais, como pode ser visto nas Figuras 5.2, 5.4, 5.6 e 5.8. Logo, o modelo de inibição pelo substrato também pode representar os dados experimentais de DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999). Concentrações iniciais de substratos mais elevadas (acima de 40 mg L^{-1}) favorecem o ajuste pelo modelo de Andrews (BIELEFELDT & STENSEL, 1999a; SHIM & YANG, 1999; SHIM *et al.*, 2005), pois fornece maiores informações sobre o sistema que apresenta efeitos de inibitórios, quando a concentração dos substratos encontra-se perto de valores tóxicos ao crescimento celular. Além disso, se o número de dados experimentais é maior que o número de parâmetros do modelo, o modelo que apresenta a maior quantidade de parâmetros também se torna privilegiado durante o ajuste aos dados experimentais.

A Tabela 5.8 apresenta a comparação entre os modelos de Monod e Andrews, avaliando o resíduo mínimo obtido durante a estimativa dos parâmetros pelo método *PSO*. Ambos os modelos alcançaram valores da função objetivo similares para os compostos, benzeno, etilbenzeno e xileno.

Como pode ser verificado nas Figuras 5.1 a 5.8, não foi possível a avaliação do sistema com relação ao crescimento dos microorganismos, por falta de dados experimentais da concentração de biomassa. No entanto, os valores dos coeficientes de rendimento estimados e utilizados na simulação do crescimento da

biomassa, mostraram-se coerentes com diversos valores extraídos da literatura, sendo que alguns são apresentados na Tabela 1, em Anexos.

Tabela 5. 8 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos cinéticos de único substrato na biodegradação dos compostos BTEX

Substrato	Função Objetivo (equação 4.25)	
	Modelo de Monod	Modelo de Andrews
Benzeno	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
Tolueno	$10 \cdot 10^{-3}$	$2,40 \cdot 10^{-3}$
Etilbenzeno	$1 \cdot 10^{-3}$	$0,75 \cdot 10^{-3}$
Xileno	$19,50 \cdot 10^{-3}$	$16,70 \cdot 10^{-3}$

A aplicação de 300 partículas e 25 iterações durante a implementação do método *PSO*, utilizando um microcomputador AMD Sempron 2800 Hz, 512MB de memória RAM, necessitou de um tempo médio de 3 minutos para a estimativa dos parâmetros de ambos os modelos cinéticos de Monod e Andrews. Em geral, a convergência do resíduo mínimo ocorreu em menos do que 25 iterações, como pode ser verificado, por exemplo, na Figura 5.9 que mostra a evolução dos valores globais da função objetivo aplicando o modelo de Andrews à biodegradação do etilbenzeno.

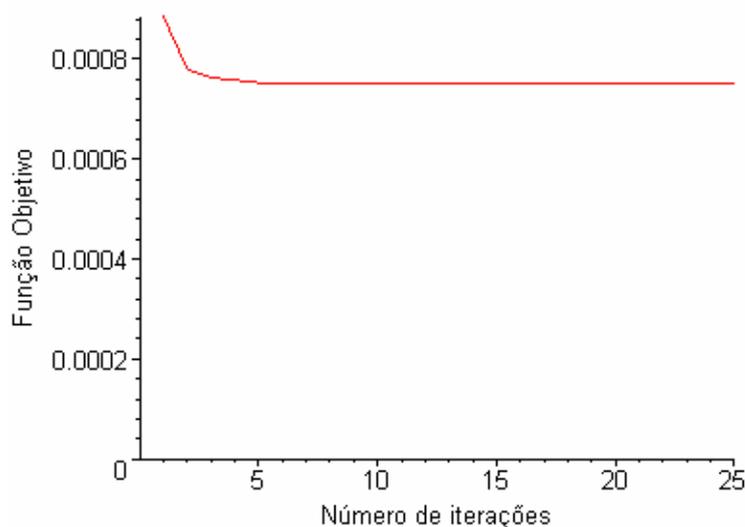


Figura 5. 9 – Evolução dos melhores valores globais da função objetivo aplicando o modelo de Andrews na biodegradação do etilbenzeno.

Durante este procedimento verificou-se que, independentemente do número de iterações aplicados, se o intervalo de busca estimado contém os valores ótimos, então a convergência torna-se rápida.

Nas Figuras 5.10 - (a), (b), (c), e (d) - são apresentadas as simulações das taxas de crescimento específico dos microorganismos, em cada composto BTEX, em função de suas respectivas concentrações.

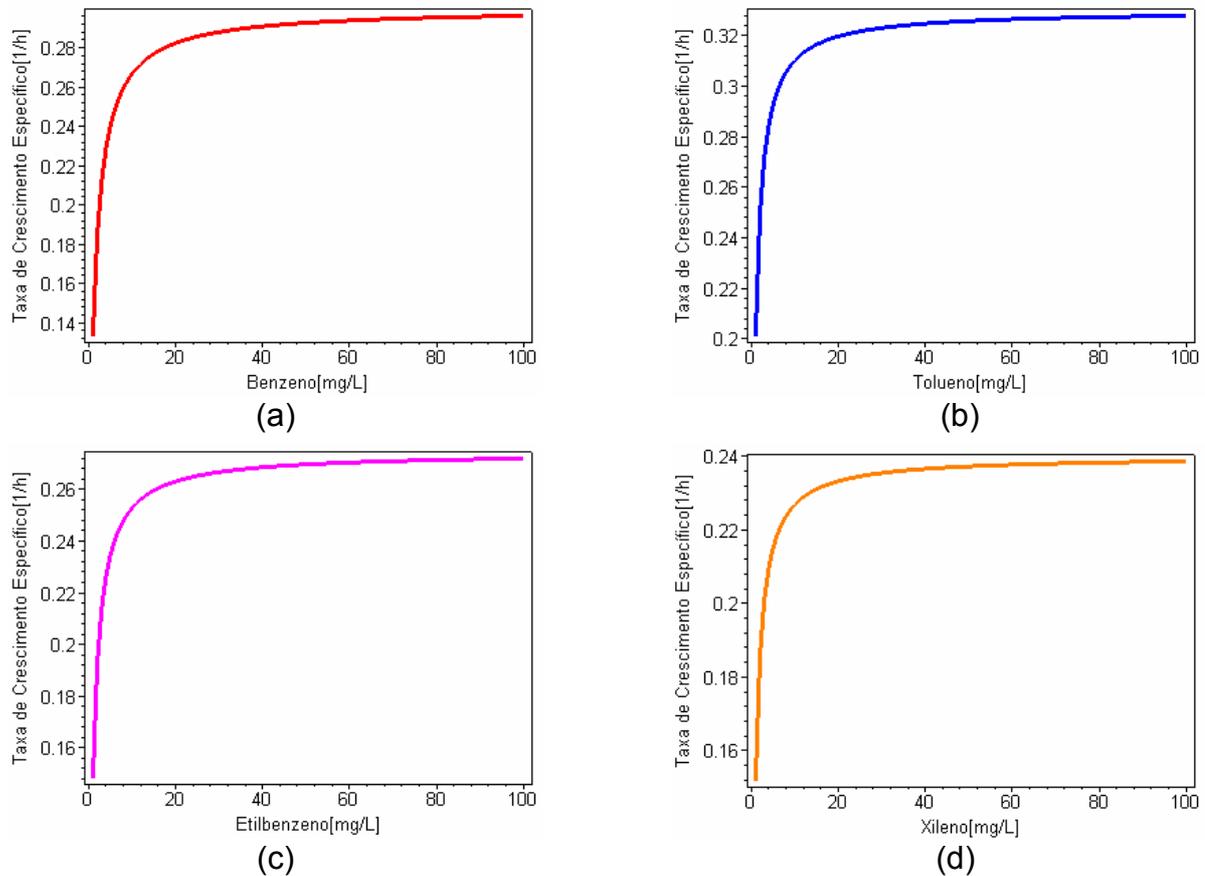


Figura 5. 10 – Simulações da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Monod para os compostos BTEX.

A constante de saturação K_s do modelo de Monod é definida como a concentração de substrato no qual μ_x é igual à metade de $\mu_{máx}$. Quanto menor o valor de K_s , maior será a afinidade entre o microorganismo e o substrato. Entretanto, se o substrato é inibitório não é possível observar um $\mu_{máx}$ “real” e desta forma, K_s assume um significado hipotético. Dos três parâmetros cinéticos do modelo de Andrews a constante K_i representa o efeito inibitório do substrato, mas quando este valor é muito elevado, a equação de Andrews assume a forma da equação de Monod.

Nas Figuras 5.11 - (a), (b), (c) e (d) - são apresentadas as simulações da dependência da taxa de crescimento específico da associação microbiana em função da concentração dos substratos BTEX aplicando o modelo de Andrews.

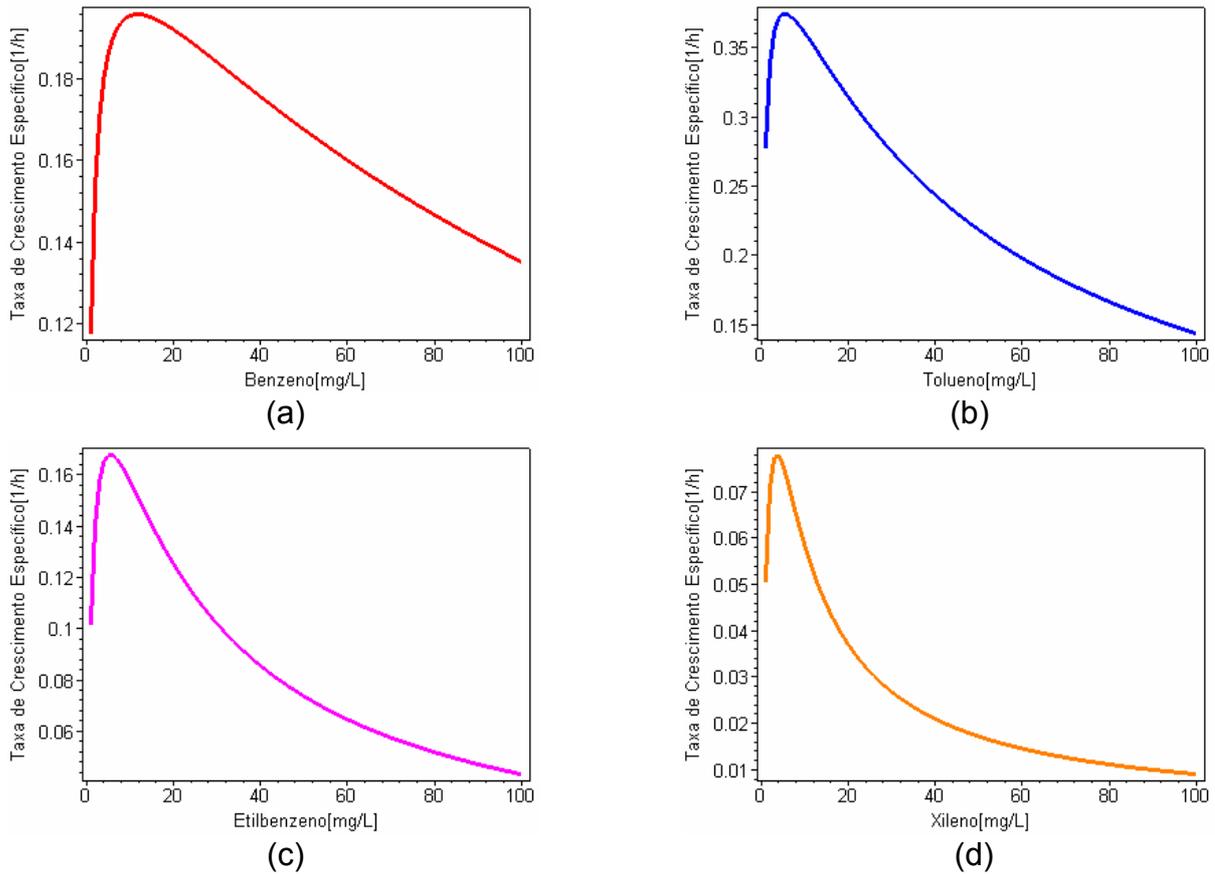


Figura 5. 11 – Simulações da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Andrews para os compostos BTEX.

A taxa máxima de crescimento específico “real” em substratos inibitórios pode ser determinada estimando-se o ponto crítico da primeira derivada da equação de Andrews. Assim, determina-se a concentração crítica de substrato e a taxa máxima de crescimento específico do microorganismo, a partir das equações (5.9) e (5.10), respectivamente.

$$S^* = \sqrt{K_s K_i} \tag{5.9}$$

$$\mu^* = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{\frac{2\sqrt{K_s K_i}}{K_i} + 1} = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{2\sqrt{\frac{K_s}{K_i}} + 1} \tag{5.10}$$

Desta forma, a intensidade de inibição pelo substrato pode ser medida pela razão entre as constantes de saturação e inibição, e não somente pelo valor de K_i .

As razões de K_s/K_i determinadas utilizando os valores apresentados na Tabela 5.7 são iguais a 0,510 para o xileno; 0,075 para o etilbenzeno; 0,014 para o tolueno e 0,006 para o benzeno. Portanto, o xileno representa o substrato com maior

efeito inibitório dentre os compostos BTEX, ao passo que o benzeno possui o menor efeito; resultado similar ao apresentado por SHIM *et al.* (2005).

Utilizando os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Andrews (Tabela 5.7), estimam-se os valores da taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica dos substratos BTEX, apresentados na Tabela 5.9, os quais podem ser visualizados a partir das simulações apresentadas na Figura 5.11.

Tabela 5. 9 – Valores da taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica dos compostos BTEX estimados aplicando o modelo de Andrews

Substrato	μ^* (h ⁻¹)	S^* (mg L ⁻¹)
Benzeno	0,19	11,56
Tolueno	0,37	5,70
Etilbenzeno	0,17	5,47
Xileno	0,08	3,57

5.1.2. Modelos cinéticos para a biodegradação de múltiplos substratos

Embora o crescimento microbiano em mistura de substratos seja comumente encontrado em biorremediação, tratamento de efluentes e processos de fermentação, a modelagem matemática da cinética do sistema em múltiplos substratos ainda tem sido limitada. O desempenho de modelos cinéticos não-estruturados foi avaliado, assumindo que a biodegradação da mistura dos compostos BTEX possa ser representada pelos modelos de inibição competitiva, inibição não-competitiva, inibição incompetitiva e pelo modelo *SKIP*.

Os balanços para cada um dos substratos presentes na mistura dos compostos BTEX são dados pelas equações (5.11), (5.12), (5.13) e (5.14), para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto*-xileno, respectivamente:

$$\frac{dS_b(t)}{dt} = -\frac{\mu_{x_b}}{Y_{X/S_b}} X(t) \quad (5.11)$$

$$\frac{dS_t(t)}{dt} = -\frac{\mu_{x_t}}{Y_{X/S_t}} X(t) \quad (5.12)$$

$$\frac{dS_e(t)}{dt} = -\frac{\mu_{x_e}}{Y_{X/S_e}} X(t) \quad (5.13)$$

$$\frac{dS_x(t)}{dt} = -\frac{\mu_{x_x}}{Y_{X/S_x}} X(t) \quad (5.14)$$

O *software Maple*[®] foi utilizado para obter a solução numérica das equações diferenciais, o ajuste de parâmetros e as simulações dos modelos. Adotou-se o método de Runge-Kutta-Fehlberg de 4^a e 5^a ordens para a resolução numérica das equações diferenciais, utilizando-se as seguintes condições iniciais: 20 mg L⁻¹ para a concentração inicial de BTEX e 2,45 mg L⁻¹ para a concentração inicial de células. Por falta de dados experimentais, o valor da concentração inicial de células foi estimado pelo método *PSO*, juntamente com os parâmetros de cada modelo.

5.1.2.1. Modelo de Inibição Competitiva

As taxas de crescimento específico no benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto*-xileno são dadas pelas equações (5.15), (5.16), (5.17) e (5.18), respectivamente, para a mistura dos compostos BTEX:

$$\mu_{x_b} = \frac{\mu_{máx_b} S_b}{\left(K_{S_b} + S_b + S_t \left(\frac{K_{S_b}}{K_{S_t}} \right) + S_e \left(\frac{K_{S_b}}{K_{S_e}} \right) + S_x \left(\frac{K_{S_b}}{K_{S_x}} \right) \right)} \quad (5.15)$$

$$\mu_{x_t} = \frac{\mu_{máx_t} S_t}{\left(K_{S_t} + S_t + S_b \left(\frac{K_{S_t}}{K_{S_b}} \right) + S_e \left(\frac{K_{S_t}}{K_{S_e}} \right) + S_x \left(\frac{K_{S_t}}{K_{S_x}} \right) \right)} \quad (5.16)$$

$$\mu_{x_e} = \frac{\mu_{máx_e} S_e}{\left(K_{S_e} + S_e + S_b \left(\frac{K_{S_e}}{K_{S_b}} \right) + S_t \left(\frac{K_{S_e}}{K_{S_t}} \right) + S_x \left(\frac{K_{S_e}}{K_{S_x}} \right) \right)} \quad (5.17)$$

$$\mu_{x_x} = \frac{\mu_{máx_x} S_x}{\left(K_{S_x} + S_x + S_b \left(\frac{K_{S_x}}{K_{S_b}} \right) + S_t \left(\frac{K_{S_x}}{K_{S_t}} \right) + S_e \left(\frac{K_{S_x}}{K_{S_e}} \right) \right)} \quad (5.18)$$

5.1.2.2. Modelo de Inibição Não-Competitiva

As taxas de crescimento específico no benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto*-xileno são dadas pelas equações (5.19), (5.20), (5.21) e (5.22), respectivamente, para a mistura dos compostos BTEX:

$$\mu_{x_b} = \frac{\mu_{\max_b} S_b}{\left(K_{S_b} + S_b + S_t \left(\frac{K_{S_b}}{K_{S_t}} \right) + \frac{S_b S_t}{K_{S_t}} + S_e \left(\frac{K_{S_b}}{K_{S_e}} \right) + \frac{S_b S_e}{K_{S_e}} + S_x \left(\frac{K_{S_b}}{K_{S_x}} \right) + \frac{S_b S_x}{K_{S_x}} \right)} \quad (5.19)$$

$$\mu_{x_t} = \frac{\mu_{\max_t} S_t}{\left(K_{S_t} + S_t + S_b \left(\frac{K_{S_t}}{K_{S_b}} \right) + \frac{S_t S_b}{K_{S_b}} + S_e \left(\frac{K_{S_t}}{K_{S_e}} \right) + \frac{S_t S_e}{K_{S_e}} + S_x \left(\frac{K_{S_t}}{K_{S_x}} \right) + \frac{S_t S_x}{K_{S_x}} \right)} \quad (5.20)$$

$$\mu_{x_e} = \frac{\mu_{\max_e} S_e}{\left(K_{S_e} + S_e + S_b \left(\frac{K_{S_e}}{K_{S_b}} \right) + \frac{S_e S_b}{K_{S_b}} + S_t \left(\frac{K_{S_e}}{K_{S_t}} \right) + \frac{S_e S_t}{K_{S_t}} + S_x \left(\frac{K_{S_e}}{K_{S_x}} \right) + \frac{S_e S_x}{K_{S_x}} \right)} \quad (5.21)$$

$$\mu_{x_x} = \frac{\mu_{\max_x} S_x}{\left(K_{S_x} + S_x + S_b \left(\frac{K_{S_x}}{K_{S_b}} \right) + \frac{S_x S_b}{K_{S_b}} + S_t \left(\frac{K_{S_x}}{K_{S_t}} \right) + \frac{S_x S_t}{K_{S_t}} + S_e \left(\frac{K_{S_x}}{K_{S_e}} \right) + \frac{S_x S_e}{K_{S_e}} \right)} \quad (5.22)$$

5.1.2.3. Modelo de Inibição Acompetitiva

As taxas de crescimento específico no benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto*-xileno são dadas pelas equações (5.23), (5.24), (5.25) e (5.26), respectivamente, para a mistura dos compostos BTEX:

$$\mu_{x_b} = \frac{\mu_{\max_b} S_b}{\left(K_{S_b} + S_b + \frac{S_b S_t}{K_{S_t}} + \frac{S_b S_e}{K_{S_e}} + \frac{S_b S_x}{K_{S_x}} \right)} \quad (5.23)$$

$$\mu_{x_t} = \frac{\mu_{\max_t} S_t}{\left(K_{S_t} + S_t + \frac{S_t S_b}{K_{S_b}} + \frac{S_t S_e}{K_{S_e}} + \frac{S_t S_x}{K_{S_x}} \right)} \quad (5.24)$$

$$\mu_{x_e} = \frac{\mu_{\max_e} S_e}{\left(K_{S_e} + S_e + \frac{S_e S_b}{K_{S_b}} + \frac{S_e S_t}{K_{S_t}} + \frac{S_e S_x}{K_{S_x}} \right)} \quad (5.25)$$

$$\mu_{x_x} = \frac{\mu_{\max_x} S_x}{\left(K_{S_x} + S_x + \frac{S_x S_b}{K_{S_b}} + \frac{S_x S_t}{K_{S_t}} + \frac{S_x S_e}{K_{S_e}} \right)} \quad (5.26)$$

5.1.2.4. Modelo SKIP

As taxas de crescimento específico no benzeno, tolueno, etilbenzeno e *orto*-xileno são dadas pelas equações (5.27), (5.28), (5.29) e (5.30), respectivamente, para a mistura dos compostos BTEX:

$$\mu_{x_b} = \frac{\mu_{máx_b} S_b}{(K S_b + S_b + S_t I_{tb} + S_e I_{eb} + S_x I_{xb})} \quad (5.27)$$

$$\mu_{x_t} = \frac{\mu_{máx_t} S_t}{(K S_t + S_t + S_b I_{bt} + S_e I_{et} + S_x I_{xt})} \quad (5.28)$$

$$\mu_{x_e} = \frac{\mu_{máx_e} S_e}{(K S_e + S_e + S_b I_{be} + S_t I_{te} + S_x I_{xe})} \quad (5.29)$$

$$\mu_{x_x} = \frac{\mu_{máx_x} S_x}{(K S_x + S_x + S_b I_{bx} + S_t I_{tx} + S_e I_{ex})} \quad (5.30)$$

5.1.2.5. Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura BTEX

As Figuras 5.12 a 5.16 apresentam as simulações dos modelos de inibição e modelo *SKIP* aplicados para a biodegradação dos compostos BTEX em mistura, juntamente com os dados experimentais de estudos conduzidos em reator batelada a 35 °C, utilizando mistura de cultura (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999).

No estudo da cinética de biodegradação da mistura BTEX a dificuldade em encontrar o valor ótimo global e o esforço computacional foram maiores, devido ao maior número de parâmetros a serem estimados – 12 parâmetros para os modelos de inibição e 24 parâmetros para o modelo *SKIP*. A partir da análise do resíduo mínimo obtido para cada modelo, apresentada na Tabela 5.10, além de inspeção visual das simulações, foi possível determinar o modelo que melhor descreve os dados experimentais da biodegradação da mistura BTEX.

Tabela 5. 10 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação dos compostos BTEX

Modelo	Função Objetivo (equações 4.25)
<i>SKIP</i>	6,60 10 ⁻³
Inibição Competitiva	26,80 10 ⁻³
Inibição Não-Competitiva	56,50 10 ⁻³
Inibição Acompetitiva	38,95 10 ⁻³

O modelo cinético *SKIP* representou melhor os dados experimentais de DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999), resultando em um menor valor da função objetivo. Os vinte e quatro parâmetros do modelo, apresentados nas Tabelas 5.11 e 5.12, necessitaram de um esforço computacional bastante elevado e foram obtidos após

um tempo médio de 55 minutos, utilizando-se um microcomputador AMD Sempron 2800 Hz, 512 MB de memória RAM. Além disso, apresentaram grande dificuldade em correlacionar cada parâmetro de maneira a obter seus significados microbiológicos coerentes.

Tabela 5. 11 – Valores dos parâmetros cinéticos e estequiométricos estimados para os compostos BTEX aplicando o Modelo *SKIP*

Substrato	Parâmetros		
	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	K _s (mg L ⁻¹)	Y _{x/s} (mg mg ⁻¹)
Benzeno	0,41	1,11	0,30
Tolueno	0,42	1,24	0,18
Etilbenzeno	0,45	1,75	0,32
Xileno	0,05	20	0,05

Tabela 5. 12 – Valores dos parâmetros interativos estimados para os compostos BTEX aplicando o Modelo *SKIP*

I _{tb}	I _{eb}	I _{xb}	I _{bt}	I _{et}	I _{xt}
1,0000	10,0000	0,0070	0,0023	4,5000	0,0005
I _{be}	I _{te}	I _{xe}	I _{bx}	I _{tx}	I _{ex}
0,1750	0,0250	0,1000	1,1000	1,7136	7,0750

O método de estimativa dos parâmetros, desenvolvido neste trabalho, mostra-se muito eficiente na predição da cinética de biodegradação de compostos tóxicos, e, portanto pode ser bastante útil na modelagem destes processos, particularmente em processos complexos em que múltiplos substratos estão envolvidos. Os valores dos parâmetros estimados neste trabalho podem ser comparados com valores encontrados na literatura, alguns apresentados na Tabela 1, em Anexos. Um dos problemas encontrados no estudo da cinética de biodegradação é a variabilidade potencial dos parâmetros cinéticos. Os relatos utilizando-se culturas puras mostram que a taxa máxima de crescimento específico $\mu_{m\acute{a}x}$ varia de 0,0194 a 0,73 h⁻¹ no benzeno e 0,0064 a 0,86 h⁻¹ no tolueno. Em estudo recente, LIN *et al.* (2007) utilizaram o modelo de Andrews para descrever a cinética de biodegradação individual dos compostos BTEX por *Pseudomonas aeruginosa*. Estes autores encontraram valores bastante baixos para $\mu_{m\acute{a}x}$ (Tabela 1 em Anexos), sendo igual a 0,034 h⁻¹ no etilbenzeno. As investigações da cinética de biodegradação do xileno,

em mistura de culturas, mostram valores de $\mu_{máx}$ no intervalo 0,0047-0,383 h⁻¹, K_s no intervalo 0,16-13,2725 mg L⁻¹ e $Y_{x/s}$ entre 0,05-0,52 mg mg⁻¹. Na biodegradação do benzeno e tolueno, por culturas puras, K_s apresenta valores de 0,12-8,35 mg L⁻¹ e 1,01-15,07 mg L⁻¹, respectivamente. O coeficiente de rendimento $Y_{x/s}$ também varia bastante e está no intervalo 0,53 a 1,20 mg mg⁻¹ no benzeno e 0,34-1,28 mg mg⁻¹ no tolueno. A variabilidade de todos estes valores depende do microorganismo, pH, temperatura, regime de operação do sistema, dentre outros fatores.

Na Figura 5.12 observa-se uma ótima relação entre as simulações do modelo *SKIP* e os dados experimentais, sugerindo uma excelente eficiência alcançada pelo método *PSO*. Além disso, a ótima simulação do modelo *SKIP* intensifica a hipótese de que esteja ocorrendo uma mistura de diferentes interações entre os compostos BTEX, mas que, no entanto não podem ser especificadas pelo modelo.

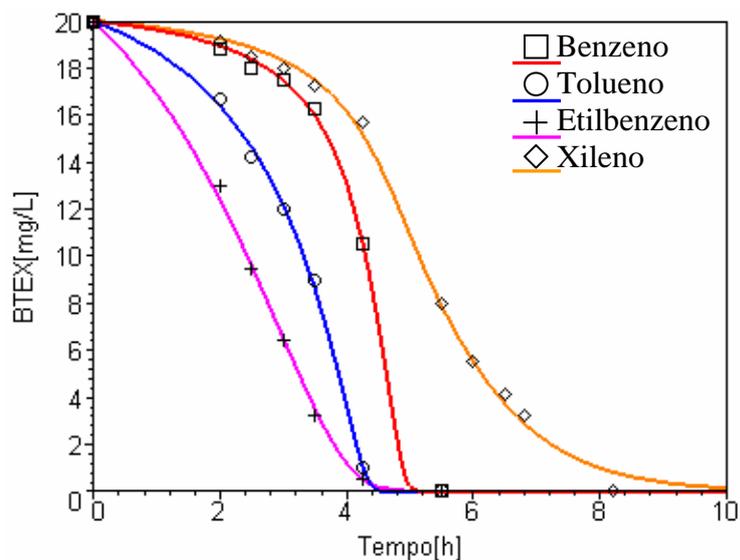


Figura 5. 12 – Simulações do modelo *SKIP* e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o BTEX.

A biodegradação de cada composto BTEX ocorreu mais rapidamente quando estes estiveram presentes sozinhos, do que quando estiveram em mistura de substratos durante a biodegradação. As taxas de biodegradação de cada um dos compostos, quando presentes em mistura, foram significativamente diferentes e a utilização dos substratos ocorreu simultaneamente, com o etilbenzeno o primeiro a ser consumido, seguido pelo tolueno, benzeno e xileno. Esta ordem também foi encontrada por BIELEFELDT & STENSEL (1999a).

A utilização simultânea observada durante a biodegradação dos compostos BTEX é uma evidência de que o processo esteja ocorrendo devido à indução não-específica de enzimas para degradação dos substratos similares ou à convergência de rotas metabólicas para utilização de múltiplos substratos. Entretanto, mesmo que os compostos sejam degradados simultaneamente, algumas vezes estes não são utilizados pela mesma rota metabólica, necessitando compreender quais outros mecanismos de regulação gênica estão envolvidos na biodegradação.

