



Biodegradacja fenoli w beztlenowych reaktorach ze złożem stacjonarnym z warstwą biofilmu adaptowanych bakterii

Phenol biodegradation in fixed-bed anaerobic reactors with an adapted bacterial biofilm layer

Maria KOPYTKO¹⁾, Luz Adriana Puentes JÁCOME²⁾

¹⁾ Faculty of Environmental Engineering; Universidad Pontificia Bolivariana; Autopista a Piedecuesta Km. 7 – Bucaramanga, Colombia; tel.: +57-7-6796220 ext. 478; fax: +57-7-6796221; e-mail: mkopytko2001@yahoo.com

²⁾ Faculty of Environmental Engineering; Universidad Pontificia Bolivariana; Autopista a Piedecuesta Km. 7 – Bucaramanga, Colombia; tel.: +57-7-6385222; e-mail: luzpuentes@gmail.com

RECENZENCI: prof. Ing. Peter FEČKO, dr hab. inż. Barbara TORA

Streszczenie

W programie tym badano możliwość biodegradacji fenoli w ściekach przemysłowych z zagłębia naftowego w prowincji Santander w Kolumbii. Stwierdzono znaczne możliwości biodegradacji biorąc pod uwagę trzy ważne czynniki: ogromną ilość mikroorganizmów stwierdzoną w próbkach pobranych ścieków i szlamów, przystosowanie się bakterii do wysokich stężeń fenolu (10 mg/l) i wysoką efektywność usuwania fenolu (do 86%) osiągniętą w badaniach laboratoryjnych. Proponowany układ oczyszczający zrealizowany w skali laboratoryjnej – składający się z bioreaktorów ze złożem stacjonarnym z warstwą biofilmu adaptowanych bakterii – zoptymalizowano stosując plan eksperymentu czynnikowego typu 2². Wybrano następujące zmienne, które zostały zbadane dla ich maksymalnych i minimalnych wartości: hydrauliczny czas retencji oraz obecność lub brak warstwy granulowanego węgla aktywnego. Zmienną zależną było stężenie fenolu. Optymalne warunki oczyszczania dla niskiego i wysokiego stężenia fenolu (2,14 i 9,30 mg/l) otrzymano w obecności granulowanego węgla aktywnego dla hydraulicznego czasu retencji (HRT) wynoszącego 18 godzin. Najlepsze wyniki dla pośredniego stężenia fenolu (6,13 mg/l) otrzymano dla 24-godzinnego czasu retencji przy obecności granulowanego węgla aktywnego. Niemniej jednak obecność warstwy granulowanego węgla aktywnego nie miała istotnego znaczenia, jeśli chodzi o usuwanie fenolu. Ponadto wzrost czasu retencji z 18 do 24 godzin nie przyniósł znaczącej poprawy stopnia usuwania fenolu.

Summary

The project studied the biodegradation potential of phenols in an industrial wastewater from an oil field in the province of Santander, Colombia. An elevated potential was established, taking into account three important factors: the great abundance of microorganisms found in the wastewater and sludge samples collected, the bacterial adaptation to high phenol concentrations (10 mg/l) and the elevated elimination efficiencies (up to 86%) obtained in the conducted laboratory tests. The proposed laboratory scale treatment system, which consisted of fixed-bed bioreactors with adapted bacterial biofilm, was optimized using a 2² factorial experimental design. The selected variables, studied in their maximum and minimum level were: hydraulic retention time and the presence or absence of a granular activated carbon layer. The response variable was phenol concentration. The optimum treatment conditions for low and high phenol concentrations (2,14 y 9,30 mg/l), were obtained with the presence of GAC and 18 hours of HRT. The best result for the intermediate phenol concentration (6,13 mg/l) was obtained with a 24 hour HRT and the presence of GAC. Nevertheless, the presence of the GAC layer was not significantly important in terms of phenol removal. Moreover, the increase of HRT from 18 to 24 hours, showed no significant improvement in phenol removal.