Os resultados dos modelos de inibição são apresentados nas Figuras 5.13 a 5.15. Estes modelos apresentaram maiores dificuldade na estimativa da taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{máx}$), que resultaram valores no intervalo de 0,42-0,75 h⁻¹ para os compostos, benzeno, tolueno e etilbenzeno, e 0,14-0,36 h⁻¹ para o xileno. Os modelos de inibição necessitaram de 37 minutos, em média, durante a estimativa dos parâmetros, utilizando um microcomputador AMD Sempron 2800 Hz e 512 MB de memória RAM. Na Figura 5.13 observa-se uma boa predição do modelo de inibição competitiva para os substratos BTEX.

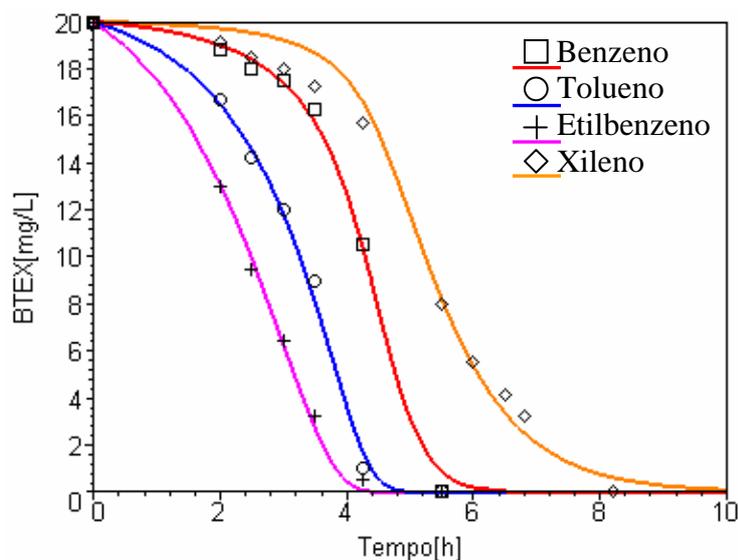


Figura 5. 13 – Simulações do modelo de Inibição Competitiva e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o BTEX.

DEEB & ALVAREZ-COHEN (2000), durante investigações sobre as interações entre os substratos BTEX em mistura, utilizando espécies *Rhodococcus*, encontraram interações positivas (cometabolismo) e negativas (inibição competitiva e não-competitiva). BIELEFELDT & STENSEL (1999a,b) também encontraram efeitos de inibição competitiva durante a biodegradação das misturas BTEX e, desta

forma, modelaram os dados experimentais aplicando o modelo de inibição competitiva proposto por YOON *et al.* (1977).

As Figuras 5.14 e 5.15 apresentam as simulações dos modelos de inibição não-competitiva e incompetitiva, respectivamente, com uma pequena diferença entre as simulações e os dados experimentais dos substratos BTEX.

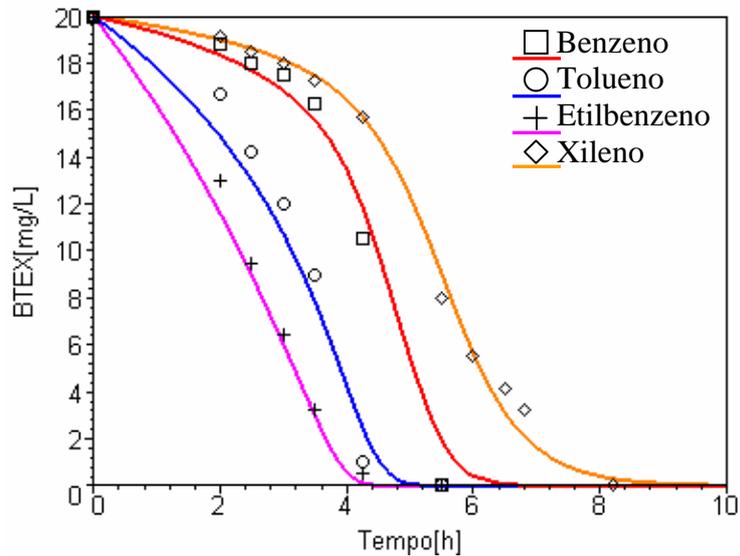


Figura 5. 14 – Simulações do modelo de Inibição Não-Competitiva e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o BTEX.

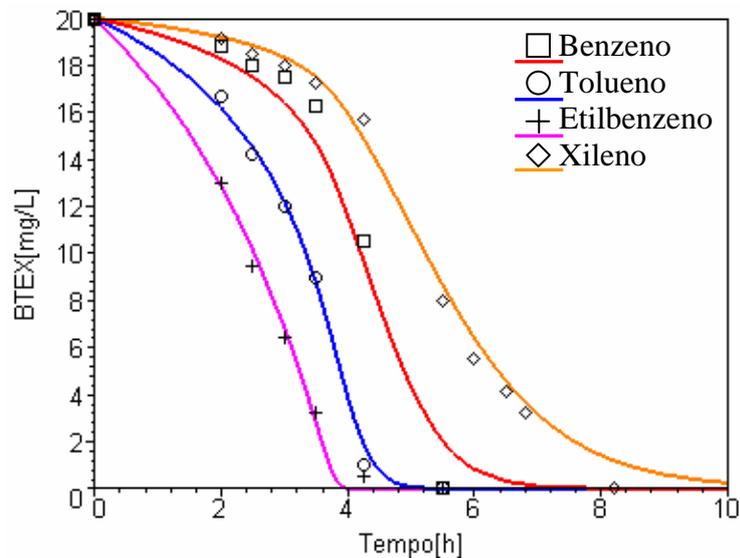


Figura 5. 15 – Simulações do modelo de Inibição Acompetitiva e dados experimentais (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999) para o BTEX.

Analisando as simulações, aplicando os modelos de inibição competitiva e não-competitiva, respectivamente, verificada nas Figuras 5.13 e 5.14, provavelmente

tenha ocorrido uma mistura de inibições entre os substratos BTEX, como sugerem DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999).

Para que os modelos possam ser discriminados, somente a inspeção visual dos resultados simulados comparados aos dados experimentais e o valor da função objetivo podem não ser suficientes. Análises estatísticas devem ser realizadas para assegurar a qualidade dos resultados obtidos. No entanto, neste trabalho esta metodologia não foi possível, pois os autores DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) não forneceram dados importantes para uma análise estatística, tais como, erro experimental, quantidade e repetição dos experimentos, dentre outros.

Na Figura 5.16 verifica-se a evolução dos valores globais da função objetivo ao longo do procedimento iterativo aplicando o modelo *SKIP*. O processo iterativo termina com os valores globais ótimos de cada parâmetro e com o menor valor da função objetivo adotada durante a implementação do método *PSO*.

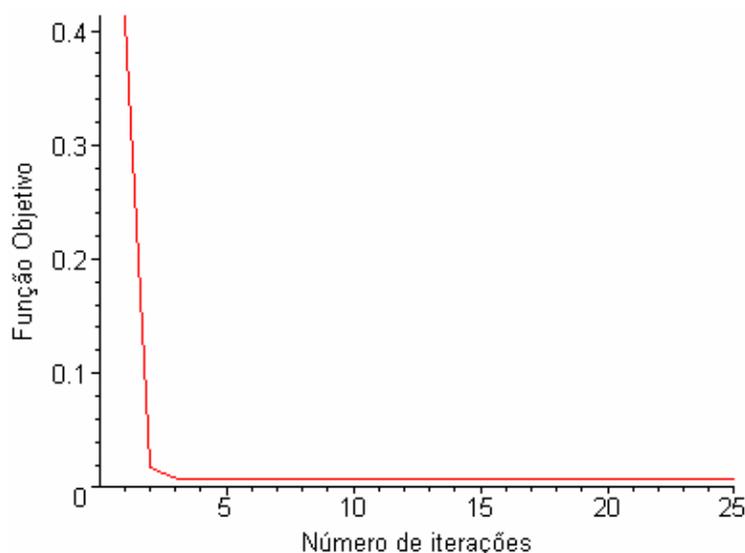


Figura 5. 16 – Evolução dos melhores valores globais da função objetivo aplicando o modelo *SKIP* na biodegradação do BTEX.

Os ótimos resultados alcançados durante a busca dos parâmetros deve-se a estimativa inicial em um intervalo muito próximo dos valores ótimos, baseado no conhecimento da fisiologia microbiana, ou seja, no conhecimento do comportamento da população, adquirido durante a realização deste trabalho. Verificou-se que o método *PSO* funciona muito bem quando os parâmetros estão “longe” do ótimo global. E quando estão próximos, torna-se mais difícil o trabalho de busca, pois os ótimos locais competem com os ótimos globais, e a busca torna-se instável.

Uma outra maneira de obter os parâmetros é adotar o método de decomposição da função objetivo proposto por KROUMOV *et al.* (2006). O método tem como fundamento a subdivisão da busca da solução global em etapas de busca de soluções locais. Assim, diminui-se a dimensão da tarefa de busca e as melhores soluções locais são preservadas para posteriormente efetuar a busca global.

Admitindo-se que o modelo *SKIP* descreve satisfatoriamente bem os dados experimentais da biodegradação da mistura BTEX, assume-se que o crescimento da biomassa possui a tendência apresentada na Figura 5.17.

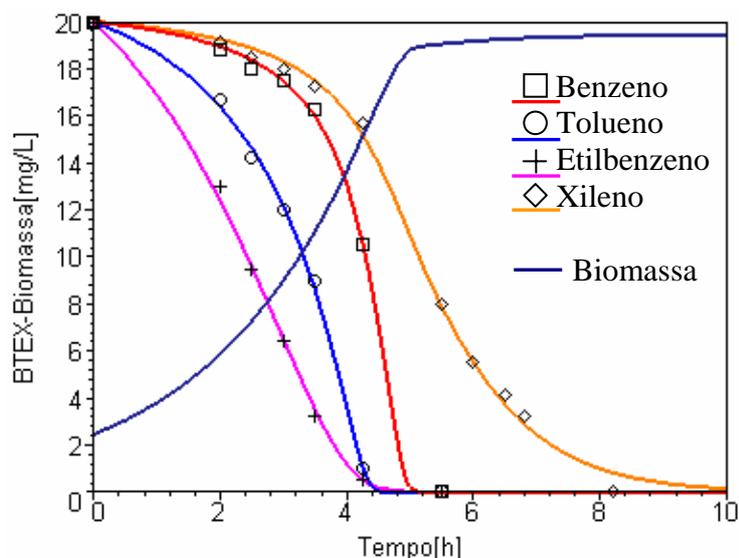


Figura 5. 17 – Utilização dos compostos BTEX e simulação do crescimento da biomassa aplicando o modelo *SKIP*.

A vantagem do modelo *SKIP* é que possibilita a quantificação das interações entre os substratos BTEX, devido à presença de parâmetros de interação I_{ji} , os quais representam a influência do substrato “j” sobre a taxa de biodegradação do substrato “i”. A partir dos valores estimados pelo método *PSO* determina-se o grau de interação entre os quatro compostos tóxicos BTEX. Conforme a Tabela 5.12, os valores dos parâmetros interativos I_{be} , I_{te} e I_{xe} mostram que a presença dos compostos benzeno, tolueno ou xileno apresentam pouco ou nenhum efeito de inibição sobre a biodegradação do etilbenzeno. Como esperado, o grau de inibição do tolueno sobre a biodegradação do benzeno é muito maior do que o grau de inibição do benzeno sobre a biodegradação do tolueno ($I_{tb} \gg I_{bt}$). O etilbenzeno pode ser considerado o maior inibidor durante a biodegradação dos compostos

BTEX, conforme os parâmetros I_{eb} , I_{et} e I_{ex} , ao passo que o xileno apresenta um efeito inibitório quase insignificante, como verificado pelos parâmetros I_{xb} , I_{xt} e I_{xe} .

A associação microbiana utilizada no experimento de DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) apresenta diversas espécies de microorganismos, as quais provavelmente possuem múltiplos caminhos metabólicos para a biodegradação dos compostos BTEX. Consequentemente efeitos de mistura de diferentes inibições entre os substratos BTEX não são surpreendentes. Uma das culturas puras isoladas a partir da associação microbiana foi caracterizada como *Rhodococcus sp.*, espécie que exibe uma variada capacidade metabólica, incluindo o ataque dioxigenase e mono-oxigenase do anel aromático e clivagem do anel catecol por ambas as vias *orto* ou *meta* (KIM *et al.*, 2004; MARUYAMA *et al.*, 2005).

A falta de especificidade do modelo *SKIP* não o torna inadequado para descrever a biodegradação da mistura dos compostos BTEX, apenas não possibilita a qualificação das interações envolvidas entre os substratos. Para adicionar maiores informações sobre as interações e caminhos metabólicos presentes na biodegradação de compostos tóxicos aromáticos, a seguir são apresentados a avaliação da modelagem cinética da biodegradação do benzeno, tolueno e fenol, utilizando *Pseudomonas putida* F1.

5.2. Biodegradação dos Compostos BTF

Os dados experimentais utilizados para avaliar o desempenho dos modelos cinéticos foram extraídos de HAMED *et al.* (2003). Neste estudo, foi utilizado *Pseudomonas putida* F1 ATCC 700007 para a biodegradação de todos os compostos BTF, individualmente e em misturas. Os microorganismos foram pré-adaptados em benzeno a 30 mg L⁻¹ e tolueno a 28 mg L⁻¹. As células foram distribuídas em frascos de 160 mL, contendo 16 mL de solução de sais minerais e, em seguida, os substratos benzeno, tolueno e fenol foram adicionados. Os experimentos foram conduzidos a 30 °C e pH 7, utilizando-se um *shaker* com uma velocidade de agitação de 150 rpm. Conforme CHANG & ALVAREZ-COHEN (1995) esta taxa de mistura mostrou-se superar as limitações por transferência de massa do oxigênio. As massas de aromáticos adicionadas foram calculadas usando as constantes da lei de Henry, volume do líquido e do gás no reator e concentrações

dos substratos na fase líquida e gasosa. Os valores das constantes da lei de Henry para os compostos BTF foram determinados a 30 °C e calculadas como descrito por ASHWORTH *et al.* (1987) *apud* HAMED *et al.* (2003).

Nas Tabelas 5.13 a 5.15 são apresentados os dados experimentais da biodegradação individual dos compostos BTF, juntamente com os dados de crescimento da biomassa.

Tabela 5. 13 – Dados experimentais do processo de biodegradação do fenol

Tempo (h)	Fenol (mg L ⁻¹)	Biomassa (mg L ⁻¹)
0	200,00	28,00
2	200,00	28,00
4	200,00	28,00
6	200,00	31,20
8	191,67	32,00
10	179,17	43,20
12	154,17	45,60
14	150,00	46,40
16	141,67	47,20
18	118,75	48,80
20	116,67	55,20
22	91,67	59,20
24	83,33	68,00
26	79,17	78,40
28	66,67	80,80
30	62,50	83,20
32	20,83	85,60
35	0	88,00

Fonte: HAMED *et al.* (2003)

Tabela 5. 14 – Dados experimentais do processo de biodegradação do benzeno

Tempo (h)	Benzeno (mg L ⁻¹)	Biomassa (mg L ⁻¹)
0	60,00	45,00
1	60,00	45,00
2	48,75	51,62
3	37,50	85,18
4	26,25	144,55
5	3,75	206,50
6	0	240,00
7	0	240,00

Fonte: HAMED *et al.* (2003)

Tabela 5. 15 – Dados experimentais do processo de biodegradação do tolueno

Tempo (h)	Tolueno (mg L ⁻¹)	Biomassa (mg L ⁻¹)
0	55,00	46,15
1	48,00	46,15
2	45,92	90,38
3	21,70	123,10
4	10,42	156,25
5	4,17	192,31
6	1,04	188,46
7	0	180,77

Fonte: HAMED *et al.* (2003)

Os dados experimentais da biodegradação das misturas benzeno-tolueno, benzeno-fenol e tolueno-fenol são apresentados nas Tabelas 5.16, 5.17 e 5.18.

Tabela 5. 16 – Dados experimentais do processo de biodegradação da mistura benzeno-tolueno

Tempo (h)	Benzeno (mg L ⁻¹)	Tolueno (mg L ⁻¹)	Biomassa (mg L ⁻¹)
0	60,00	55,00	16,36
1	60,00	55,00	16,36
2	60,00	53,75	27,27
3	57,50	47,50	32,73
4	51,25	36,25	62,73
5	40,00	16,25	147,27
6	20,00	2,50	226,36
7	2,50	0	349,10
8	0	0	393,85
9	0	0	398,86

Fonte: HAMED *et al.* (2003)

Tabela 5. 17 – Dados experimentais do processo de biodegradação da mistura benzeno-fenol

Tempo (h)	Benzeno (mg L ⁻¹)	Fenol (mg L ⁻¹)	Biomassa (mg L ⁻¹)
0	60,00	200,00	30,00
2	60,00	200,00	30,00
4	60,00	200,00	30,00
6	50,00	200,00	32,75
8	25,25	200,00	92,25
9	3,25	200,00	189,25
10	0	110,00	214,25
12	-	72,00	221,43
14	-	50,00	225,75
16	-	30,00	239,25
18	-	0	226,25

Fonte: HAMED *et al.* (2003)

Tabela 5. 18 – Dados experimentais do processo de biodegradação da mistura tolueno-fenol

Tempo (h)	Tolueno (mg L ⁻¹)	Fenol (mg L ⁻¹)	Biomassa (mg L ⁻¹)
0	55	200,00	30,00
1	55	200,00	28,48
3	25	200,00	28,92
5	0	200,00	75,64
7	0	143,25	93,48
9	-	112,25	102,48
11	-	82,75	150,00
13	-	12,75	172,48
15	-	0	196,15
17	-	0	190,48

Fonte: HAMED *et al.* (2003)

Os dados experimentais da biodegradação da mistura ternária benzeno-tolueno-fenol e crescimento da biomassa, obtidos de HAMED *et al.* (2003), são apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5. 19 – Dados experimentais do processo de biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol

Tempo (h)	Benzeno (mg L ⁻¹)	Tolueno (mg L ⁻¹)	Fenol (mg L ⁻¹)	Biomassa (mg L ⁻¹)
0	60,00	55,00	200,00	48,70
2	60,00	55,00	200,00	48,70
4	48,48	33,35	200,00	83,48
6	27,27	9,10	200,00	180,00
8	0	0	200,00	290,43
10	-	-	84,85	297,40
12	-	-	50,00	300,87
13	-	-	34,85	306,10
14	-	-	19,70	309,57
15	-	-	0	299,15

Fonte: HAMED *et al.* (2003)

5.2.1. Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação individual dos substratos BTF

Os modelos de Andrews e Monod foram aplicados para descrever os dados experimentais de HAMED *et al.* (2003), nos quais 60 mg L⁻¹ de benzeno, 55 mg L⁻¹ de tolueno e 200 mg L⁻¹ de fenol foram biodegradados individualmente. Os

parâmetros dos modelos foram estimados pelo método *PSO*, e são apresentados na Tabela 5.20. O procedimento de estimativa dos parâmetros requereu um tempo de 10 a 15 minutos, aplicando 300 partículas e 25 iterações no método *PSO*.

Tabela 5. 20 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação dos compostos BTF individualmente aplicando os modelos de único substrato

Modelos	Substratos	Parâmetros			
		$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	K_s (mg L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (mg mg ⁻¹)	K_i (mg L ⁻¹)
Andrews	Benzeno	0,48	3,10	3,18	97
	Tolueno	0,47	4,80	2,54	107
	Fenol	0,11	76,50	0,32	84
Monod	Benzeno	0,34	3,00	3,15	-
	Tolueno	0,33	1,85	2,55	-

O objetivo foi identificar parâmetros cinéticos e estequiométricos que apresentam significado microbiológico adequado às condições estudadas por HAMED *et al.* (2003). Os parâmetros cinéticos variam em um intervalo grande, pois dependem do microorganismo utilizado, cultura pura ou mistura de culturas, além das condições ambientais. A taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{m\acute{a}x}$) para o fenol tem sido relatada por estar no intervalo de 0,131-0,363 h⁻¹ utilizando-se mistura de culturas e 0,10-0,90 h⁻¹ utilizando-se *Pseudomonas putida* F1.

Como mencionado anteriormente, o caráter inibitório do substrato pode ser determinado através da razão entre as constantes de saturação e inibição. Desta forma, a partir dos parâmetros apresentados na Tabela 5.20, obtêm-se os valores: 0,032 para o benzeno, 0,045 para o tolueno e 0,91 para o fenol. Isto significa que o fenol apresenta o maior efeito inibitório ao crescimento celular, seguido pelo tolueno e benzeno.

As simulações do modelo de Andrews, para a biodegradação do benzeno e para o crescimento da biomassa, juntamente com os dados experimentais, são apresentadas nas Figuras 5.18 e 5.19, respectivamente. As simulações do modelo de Monod são apresentadas nas Figuras 5.20 e 5.21, para a biodegradação do benzeno e para o crescimento da biomassa, respectivamente.

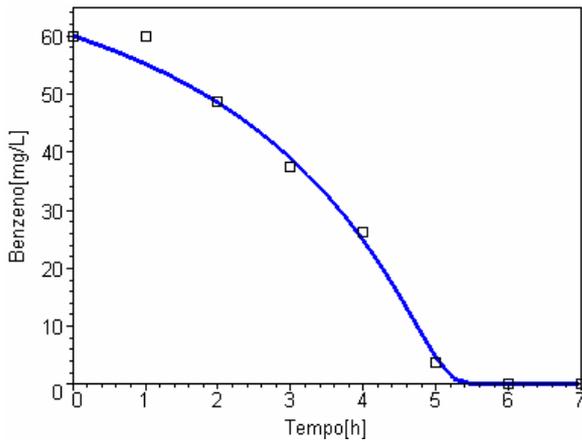


Figura 5. 18 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para o benzeno.

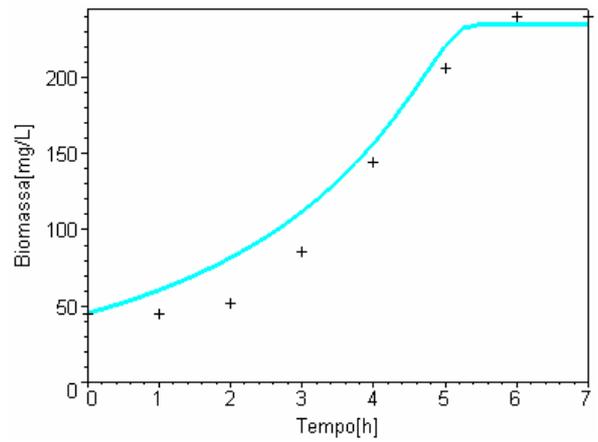


Figura 5. 19 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

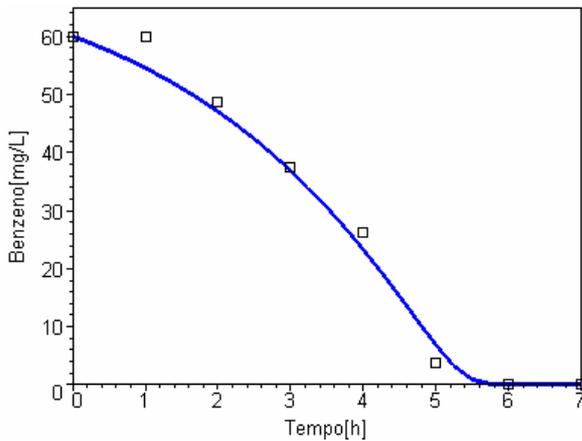


Figura 5. 20 – Simulação do modelo de Monod e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para o benzeno.

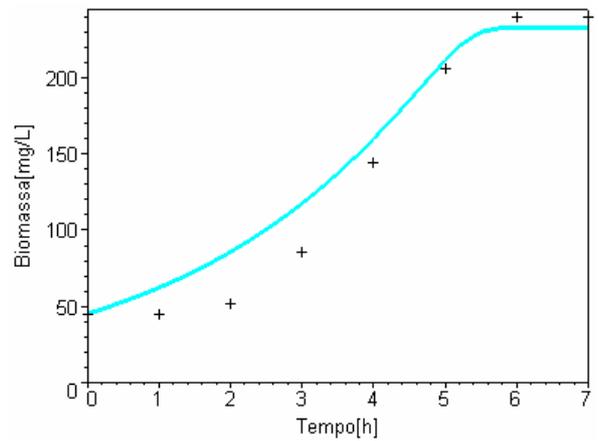


Figura 5. 21 – Simulação do modelo de Monod e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

A inabilidade dos modelos Monod e Andrews em descrever exatamente o crescimento da biomassa durante a utilização do benzeno pode ser devido ao efeito inibitório de intermediários metabólicos formados durante a biodegradação. Esta dificuldade também foi relatada por REARDON *et al.* (2000), os quais sugerem a formação de semialdeído 2-hidroximucônico.

As Figuras 5.22 e 5.23 apresentam as simulações do modelo de Andrews e as Figuras 5.24 e 5.25 apresentam as simulações do modelo de Monod, para a biodegradação do tolueno e para o crescimento da biomassa, respectivamente, juntamente com os dados experimentais.

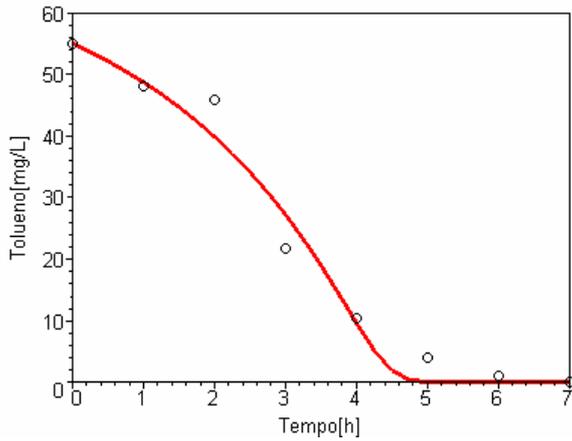


Figura 5. 22 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para o tolueno.

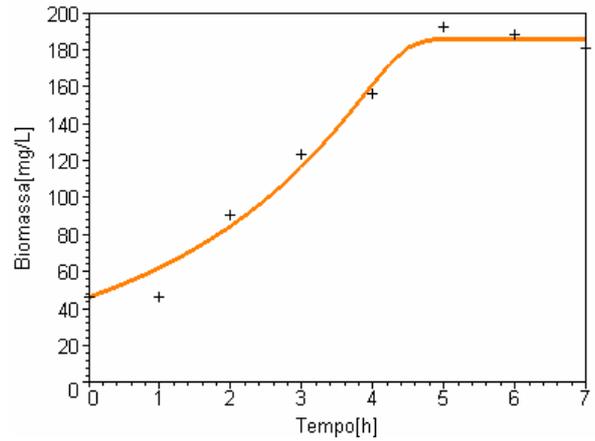


Figura 5. 23 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

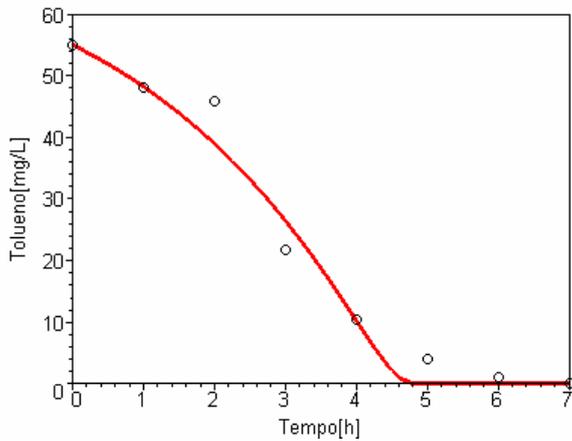


Figura 5. 24 – Simulação do modelo de Monod e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para o tolueno.

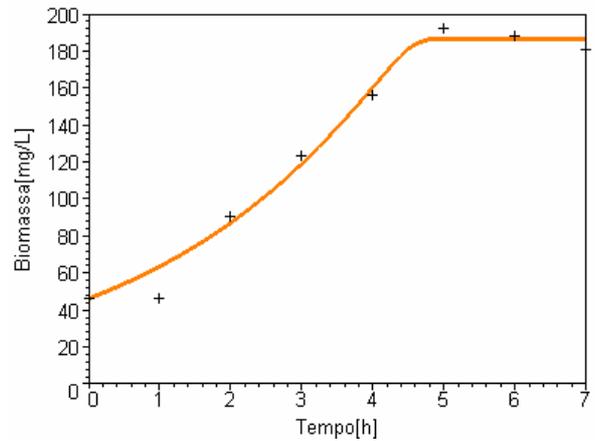


Figura 5. 25 – Simulação do modelo de Monod e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Analisando as Figuras 5.18, 5.20, 5.22 e 5.24, verifica-se uma satisfatória relação entre as simulações da utilização dos substratos e os dados experimentais, sugerindo uma ótima eficiência alcançada pelo método *PSO* implementado neste trabalho. Os maiores desvios ocorreram quando os modelos descrevem o crescimento da biomassa, principalmente na fase de adaptação, como pode ser vistos nas Figuras 5.19, 5.21, 5.23 e 5.25. Durante o procedimento de identificação de parâmetros é fundamental o conhecimento sobre o valor exato da concentração inicial de células, podendo ser este um dos motivos que acarretou na dificuldade em descrever o crescimento da biomassa. A dificuldade em determinar a concentração inicial de células é frequentemente relatada (CHANG, *et al.*, 1993; WANG & LOH, 1999), e por isso tem sido estimada juntamente com os parâmetros dos modelos.

As Figuras 5.26 e 5.27 apresentam as simulações do modelo de Andrews para a biodegradação do fenol e crescimento da biomassa, respectivamente, juntamente com os dados experimentais. As simulações mostram claramente que o modelo de Andrews não representou os dados experimentais de utilização do fenol, tampouco os dados de crescimento da biomassa. Uma explicação para este comportamento poderia ser atribuída à elevada concentração inicial de substrato (200 mg L^{-1}), implicando inibição do crescimento celular devido à toxicidade do fenol.

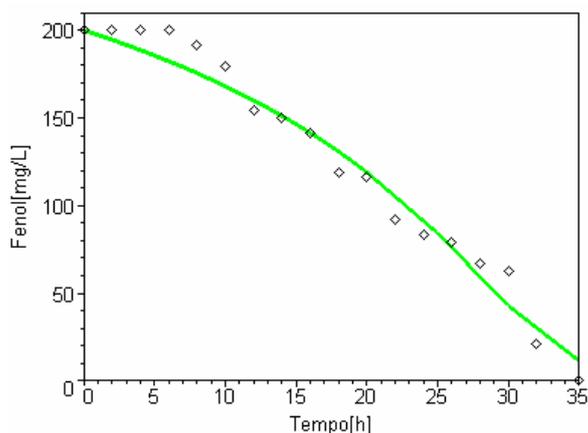


Figura 5. 26 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para o fenol.

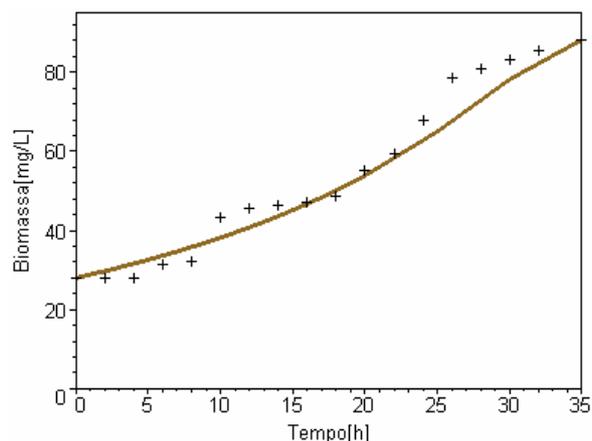


Figura 5. 27 – Simulação do modelo de Andrews e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

No entanto, analisando o sistema com relação ao crescimento da biomassa, é possível observar que ocorreu um crescimento diáuxico. Este fenômeno surge quando dois ou mais substratos estão envolvidos na biodegradação, e sugere que o mecanismo de regulação interna, conhecido como repressão catabólica, esteve presente durante o metabolismo. Logo, evidentemente intermediários metabólicos estiveram presentes durante a biodegradação do fenol e, portanto o modelo de Andrews não é capaz de considerá-los. Este resultado foi o mesmo encontrado por ALLSOP *et al.* (1993).

Neste caso, a modelagem cinética da biodegradação do fenol requer dados experimentais da utilização dos intermediários metabólicos produzidos e, além disso, deve levar em conta os mecanismos de regulação gênica responsáveis pelas interações entre os substratos para descrever adequadamente, tanto a utilização dos substratos quanto o crescimento da biomassa.

Os valores do resíduo mínimo estimados aplicando os modelos de Monod e Andrews estão apresentados na Tabela 5.21.

Tabela 5. 21 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de único substrato na biodegradação dos compostos BTF

Modelos	Função Objetivo (equações 4.25 e 4.26)		
	Benzeno	Tolueno	Fenol
Monod	$64 \cdot 10^{-3}$	$40 \cdot 10^{-3}$	-
Andrews	$45 \cdot 10^{-3}$	$43 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$

Nas Figuras 5.28 e 5.29 são apresentadas as simulações da dependência da taxa de crescimento específico em função da concentração dos substratos benzeno e tolueno, respectivamente, aplicando o modelo de Andrews.

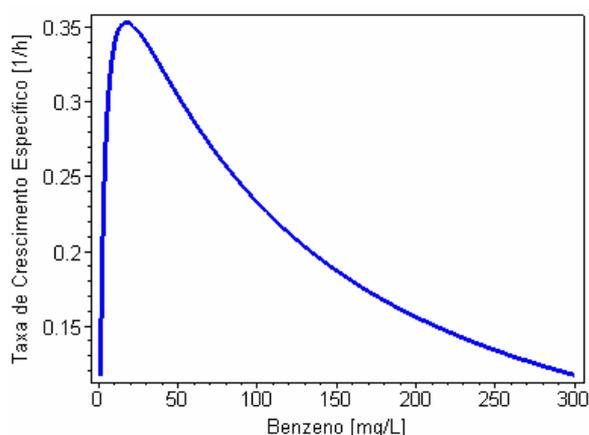


Figura 5. 28 – Simulação da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Andrews para o benzeno.

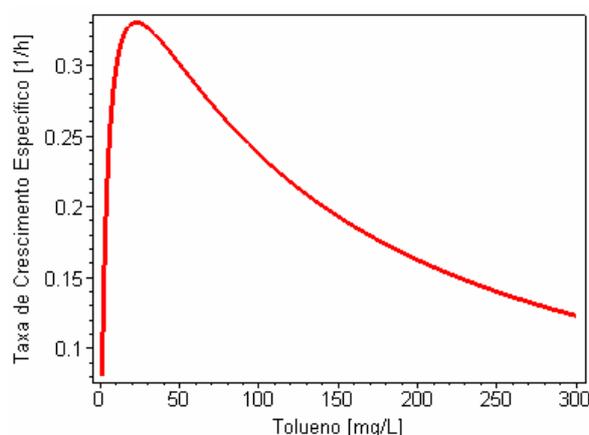


Figura 5. 29 – Simulação da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Andrews para o tolueno.

Apesar do modelo de Andrews não descrever bem os dados experimentais da biodegradação do fenol, a Figura 5.30 admite que a taxa de crescimento específico em função da concentração do fenol segue a cinética de Andrews.

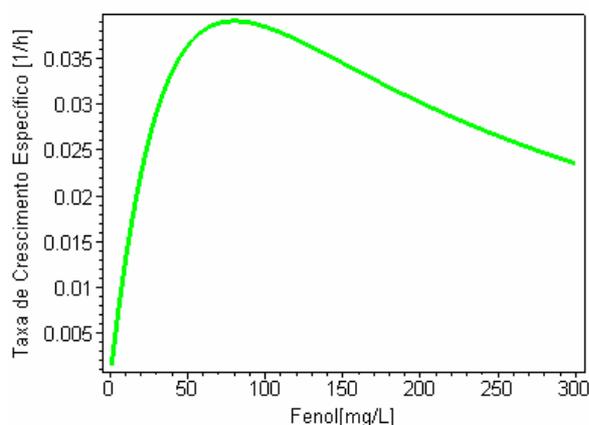


Figura 5. 30 – Simulação da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de Andrews para o fenol.

A taxa máxima de crescimento específico no benzeno é de $0,35 \text{ h}^{-1}$ e no tolueno é de $0,33 \text{ h}^{-1}$, nas concentrações críticas de $17,34 \text{ mg L}^{-1}$ e $22,67 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são obtidos a partir das equações (5.9) e (5.10) e são visualizadas nas Figuras 5.28 e 5.29.

A partir das investigações sobre a cinética de biodegradação individual dos substratos, é possível avaliar as mudanças na fisiologia microbiana quando a biodegradação ocorre em misturas de substratos. Além disso, os modelos simples são utilizados como base para avaliação dos modelos sofisticados apresentados para a biodegradação dos múltiplos substratos.

5.2.2. Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura benzeno-tolueno

Na Tabela 5.22 são apresentados os valores dos parâmetros dos modelos cinéticos propostos, estimados pelo método *PSO*.

Tabela 5. 22 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação da mistura benzeno-tolueno aplicando os modelos de múltiplos substratos

Modelos	Substratos	Parâmetros				
		$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	K_s (mg L^{-1})	$Y_{x/s}$ (mg mg^{-1})	I_{tb}	I_{bt}
Inibição Competitiva	Benzeno	0,85	7,80	3,20	-	-
	Tolueno	0,40	1,40	2,95	-	-
Inibição Acompetitiva	Benzeno	0,83	31,00	2,12	-	-
	Tolueno	0,81	9,50	2,00	-	-
Inibição Não-Competitiva	Benzeno	0,85	38,60	1,55	-	-
	Tolueno	0,85	12,40	1,85	-	-
<i>SKIP</i>	Benzeno	0,85	15,00	3,20	5,00	-
	Tolueno	0,41	2,00	2,85	-	0,20

Os valores do resíduo mínimo dos modelos aplicados para descrever a biodegradação da mistura benzeno-tolueno são apresentados na Tabela 5.23, onde verifica-se que o modelo de inibição competitiva e o modelo *SKIP* apresentaram os melhores ajustes aos dados experimentais; resultado similar ao encontrado por REARDON *et al.* (2000).

Tabela 5. 23 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação da mistura benzeno-tolueno

Modelos	Função Objetivo (equações 4.25 e 4.26)
Inibição Competitiva	0,093
Inibição Acompetitiva	0,400
Inibição Não-Competitiva	0,632
SKIP	0,104

As concentrações iniciais de benzeno e de tolueno foram de 60 mg L⁻¹ e 55 mg L⁻¹, respectivamente, e o satisfatório ajuste do modelo de Andrews aos dados experimentais da biodegradação individual destes compostos, foi condizente com os resultados apresentados por HAMED *et al.* (2003). Estes autores mostraram que efeitos de inibição pelo substrato ocorreram em concentrações acima de 30 mg L⁻¹ para o benzeno e 28 mg L⁻¹ para o tolueno. Partindo-se desta verificação, propôs-se adicionar o termo de inibição pelo substrato $\left(\frac{S^2}{K_i}\right)$ no modelo de inibição competitiva para biodegradação da mistura benzeno-tolueno. Assim, as taxas de crescimento específico na mistura são dadas pelas equações (5.31) e (5.32), para o benzeno e para o tolueno, respectivamente.

$$\mu_{x_b} = \frac{\mu_{máx_b} S_b}{\left(K S_b + S_b + \frac{S_b^2}{K i_b} + S_t \left(\frac{K S_b}{K S_t} \right) \right)} \quad (5.31)$$

$$\mu_{x_t} = \frac{\mu_{máx_t} S_t}{\left(K S_t + S_t + \frac{S_t^2}{K i_t} + S_b \left(\frac{K S_t}{K S_b} \right) \right)} \quad (5.32)$$

A estimativa dos parâmetros cinéticos para o modelo de inibição competitiva com o termo de inibição pelo substrato, cujos valores são apresentados na Tabela 5.24, resultaram no valor de 0,089 para a função objetivo. Verifica-se que a modificação proposta no modelo de inibição competitiva diminuiu o valor da função objetivo e melhorou o ajuste aos dados experimentais da biodegradação da mistura dos compostos tóxicos. Isso ocorre, pois a adição de mais parâmetros proporciona maior flexibilidade ao modelo. Por outro lado, durante a estimativa dos oito parâmetros do novo modelo, observou-se uma instabilidade durante a busca, o que aumentou a dificuldade na estimativa dos valores ótimos globais. Os resultados apresentados na Tabela 5.24 mostram valores similares de $\mu_{máx}$ no benzeno e

tolueno, e os dados experimentais mostram que ambos foram consumidos praticamente ao mesmo tempo. O valor de K_s mostra que *Pseudomonas putida* F1 apresenta maior afinidade com o tolueno, mesmo que o coeficiente de rendimento $Y_{x/s}$ seja pouco maior no benzeno.

Tabela 5. 24 – Valores dos parâmetros estimados aplicando o Modelo de Inibição Competitiva modificado na biodegradação da mistura benzeno-tolueno

Substratos	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	K_s (mg L^{-1})	$Y_{x/s}$ (mg mg^{-1})	K_i (mg L^{-1})
Benzeno	0,837	28,50	3,23	140
Tolueno	0,844	7,60	2,82	35,70

O método *PSO* foi implementado em um microcomputador AMD Sempron 2800 Hz, 512 MB de memória RAM. A estimativa dos seis parâmetros dos modelos de inibição requereu um tempo de 25 a 28 minutos, aplicando 300 partículas e 25 iterações. O modelo *SKIP* e o modelo de inibição modificado, os quais apresentam oito parâmetros, necessitaram de 27 e 34 minutos em média, respectivamente.

As simulações do modelo de inibição competitiva modificado, juntamente com os dados experimentais obtidos por HAMED *et al.* (2003), são apresentadas nas Figuras 5.31 e 5.32, para a utilização da mistura benzeno-tolueno e para o crescimento da biomassa, respectivamente.

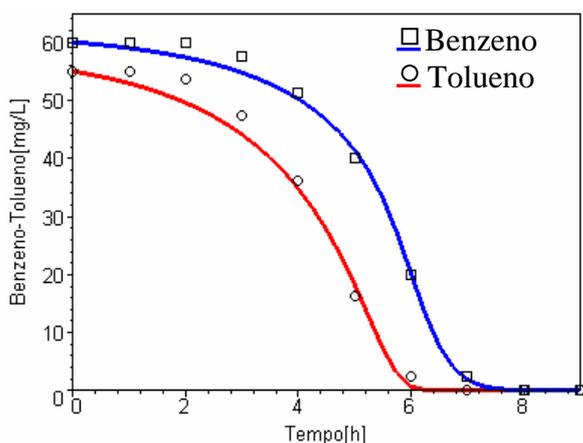


Figura 5. 31 – Simulação do modelo de inibição competitiva modificado e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno.

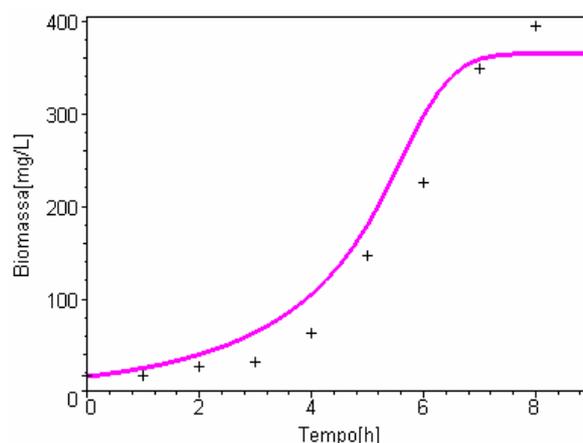


Figura 5. 32 – Simulação do modelo de inibição competitiva modificado e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Como pode ser visto, o modelo de inibição competitiva modificado descreveu muito bem a utilização de ambos os substratos benzeno e tolueno. O desvio na simulação do crescimento da biomassa pode ser atribuído à prolongada fase de

adaptação (primeiras 3 horas), a qual não é levada em conta na modelagem cinética. Usualmente, em tratamento de efluentes, a adaptação dos microorganismos aos compostos tóxicos presentes no ambiente leva tempo, e se este período de adaptação for muito longo, os esforços na modelagem, geralmente, são concentrados no ponto em que o processo se inicia. Os demais modelos cinéticos aplicados para descrever os dados experimentais da mistura benzeno-tolueno também tiveram dificuldade em ajustar o perfil do crescimento da biomassa.

As simulações dos demais modelos aplicados para descrever o consumo dos substratos são apresentadas nas Figuras 5.33, 5.35, 5.37 e 5.39, e mostram-se adequadamente ajustadas aos dados experimentais e, portanto, resultaram em representações similares.

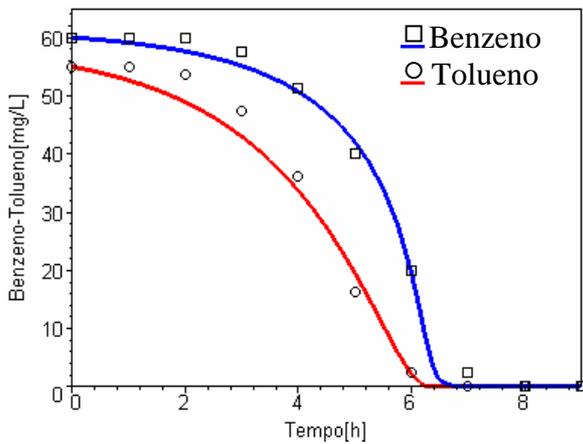


Figura 5. 33 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno.

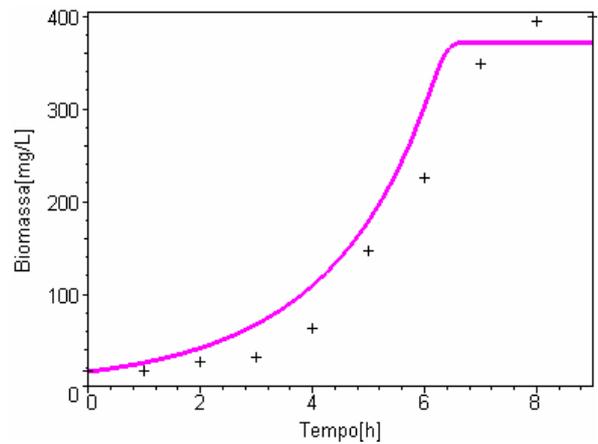


Figura 5. 34 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

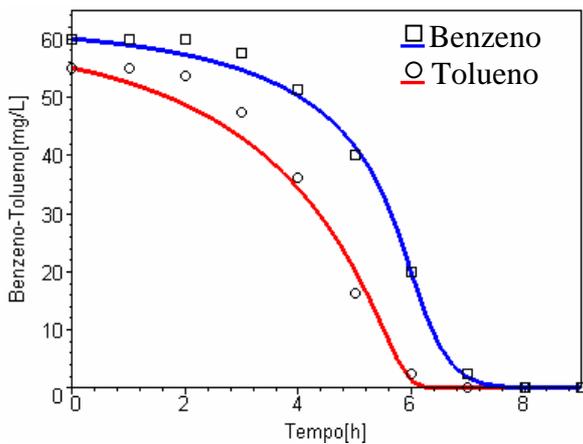


Figura 5. 35 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno.

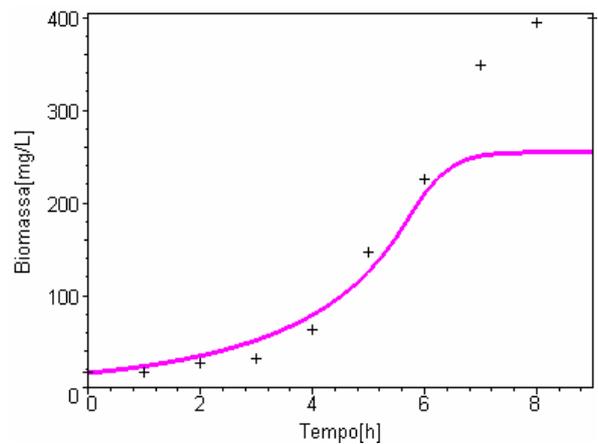


Figura 5. 36 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Entretanto, as simulações para o crescimento da biomassa, aplicando o modelo de inibição acompetitiva e o modelo de inibição não-competitiva, apresentam distorções em relação aos dados experimentais, como pode ser notado nas Figuras 5.36 e 5.38, além de resultarem em maiores valores da função objetivo, como apresentados na Tabela 5.21.

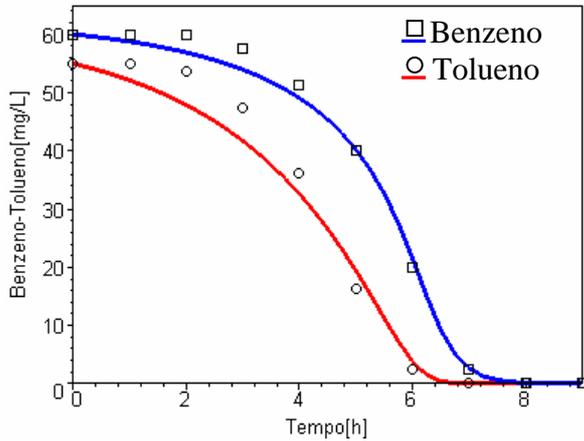


Figura 5. 37 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno.

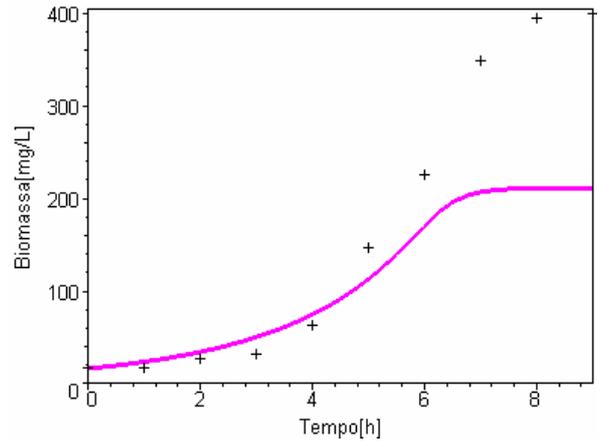


Figura 5. 38 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

O modelo *SKIP* apresentou um comportamento similar ao modelo de inibição competitiva, tanto no consumo de substratos quanto no crescimento da biomassa, visualizados nas Figuras 5.39 e 5.40. Este fato pode ser atribuído aos valores dos parâmetros I_{ij} , K_{S_b} e K_{S_t} estimados. Se $I_{tb} = K_{S_b}/K_{S_t}$ e $I_{bt} = K_{S_t}/K_{S_b}$, então o modelo *SKIP* reduz-se à inibição competitiva.

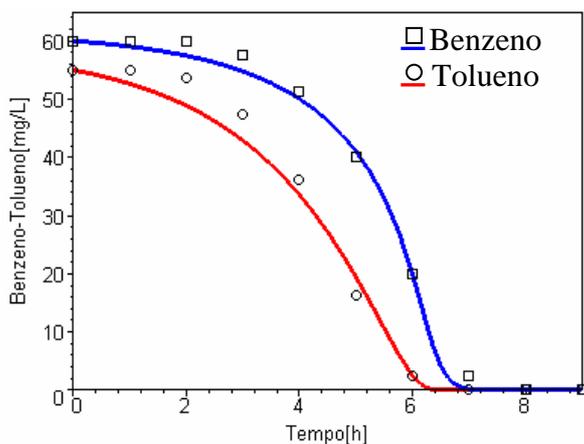


Figura 5. 39 – Simulação do modelo *SKIP* e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno.

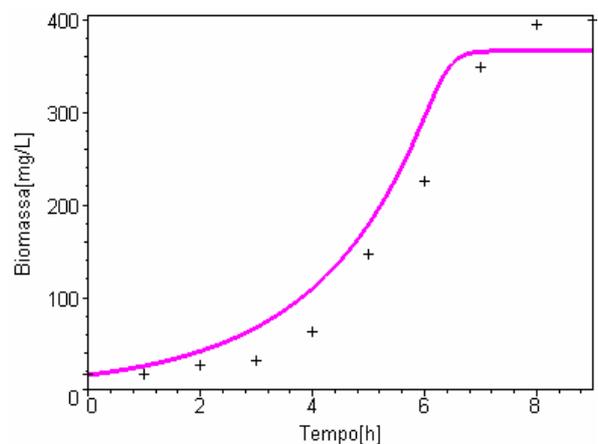


Figura 5. 40 – Simulação do modelo *SKIP* e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

HAMED *et al.* (2003) conduziram seus experimentos utilizando *Pseudomonas putida* F1, cujas enzimas induzíveis são não-específicas, permitindo uma utilização simultânea de vários substratos similares. Os autores mostraram que a biodegradação do benzeno e tolueno em mistura ocorreu simultaneamente, onde o tolueno foi o primeiro composto a ser esgotado. Assim, é possível concluir que o tolueno inibiu a biodegradação do benzeno muito mais do que o benzeno inibiu a utilização do tolueno, comportamento bastante conhecido (CHANG *et al.*, 1993; OH *et al.*, 1994; REARDON *et al.*, 2000; ABUHAMED *et al.*, 2004). Os valores dos parâmetros de interação (I_{tb} , I_{bt}) estimados aplicando o modelo SKIP (Tabela 5.23) comprovam este comportamento, ou seja, o grau de inibição do tolueno sobre a biodegradação do benzeno é muito maior do que o grau de inibição do benzeno sobre a biodegradação do tolueno ($I_{tb} = 5,00$ e $I_{bt} = 0,20$). ABUHAMED *et al.* (2004) encontraram os valores $I_{tb} = 5,16$ e $I_{bt} = 0,49$ e REARDON *et al.* (2000) encontraram os valores $I_{tb} = 5,00 \pm 0,30$ e $I_{bt} = 0,01 \pm 0,003$.

A biodegradação do benzeno e tolueno por *Pseudomonas putida* F1 tem sido extensamente estudada. Os relatos mostram que a mesma rota metabólica pode ser utilizada para catabolizar ambos os substratos. A Figura 5.41 apresenta as rotas metabólicas envolvidas na biodegradação aeróbica do tolueno, benzeno e fenol, utilizando-se *Pseudomonas putida* F1.

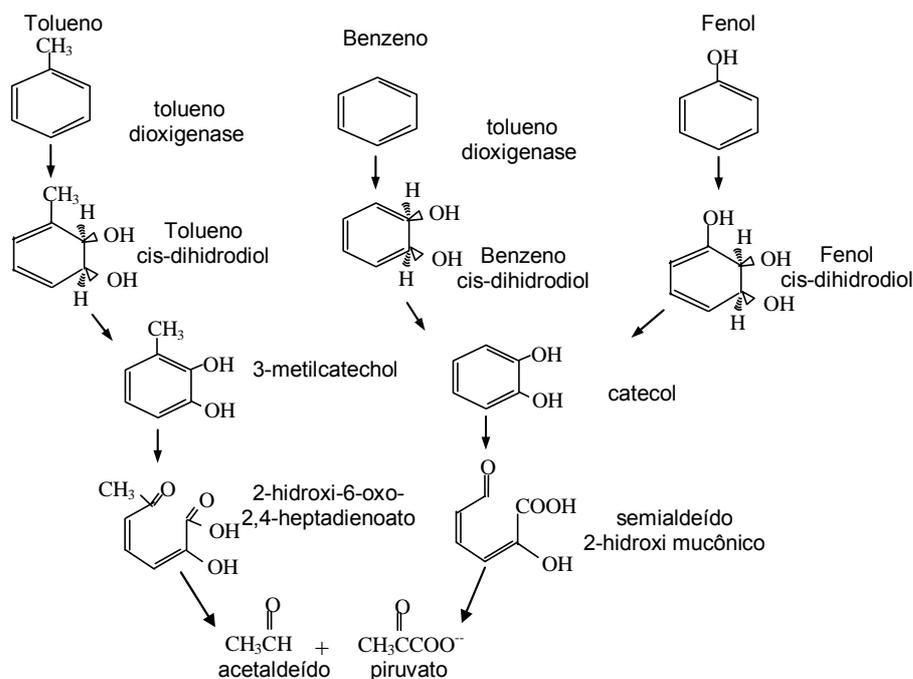


Figura 5. 41 – Rota metabólica do tolueno, benzeno e fenol por *Pseudomonas putida* F1.

Pseudomonas putida F1 inicia a oxidação do tolueno incorporando dois átomos de oxigênio molecular no anel aromático para formar tolueno cis-dihidrodiol (GIBSON *et al.*, 1970 *apud* HAMED *et al.*, 2003); mais adiante, uma reação de desidrogenação forma 3-metilcatecol. A clivagem do extradiol na posição 2,3 pela enzima metil catecol 2,3-dioxigenase resulta 2-hidroxi-6-oxo-2,4-heptadienoato, que em seguida é metabolizado até 2-hidroxipenta-2,4-dienoato e acetato. Estes microorganismos também podem crescer no fenol, onde catecol e semialdeído 2-hidroximucônico foram identificados como subprodutos intermediários (SPAIN & GIBSON, 1988 *apud* HAMED *et al.*, 2003). O caminho metabólico de degradação do benzeno por *P. putida* F1 também envolve a adição de dois átomos de oxigênio, catalizada pela enzima tolueno dioxigenase, para formar benzeno cis-dihidrodiol, seguido pela desidrogenação até catecol. Todos estes intermediários identificados são em seguida metabolizados aos intermediários do ciclo de Krebs, acetaldeído e piruvato.

Portanto, a utilização simultânea observada durante a biodegradação da mistura benzeno-tolueno suporta a hipótese de que as reações envolvidas são catabolizadas pela mesma enzima, caracterizada como tolueno dioxigenase (TOD) (ZYLSTRA & GIBSON, 1989 *apud* REARDON *et al.*, 2000). Isto significa que os substratos são utilizados pela mesma rota metabólica, o que sugere a presença de inibição competitiva entre os substratos. Durante a inibição competitiva, substratos que possuem estrutura química similar, como o benzeno e o tolueno, competem pelo mesmo sítio ativo da enzima e portanto, são adequados os resultados encontrados pelo ajuste do modelo de inibição competitiva aos dados experimentais. Além disso, a adição do termo de inibição pelo substrato tornou o ajuste do modelo de inibição competitiva ainda melhor.