Słowa kluczowe: biodegradacja fenoli, optymalizacja, węgiel aktywny, ścieki ropopochodne

Key words: phenols biodegradation, optimization, activated carbon, petroleum wastewaters

Użyte skróty: HRT: hydrauliczny czas retencji
GAC: granulowany węgiel aktywny
ECOPETROL: Colombian Petroleum Company
ICP: Kolumbijski Instytut Badań nad Ropą Naftową
ChZT: chemiczne zapotrzebowanie na tlen
BZT: biologiczne zapotrzebowanie na tlen
TPH: suma węglowodorów ropopochodnych

Abbreviations: HRT: hydraulic retention time
GAC: granular activated carbon
ECOPETROL: Colombian Petroleum Company
ICP: Colombian Petroleum Research Institute
COD: chemical oxygen demand
BOD: biological oxygen demand
TPH: total petroleum hydrocarbons

Zakłady przemysłu petrochemicznego powodują znaczne zanieczyszczenie wody na etapie poszukiwań, cementowania szybu i wydobywania. Na etapie wydobywania woda jest stale zanieczyszczana na skutek ciągłego bezpośredniego zrzucania tych ścieków przemysłowych, co jest częstą praktyką na polach naftowych w Kolum-

Petroleum Industries causes significant water contamination in the stages of exploration, well cementation and oil extraction. In the extraction stage, water is continuously contaminated due to the direct discharge of these industrial wastewaters, which is a common activity in oil fields in Colombia.

bii. Ścieki te zawierają wiele substancji zanieczyszczających, takich jak fenole, i są często zrzucane bez odpowiedniego oczyszczenia. Fenol jest substancją silnie toksyczną, żrącą i mutageną. Jest także znany jako czynnik karcinogeny i teratogeny [szkodliwe działanie na płód] wpływającym zarówno na środowisko jak i na człowieka. Konieczne jest usuwanie fenolu ze ścieków przed ich zrzuceniem. Niemalże cały przemysł petrochemiczny tradycyjnie stosuje procesy fizykochemiczne do oczyszczania zanieczyszczonej przez siebie wody. Ścieki te zawierają podwyższone ilości substancji organicznych, których usuwanie jest dość kosztowne, oraz zawierają one znaczne stężenia specyficznych zanieczyszczeń. W opisanej sytuacji biologiczne oczyszczanie tych wód stanowi atrakcyjne rozwiązanie alternatywne.

W ostatnich dziesięcioleciach procesy biologiczne usuwania zanieczyszczeń ze ścieków przemysłu naftowego było przedmiotem badań w Kolumbii (Delgado et al., 1993). Jednakże, jak już wcześniej wspomniano, na ściekach ropopochodnych przebadano pewne specyficzne procesy chemiczne do usuwania fenolu. Zdobyto duże doświadczenie w usuwaniu fenolu w ośrodkach tlenowych. Choć procesy przebiegające w ośrodkach tlenowych prowadzą na ogół do wysokiej wydajności usuwania fenolu, procesy beztlenowe nie wytwarzają dużych ilości odpadowych szlamów, a zużycie w nich energii jest minimalne, co przekłada się na niskie koszty prowadzenia procesu. Kilka badań wskazało na możliwość zaprojektowania tego typu biologicznych procesów (Field and Sierra, 1989). Biodegradacji fenolu dokonywano za pomocą takich bakterii jak *Pseudomonas cepacia* (Folsom et al., 1990), *Pseudomonas putida-P8* oraz *Cryptococcus elinovii-H1* (Yucel, 1989), przy stężeniach fenolu sięgających 3,2 g/l.

Beztlenowa biodegradacja fenolu była także badana za pomocą specjalnego zespołu bakterii, gdzie stwierdzono bliską wzajemną zależność pomiędzy bakteriami (Knoll and Winter, 1989). Inne badania koncentrowały się na zjawiskach zachodzących w mieszanych i czystych kulturach bakterii. Kryterium to jest uważane za równie ważne jak rodzaj ośrodka lub procesu (tlenowy czy beztlenowy). Udokumentowano pewne mechanizmy przemiany fenolu (Young and Häggblom). Generalnie mechanizmy te implikują różne oddziaływania pomiędzy różnymi gatunkami bakterii, takimi jak bakterie fotosyntezujące, denitryfikacyjne, bakterie redukujące siarczany oraz bakterie metanogenne.