Nas Figuras 5.42 e 5.43 são apresentadas as simulações das taxas de crescimento específico no benzeno e no tolueno, aplicando o modelo de inibição competitiva modificado, em função de suas concentrações.

A eficiência da biodegradação é intensificada quando ocorre utilização simultânea de rotas metabólicas em comparação às taxas de crescimento durante a biodegradação individual dos substratos. Esta intensificação pode ser atribuída às taxas elevadas de crescimento e ocorre devido à indução não-específica de enzimas para biodegradação de substratos similares ou à convergência de rotas metabólicas para a utilização de múltiplos substratos.

As simulações da taxa de crescimento específico aplicando o modelo de inibição competitiva modificado foram realizadas, adotando-se a metodologia de análise de superfície, com o objetivo de comparar as taxas de biodegradação dos substratos em mistura com as taxas de biodegradação individuais dos substratos.

Conforme a Figura 5.42, à medida que a concentração do tolueno aumenta, a taxa de crescimento específico no benzeno decresce. O mesmo é verificado na Figura 5.43, à medida que a concentração do benzeno aumenta a taxa de crescimento específico no tolueno diminui. Quantitativamente essa diminuição é maior observada para a taxa específica de crescimento no benzeno, mostrando um maior grau de inibição pelo tolueno.

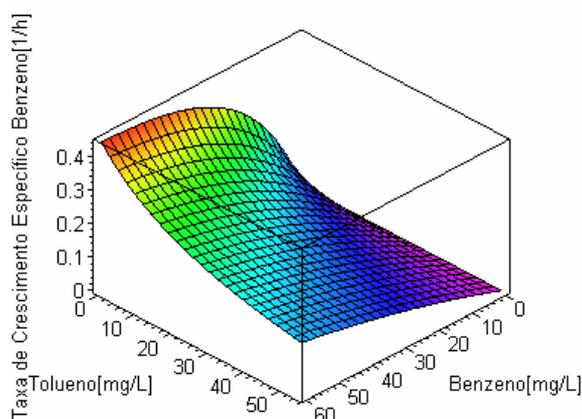


Figura 5. 42 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva modificado para o benzeno.

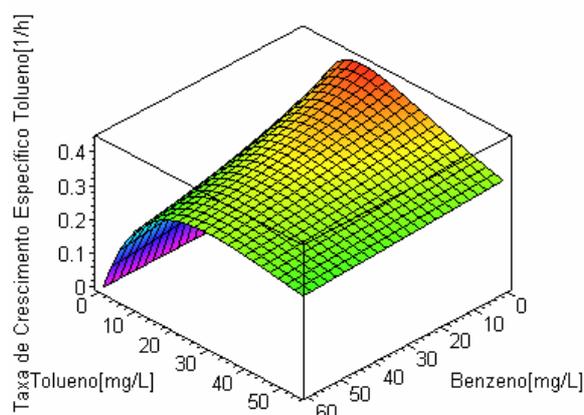


Figura 5. 43 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva modificado para o tolueno.

Neste caso, as taxas máximas de crescimento específico no benzeno e no tolueno aumentaram quando ambos foram utilizados em mistura, se comparadas às respectivas taxas máximas de crescimento nos compostos individuais. Os valores aumentaram de 0,35 para 0,45 h⁻¹ no benzeno e 0,33 para 0,44 h⁻¹ no tolueno. No entanto, verifica-se que a biodegradação do benzeno na presença do tolueno ocorreu em 8 horas, enquanto individualmente o benzeno foi completamente consumido em 6 horas. Por outro lado, a presença do benzeno não afetou significativamente o tempo de biodegradação do tolueno (7 horas).

5.2.3. Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura benzeno-fenol

A modelagem da cinética de biodegradação da mistura benzeno-fenol partiu das seguintes suposições: (a) HAMED *et al.* (2003) mostraram que efeitos de inibição pelo substrato ocorreram em concentrações acima de 30 mg L⁻¹ de benzeno; (b) considerou-se a inadequação do modelo de Andrews em ajustar-se aos dados experimentais em elevados valores da concentração inicial do fenol (200 mg L⁻¹), atribuída à inibição por intermediários metabólicos, conforme verificado em WANG & LOH (1999).

Assim, propôs-se adicionar, em todos os modelos cinéticos avaliados, o termo de inibição pelo substrato $\left(\frac{S^2}{K_i}\right)$, para a biodegradação do benzeno, e o termo de inibição causada pela presença de intermediários metabólicos $\left(\frac{(S_0 - S_f)^2}{K_{i_f}}\right)$, para a biodegradação do fenol, na modelagem da biodegradação da mistura benzeno-fenol.

Após realizar as modificações em todos os modelos, utilizou-se o método PSO na estimativa dos parâmetros cinéticos, os quais são apresentados na Tabela 5.25. O procedimento realizado, utilizando 300 partículas e 25 iterações, necessitou de um tempo de 32 a 47 minutos durante a estimativa dos oito parâmetros dos modelos de inibição, e 40 minutos para a estimativa dos dez parâmetros do modelo SKIP.

Tabela 5. 25 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação da mistura benzeno-fenol aplicando os modelos de múltiplos substratos

Modelos	Substratos	Parâmetros					
		$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	K_s (mg L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (mg mg ⁻¹)	K_i (mg L ⁻¹)	I_{fb}	I_{bf}
Inibição Competitiva	Benzeno	0,50	0,020	2,36	24,00	-	-
	Fenol	0,14	41,00	0,30	84,00	-	-
Inibição Acompetitiva	Benzeno	0,85	0,20	1,73	22,00	-	-
	Fenol	0,28	82,00	0,37	54,00	-	-
Inibição Não-competitiva	Benzeno	0,84	0,46	1,73	29,00	-	-
	Fenol	0,31	72,00	0,51	62,00	-	-
SKIP	Benzeno	0,71	0,16	1,25	8,50	0,001	-
	Fenol	0,30	35,00	0,55	75,00	-	84

Observa-se que os valores dos parâmetros foram obtidos corretamente. A taxa máxima de crescimento específico $\mu_{m\acute{a}x}$ no benzeno mostra-se maior, o que pode indicar que o benzeno foi utilizado primeiramente ao fenol; o baixo valor de K_s mostra que *Pseudomonas putida* F1 apresenta maior afinidade com o benzeno, proporcionando maior coeficiente de rendimento $Y_{x/s}$; e os valores de K_s/K_i indicam que o fenol apresenta elevado efeito inibitório.

ABUHAMED *et al.* (2004) utilizaram com sucesso o modelo *SKIP* na modelagem da biodegradação dos compostos BTF e estimaram os parâmetros de interação $I_{fb} = 1,08$ e $I_{bf} = 0,27$. Isto significa que o benzeno intensificou a biodegradação do fenol e o fenol inibiu a biodegradação do benzeno. Valores contrários foram relatados por REARDON *et al.* (2000), os quais estimaram $I_{fb} = 0,01 \pm 0,002$ e $I_{bf} = 18,5 \pm 1,5$, mostrando um comportamento similar ao encontrado neste trabalho, ou seja, o benzeno inibe a biodegradação do fenol.

As simulações dos modelos são apresentadas nas Figuras 5.44 a 5.51, onde se observa que os modelos de inibição, competitiva e não-competitiva, apresentaram os melhores ajustes, como pode ser confirmado pelos valores da função objetivo apresentadas na Tabela 5.26.

Tabela 5. 26 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação da mistura benzeno-fenol

Modelos	Função Objetivo (equações 4.25 e 4.26)
Inibição Competitiva	0,188
Inibição Acompetitiva	0,400
Inibição Não-Competitiva	0,360
<i>SKIP</i>	0,390

Assim, considerando as modificações propostas, as taxas específicas de crescimento no benzeno e no fenol, aplicando o modelo de inibição competitiva, podem ser apresentadas pelas equações (5.33) e (5.34), respectivamente.

$$\mu_{x_b} = \frac{\mu_{m\acute{a}x_b} S_b}{\left(K_{S_b} + S_b + \frac{S_b^2}{K_{i_b}} + S_t \left(\frac{K_{S_b}}{K_{S_t}} \right) \right)} \quad (5.33)$$

$$\mu_{x_f} = \frac{\mu_{m\acute{a}x_f} S_f}{\left(Ks_f + S_f + \frac{(S_0 - S_f)^2}{Ki_f} + S_b \left(\frac{Ks_f}{Ks_b} \right) \right)} \quad (5.34)$$

Verifica-se que, dentre os modelos avaliados, o modelo de inibição competitiva descreve muito bem, tanto a utilização dos substratos, quanto o crescimento da biomassa, observado nas Figuras 5.44 e 5.45.

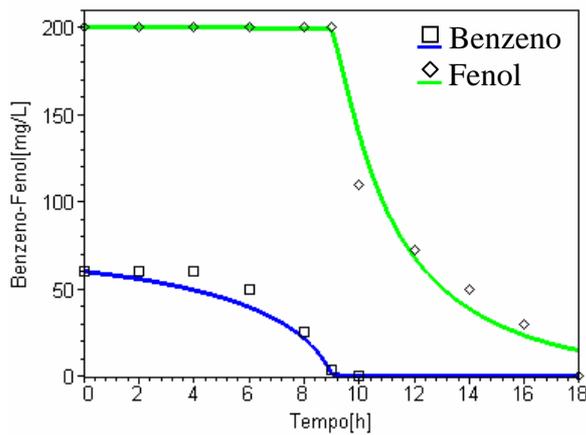


Figura 5. 44 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-fenol.

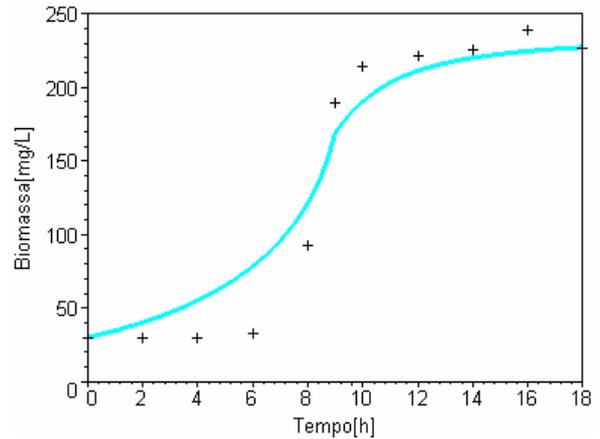


Figura 5. 45 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Durante a biodegradação do benzeno e fenol em mistura observou-se uma utilização seqüencial dos substratos. Assim, o benzeno foi primeiramente consumido e a degradação do fenol não iniciou antes que a concentração do benzeno atingisse valores próximos de zero. Este comportamento é conhecido como repressão catabólica e caracteriza o crescimento diáuxico, onde duas fases de crescimento exponencial são apresentadas pela biomassa. Portanto, neste caso, o benzeno estaria reprimindo a expressão de genes que codificam enzimas necessárias ao metabolismo do fenol. REARDON *et al.* (2000) também verificaram este comportamento e sugeriram que a biodegradação do benzeno pode ser inibida competitivamente pela presença do fenol, e que o efeito do benzeno sobre a biodegradação do fenol é muito mais complexo.

Os dados experimentais da biomassa apresentam crescimento diáuxico, mas o conhecimento de que a mesma enzima, conhecida como tolueno dioxigenase, é utilizada para iniciar a oxidação do benzeno e fenol é relevante para sugerir que inibição competitiva esteja ocorrendo entre ambos os substratos.

As Figuras 5.46 e 5.47 apresentam as simulações do modelo de inibição acompetitiva, para a biodegradação da mistura benzeno-fenol e para o crescimento da biomassa, juntamente com os dados experimentais, onde também se observa um bom desempenho do modelo.

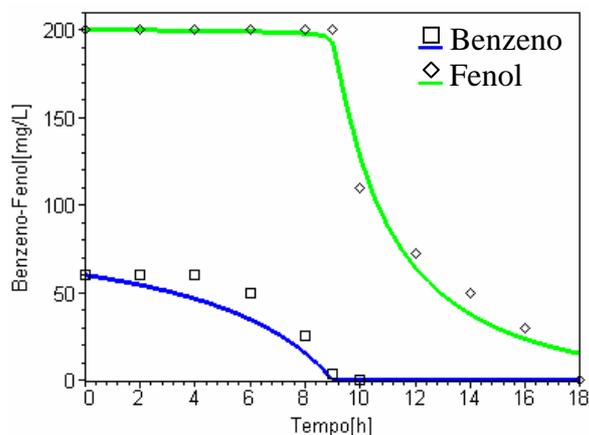


Figura 5. 46 – Simulação do modelo de inibição acompetitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-fenol.

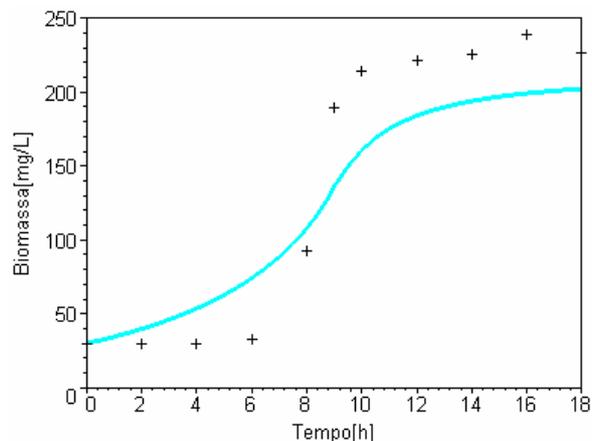


Figura 5. 47 – Simulação do modelo de inibição acompetitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

A biodegradação individual do benzeno ocorreu em 6 horas, e quando na presença do fenol, sua utilização completa aumentou para 10 horas. Isso mostra que o fenol prejudica a taxa de biodegradação do benzeno, nas condições que este experimento foi conduzido, provavelmente por aumentar o tempo de adaptação dos microorganismos. Por outro lado, verifica-se que o benzeno diminuiu o tempo de biodegradação do fenol. Individualmente, o fenol foi completamente esgotado em 35 horas, e quando esteve em mistura com o benzeno, seu tempo de biodegradação foi menor, atingindo 18 horas. Isto pode ser atribuído ao fato de que a biomassa remanescente da biodegradação do benzeno passa a utilizar rapidamente o segundo substrato. Além disso, benzeno e fenol produzem exatamente o mesmo intermediário (semialdeído 2-hidroximucônico) durante a metabolização por *Pseudomonas putida* F1, sugerindo a utilização da mesma enzima. Assim, as enzimas primeiramente requeridas para a utilização do benzeno metabolizam rapidamente o fenol.

As simulações do modelo de inibição não-competitiva, para a degradação da mistura benzeno-fenol e para o crescimento da biomassa, são apresentadas nas Figuras 5.48 e 5.49. Neste caso, o substrato inibidor, o benzeno, estaria inativando o complexo enzima-fenol.

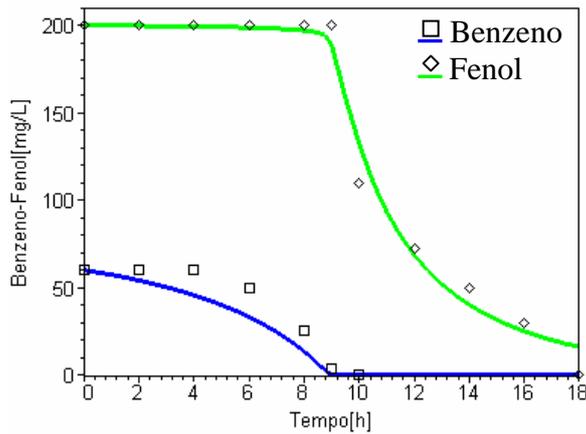


Figura 5. 48 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-fenol.

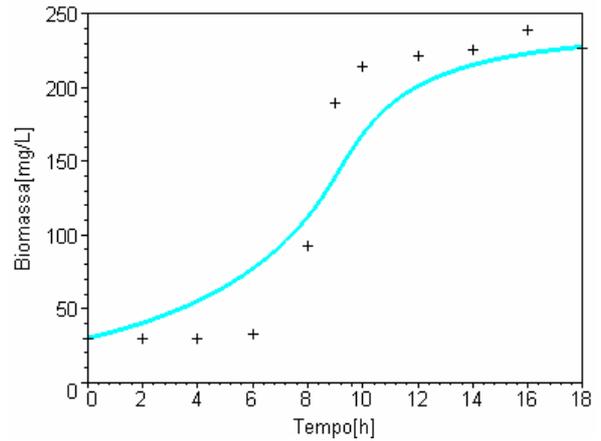


Figura 5. 49 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

As simulações do modelo *SKIP*, para a biodegradação da mistura benzeno-fenol e para o crescimento da biomassa, são apresentadas nas Figuras 5.50 e 5.51. Este modelo foi satisfatoriamente utilizado por REARDON *et al.* (2000) e ABUHAMED *et al.* (2004) para representar a biodegradação da mistura benzeno-fenol por meio de *Pseudomonas putida* F1.

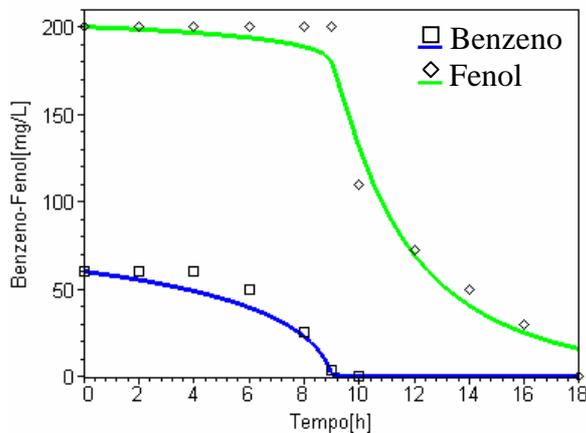


Figura 5. 50 – Simulação do modelo *SKIP* e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-fenol.

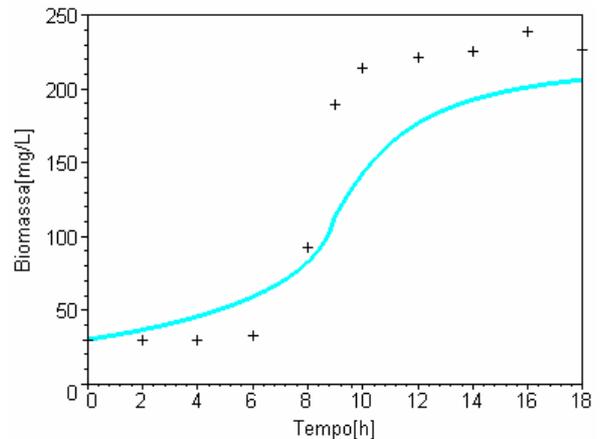


Figura 5. 51 – Simulação do modelo *SKIP* e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Todos os modelos falharam ao descrever a fase de adaptação do microorganismo (até 6 horas), pois este fator não é levado em conta na modelagem cinética. A fase de crescimento exponencial também não é adequadamente descrita pelos modelos. O comportamento do sistema deve ser analisado em dois níveis. O primeiro é baseado na resposta do sistema durante a metabolização dos substratos, e o segundo refere-se ao crescimento da biomassa como função da biodegradação

do substrato. Verifica-se que a utilização do fenol somente inicia-se quando a concentração do benzeno aproxima-se de zero, ou seja, o benzeno aparentemente estaria reprimindo a síntese de enzimas requeridas para a degradação do fenol. Isto também pode ser verificado pelo alto valor do parâmetro I_{bf} estimado (Tabela 5.25), na tentativa de ajustar os dados aplicando o modelo *SKIP*, sendo que este valor foi interpretado como sendo o grau de inibição do benzeno sobre a biodegradação do fenol. Por outro lado, o fenol tem pouco efeito na biodegradação do benzeno.

Após 9 horas, aproximadamente, o crescimento da biomassa continua apenas devido à utilização do fenol. A concentração do benzeno encontra-se esgotada às 10 horas, enquanto 110 mg L^{-1} de fenol permanece sujeito à biodegradação. Assim, após as 10 horas somente o composto fenol torna-se responsável pelo crescimento da biomassa e os valores dos coeficientes de rendimento estimados (Tabela 5.25) descrevem muito bem esta tendência, isto é, alto coeficiente de rendimento no benzeno e baixo coeficiente de rendimento no fenol.

Apesar dos substratos benzeno e fenol não serem utilizados simultaneamente, o satisfatório ajuste do modelo de inibição competitiva suporta a hipótese de que as reações envolvidas são catabolizadas pela mesma enzima, caracterizada como tolueno dioxigenase. Portanto, os substratos são utilizados pela mesma rota metabólica da *P. putida* F1, que pode ser visualizadas na Figura 5.41.

Finalmente, as taxas de crescimento específico no benzeno e no fenol são representadas em função de suas concentrações nas Figuras 5.52 e 5.53, respectivamente. Admite-se que o modelo de inibição competitiva modificado melhor descreve a biodegradação da mistura benzeno-fenol. As análises de superfície mostram claramente os efeitos de inibição pelo substrato benzeno, verificado na Figura 5.52, independentemente da concentração do fenol. A taxa máxima de crescimento específico no benzeno em mistura aumentou ($0,35$ para $0,46 \text{ h}^{-1}$). Após este valor máximo de $0,46 \text{ h}^{-1}$, a taxa de crescimento específico no benzeno sofre um decréscimo maior se comparado a biodegradação individual (Figura 5.28). Isto também pode explicar porque a biodegradação do benzeno em mistura foi mais demorada (10 horas) se comparado à biodegradação do composto individualmente (6 horas). A Figura 5.53 mostra que no fenol, a taxa de crescimento específico é observada somente quando a concentração do benzeno é nula, e efeitos de inibição pela presença de intermediários metabólicos são observados a partir de 200 mg L^{-1} ,

onde a taxa de crescimento específico começa a decrescer. Comparações entre as taxas de biodegradação do fenol, individualmente e em mistura, não são possíveis, pois, neste caso, o modelo de Andrews não pôde ajustar adequadamente os dados experimentais de HAMED *et al.* (2003).

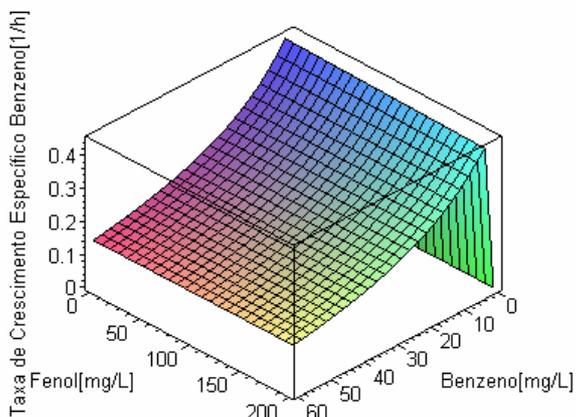


Figura 5. 52 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva modificado para o benzeno.

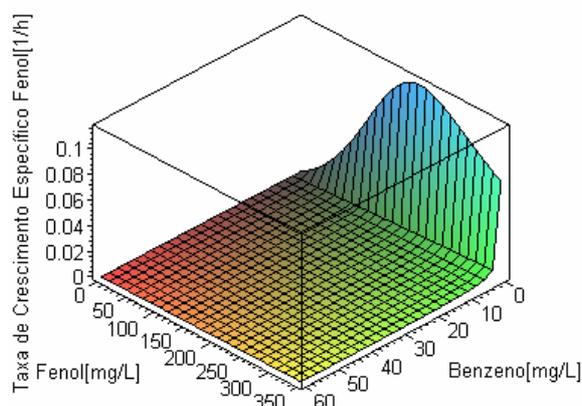


Figura 5. 53 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva modificado para o fenol.

5.2.4. Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura tolueno-fenol

A partir do método de busca *PSO*, implementado neste trabalho, foi possível a estimativa dos parâmetros cinéticos e estequiométricos, apresentados na Tabela 5.27.

Tabela 5. 27 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação da mistura tolueno-fenol aplicando os modelos de múltiplos substratos

Modelos	Substratos	Parâmetros				
		$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	K_s (mg L^{-1})	$Y_{x/s}$ (mg mg^{-1})	I_{ft}	I_{tf}
Inibição Competitiva	Tolueno	0,17	0,10	0,66	-	-
	Fenol	0,13	15,00	0,62	-	-
Inibição Acompetitiva	Tolueno	0,55	1,75	0,54	-	-
	Fenol	0,21	66,00	0,66	-	-
Inibição Não-Competitiva	Tolueno	0,65	1,00	0,55	-	-
	Fenol	0,20	58,50	0,66	-	-
SKIP	Tolueno	0,24	1,00	0,75	0,047	-
	Fenol	0,13	20,00	0,60	-	55

Os valores dos parâmetros estimados mostram-se coerentes: $\mu_{m\acute{a}x}$ no tolueno apresenta-se maior que no fenol, podendo indicar que tolueno foi primeiramente utilizado; e o baixo valor de K_s mostra uma maior afinidade de *Pseudomonas putida* F1 com o tolueno. Durante a busca, verificou-se uma grande dificuldade em estimar os valores ótimos, devido a uma instabilidade produzida durante a evolução da função objetivo. O tempo requerido na estimativa dos seis parâmetros de cada modelo de inibição variou entre 30 a 35 minutos. Os parâmetros do modelo *SKIP* necessitaram de 27 minutos para serem estimados.

Seguindo a mesma estratégia utilizada nas simulações anteriores para a modelagem da cinética microbiana, confirmou-se que modificações nos diferentes modelos não resultaram melhorias nas simulações e, portanto, os modelos foram avaliados em sua forma original. No entanto, outros modelos que incorporem os mecanismos internos de regulação gênica deveriam ser investigados para corrigir algumas falhas que estes modelos não-estruturadas apresentaram ao descrever a biodegradação da mistura tolueno-fenol, como podem ser visualizados a seguir.

Nas Figuras 5.54 e 5.55 são apresentadas as simulações da utilização da mistura tolueno-fenol e do crescimento da biomassa, respectivamente, aplicando o modelo de inibição competitiva, juntamente com os dados experimentais.

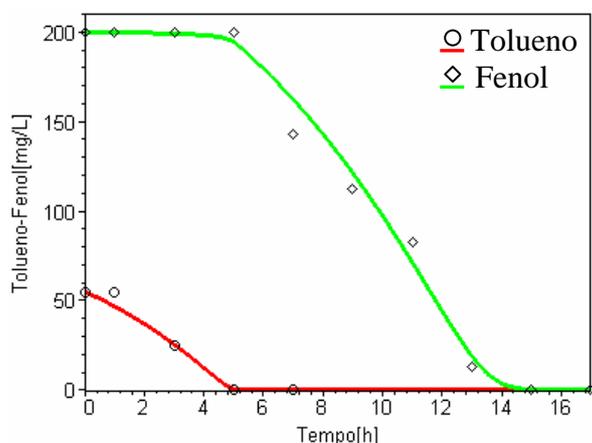


Figura 5. 54 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura tolueno-fenol.

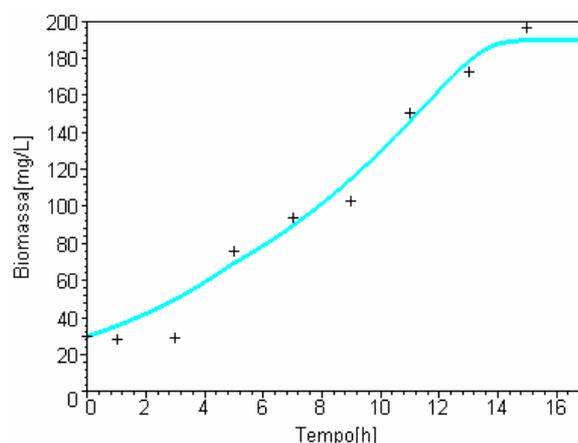


Figura 5. 55 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Na biodegradação do tolueno e fenol também se confirmou uma utilização seqüencial dos substratos, na qual o tolueno foi primeiramente consumido e a degradação do fenol não começou até que a concentração do tolueno esgotasse completamente. Neste caso, os dados experimentais da biomassa mostram a

existência de duas fases de crescimento exponencial caracterizando o crescimento diáuxico. Portanto, neste caso, o tolueno estaria reprimindo a expressão de genes que codificam enzimas necessárias ao metabolismo do fenol, caracterizando o mecanismo de repressão catabólica. Mas, este pode não ser um caso de repressão catabólica, visto que *Pseudomonas putida* F1 utiliza a mesma enzima (tolueno dioxigenase) para metabolizar ambos os substratos tolueno e fenol. Portanto, o ajuste adequado do modelo de inibição competitiva sugere que o tolueno e o fenol competem pelo mesmo sítio ativo da enzima.

Apesar de todos os modelos resultarem em valores da função objetivo bastante próximos, conforme apresentado na Tabela 5.28, admite-se que o modelo de inibição competitiva descreve melhor os dados experimentais.

Tabela 5. 28 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação da mistura tolueno-fenol

Modelos	Função Objetivo (equações 4.25 e 4.26)
Inibição Competitiva	0,059
Inibição Acompetitiva	0,062
Inibição Não-Competitiva	0,063
SKIP	0,075

As Figuras 5.56 e 5.57 apresentam as simulações do modelo de inibição incompetitiva, para a utilização da mistura tolueno-fenol e para o crescimento da biomassa, respectivamente, juntamente com os dados experimentais.

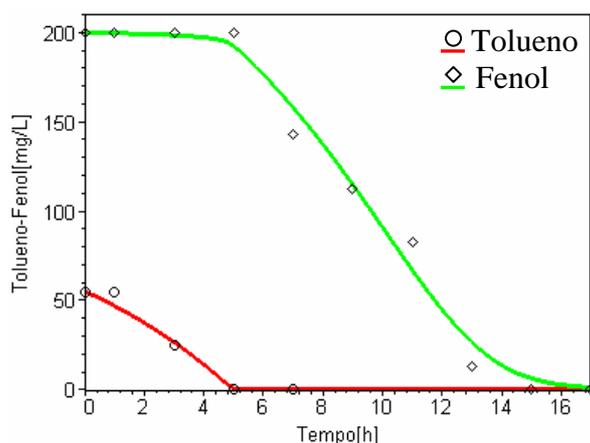


Figura 5. 56 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura tolueno-fenol.

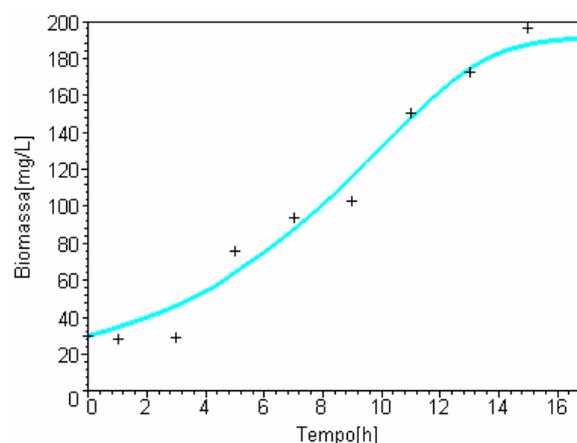


Figura 5. 57 – Simulação do modelo de inibição incompetitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Entretanto, nenhum modelo foi capaz de descrever o crescimento da biomassa, que aparentemente caracteriza-se como um fenômeno diáuxico, isto é, aparecimento de duas fases de crescimento exponencial separados por uma fase de adaptação, chamada de adaptação diáuxico. Assim, o consumo do primeiro substrato, o tolueno, é seguido por um período de adaptação dos microorganismos ao segundo substrato, o fenol. O fenômeno diáuxico, que ocorre quando dois ou mais substratos estão sendo consumidos, é caracterizada pela utilização seqüencial, mas também pode envolver a utilização simultânea dos substratos presentes. Neste caso, analisando o sistema com relação a utilização dos substratos tolueno e fenol, verifica-se que ocorreu utilização seqüencial das rotas metabólicas, e portanto um dos substratos pode estar inibindo a degradação de outro por toxicidade, repressão catabólica ou inibição enzimática. Teoricamente, o aparecimento de duas fases de crescimento exponencial pode comprovar a repressão catabólica do tolueno. Além disso, a utilização do fenol inicia-se somente quando a concentração do tolueno encontra-se nula.

As simulações do modelo de inibição não-competitiva e do modelo *SKIP*, para a utilização da mistura tolueno-fenol e para o crescimento da biomassa, são apresentadas nas Figuras 5.58 e 5.59 e nas Figuras 5.60 e 5.61, respectivamente.

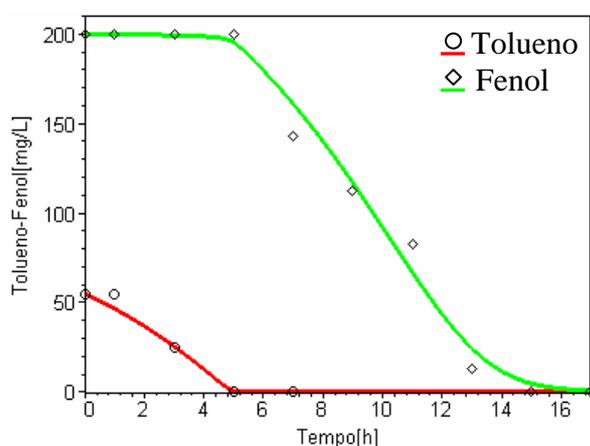


Figura 5. 58 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura tolueno-fenol.

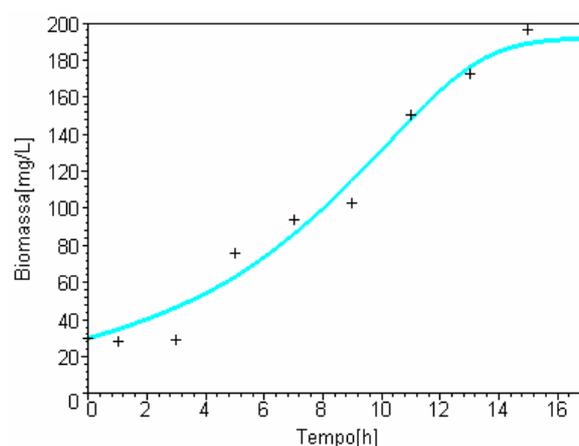


Figura 5. 59 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Apesar de não predizer exatamente o crescimento da biomassa, observa-se que os modelos descreveram adequadamente o processo de biodegradação da mistura tolueno-fenol.

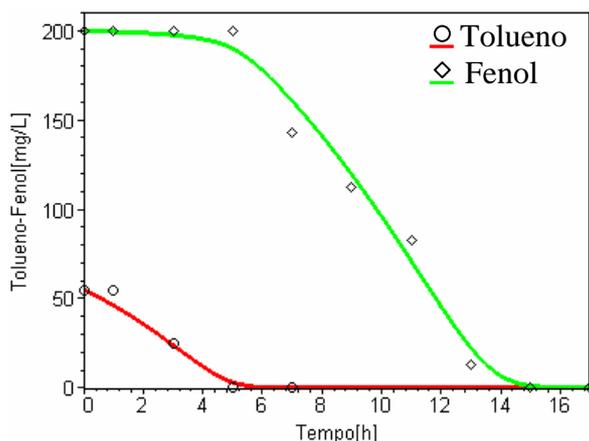


Figura 5. 60 – Simulação do modelo *SKIP* e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura tolueno-fenol.

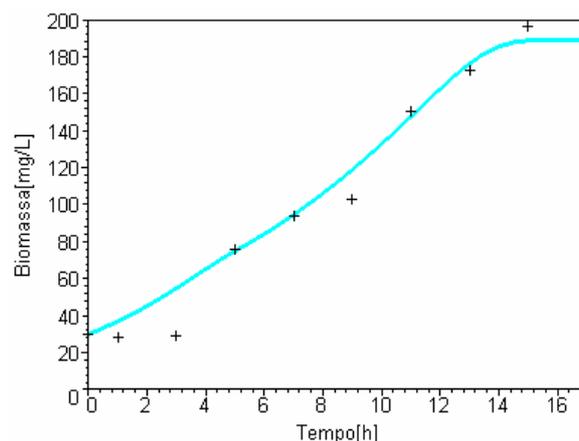


Figura 5. 61 – Simulação do modelo *SKIP* e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Os modelos avaliados neste trabalho, para os sistemas com múltiplos substratos, não incorporam os mecanismos de regulação interna envolvidos no crescimento microbiano. Tais modelos, apresentados em diversos trabalhos (BRANDT *et al.*, 2004; HAMILTON *et al.*, 2005; NARANG, 2006), avaliam a regulação genética dos sistemas, especialmente os que apresentam crescimento diáuxico, considerando os microorganismos como “*optimal strategists*”, além de simular a fase de adaptação diáuxico.

Os mecanismos regulatórios, que causam as preferências microbianas por determinado substrato e consumo destes sequencialmente e/ou simultaneamente, são bastante complexos. Logo, assume-se que a biodegradação da mistura tolueno-fenol ocorre devido à inibição enzimática, visto que a utilização de ambos os substratos tolueno e fenol foram adequadamente descrita aplicando os modelos de inibição. Provavelmente, tolueno e fenol competem pelo mesmo sítio ativo da enzima responsável pelo catabolismo destes substratos, por meio de inibição competitiva. Sugere-se que o grau de inibição do tolueno sobre a biodegradação do fenol seja bastante elevado. Em contrapartida, a influência do fenol sobre a biodegradação tolueno não é significativa.

Este comportamento pode ser comprovado pelos valores dos parâmetros de interação quando aplicado o modelo *SKIP* no ajuste aos dados experimentais. Este modelo foi utilizado com sucesso por REARDON *et al.* (2000, 2002) e ABUHAMED *et al.* (2004) na representação da biodegradação da mistura tolueno-fenol. Apesar de não constatarem inibição competitiva entre o tolueno e o fenol, REARDON *et al.*

(2000, 2002) estimaram $I_{yf} = 55 \pm 5$, $I_{ft} = 0,01 \pm 0,002$ e $I_{yf} = 80,6 \pm 6$, $I_{ft} = 0,6 \pm 0,03$, respectivamente, sugerindo que o tolueno inibe a biodegradação do fenol, muito mais do que o fenol inibe a biodegradação do tolueno. Neste trabalho, na tentativa de ajustar o modelo *SKIP* aos dados experimentais, estimaram-se os parâmetros $I_{yf} = 23,55$ e $I_{ft} = 0,067$. Por outro lado ABUHAMED *et al.* (2004) encontraram resultados opostos, isto é, $I_{yf} = 0,14$ e $I_{ft} = 1,03$.

Pode-se afirmar que tolueno inibe o consumo do fenol e os resultados são: a prolongada fase de adaptação, antes que a degradação do fenol comece, e a rápida taxa de biodegradação do tolueno. Este resultado também foi encontrado por REARDON *et al.* (2002). Estes autores acreditam que a inibição da biodegradação do fenol na presença do tolueno pode ser atribuída ao seu vagaroso transporte para dentro das células, quando a membrana está adaptada em ambiente mais hidrofóbico. Então, quando o tolueno é completamente consumido do meio, a composição da membrana muda para uma forma na qual a difusão do fenol possa ocorrer mais rapidamente.

Nas Figuras 5.62 e 5.63 são apresentadas as análises de superfície aplicando o modelo de inibição competitiva, nas quais as taxas específicas de crescimento no tolueno e no fenol são representadas em função de suas concentrações.

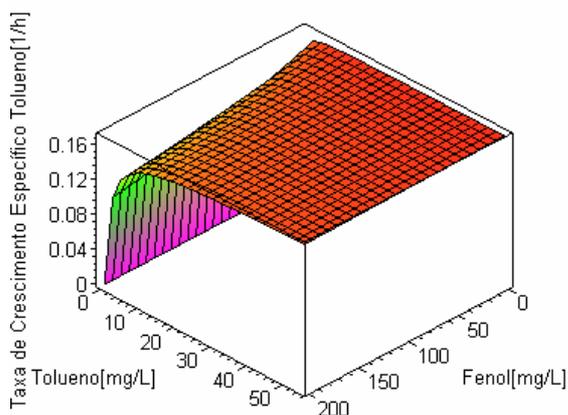


Figura 5. 62 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva para o tolueno.

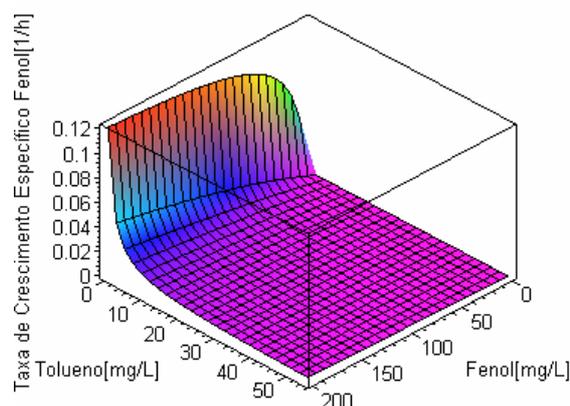


Figura 5. 63 – Simulação da taxa específica de crescimento na mistura aplicando o modelo de inibição competitiva para o fenol.

Analisando a Figura 5.62 verifica-se uma insignificante diminuição na taxa de crescimento específico no tolueno à medida que a concentração do fenol aumenta. Por outro lado, verifica-se pela Figura 5.63 que a taxa de crescimento específico no fenol decresce muito quando a concentração do tolueno aumenta.

A taxa máxima de crescimento específico no tolueno diminuiu na presença do fenol, passando de 0,33 para 0,21 h⁻¹. Isto significa que o fenol pode estar retardando o crescimento da biomassa no tolueno, provavelmente pela elevada concentração, além da sua toxicidade e formação de intermediários metabólicos. O tempo que o fenol levou para ser completamente esgotado passou de 35 horas, individualmente, para 15 horas quando o tolueno esteve presente; comportamento similar ao observado durante a biodegradação da mistura benzeno-fenol. O tolueno também foi utilizado mais rapidamente (7 para 5 horas).

5.2.5. Avaliação dos modelos cinéticos na biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol

Neste caso, também não houve a necessidade de alterações nos modelos cinéticos para descrever os dados experimentais de HAMED *et al.* (2003). Na Tabela 5.29 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos estimados para a biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol.

Tabela 5. 29 – Valores dos parâmetros estimados para a cinética de biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol aplicando os modelos de múltiplos substratos

Modelos	Substratos	Parâmetros		
		$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	K_s (mg L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (mg mg ⁻¹)
Inibição Competitiva	Benzeno	0,25	0,14	2,35
	Tolueno	0,20	0,08	1,55
	Fenol	0,05	155	0,15
Inibição Acompetitiva	Benzeno	0,75	14,00	2,00
	Tolueno	0,73	6,00	1,65
	Fenol	0,06	155	0,29
Inibição Não-Competitiva	Benzeno	0,70	15,34	1,50
	Tolueno	0,70	8,75	1,50
	Fenol	0,12	175	0,40
SKIP	Benzeno	0,35	10,00	1,70
	Tolueno	0,41	5,00	1,24
	Fenol	0,18	185	0,47

Os nove parâmetros dos modelos de inibição necessitaram de 36 a 50 minutos e os quinze parâmetros do modelo *SKIP* necessitaram, em média de 50

minutos para serem estimados através do método *PSO*. Todos apresentaram coerência com o processo, sendo a taxa de crescimento específico no benzeno e tolueno similares e maiores que no fenol, o qual foi consumido mais tarde. Os baixos valores de K_s mostram que *Pseudomonas putida* F1 apresentam maior afinidade com o benzeno e com o tolueno, resultando em elevados valores do coeficiente de rendimento $Y_{x/s}$.

Na Tabela 5.30 são apresentados os valores dos parâmetros de interação estimados aplicando o modelo *SKIP*. Os parâmetros iterativos mostram que o tolueno inibe a biodegradação do benzeno; o fenol apresenta uma inibição muito pequena na biodegradação de ambos, benzeno e tolueno, e o grau de inibição do benzeno e do tolueno é bastante elevado sobre a biodegradação do fenol.

Tabela 5. 30 – Valores dos parâmetros iterativos estimados para a cinética de biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol aplicando o modelo *SKIP*

I_{tb}	I_{fb}	I_{bt}	I_{ft}	I_{bf}	I_{tf}
2,820	0,008	2,300	0,0001	58	180

Os valores do resíduo mínimo estimados para os modelos cinéticos são apresentados na Tabela 5.31. Verifica-se que o modelo de inibição competitiva proporcionou o melhor resultado e portanto, pode representar a cinética de biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol.

Tabela 5. 31 – Valores da função objetivo estimados aplicando os modelos de múltiplos substratos na biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol

Modelos	Função Objetivo (equações 4.25 e 4.26)
Inibição Competitiva	0,085
Inibição Acompetitiva	0,135
Inibição Não-Competitiva	0,170
<i>SKIP</i>	0,164

As simulações do modelo de inibição competitiva, para a biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol e para o crescimento da biomassa, juntamente com os dados experimentais, são apresentadas nas Figuras 5.64 e 5.65, respectivamente.

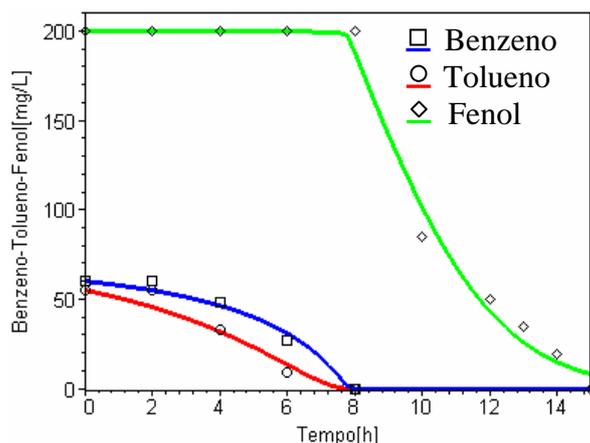


Figura 5. 64 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno-fenol.

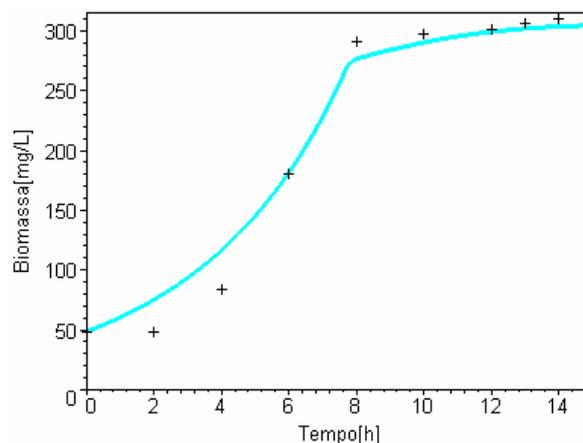


Figura 5. 65 – Simulação do modelo de inibição competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Observa-se que ocorreu uma utilização simultânea do benzeno e tolueno, ao passo que o fenol foi utilizado sequencialmente ao consumo de ambos. Logo, as taxas de crescimento específico e os coeficientes de rendimento no benzeno e no tolueno devem ser similares, e maiores se comparados aos valores para o fenol, conforme pode ser verificado na Tabela 5.29.

A biodegradação do fenol não ocorreu até que ambos os substratos, benzeno e tolueno foram esgotados. Este comportamento também mostra que complexos mecanismos de regulação interna estão presentes na utilização dos substratos, sendo a repressão catabólica o mecanismo mais provável. No entanto, apesar deste comportamento, a biodegradação da mistura ternária, neste caso, pode seguir a cinética de inibição competitiva, visto que os três compostos tóxicos são conhecidos por serem metabolizados pela mesma enzima da *Pseudomonas putida* F1 (tolueno dioxigenase - TOD).

Analisando o sistema com relação ao crescimento da biomassa, nota-se que o crescimento foi bastante elevado até às 8 horas. Após o consumo completo do benzeno e tolueno, que ocorreu às 8 horas, a concentração inicial de 200 mg L⁻¹ de fenol começou a ser utilizada pelos microorganismos. Isto significa que, após este momento, o crescimento da biomassa é exclusivamente baseado na utilização do fenol, que resultou baixo coeficiente de rendimento. Verifica-se na Tabela 5.29, que para todos os modelos, foram estimados valores baixos para o coeficiente de rendimento no fenol (Y_{xf}), o que concorda com os resultados esperados.

Baseado neste entendimento, a capacidade de avaliação das diferenças, entre os dados experimentais e os modelos, torna-se mais precisa. As Figuras 5.66 e 5.67 apresentam, respectivamente, as simulações do modelo de inibição acompetitiva, para a biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol e para o crescimento da biomassa, juntamente com os dados experimentais.

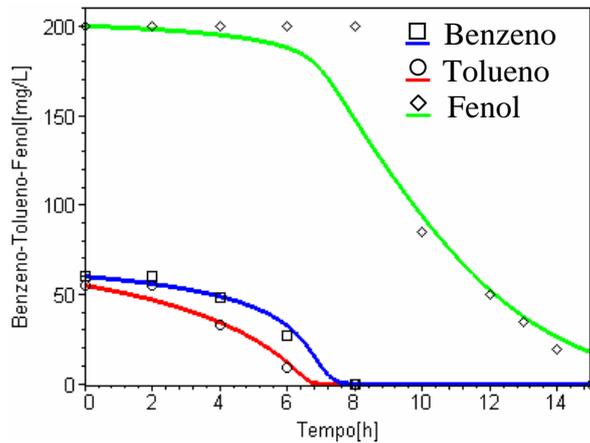


Figura 5. 66 – Simulação do modelo de inibição acompetitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno-fenol.

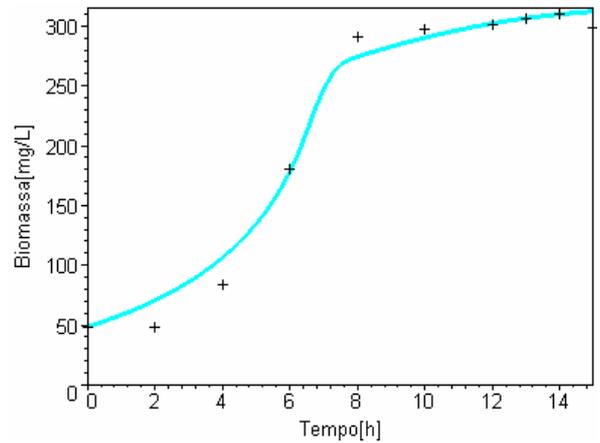


Figura 5. 67 – Simulação do modelo de inibição acompetitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

As simulações do modelo de inibição não-competitiva, para a biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol e para o crescimento da biomassa, são apresentadas nas Figuras 5.68 e 5.69, respectivamente.

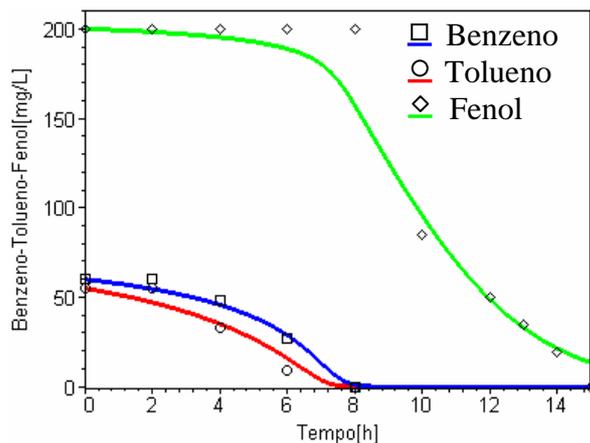


Figura 5. 68 – Simulação do Modelo de Inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno-fenol.

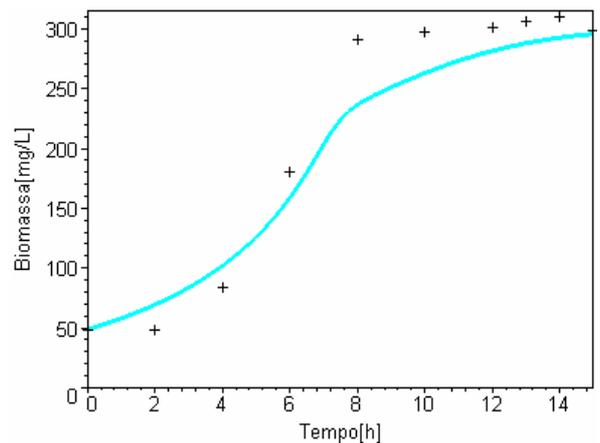


Figura 5. 69 – Simulação do modelo de inibição não-competitiva e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

As simulações do modelo *SKIP*, para a biodegradação da mistura ternária e para o crescimento da biomassa, são apresentadas nas Figuras 5.70 e 5.71, respectivamente.

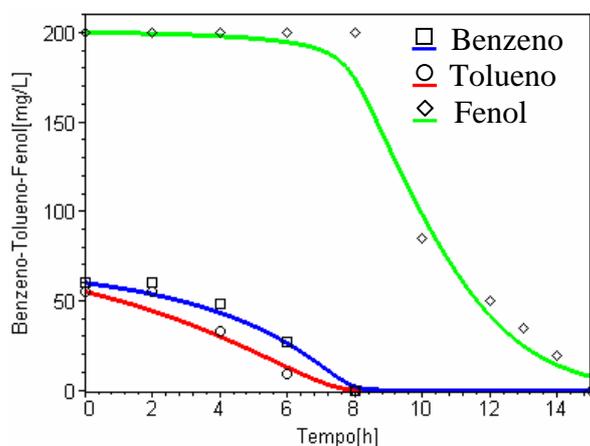


Figura 5. 70 – Simulação do modelo *SKIP* e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a mistura benzeno-tolueno-fenol.

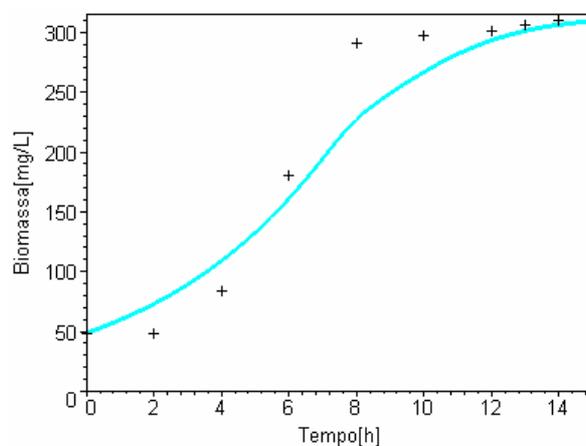


Figura 5. 71 – Simulação do modelo *SKIP* e dados experimentais (HAMED *et al.*, 2003) para a biomassa.

Pseudomonas putida F1 é conhecida por utilizar compostos tóxicos, como o benzeno, tolueno e fenol, além de outros aromáticos. A enzima TOD, além de catabolizar a biodegradação do benzeno e tolueno, também tem sido caracterizada por catabolizar a oxidação do fenol (SPAIN *et al.*, 1989 *apud* REARDON *et al.*, 2002). Na biodegradação do tolueno a oxidação do anel aromático pela enzima TOD leva à formação do intermediário 3-metilcatecol. Durante a biodegradação do benzeno, a oxidação do anel aromático leva a formação do intermediário catecol, que posteriormente é clivado pela via *meta* para formar semialdeído 2-hidroxiacético (2HSM). Estas rotas metabólicas são apresentadas na Figura 5.41, onde se pode visualizar que o fenol também pode ser utilizado pela enzima TOD, formando catecol e 2HSM como intermediários (SPAIN & GIBSON, 1988 *apud* HAMED *et al.*, 2003).

Portanto, *Pseudomonas putida* F1 utiliza a mesma rota metabólica para metabolizar os compostos benzeno, tolueno e fenol (REARDON *et al.*, 2000; REARDON *et al.*, 2002). Isto justifica os resultados obtidos nas simulações, neste trabalho, para os quais o modelo cinético de inibição competitiva alcançou os melhores ajustes.

Pode-se afirmar que devido à complexidade do processo de biodegradação quando múltiplos substratos estão envolvidos, a metodologia adotada neste trabalho apresentou ótimos resultados no desenvolvimento da modelagem cinética. Os

resultados mostram claramente que a cinética de biodegradação de misturas de compostos tóxicos pode ser complexa e difícil de ser descrita matematicamente, especialmente o perfil de crescimento da biomassa, mesmo quando os compostos são substratos “*homologous*” para a cultura microbiana, isto é, substratos que são catabolizados pela mesma rota metabólica, como o benzeno, tolueno e fenol.

Na Tabela 5.32 são apresentados alguns estudos sobre a cinética de biodegradação de múltiplos substratos BTEX e BTF selecionados na literatura. Verifica-se que a modelagem dos processos foram realizadas aplicando modelos não-estruturados, tais como o modelo de inibição competitiva e *SKIP*.

Tabela 5. 32 – Cinética de biodegradação de múltiplos substratos BTEX e BTF selecionados na literatura

Múltiplos Substratos	Cultura	Modelagem
Benzeno-Tolueno Tolueno-Xileno	<i>P. sp</i> B1 <i>P. sp</i> X1	Inibição Competitiva ^(a)
Benzeno-Tolueno	<i>P. putida</i> O1	Parâmetros de Interação ^(b)
Benzeno-Tolueno-Etilbenzeno-Xileno	Mistura de culturas	Inibição Competitiva ^(c)
Benzeno-Tolueno Benzeno-Fenol Tolueno-Fenol Benzeno-Tolueno-Fenol	<i>P. putida</i> F1	<i>SKIP</i> ^(d)
Benzeno-Tolueno Benzeno-Fenol Tolueno-Fenol	<i>P. putida</i> F1	<i>SKIP</i> ^(e)

^(a)CHANG *et al.* (1993), ^(b)OH *et al.* (1994), ^(c)BIELEFELDT & STENSEL. (1999b), ^(d)REARDON *et al.* (2000), ^(e)ABUHAMED *et al.* (2004).

Embora a aplicação de modelos não-estruturados seja uma vantagem, devido à simplicidade de manipulação matemática e facilidade de verificação experimental, existe um grande número de aplicações nas quais estes modelos falham. Isso ocorre quando a composição do sistema muda drasticamente, como em alguns processos batelada, fases de adaptação, fenômeno diáuxico e em situações onde um constituinte específico deve ser modelado. Portanto, as falhas obtidas pelos modelos não-estruturados avaliados deste trabalho, durante o ajuste do crescimento da biomassa, podem ser corrigidas avaliando-se modelos estruturados.

Capítulo 6

6.1. Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho podem contribuir para uma melhor aproximação da modelagem matemática de processos de biodegradação de mistura de compostos tóxicos, nos quais fenômenos de interações entre os substratos e mecanismos de controle, representando a fisiologia microbiana, estão envolvidos.

Neste trabalho foi avaliado o desempenho de modelos cinéticos de crescimento microbiano na descrição de dados experimentais da biodegradação de compostos tóxicos BTEX e BTF. Para a avaliação dos modelos foram utilizados dados experimentais obtidos na literatura. Estes dados foram obtidos por DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) e por HAMED *et al.* (2003), os quais investigaram a biodegradação dos compostos BTEX e BTF, respectivamente, em operação batelada. DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999) avaliaram o efeito da temperatura e interações entre os substratos BTEX utilizando uma associação microbiana e *Rhodococcus rhodochrous* como microorganismos degradadores. HAMED *et al.* (2003) investigaram as interações entre os substratos benzeno, tolueno e fenol durante a biodegradação aeróbia utilizando *Pseudomonas putida* F1.

Verificou-se, durante a modelagem matemática, que uma das tarefas mais complexas no desenvolvimento de processos biotecnológicos consiste na identificação não-linear dos parâmetros dos modelos. Para este procedimento foi implementado no *software Maple*[®] um método de otimização global, conhecido como Enxame de Partículas ou *Particle Swarm Optimization (PSO)*, o qual se mostrou muito eficiente na identificação dos parâmetros. Para todos os casos avaliados, o método foi programado utilizando um microcomputador AMD Sempron 2800 Hz, 512 MB de memória RAM, onde as buscas foram realizadas adotando-se 300 partículas e 25 iterações. Verificou-se que o número de iterações foi suficiente, na maioria dos casos. Observou-se que a convergência para os valores ótimos globais ocorreu rapidamente, independentemente do número de iterações, quando a estimativa do intervalo de busca apresentaram os valores ótimos. Também se observou que a complexidade desta tarefa aumentou com o aumento do número de parâmetros dos modelos. A busca pelos parâmetros dos modelos simples mostrou-se fácil, pois

envolvia apenas três (modelo de Monod) e quatro parâmetros (modelo de Andrews), necessitando em média 3 minutos para serem estimados para a biodegradação do BTEX, e 10 a 15 minutos para a biodegradação do BTF. Por outro lado, a estimativa dos parâmetros dos modelos para múltiplos substratos, necessitou de um elevado esforço computacional e apresentou grande dificuldade em estimar os valores ótimos globais, devido a dificuldade em correlacionar cada parâmetro de maneira a obter o significado microbiológico coerente com o processo. Os modelos aplicados a biodegradação do BTEX apresentaram doze (modelos de inibição) e vinte e quatro parâmetros (modelo *SKIP*) a serem estimados, necessitando em média do tempo de 37 e 55 minutos, respectivamente. A dificuldade em estimar os valores ótimos dos parâmetros para a biodegradação da mistura benzeno-tolueno e tolueno-fenol foi diminuída, levando em média 25 a 28 minutos e 30 a 35 minutos, respectivamente, utilizando os modelos de inibição (seis parâmetros) e 27 minutos, em ambos os casos, utilizando o modelo *SKIP* (oito parâmetros). Para a mistura benzeno-tolueno-fenol, os nove parâmetros dos modelos de inibição necessitaram de 36 a 50 minutos e os quinze parâmetros do modelo *SKIP* necessitaram, em média de 50 minutos para serem estimados. As modificações propostas nos modelos para descrever a biodegradação da mistura benzeno-tolueno e benzeno-fenol resultaram aumento em apenas dois parâmetros, mas que, no entanto implicaram em maiores dificuldades na estimativa dos ótimos globais, pois uma instabilidade durante a busca foi encontrada. Os parâmetros do modelo de inibição competitiva modificado para a biodegradação da mistura benzeno-tolueno necessitaram de um tempo médio de 34 minutos. Os modelos de inibição e o modelo *SKIP* aplicados à biodegradação da mistura benzeno-fenol, necessitaram um tempo médio de 32 a 47 minutos e 40 minutos, respectivamente. Os parâmetros obtidos no presente trabalho mostraram-se coerentes com valores relatados na literatura, apresentando coerência microbiológica. A biodegradação individual dos substratos foi adequadamente descrita pelos modelos de Andrews e Monod para os compostos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno. Apesar da biodegradação do fenol estar bem definida por seguir o modelo de Andrews, neste trabalho este comportamento não foi observado, sugerindo que intermediários metabólicos estiveram presentes juntamente com o fenol durante a biodegradação. O crescimento diáuxico verificado a partir dos dados experimentais de crescimento da biomassa intensifica a presença de repressão catabólica entre o substrato fenol e seus intermediários.

Apesar dos poucos relatos encontrados na literatura descreverem a cinética de biodegradação da mistura BTEX por meio dos modelos de inibição, este trabalho demonstra que nas condições experimentais estudadas por DEEB & ALVAREZ-COHEN (1999), isso não ocorreu. Neste trabalho, um novo modelo, conhecido como modelo *SKIP*, apresentou uma ótima performance em descrever os dados experimentais da biodegradação da mistura BTEX. Contudo, os demais modelos avaliados não puderam ser descartados, pois uma metodologia estatística, necessária para assegurar a qualidade dos resultados obtidos, não pôde ser realizada por falta de informações importantes para este fim. O modelo *SKIP* sugere a existência de interações não específicas entre os substratos BTEX, e inferências sobre o comportamento dos demais modelos apontam para uma mistura de inibição competitiva e não-competitiva. Isto concorda com o fato de que, a mistura de culturas microbianas utilizada na biodegradação, pode apresentar múltiplos caminhos metabólicos para a biodegradação dos compostos BTEX. Por meio do modelo *SKIP* estimou-se as interações entre os substratos BTEX, onde o etilbenzeno apresentou o maior efeito de inibição sobre os demais compostos, ao passo que o xileno mostrou o menor efeito. Verifica-se, portanto que as interações entre os compostos BTEX são bastante complicadas devido, tanto à similaridade nas propriedades e estruturas dos mesmos, quanto aos complexos sistemas enzimáticos requeridos para metabolização destes substratos. A partir disto, propôs-se também avaliar os modelos cinéticos na descrição dos dados experimentais da biodegradação dos compostos BTF.

As modificações propostas para o modelo de inibição competitiva, na modelagem da biodegradação da mistura benzeno-tolueno, mostraram-se adequadas para confirmar os efeitos de inibição pela concentração de ambos os substratos. O modelo de inibição competitiva também foi utilizado com sucesso para descrever a biodegradação da mistura benzeno-fenol. Neste caso, propôs-se adicionar o termo de inibição pelo substrato na equação da taxa de crescimento específico no benzeno, e o termo de inibição por intermediários metabólicos na equação da taxa de crescimento específico no fenol. A biodegradação da mistura tolueno-fenol foi bem descrita pelo modelo de inibição competitiva, e modificações não foram necessárias. Entretanto, os dados experimentais de crescimento da biomassa, neste caso, apresentaram um comportamento diáuxico e, portanto, investigações de outros modelos, que incorporem mecanismos complexos de

regulação interna, como a repressão catabólica, podem corrigir as falhas apresentadas com relação ao perfil da biomassa. Finalmente, a cinética de biodegradação da mistura benzeno-tolueno-fenol mostrou-se adequadamente descrita pelo modelo de inibição competitiva, suportando a hipótese de que os três compostos são metabolizados pelo mesmo caminho enzimático da *Pseudomonas putida* F1 utilizada na biodegradação, conhecido como rota metabólica TOD.

Os resultados alcançados neste trabalho mostram que os melhores modelos podem ser aplicados com sucesso na otimização dos processos de biodegradação de compostos tóxicos em diferentes tipos de biorreatores e condições operacionais.

6.2. Sugestões

Com o objetivo de prosseguir com as investigações e resultados encontrados neste trabalho seguem algumas sugestões.

Com relação ao método *PSO* sugerem-se alguns ajustes de modo que o algoritmo apresente um desempenho ainda melhor:

- Verificar a influência da velocidade inicial no desempenho do algoritmo. Durante a implementação neste trabalho adotou-se que as partículas partiriam do repouso;
- Procurar utilizar outras funções para discretizar as posições das partículas.

Com relação à biodegradação de compostos tóxicos sugerem-se prosseguir na investigação a partir dos seguintes estudos:

- Obter dados experimentais para testar os modelos cinéticos avaliados;
- Seguir no estudo dos demais níveis hierárquicos do conhecimento, apresentados no capítulo quatro;
- Desenvolver a modelagem matemática de biorreatores para biodegradação de compostos tóxicos utilizando a cinética de biodegradação descrita pelo modelo *SKIP* para os compostos BTEX;
- Aplicar modelos cinéticos que incorporam complexos mecanismos de regulação gênica, como a repressão catabólica, para descrever o processo de biodegradação dos compostos que, aparentemente, apresentaram um fenômeno diáuxico.

Referências

- ABUHAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOĞLU, T.; MEHMETOĞLU, U. Kinetics model for growth os *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*, v.39, p.983-988, 2004.
- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGALANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, v.10, p. 845-864, 1968.
- ALABURDA, J.; NISHIHARA, L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. *Revista de Saúde Pública*, v.32, p.160-165, 1998.
- ALAGAPPAN, G.; COWAN, R. M. Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida* F1 growing on benzene and toluene. *Chemosphere*, v.54, p.1255-1265, 2004.
- ALLSOP, P. J.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M.; SULLIVAN, G. R. Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng*, v.41, p.572-80, 1993.
- ALVAREZ, P. J. J.; HUNT, C. S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v.44, n.2, p.83-104, 2002.
- ALVAREZ, P. J. J.; VOGEL, T. M. Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate reducing conditions. *Water Science Technol*, v.31, n.1, p.15-28, 1995.
- ALVAREZ, P. J. J.; VOGEL, T. M. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl Environ Microbiol*, v.57, n.10, p2981-2985, 1991.
- ANDERSON, R. T.; LOVLEY, D. R. Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environ Sci Technol*, v.34, p.2261-2266, 2000.
- ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continious culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol Bioeng*, v.10, p.707-723, 1968.
- ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em http://www.anp.gov.br/conheca/anuario_2006. Acesso em: novembro de 2007.

- APPLEGATE, B. M.; KEHRMEYER, S. R.; SAYLER, G. S. A chromosomally based tod-luxCDABE whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl Environ Microbiology*, v.64, n.7, p.2730-2735, 1998.
- ARVIN, E.; JENSEN, B. K.; GUNDERSEN, A. T. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl Environ Microbiol*, v.55, p.3221-3225, 1989.
- ASHWORTH, R. A.; HOWE, G. B.; MULLINS, M. E.; ROGERS, T. N. Air/water partitioning coefficients of organics in dilute aqueous solutions. *J Hazard Mater*, v.18, p.25-36, 1987.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2.ed. New York, McGraw-Hill, 1986.
- BALL, H. A.; JOHNSON, H. A.; REINHARD M.; SPORMANN A. M. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J Bacteriol*, v.178, n.19, p.5755-5761, 1996.
- BALOO, S.; RAMKRISHNA, D. Metabolic regulation in bacterial continuous cultures. *Biotech Bioeng*, v.38, n.11, p.1337-1352, 1991a.
- BALOO, S.; RAMKRISHNA, D. Metabolic regulation in bacterial continuous cultures. *Biotech Bioeng*, v.38, n.11, p.1353-1363, 1991b.
- BELLER, H. R.; SPORMANN, A. M. Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product. *J. Bacteriol*, v.180, p.5454-5457, 1998.
- BERTÃO, F. N. Desenvolvimento de software para projeto e simulação da operação de uma unidade de remediação de águas subterrâneas contaminadas por BTEX. 2007. 87p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- BERTONI, G.; BOLOGNESE, F.; GALLI, E.; BARBIERI, P. Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene and *o*-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzer* OX1. *Appl Environ Microbiol*, v.62, p.3704-3711, 1996.
- BIEGERT, T.; FUCHS, G.; HEIDER, J. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *J Biochem*, v.238, n.3, p.661-668, 1996.
- BIELEFELDT, A. R.; STENSEL, H. D. Modeling competitive inhibition effects during biodegradation of BTEX mixtures. *Wat Res*, v.33, n.3, p.707-714, 1999a.
- BIELEFELDT, A. R.; STENSEL, H. D. Biodegradation of aromatic compounds and TCE by a filamentous bacteria-dominated consortium. *Biodegradation*, v.10, p.1-13, 1999b.

- BONO, R.; BUGLIOSI, H. E.; SCHILIRÓ, T.; GILLI, G. The Lagrange Street story: the prevention of aromatics air pollution during the last nine years in a European city. *Atmos Environ*, v.35, p.107-113, 2001.
- BORDEN, R. C.; GOMES, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. *Ground Water*, v.33, p.180-189, 1995.
- BORGUETTI, N. R. B.; BORGUETTI, J. R.; FILHO, E. F. R. *O Aquífero Guarani*. 2004, Curitiba, p. 214.
- BRANDT, B. W.; KELPIN, F. D. L.; VAN LEEUWEN, I. M. M.; KOOIJMAN, S. A. L. M. Modelling microbial adaptation to changing availability of substrates. *Water Research*, v.38, p.1003-1013, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Disponível em: www.funasa.gov.br. Acesso: março 2006.
- BROHOLM, M. M.; ARVIN, E. Biodegradation of phenols in a sandstone aquifer under aerobic conditions and mixed nitrate and iron reducing conditions. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 44, p.239-273, 2000.
- BURLAGE, R. S.; HOOPER, S. W.; SAYLER, G. S. The TOL (pWWO) catabolic plasmid. *Appl Environ Microbiol*, v.55, p.1323-1328, 1989.
- BURLAND, S. M.; EDWARDS, E. A. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl Environ Microbiol*, v.65, n.2, p.529-533, 1999.
- CAPUANO, R. N.; JOHNSON, M. A. Geochemical reactions during biodegradation/vapor-extraction remediation of petroleum contamination in the vadose zone. *Ground Water*, v.34, p.31-40, 1996.
- CASASÚS, A. I.; HAMILTON, R. K.; SVORONOS, S. A.; KOOPMAN, B. A simple model for diauxic growth of denitrifying bacteria. *Water Res*, v.39, p.1914-1920, 2005.
- CAVALCA, L.; DI GENNARO, P.; COLOMBO, M.; ANDREONI, V.; BERNASCONI, S.; RONCO, I.; BESTETTI, G. Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. *Res Microbiol*, v.151, p.877-887, 2000.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Águas Subterrâneas, 2007. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/agua_sub/importancia.asp. Acesso em: setembro de 2007.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Águas Subterrâneas, 2007. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/postos/cadastro.asp>. Acesso em: setembro de 2007.

- CHAÎNEAU, C. H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci Total Environ*, v.227, n.2/3, p.237-247, 1999.
- CHANG, H.-L.; ALVAREZ-COHEN, L. Transformation capacities of chlorinated organics by mixed cultures enriched on methane, propane, toluene, or phenol. *Biotechnol Bioeng*, v.45, p.440-449, 1995
- CHANG, M.-K.; VOICE T. C.; CRIDDLE C. S. Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnol Bioeng*, v.41, p.1057-1065, 1993.
- CHOI, Y. B.; LEE, J. Y.; KIM, H. S. A novel bioreactor for the biodegradation of inhibitory aromatic solvents: experimental results and mathematical analysis. *Biotechnol Bioeng*, v.40, p.1403-1411, 1992.
- CHRISTENSEN, B. B.; HAAGENSEN, J. A. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S. Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl Environ Microbiol*, v.68, p.2495-2502, 2002.
- CHRISTENSEN, T. H.; BJERG, P. L.; BANWART, S. A.; JAKOBSEN, R.; HERON, G.; ALBRECHTSEN, H.-J. Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. *J Contam Hydrol*, v.45, p.165-241, 2000.
- CONTOIS, D. E. Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *J Gen Microbiol*, n.21, v.40, 1959.
- CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural biorremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil. *Water Sci Technol*, v. 35, p.9-16, 1996a.
- CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural biremediation of aquifer material contaminated with gasoline-ethanol mixtures. *Rev Microbiol*, v.27, n.1, p.19-26, 1996b.
- CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.4, n.1, n.2, p.71-75, 1999.
- CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Contaminação de águas subterrâneas por derrames de gasolina: O problema é grave? *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.2, n.2, p.50-54, 1997.
- CORSEUIL, H. X.; WEBER, W. J. Potential Biomass Limitations on Rates of Degradation of Monoaromatic Hydrocarbons by Indigenous Microbes in Subsurface Soils. *Water Res*, v.28, p.1407-1414, 1994.

- CORSEUIL, H.; HUNT, C.; FERREIRA, R. S.; ALVAREZ, P. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Water Res*, v.32, n.7, p.2065-2072, 1998.
- DAVEY, J. F.; GIBSON, D. T. Bacterial metabolism of para- and meta xylene: oxidation of a methyl substituent. *J Bacteriol*, v.119, n.1, p.923-929, 1974.
- DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixtures. *Bioremediation Journal*, v.4, n.1, p.1-9, 2000.
- DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Temperature effects and substrate Interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. *Biotechnol Bioeng*, v.62, n.5, p.526-536, 1999.
- DEEB, R. A.; HU, H.-Y.; HANSON, J. R.; SCOW, K. M.; ALVAREZ-COHEN, L. Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environ Sci Technol*, v.35, p.312-317, 2001.
- DEL'ARCO, J. P. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimentos arenosos. 1999. 171p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- deNARDI, I. R.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. *Water Sci Tech*, v.45, n.10, p.175-180, 2002.
- deNARDI, I. R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Kinetics of BTEX degradation in a packed-bed anaerobic reactor. *Biodegradation*, v.18, p.83-90, 2007.
- DOURADO, F. F. M. Tratabilidade de água subterrânea contaminada com hidrocarbonetos do petróleo. 1998. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DUETZ, W. A.; MARQUES, S.; JONG, C.; RAMOS, J. L.; VAN ANDEL, J. G. Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWWO) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression. *J Bacteriol*, v.176, p.2354-2361, 1994.
- DUETZ, W. A.; MARQUES, S.; WIND, B.; RAMOS, J. L.; VAN ANDEL, J. G. Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWWO under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. *Appl Environ Microbiol*, v.62, p.601-606, 1996.
- DUETZ, W. A.; WIND, B.; VAN ANDEL, J. G.; BARNES, M. R.; WILLIAMS, P. A.; RUTGERS, M. Biodegradation kinetics of toluene, m-xylene, p-xylene and their

- intermediates through the upper TOL pathway in *Pseudomonas putida* (pWWO). *Microbiology*, v. 143, p.2331-2338, 1998.
- DUNN, I. J.; HEINZLE, E.; INGHAM, J.; PRENOSIL, J. E. Biological Reaction Engineering, 1992.
- EDWARDS, V. H. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnol Bioeng*, v.12, p.679-712, 1970.
- ESENER, A. A.; ROELS, J. A.; KOSSEN, N. W. F.; ROOZENBURG, J. W. H. Description of microbial growth behaviour during the wash-out phase; determination of the maximum specific growth rate. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, v.13, p.141-144, 1981.
- ESSAID, H. I.; COZZARELLI, I. M.; EGANHOUSE, R. P.; HERKELRATH, W. N.; BEKINS, B. A.; DELIN, G. N. Inverse modelling of BTEX dissolution and biodegradation at the Bemidji, MN crude-oil spill site. *J Contam Hydrol*, v.67, p.269-299, 2003.
- FARRELL, A.; QUILTY, B. Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a meta-cleavage pathway. *Biodegradation*, v.10, p.353-362, 1999.
- FERNANDES, M. Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido à derramamento de gasolina. 2002. 212p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- FERNANDES, M. Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com gasolina. 1997. 115p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- FERNANDES, M.; BRICKUS, L. S. R.; MOREIRA, J. C.; CARDOSO, J. N. Atmospheric BTX and polyaromatic hydrocarbons in Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*, v.47, p.417-425, 2002.
- FERNANDES, M.; CORSEUIL, H. X. Contaminação de águas subterrâneas por derramamento de gasolina: Efeito co-solvência. In: SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 3., 1996, Gramado. Anais. Gramado: 1996, p.78-81.
- FERREIRA, S. B. Estudos laboratoriais para avaliação do potencial de contaminação de água e de solo por gasolina oxigenada. 2000. 197p. Tese (Doutorado em Geotecnia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Paulo.
- GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, v.12, n.5, p.325-335, 2001.

- GIBSON, D. T.; HENSLEY, M.; YOSHIOKA, H.; MARBY, T. J. Formation of (+/-)-cis-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, v.9, p.1626-1630, 1970.
- GIBSON, D. T.; KOCH, J. R.; KALLIO, R. E. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry*, v.7, p.2653-2662, 1968.
- GIBSON, D. T.; MAHADEVAN, V.; DAVEY, J. F. Bacterial metabolism of para- and meta-xylene: oxidation of the aromatic ring. *J of Bacteriol*, v.119, n.3, p.930-936, 1974.
- GIBSON, D. T.; SUBRAMANIAN, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: D.T. Gibson (ed.), *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Marcel Dekker, Inc. New York, NY, p.181-252, 1984.
- GLOVER, F. Future paths for integer programming and links to artificial intelligence. *Computers and Operations Research*, v.5, p.553-549, 1986.
- GRISHCHENKOV, V. G.; TOWNSEND, R. T.; MCDONALD, T. J.; AUTENRIETH, R. L.; BONNER, J. S.; BORONIN, A. M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochem*, v.35, p.889-96, 2000.
- GUHA, S.; PETERS, C.; JAFFE, P. Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, phenanthrene, and pyrene mixtures. *Biotechnol Bioeng*, v.65, p.491-499, 1999.
- GUSMÃO, V. R.; MARTINS, T. H.; CHINALIA, F. A.; SAKAMOTO, I. K.; THIEMANN, O. H. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. *Process Biochem*, v.41, p.1391-1400, 2006.
- GUSMÃO, V. R. Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator anaeróbio horizontal de leito fixo utilizado na remoção de BTEX. 2005. 174p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- HAIGLER, B. E.; PETTIGREW, C. A.; SPAIN, J. C. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas sp.* strain JS150. *Appl Environ Microbiol*, v.58, p.2237-2244, 1992.
- HAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOĞLU, T.; MEHMETOĞLU, U. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene and phenol mixtures. *Process Biochemistry*, v.39, p.27-35, 2003.

- HAMILTON, R.; CASASÚS, A.; RASCHE, M.; NARANG, A.; SVORONOS, S. A.; KOOPMAN, B. Structured model for denitrifier diauxic growth. *Biotechnol Bioeng*, v.90, n.4, p.501-508, 2005.
- HARDER, W.; DIJKHUIZEN, L. Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms. *Philos Trans R Soc London B*, v.297, p.459-480, 1982.
- HARMS, G.; ZENGLER, K.; RABUS, R.; AECKERSBERG, F.; MINZ, D.; ROSELLÓ-MORA, R.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, v.65, p.999-1004, 1999.
- HARWOOD, C. S.; GIBSON, J. Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *Journal of Bacteriology*, v.179, n.2, p.301-309, 1997.
- HEIDER, J.; SPORMANN, A. M.; BELLER, H. R.; WIDDEL, F. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev*, v.22, p.459-73, 1999.
- HEKMAT, D.; STEPHAN, M.; BAUER, R.; FEUCHTINGER, A.; VORTMEYER, D. Modelling of multispecies biofilm population dynamics in a trickle-bed bioreactor used for waste gas treatment. *Process Biochemistry*, v.41, p.1409-1416, 2006.
- HENDRICKX, B.; JUNCA, H.; VOSAHOVA, J.; LINDNER, A.; RÜEGG, I.; WITSCHER, M. B.; FABER, F.; EGLI, T.; MAU, M.; SCHLÖMANN, M.; BRENNEROVA, M.; BRENNER, V.; PIEPER, D. H.; TOP, E. M.; DEJONGHE, W.; BASTIAENS, L.; SPRINGAEL, D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods*, v.64, p.250-265, 2006.
- HOLLAND, J. H. Adaptation in natural and artificial systems. University of Michigan, Ann Arbor, MI, 1ed, 1975.
- HOLLIGER, C.; ZEHNDER, A. J. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol*, v.7, n.3, p.326-330, 1996.
- HUTCHINS, S. R. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. *Appl Environ Microbiol*, v.57, p.2403-2407, 1991.
- HUTCHINS, S. R. Biotransformation and mineralization of alkylbenzene under denitrifying conditions. *Environ Toxicology Chemistry*, v.12, p.1413-1423, 1993.
- HUTCHINS, S. R.; DOWNS, W. C.; WILSON, J. T.; SMITH, G. B.; KOVACS, D. A.; FINE, D. D.; DOUGLASS, R. H.; HENDRIX, D. J. Effect of nitrate addition on bioremediation of fuel-contaminated aquifer: Field demonstration. *Ground Water*, v.29, p.571-580, 1991.

- JACOB, F., MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*, v.3, p.318-356, 1961.
- JIANG, Y.; WEN, J.; BAI, J.; JIA, X.; HU, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *J of Hazard Materials*, v.147, p.672-676, 2007.
- 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 Hazardous Materials*, in press, 2007.
- JONES, K. D.; KOMPALA, D. S. Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. *J of Biotechnol*, v.71, p.105-131, 1999.
- JORGENSEN, C.; NIELSEN, B.; JENSEN, B. K.; MORTENSEN, E. Transformation of o-xylene to o-methyl benzoic acid by a denitrifying enrichment culture using toluene as the primary substrate. *Biodegradation*, v.6, n.2, p.141-146, 1995.
- JUNG, I.-G.; PARK, C.-O. Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, m-xylene (BTX), and their mixtures. *J of Bioscience Bioeng*, v.97, n.6, p.429-431, 2004.
- KAIPPER, B. I. A. Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel. 2003. 179p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- KANE, S. R.; BELLER, H. R.; LEGLER, T. C.; ANDERSON, R. T. Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation*, v.13, p.149-154, 2002.
- KAO, C. M.; WANG, C. C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. *Wat Res*, v.34, n.13, p.3413-3423, 2000.
- KELLY, W. R.; HORNBERGER, G. M.; HERMAN, J. S.; MILLS, A. L. Kinetics of BTX biodegradation and mineralization in batch and column systems. *J of Contaminant Hydrology*, v.23, p.113-132, 1996.
- KENNEDY, J.; EBERHART, R. *Swarm Intelligence*. Morgan Kaufmann Publishers, 2001, 512p.
- KERMANSHAHI POUR, A.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v.27, p.204-211, 2006.

- KIM, D.; CHAE, J. C.; ZYLSTRA, G. J.; KIM, Y. S.; KIM, S. K.; NAM, M. H.; KIM, Y. M.; KIM, E. Identification of a novel dioxygenase involved in metabolism of o-xylene, toluene, and ethylbenzene by *Rhodococcus* sp strain DK17. *Appl Environ Microbiol*, v.70, p.7086-7092, 2004.
- KIRKPATRICK, S.; GELLAT, D. C.; VECCHI, M. P. Optimization by Simulated Annealing. *Science*, v.220, p.671-680, 1983.
- KLEČKA, G. M.; MAIER, W. J. Kinetics of microbial growth on mixtures of pentachlorophenol and chlorinated aromatic compounds. *Biotechnol Bioeng*, v.31, p. 328-335, 1988.
- KOMPALA, D. S.; RAMKRISHNA, D.; JANSEN, N. B.; TSAO, G. T. Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models. *Biotechnol Bioeng*, v.28, p.1044-1055, 1986.
- KOMPALA, D. S.; RAMKRISHNA, D.; TSAO, G. T. Cybernetic modeling of microbial growth on multiple substrates. *Biotechnol Bioeng*, v.26, p.1272-1281, 1984.
- KOTTURI, G.; ROBINSON, C. W.; INNIS, W. E. Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.34, p.539-543, 1991.
- KOUSSIS, A. D.; PESMAJOGLOU, S.; SYRIOPOULOU, D. Modelling biodegradation of hydrocarbons in aquifers: when is the use of the instantaneous reaction approximation justified? *J of Contaminant Hydrology*, v.60, p.287-305, 2003.
- KROUMOV, A. D. Model of *Ruminococcus albus* bacterial growth on cellobiose-xylose mixture. In: SEMINAR ON ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIOMASS, 5., 1999, Maringá-PR, Brasil, 1999.
- KROUMOV, A. D.; MÓDENES, A. N.; TAIT, M. C. A. Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *Bioch Engineering Journal*, v.28, p.243-255, 2006.
- KUHN, E. P.; COLBERG, P. J.; SCHNOOR, J. L.; WANNER, O.; ZEHNDER, A. J. B.; SCHWARZENBACH, R. P. Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: Laboratory column studies. *Environ Science Technol*, v.19, p.961-968, 1985.
- KUKOR, J. J.; OLSEN, R. H. Genetic organization and regulation of a meta cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol, and cresols by *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J Bacteriol*, v.173, p.4587-4594, 1991.
- KUMAR, A.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Bioch Engineering Journal*, v.22, p.151-159, 2005.

- LEE, J.-Y.; JUNG, K. H.; CHOI, S. H.; KIM, H.-S. Combination of the *tod* and the *tol* pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene, and p-xylene mixture. *Appl Environ Microbiol*, v.61, n.6, p.2211-2217, 1995a.
- LEE, J.-Y.; ROH, J.-R.; KIM, H.-S. Amplification of toluene dioxygenase genes in a hybrid *Pseudomonas* strain to enhance the biodegradation of benzene, toluene and p-xylene mixture. *Biotechnol Bioeng*, v.45, n.11, p.488-494, 1995b.
- LEE, K.; GIBSON, D. T. Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas sp.* strain NCIB 9816-4. *Appl Environ Microbiol*, v.62, n.9, p.3101-3106, 1996.
- LENDENMANN, U.; SNOZZI, M.; EGLI, T. Kinetics of the simultaneous utilization of sugar mixtures by *Escherichia coli* in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*, v. 62, p.1493-1499, 1996.
- LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. 1ed., São Paulo. Editora Edgard Blücher LTDA, 2001, v.2, 541p.
- LIN, B., MILEER, D. C. Tabu search algorithm for chemical process optimization. *Computers and Chemical Engineering*, v.28, p.2287-2306, 2004.
- LIN, C.-W.; CHENG, Y.-W.; TSAI, S.-L. Multisubstrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, in press, 2007.
- LINKFIELD, T.; SUFLITA, J.; TIEDJE, J. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of chlorobenzoates. *Appl Environ Microbiol*, v.55, p.2773-2778, 1989.
- LIU, P. H.; SVORONOS, S. A.; KOOPMAN, B. Experimental and modeling study of diauxic lag of *Pseudomonas denitrificans* switching from oxic to anoxic conditions. *Biotechnol Bioeng*, v.60, p.649-655, 1998.
- LODAYA, M. P. Biodegradation of benzene and a BTX mixture using immobilized activated sludge. 1989. 113p. Thesis (Doctor of Engineering Science in Chemical Engineering) – Faculty of the Graduate School of the New Jersey Institute of Technology.
- LODAYA, M.; LAKHWALA, F.; RUS, E.; SINGH, M.; LEWANDOWSKI, G.; SOFER, S. Biodegradation of benzene and BTX mixture using immobilized activated sludge. *J Environ Sci Health*, v.26, n.1, p.121-137, 1991.

- LOURENÇO, E. S. O. Avaliação físico-química da remediação de solos contaminados por BTEX. 2006. 116p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.
- LOVANH, N.; HUNT, C. S.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. *Water Res*, v.36, p.3739-3746, 2002.
- LOVLEY, D. R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v.18, p.75-81, 1997.
- LOVLEY, D. R.; WOODWARD, J. C.; CHAPELLE, F. H. Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe (III) forms. *Appl Environ Microbiol*, v.62, p.288-291, 1996.
- MACKAY, D.; CHERRY, J. A. Groundwater contamination: Pump and treat remediation. *Environmental Science & Technology*, v.23, p.7-13, 1989.
- MAINI, G.; SHARMAN, A. K.; KNOWLES, C. J.; SANDERLAND, G.; JACKMAN, S. A. Electrokinetic remediation of metals and organics from historically contaminated soil. *J of the Chemical Technol Biotechnol*, v.75, p.657-664, 2000.
- MAK, K. S.; GRIEBLER, C.; MECKENSTOCK, R. U.; LIEDL, R.; PETER, A. Combined application of conservative transport modelling and compound-specific carbon isotope analyses to assess in situ attenuation of benzene, toluene, and o-xylene. *J of Contaminant Hydrology*, v.88, p.306-320, 2006.
- MALAMUD, E. S. T.; JÚNIOR C. J. A.; Rosário, M.; CORSEUIL, H. X. Avaliação da atenuação natural dos contaminantes BTEX e etanol em um derramamento controlado de gasolina através do balanço de massa. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23.,2005, Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- MALIYEKKAL, S. M.; RENE, E. R.; PHILIP, L.; SWAMINATHAN, T. Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. *J Hazard Mater*, v.109, n.1-3, p.201-11, 2004.
- MANZOCHI, C. I. S. Gerenciamento Ambiental de Postos de Serviços Automotivos. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MARTINS, D. O. Estudo do controle de emissões de compostos orgânicos voláteis em tanques de armazenamento de produtos químicos. 2004. 181p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

- MARUYAMA, T.; ISHIKURA, M.; TAKI, H.; SHINDO, K.; KASAI, H.; HAGA, M. Isolation and characterization of o-xylene oxygenase genes from *Rhodococcus opacus* TKN14. *Appl Environ Microbiol*, in press, 2005.
- MATHEUS, D. R. Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros. 1997. 162p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- MAXIMIANO, A. M. S. Determinação de níveis aceitáveis no ambiente para hidrocarbonetos utilizando o procedimento de ações corretivas baseadas no rico (RBCA), aplicação para cidade São Paulo. 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MEGEE, R. D.; DRAKE, J. F.; FREDRICKSON, A. G.; TSUCHIYA, H. M. Studies in intermicrobial symbiosis *S. cerevisiae* and *L. casei*. *Canadian. J Microbiol*, v.18, p.1733-1742, 1972.
- MENDES, R. Exposição ocupacional ao benzeno e seus efeitos sobre a saúde dos trabalhadores. *Revista da Associação Médica do Brasil*, v.39, p.249-256, 1993.
- METCALF, EDDY. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*, 3. ed., New York, McGraw-Hill, 1996, 1334p.
- MEYER, J. S.; MARCUS, M. D.; BERGMAN, H. L. Inhibitory interactions of aromatic organics during microbial degradation. *Environ Toxicol Chem*, v.3, p.583–587, 1984.
- MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. *Adv Env Res*, vol.7, n.4, p.881-887, 2003.
- MILLER, A. D. Remediação de fase livre de gasolina por bombeamento duplo: estudo de caso. 2001. 133p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MINDRISZ, A. C. Avaliação da contaminação da água subterrânea de poços tubulares, por combustíveis fósseis, no município de Santo André, São Paulo: Uma contribuição à gestão ambiental. 2006. 231p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MIRPURI, R.; JONES, W.; BRYERS, J. D. Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnol Bioeng*, v.53, p.535-546, 1997.
- MØLLER, S.; STERNBERG, C.; ANDERSEN, J. B.; CHRISTENSEN, B. B.; RAMOS, J. L.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of

- metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol*, v.64, p.721-732, 1998.
- MONOD, J. Research on the growth of bacterial cultures. *Actualités Scientifique et Industrielles*, v.911, p.1-215 (in French), 1942.
- MONOD, J. The phenomenon of enzymatic adaptation and its bearings on problems of genetics and cellular differentiation. *Growth*, v.11, p.223-289, 1947.
- MONTENEGRO, M. A. P. Avaliação da performance de um reator anaeróbio híbrido (RAH) e da atividade das populações de microrganismos anaeróbios na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP). 2001. 222p. Tese (Doutorado) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- MORASCH, B.; SCHINK, B.; TEBBE, C. C.; MECKENSTOCK, R. U. Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Archives of Microbiol*, p.1-22, 2004.
- MORGAN, P.; STEPHEN, T.; WATKINSON, R. J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in gas-condensate-contaminated groundwater. *Environmental Pollution*, v.82, p.181-190, 1993.
- MOSER, H. The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. *Carnegie Institution of Washington*, 1958.
- NAKAGAWA, T.; SATO, S.; YAMAMOTO, Y.; FUKUI, M. Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. *Water Res*, v.36, n.11, p.2813-23, 2002.
- NAKHLA, G. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds-impact of process variables and scale up implications. *Water Res*, v.37, p.1296-1307, 2003.
- NARANG, A. Comparative analysis of some models of gene regulation in mixed-substrate microbial growth. *J of Theoretical Biology*, v.246, p.489-501, 2006.
- NARANG, A., KONOPKA, A., RAMKRISHNA, D. The dynamics of microbial growth on mixtures of substrates in batch reactors. *J Theoretical. Biol*, v.84, p.301-317, 1997.
- NEGRÃO, P. Extração de compostos orgânicos voláteis de águas subterrâneas através de *air strippers*. *Clean News*. São Paulo. n.5, 2002. Disponível em: www.clean.com.br. Acesso em: agosto de 2006.
- NEWMAN, L. M.; WACKETT, L. P. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochem*, v.34, p.14066-14076, 1995.

- NICHOLSON, C. A.; FATHEPURE, B. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*, v.70, n.2, p.1222-1225, 2004.
- NOBRE M. M., NOBRE, R. C. M. Remediação de solos: Técnicas alternativas melhoram desempenho. *Química e Derivados*, n.417, 2003.
- NOCENTINI, M.; PINELI, D.; FAVA, F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere*, v.41, n.8, p.1115-1123, 2000.
- NUHOGLU, A.; YALCIN, B. Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*, v.40, p.1233-1239, 2005.
- NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. A importância da biodegradação anaeróbica em aquíferos impactados por gasolina e etanol. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23., 2005, Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- OH, Y.-S.; BARTHA, R. Construction of a bacterial consortium for the biofiltration of benzene, toluene and xylene emissions. *World J Microbiol Biotechnol*, v.13, p.627-632, 1997.
- OH, Y.-S.; SHAREEFDEEN, Z.; BALTZIS, B. C.; BARTHA R. Interactions between benzene, toluene and p-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnol Bioeng*, v.44, p.533-538, 1994.
- OLIVEIRA, E. Contaminação de aquíferos por hidrocarbonetos provenientes de vazamento subterrâneo. 1992. 112p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- OLIVEIRA, L. D. Análise de desempenho e complexidade dos algoritmos swarm e swarm quântico aplicados à detecção multiusuário em sistemas DS-CDMA. 2005. 61p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- OLSEN, R. H.; KUKOR, J. J.; KAPHAMMER, B. A novel toluene-3-mono-oxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J Bacteriol*, v.176, p.3749-3756, 1994.
- PATNAIK, P. R. Are microbes intelligent beings? An assessment of cybernetic modeling. *Biotechnol Advances*, v.18, p.267-288, 2000.
- PHELPS, C. D.; KERKHOF, L. J.; YOUNG, L. Y. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiol Ecol*, v.27, p.269-279, 1998.

- PHELPS, C. D.; YOUNG, L. Y. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation*, v.10, p.15-25, 1999.
- PHELPS, C. D.; YOUNG, L. Y. Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Adv Agronomy*, v.70, p.329-357, 2001.
- PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J. T. C.; GROENESTIJN, W. J. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Appl Environ Microbiol*, v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.
- PRUDEN, A. J. Biodegradation of methyl-tert-butyl ether. 2002. 211p. Thesis (Title of PhD in Environmental Science) – College of Engineering, University of Cincinnati.
- PRUDEN, A.; SEDRAN, M. A.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. Biodegradation of MTBE and BTEX in an aerobic fluidized-bed reactor. *Water Sci Technol*, v.47, n.9, p.123-128, 2003.
- PRUDEN, A.; SUIDAN, M. T. Effect of benzene, toluene, ethylbenzene and p-xylene (BTEX) on biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA) by pure bacterial culture UC1. *Biodegradation*, v.15, n.4, p.213-227, 2004.
- RABUS, R.; WIDDEL, F. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol*, v.163, n.2, p.96-103, 1995.
- RAHBEH, M. E.; MOHTAR, R. H. Application of multiphase transport models to field remediation by air sparging and soil vapor extraction. *J of Hazardous Materials*, v.143, p.156-170, 2007.
- RAMKRISHNA, R.; RAMKRISHNA, D.; KONOPKA, A. E. Cybernetic modeling of growth in mixed, substitutable substrate environments: preferential and simultaneous utilization. *Biotechnol Bioeng*, v. 52, p.141-151, 1996.
- RATHFELDER, K. M.; LANG, J. R.; ABRIOLA, L. M. A numerical model (MISER) for the simulation of coupled physical, chemical and biological processes in soil vapor extraction and bioventing systems. *J Contam Hydrol*, v.43, p.239-270, 2000.
- REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. B.; DUTEAU, N. M.; KIM, K.-H. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environ Health Perspectives*, v.110, suppl.6, p.1005-1011, 2002.
- REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. D. B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol Bioeng*, v.69, p. 385-400, 2000.

- REBOUÇAS, A. C. A política nacional de recursos hídricos e as águas subterrâneas. Ver. *Águas Subterrâneas* n.16, p.1-13, maio 2002.
- REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. Águas doces no Brasil: Capital ecológico, uso e conservação. 2.ed. São Paulo: Escrituras, 2002. 702p.
- RIBEIRO, R. Recuperação de águas contaminadas com gasolina utilizando reatores de leito fixo. 2005. 186p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- RICHNOW, H. H.; ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; MECKENSTOCK, R. U. Microbial in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation. *J Contamin Hydrol*, v.65, p.101-120, 2003.
- RINALDI, A. Degradação de BTEX em solo contaminado, através de processos oxidativos avançados utilizando peróxido de hidrogênio e permanganato de potássio. 2006. 100p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.
- ROBERTSON, B. R.; BUTTON, D. K. Toluene induction and uptake kinetics and their inclusion in the specific-affinity relationship for describing rates of hydrocarbon metabolism. *Appl Environ Microbiol*, v.53, n.9, p.2193-2205, 1987.
- RODRIGUES, K. A. Uso de reatores biológicos com fungos para a remoção de fenol de água residuária sintética. 2006. 125p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- ROGERS, J. B.; READON, K. F. Modelling substrate interactions during the biodegradation of mixtures of toluene and phenol by *Burkholderia species* JS150. *Biotech Bioeng*, v.70, p.428-435, 2000.
- ROONEY-VARGA, J. N.; ANDERSON, R. T.; FRAGA, J. L.; RINGELBERG, D.; LOVLEY, D. R. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol*, v.65, n.7, p.3056-3063, 1999.
- SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potential. *Process Biochemistry*, v.39, p.1001-1006, 2004.
- SCHIRMER, M.; BUTLER, B. J.; ROY, J. W.; FRIND, E. O.; BARKER, J. F. A relative-least-squares technique to determine unique Monod kinetic parameters of BTEX compounds using batch experiments. *J of Contam Hydrology*, v.37, p.69-86, 1999.

- SCHMIDT, S. K.; ALEXANDER, M. Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations. *Appl Environ Microbiol*, v.49, p.822-827, 1985.
- SCHNEIDER, M. R.; SILVEIRA, O. D.; CORSEUIL, H. X. Intemperismo da gasolina com etanol em sistemas subsuperficiais. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23., 2005, Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- SCHREIBER, M. E.; BAHR, J. M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. *J Contain Hydrol*, v.55, p.29-56, 2002.
- SCHRÖDER, M.; MÜLLER, C.; POSTEN, C.; DECKWER, W. D.; HECHT, V. Inhibition kinetics of phenol degradation from unstable steady-state data. *Biotechnol Bioeng*, v.54, p.567-576, 1997.
- SEDRAN, M. A. MTBE and BTEX biodegradation in a porous pot and a fluidized bed reactor. 2004. 158p. Thesis (Title of PhD in Environmental Engineering) – College of Engineering, University of Cincinnati.
- SEDRAN, M. A.; PRUDEN, A.; WILSON, G. J.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. Effect of BTEX on the degradation of MTBE and TBA by a mixed bacterial consortium. *ASCE J Environ Eng*, v.128, p.830-835, 2002.
- SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. New York: John Wiley & Sons, 1975.
- SEKER, S.; BEYENAL, H.; SALIH, B.; TANYOLAC, A. Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.47, p.610-614, 1997.
- SHALABY, M. EL-S. A. EL-H. Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4. 2003. 143p. Thesis (Title of PhD) – Biochemical Engineering Division GBF, Alemanha.
- SHIM, H.; HWANG, B.; LEE S.-S., KONG S.-H. Kinetics of biodegradation of BTEX by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. *Biodegradation*, v.16, 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*. *Advances in Environmental Research*, v.7, p.203-216, 2002.
- SHIM, H.; YANG, S.-T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *J Biotechnol*, v.67, n.2-3, p.99-112, 1999.

- SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UENISHI, H.; UCHIHASHI, Y.; HIRAISHI, A.; YUKAWA, H.; YURIMOTO, H.; KATO, N. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl Environ Microbiol*, v.70, n.3, p.1385-1392, 2004.
- SILVA, C. C. G. Otimização de uma unidade de *air-stripping* para remover BTEX de águas residuárias. UNICAMP, 2004. 229p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí. *Caderno Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.18, n.6, p.1599-1607, 2002.
- SKUBAL, K. L.; BARCELONA, M. J.; ADRIAENS, P. An assessment of natural biotransformation of petroleum hydrocarbons and chlorinated solvents at an aquifer plume transect. *J of Contaminant Hydrology*, v.49, p.151-169, 2001.
- SOKOL, W. Uptake rate of phenol by *Pseudomonas putida* grown in unsteady state. *Biotechnol Bioeng*, v.32, p.1097-1103, 1988.
- SOO CHO, J.; DiGIULIO, D. C.; WILSON, J. T. In situ air injection, soil vacuum extraction and enhanced biodegradation: A case study in a jp-4 jet fuel contaminated site. *Environ Progress*, v.16, p.35-42, 1997.
- SPAIN, J. C.; GIBSON, D. T. Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. JS6. *Appl Environ Microbiol*, v.54, p.1399-1404, 1988.
- SPAIN, J. C.; ZYLSTRA, G. J.; BLAKE, C. K.; GIBSON, D. T. Monohydroxylation of phenol and 2,5-dichlorophenol by toluene dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1. *Appl Environ Microbiol*, v.55, p.2648-2652, 1989.
- SPILBORGS, M. C. F. Biorremediação de aquíferos contaminado com hidrocarbonetos. 1997. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo Instituto de Geociências, São Paulo.
- SPORMANN, A. M.; WIDDEL, F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, v.11, p.85-105, 2001.
- TESSIER, G. Croissance des populations bactériennes et quantité d'aliment disponible. *Rev Sci Paris*, 80-209, 1942.

- TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Rev Quím Nova*, v.27, n.3, p.441-446, 2004.
- TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A.; LEAL, E. S. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. *Rev Quim Nova*, v.28, n.1, p.61-64, 2005.
- TROVÃO, R. S. Análise ambiental de solos e águas subterrâneas contaminadas com gasolina: Estudo de caso no município de Guarulhos – SP. 2006. 157p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- TSAO, C.-W.; SONG, H.-G.; BARTHA, R. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Appl Environ Microbiol*, v.64, n.12, p.4924-4929, 1998.
- TSAO, G. T.; HANSON, T. P. Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. *Biotechnol Bioeng*, v.17, p.1591-1598, 1975.
- VENKATARAMANI, E. S.; AHLERT, R. C. Role of cometabolism in biological oxidation of synthetic compounds. *Biotechnol Bioeng*, v. 27, p.1306-1311, 1985.
- VILLATORO-MONZÓN, W. R.; MESTA-HOWARD, A. M.; RAZO-FLORES, E. Anaerobic biodegradation of BTEX using Mn(IV) and Fe(III) as alternative electron acceptors. *Water Sci Technol*, v.48, n.6, p.125–31, 2003.
- WALTER, M. V.; CRAWFORD, R. L. Overview: Biotransformation and Biodegradation. *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, cap. 76, p.707-708, 1997.
- WANG, S.-J.; LOH, K.-C. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of a conventional carbon source. *Biotechnol Bioeng*, v.68, p.437-447, 2000.
- WANG, S.-J.; LOH, K.-C. Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme Microb Technol*, v.25, p. 177-184, 1999.
- WEBB, J. L. Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press, Boston, USA, 1963.
- WEINER, J. M.; LOVLEY, D. R. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Appl Env Microbiol*, v.64, n.5, p.1937-1939, 1998.
- WHITED, G. M.; GIBSON, D. T. Toluene-4-mono-oxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J Bacteriol*, v.173, p.3010-3016, 1991.
- WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol*, v.12, p.259-276, 2001.

- WILLIAMS, P. A.; MURRAY, K. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol*, v.120, p.416-423, 1974.
- WILSON, G. J.; PRUDEN, A.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. Biodegradation kinetics of MTBE in laboratory batch and continuous flow reactors. *ASCE J Environ Eng*, v.128, p.824-829, 2002.
- WU, Y. C.; HAO, O. J.; OU, K. C.; SCHOELZE, R. J. Treatment of leachate from solid waste landfill site using a two-stage anaerobic filter. *Biotechnol Bioeng*, v.31, p.257-266, 1988.
- YADAV, J. S.; REDDY, C. A. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, v.59, p.756-762, 1993.
- YANO, T.; KOGA, S. Dynamic behaviour of the chemostat subject to substrate inhibition. *Biotechnol Bioeng*, v.11, p.139-153, 1969.
- YANO, T.; NAKAHARA, T.; KAMIYAMA, S.; YAMADA, K. Kinetic studies on microbial activities in concentrated solutions. I. Effect of excess sugars on oxygen uptake rate of a cell-free respiratory system. *Agric Biol Chem*, v.30, p.42-48, 1966.
- YEN, K.-M.; KARL, M. R.; BLATT, L. M.; SIMON, M. J.; WINTER, R. B.; FAUSSET, P. R.; LU, H. S.; HARCOURT, A. A.; CHEN, K. K. Cloning and characterization of a *Pseudomonas putida* KR1 gene cluster encoding toluene-4-mono-oxygenase. *J Bacteriol*, v.173, p.5315-5327, 1991.
- YOON, H.; KLINZING, G.; BLANCH, H. W. Competition for mixed substrates by microbial populations. *Biotechnol Bioeng*, v.19, p.1193-1210, 1977.
- ZEIN, M. M.; PINTO, P. X.; GARCIA-BLANCO, S.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. Treatment of groundwater contaminated with PAHs, gasoline hydrocarbons, and methyl tert-butyl ether in a laboratory biomass-retaining bioreactor. *Biodegradation*, v.17, p.57-69, 2006.
- ZYLSTRA, G. J.; GIBSON D. T. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: nucleotide sequence of the todC1C2BADE genes and their expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, v.264, p.14940-14946, 1989.
- ZYLSTRA, G. J. Molecular analysis of aromatic hydrocarbon degradation. In: *Molecular Environmental Biology*, ed. S. J. Garte. Lewis Publishers. Boca Raton, 1994.

Anexos

Os caminhos metabólicos de utilização dos compostos BTEX e de outros compostos tóxicos estão incluídos atualmente na base de dados da universidade de Minesota (<http://umbbd.msi.umn.edu>). A seguir, são apresentados os caminhos completos de biodegradação aeróbica e anaeróbica dos compostos BTEX.

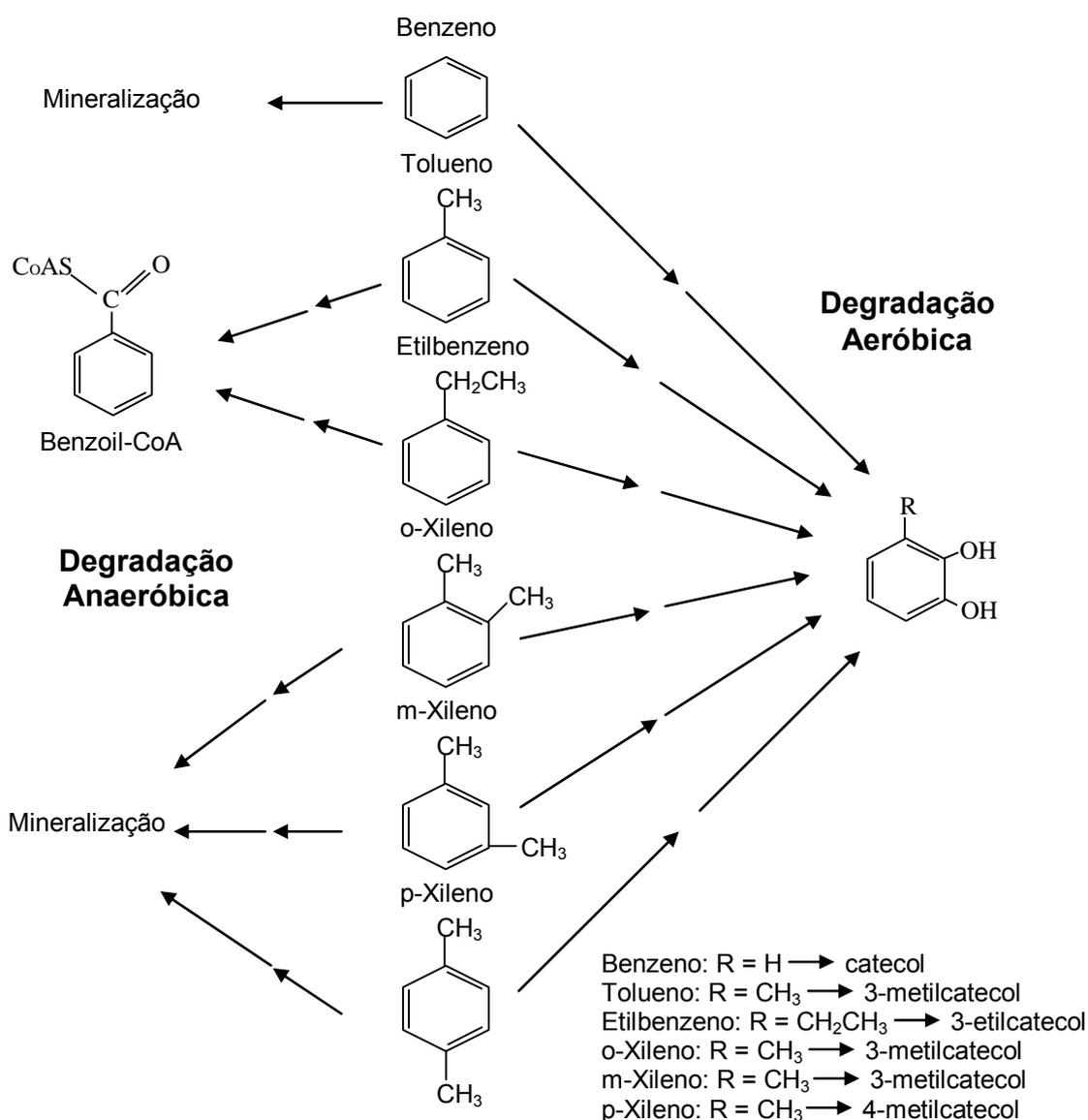


Ilustração 1 – Esquema da degradação aeróbica e anaeróbica dos compostos BTEX.

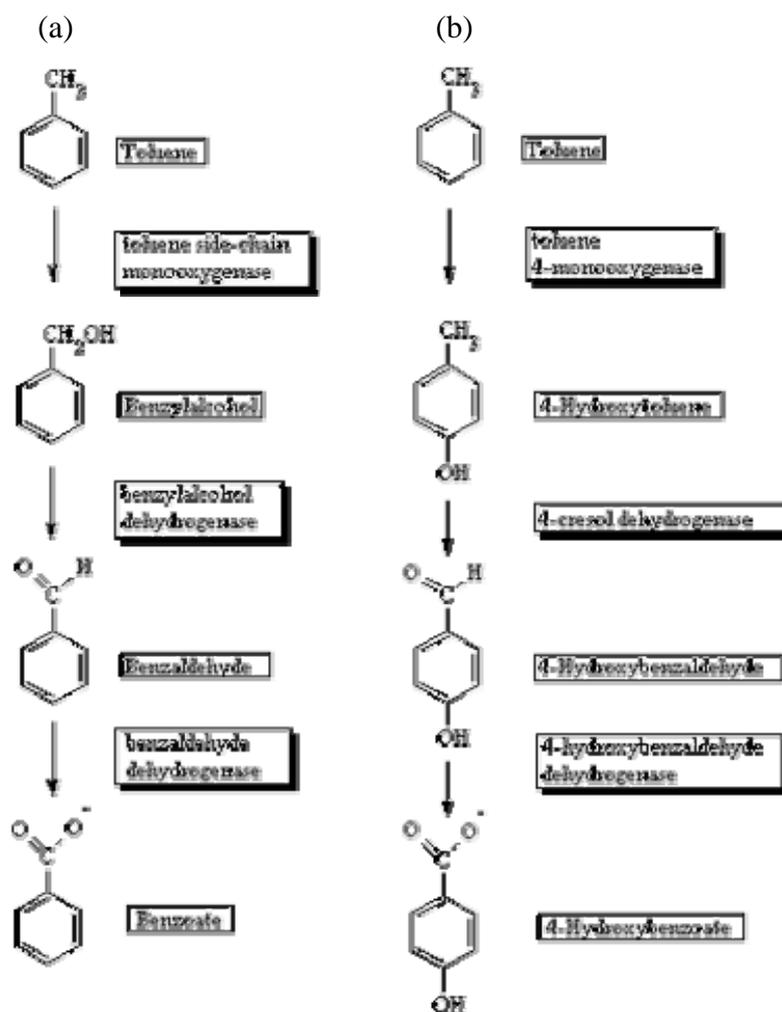


Ilustração 2 – Caminhos metabólicos da biodegradação aeróbica do tolueno utilizando-se (a) *Pseudomonas putida* mt-2 e (b) *Pseudomonas mendocina* KR1.

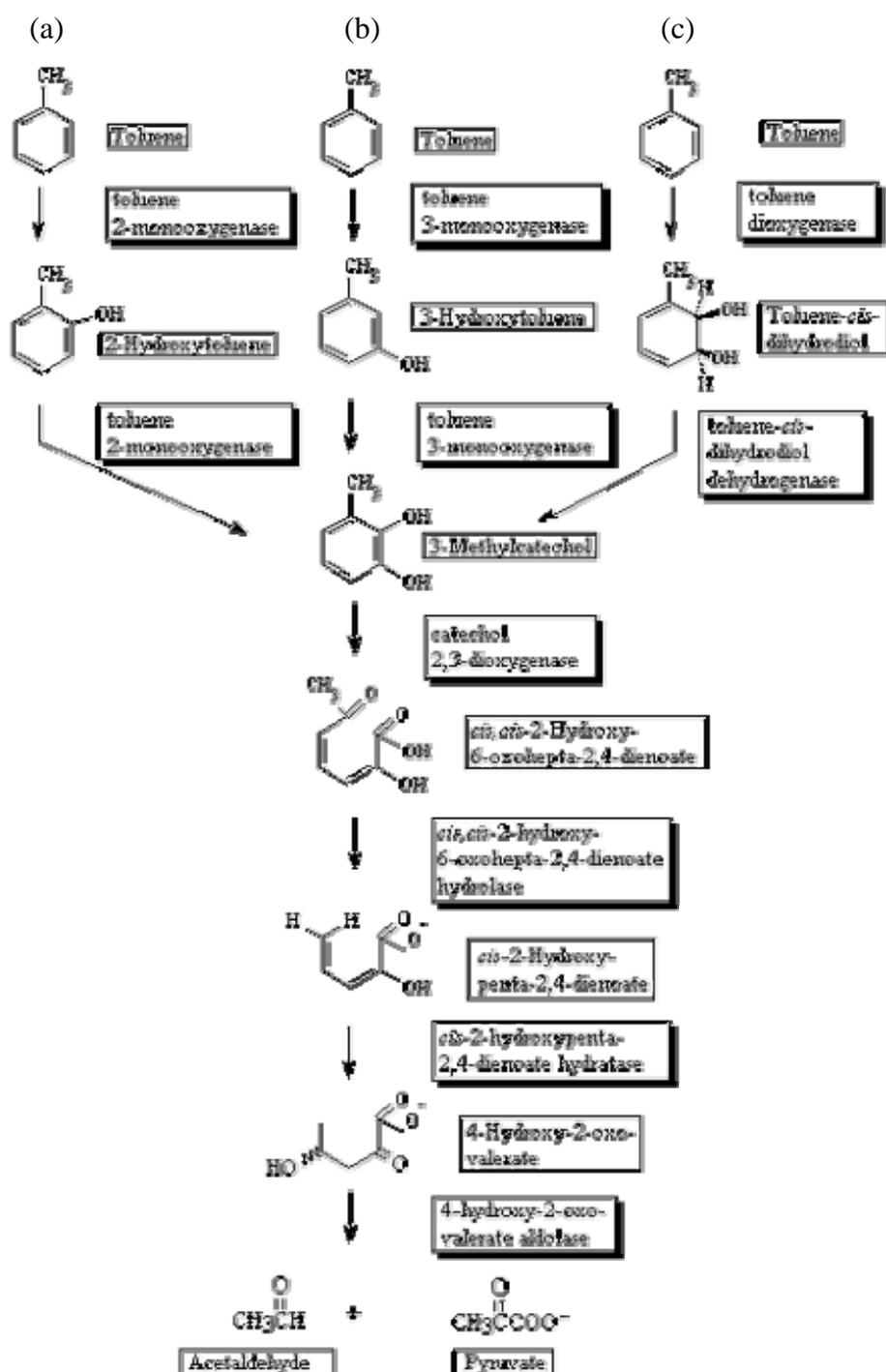


Ilustração 3 – Caminhos metabólicos da biodegradação aeróbica do tolueno utilizando-se (a) *Burkholderia* G4, (b) *Pseudomonas pickettii* PKO1 e (c) *Pseudomonas putida* F1.

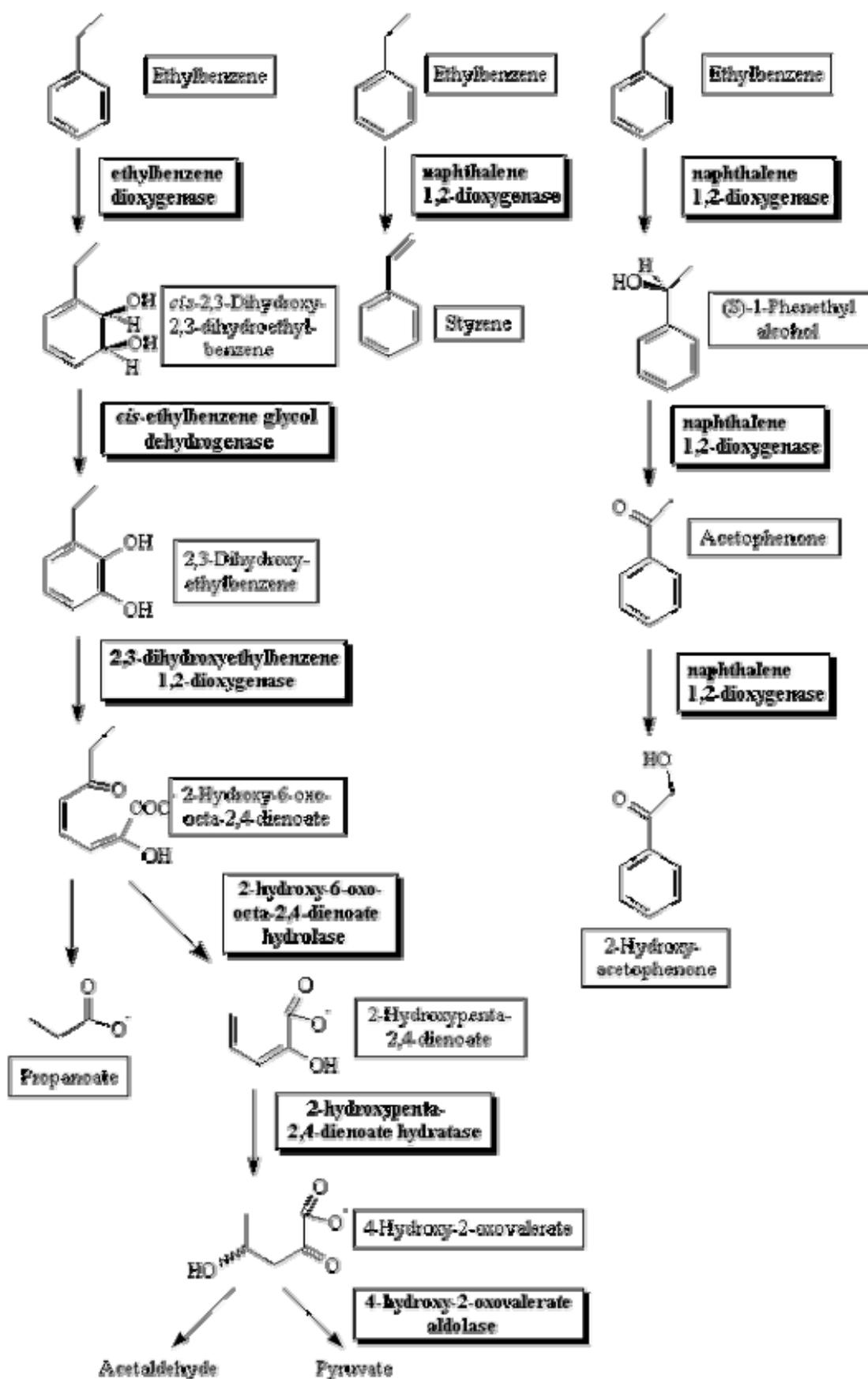


Ilustração 4 – Caminhos metabólicos da biodegradação aeróbica do etilbenzeno utilizando-se *Pseudomonas sp.* NCIB.

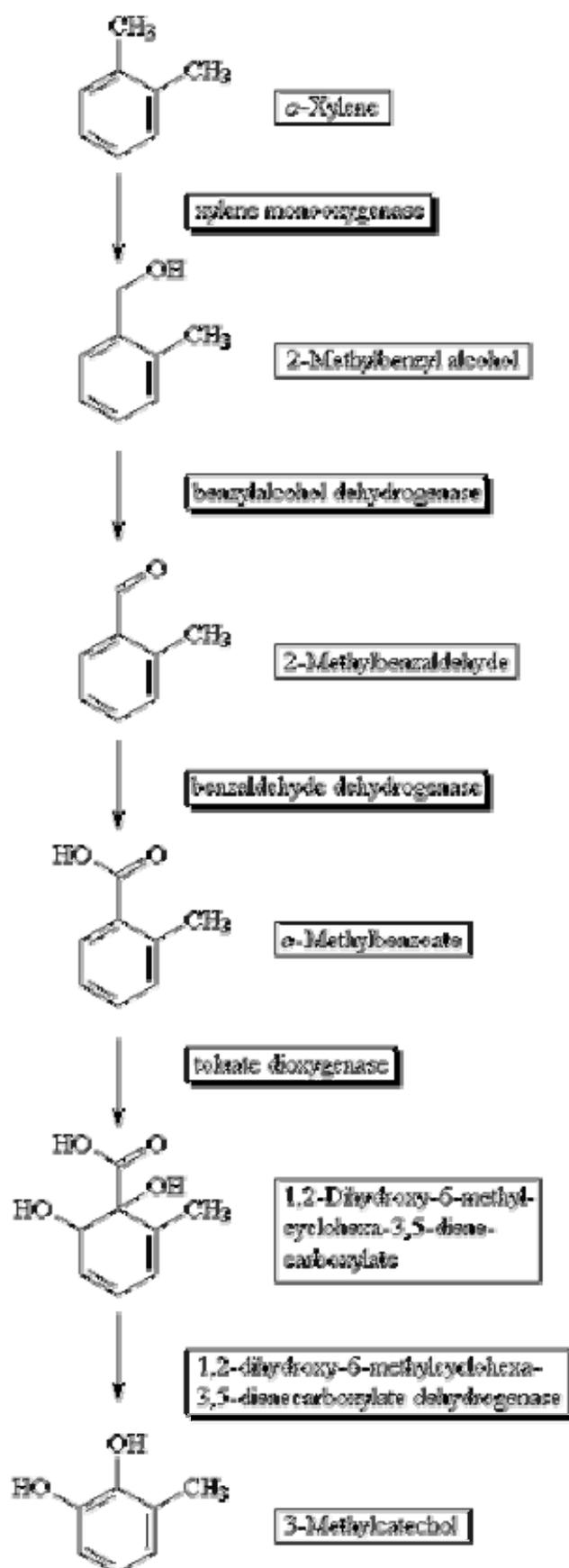


Ilustração 5 – Caminho metabólico da biodegradação aeróbica do o-xileno utilizando-se *Burkholderia cepacia* MB2.

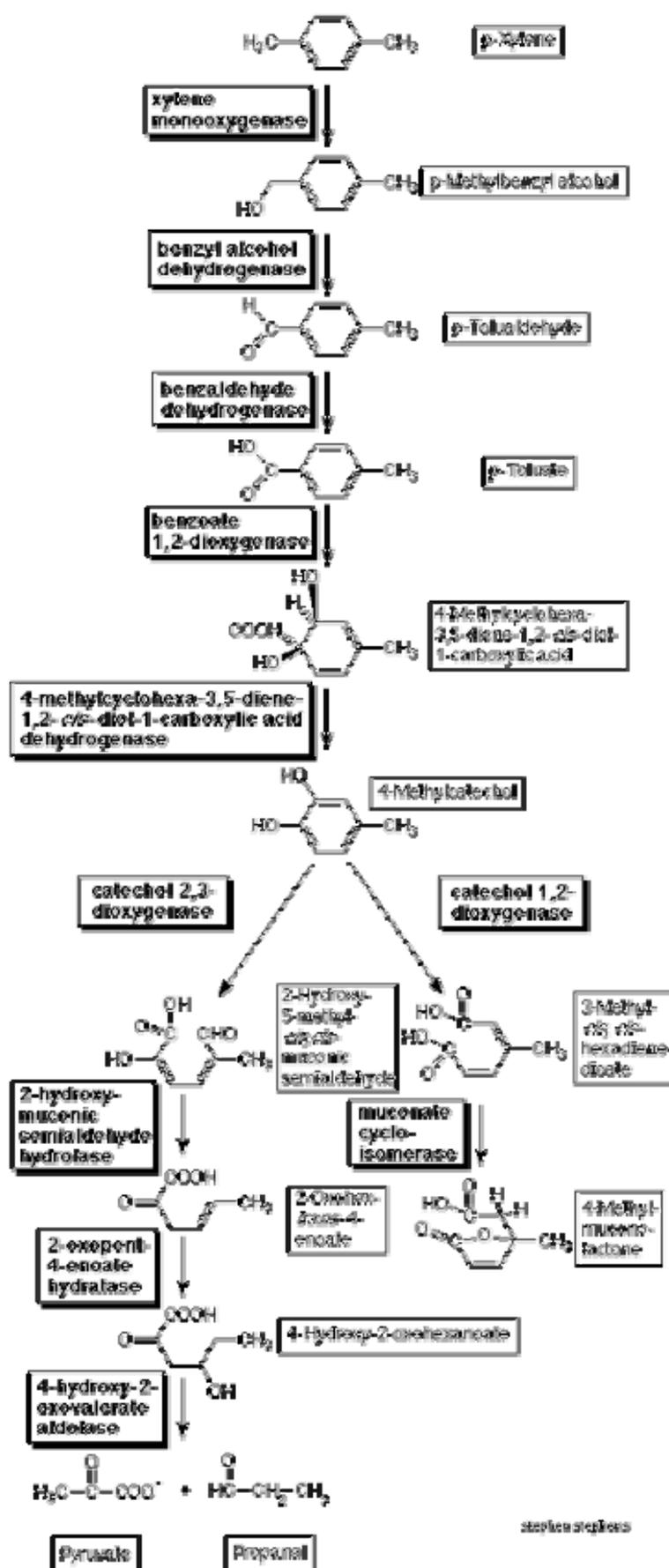


Ilustração 6 – Caminhos metabólicos da biodegradação aeróbica do p-xileno utilizando-se *Pseudomonas putida*.

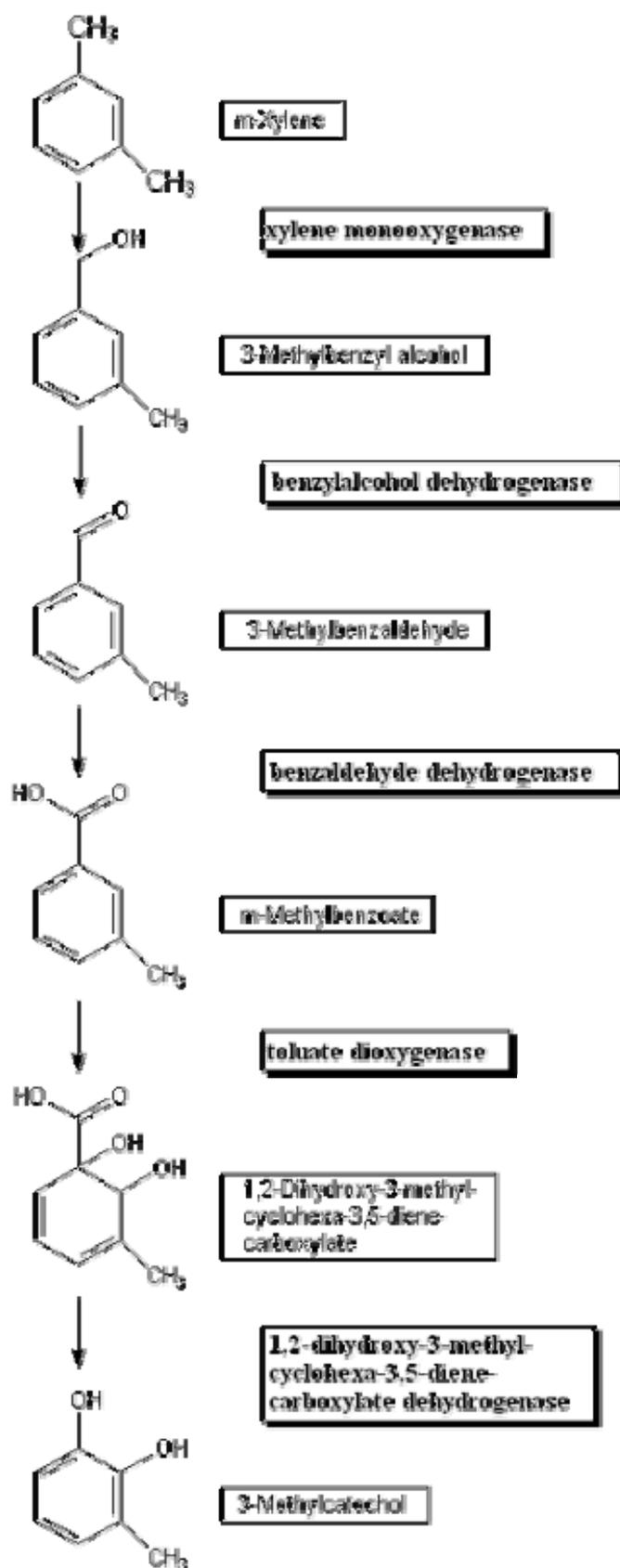
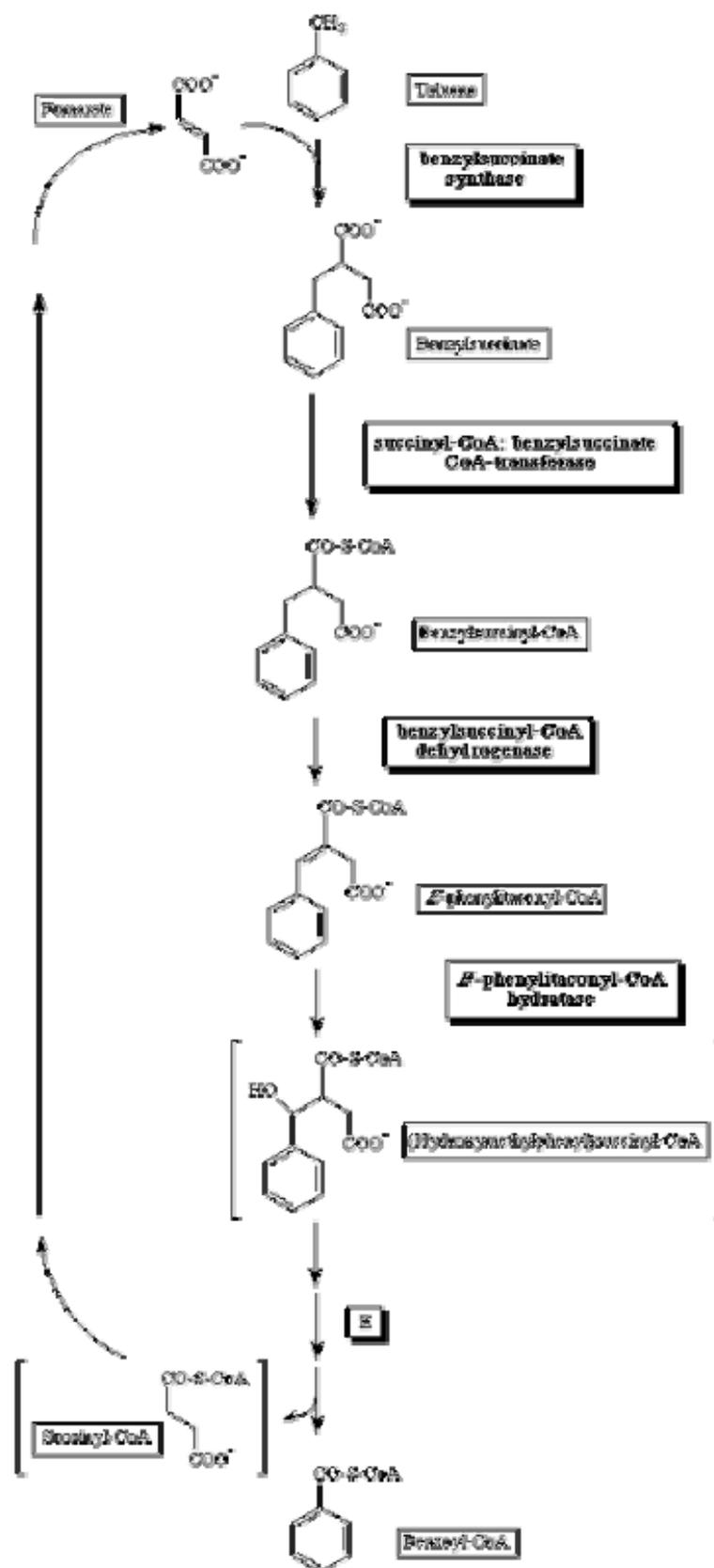


Ilustração 7 – Caminho metabólico da biodegradação aeróbica do m-xileno utilizando-se *Pseudomonas putida* mt-2.



Alfred Spormann and Eric Young

Ilustração 8 – Caminho metabólico da biodegradação anaeróbica do tolueno utilizando-se *Azoarcus sp. T* ou *Thauera aromática*.

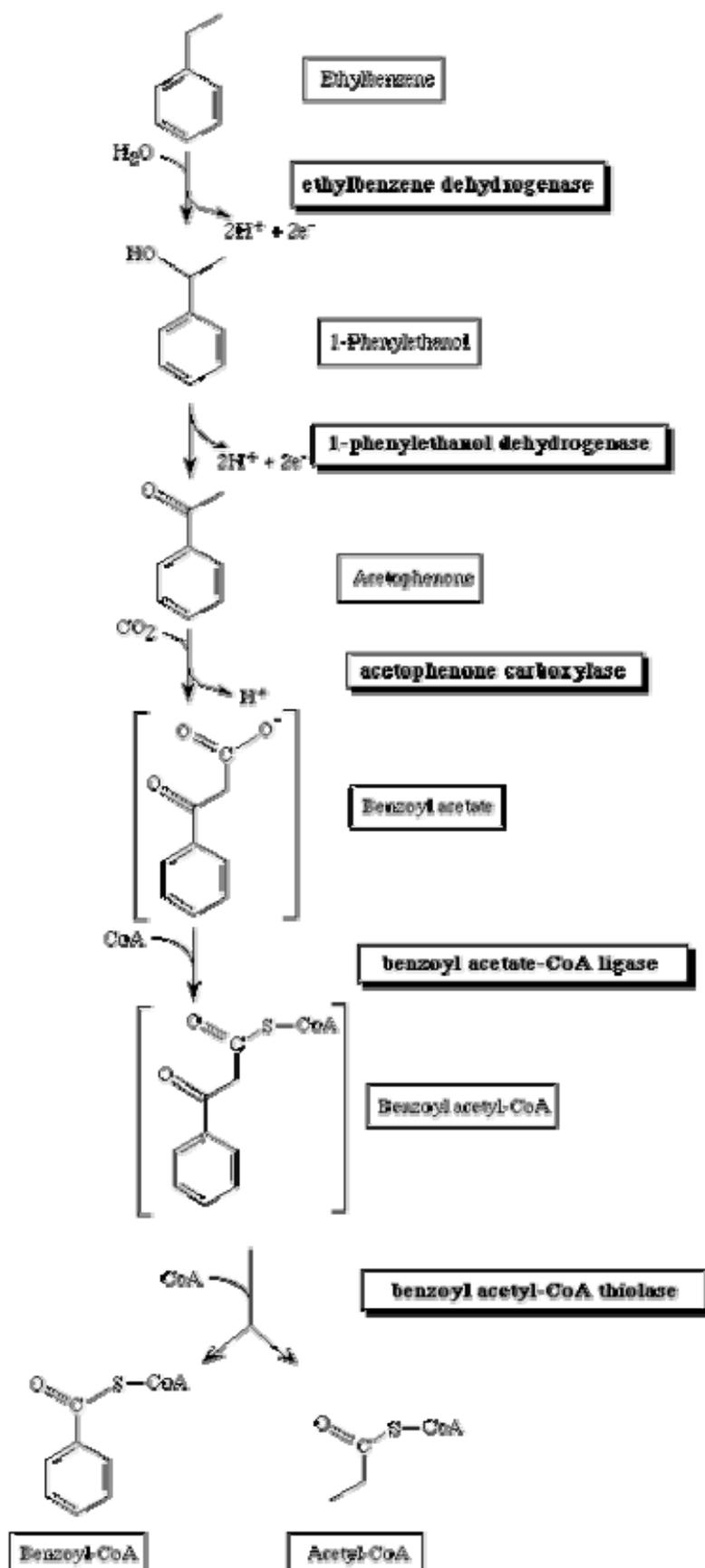


Ilustração 9 – Caminho metabólico da biodegradação anaeróbica do etilbenzeno utilizando-se *Azoarcus sp.* EBN1 ou EB1.

Tabela 1 – Sumário da cinética de crescimento obtida em vários estudos de biodegradação de compostos tóxicos

Referência	Composto	Intervalo de Concentração [mg L ⁻¹]	Parâmetros				Microorganismo
			$\mu_{\text{máx}}$ [h ⁻¹]	K_s [mg L ⁻¹]	$Y_{x/s}$ [mg mg ⁻¹]	K_i [mg L ⁻¹]	
Abuhamed <i>et al.</i> (2004)	B	3,00 - 187, 70	0,620	1,65	0,75	180	<i>P. putida</i> F1 ATCC700007
	T	2,76 - 160,30	0,610	6,47	0,58	88	
	F	10 - 200	0,051	18,00	0,44	430	
Reardon <i>et al.</i> (2000)	B	≤ 43	0,73 ± 0,03	0,12 ± 0,02	1,20 ± 0,05	-	<i>P. putida</i> F1
	T	≤ 43	0,86 ± 0,01	13,80 ± 0,90	1,28 ± 0,13	-	
	F	≤ 54	0,11 ± 0,01	32,00 ± 2,40	0,80 ± 0,07	-	
Chang <i>et al.</i> (1993)	B	≤ 10	0,335 ± 0,129	3,17 ± 0,82	1,04 ± 0,09	-	<i>P. fragi</i> B1
	T	≤ 10	0,543 ± 0,076	1,96 ± 0,91	1,22 ± 0,10	-	<i>P. fragi</i> B1
	T	≤ 10	0,452 ± 0,115	1,88 ± 1,26	0,99 ± 0,25	-	<i>P. sp.</i> X1
	p-X	≤ 10	0,130	16,00	*	-	<i>P. sp.</i> X1
Nakhla (2003)	B	10 - 50	0,0058-0,0144	5,54 - 10,16	0,50 - 1,02	-	mistura de culturas
	T	10 - 50	0,0052-0,0127	6,32 - 10,47	0,48 - 1,02	-	
	o-X	10 - 50	0,0052-0,0114	6,78 - 10,81	0,52 - 1,02	-	
Oh <i>et al.</i> (1994)	B	≤ 70	0,44	3,36	0,65	-	<i>P. putida</i> O1
	T	≤ 70	0,72	15,07	0,64	44,43	
Lin <i>et al.</i> (2007)	B	*	0,0194	8,349	0,53	191,89	<i>P. aeruginosa</i>
	T	*	0,0064	9,851	0,34	48,48	
	E	*	0,0340	211,791	0,32	310,56	
	X	*	0,0060	1,427	0,75	153,55	

B – benzeno; T – tolueno; E – etilbenzeno, o-X – *orto*-xileno; p-X – *para*-xileno; m-X – *meta*-xileno; F – fenol

* - valores não encontrados

Tabela 1 (Continuação) – Sumário da cinética de crescimento obtida em vários estudos de biodegradação de compostos tóxicos

Referência	Composto	Intervalo de Concentração [mg L ⁻¹]	Parâmetros				Microorganismo
			$\mu_{\text{máx}}$ [h ⁻¹]	K_s [mg L ⁻¹]	$Y_{x/s}$ [mg mg ⁻¹]	K_i [mg L ⁻¹]	
Bielefeldt & Stensel (1999b)	B	1,40 - 15,60	0,0475	0,51	0,95	-	mistura de culturas
	T	1,40 - 15,60	0,0827	0,47	0,95	-	
	E	1,40 - 15,60	0,0200	0,23	0,62	-	
	o-X	1,40 - 15,60	0,0058	0,16	0,23	-	
	p-X	1,40 - 15,60	0,0097	0,23	0,32	-	
Reardon <i>et al.</i> (2002)	T	*	0,39 ± 0,01	1,01 ± 0,28	1,030 ± 0,090	-	<i>Burkholderia sp.</i> JS150
	F	*	0,31 ± 0,03	0,51 ± 0,38	0,880 ± 0,005	-	
Mirpuri <i>et al.</i> (1997)	T	≤ 50	0,42 ± 0,05	3,98 ± 0,78	0,90 ± 0,13	42,78	<i>P. putida</i> 54G
Kermanshahi <i>et al.</i> (2006)	p-X	13,60 - 67,50	0,0047	10	0,05	-	mistura de culturas
Kelly <i>et al.</i> (1996)	X	*	0,3830	13,2725	*	-	mistura de culturas
Schirmer <i>et al.</i> (1999)	m-X	4,70 - 37,30	0,172	0,790	0,520	91,700	mistura de culturas
Seker <i>et al.</i> (1997)	F	≤ 400	0,569	18,539	0,521	99,374	<i>P. putida</i> NRRL β14875
Kotturi <i>et al.</i> (1991)	F	≤ 200	0,119	5,270	0,550	377	<i>P. putida</i> Q5
Wang & Loh (1999)	F	25 - 800	0,90	6,93	0,43	284,30	<i>P. putida</i> ATTC49451
Jiang <i>et al.</i> (2007)	F	≤ 1600	0,15	2,22	*	245,37	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Nuhoglu & Yalcin (2005)	F	25 - 100	0,143	87,450	0,600	107,060	mistura de culturas
		100 - 1450	0,145	88,500	0,600	145,000	
Kumar <i>et al.</i> (2005)	F	10 - 1000	0,305	36,330	0,650	129,790	<i>P. putida</i> MTCC1194
			0,216	20,590	0,650	-	

B – benzeno; T – tolueno; E – etilbenzeno, o-X – *orto*-xileno; p-X – *para*-xileno; m-X – *meta*-xileno; F – fenol

* - valores não encontrados