W Kolumbii firma ECOPETROL oraz instytut ICP badały różne możliwości oczyszczania ścieków: od procesów chemicznego utleniania do kombinacji różnych procesów z zastosowaniem biotechnologii. Większość stosowanych na polach naftowych procesów stosujących biotechnologię została przebadana

These wastewaters contain several pollutants such as phenols, which are commonly disposed of without a proper treatment. Phenol is highly toxic, corrosive, and mutagenic. It is also known as a carcinogenic and teratogenic agent, which affects both the environment and human beings. Phenol removal from the industrial wastewaters is necessary, prior to the wastewater discharge. Almost all petroleum industries have traditionally used physicochemical processes to treat their contaminated waters. These wastewaters contain elevated organic loads, their treatment is quite expensive and they contain significant concentrations of specific pollutants. Given these characteristics, the biological treatment of these waters is an attractive alternative.

In the last decades several biological processes for the decontamination of petroleum wastewaters, such as the aerobic and anaerobic degradation, have been studied in Colombia (Delgado et al, 1993). Nevertheless, as mentioned before, specific chemical processes have been tested in petroleum wastewaters to accomplish phenol removal. There is a great abundance of phenol removal experiences in aerobic media. Even though aerobic media processes generally contribute to high elimination efficiencies, anaerobic processes do not generate great amounts of waste sludge, and their energy consumption is minimal, which contributes to low maintenance costs. Several studies have indicated the possibility of designing such kinds of biological processes (Field and Sierra, 1989). Phenol biodegradation has been accomplished with bacteria such as *Pseudomonas cepacia* (Folsom et al, 1990), *Pseudomonas putida-P8* and *Cryptococcus elinovii-H1* (Yucel, 1989), with phenol concentrations up to 3.2 g/l.

Anaerobic phenol biodegradation has also been studied via an obliged bacterial consortium where an intimate interdependence was established among the bacteria (Knoll and Winter, 1989). Other research has been focused in mixed and pure culture phenomena. This criterion is considered just as important as the type of media or process (aerobic or anaerobic). Certain mechanisms for phenol transformation have been documented (Young and Häggblom,). Generally, these mechanisms imply diverse interaction between different bacterial species such as photosynthetic, denitrifying, sulphate-reducing and methanogenic bacteria.

In Colombia, ECOPETROL and ICP have explored various treatment alternatives, which range from chemical oxidation to combined processes with biotechnology. Most of the biotechnology used in oil fields has been tested in aerobic media (Restrepo et al, 2007). An example of these combined processes

w środowiskach tlenowych (Restrepo et al., 2007). Przykładem takiej kombinacji procesów może być stosowanie powietrza i fotolizy z dodatkowym użyciem roztworów z adaptowanymi bakteriami do usuwania fenolu. Tego rodzaju technologie są badane na polach naftowych spółki ECOPETROL od roku 2005.

Inni autorzy badali możliwość połączenia biotechnologii z adsorpcją na węglu aktywnym. Zastosowanie węgla aktywnego jest bardzo interesujące, ponieważ efektywne usuwanie fenolu można zagwarantować wtedy, gdy procesy biologiczne nie są całkowicie skuteczne. Podjęto kilka badań w tym zagadnieniu. Jedne z tych badań polegały na biodegradacji fenolu i aromatycznych amin za pomocą adaptowanych bakterii zaczepionych we fluidalnym złożu piasku i węgla aktywnego (Kock et al, 1991). Inni badacze doszli do wniosku, że beztlenowy rozkład fenolu prowadzący do wytworzenia metanu i dwutlenku węgla zachodzi w tym samym czasie co adsorpcja fenolu na granulowanym węglu aktywnym. W szczególności jedno badanie wykazało, że bakterie dokonują biologicznego przetworzenia uprzednio zaadsorbowanego fenolu w dwutlenek węgla i metan w przypadku braku innego źródła węgla. Wskazało to na możliwość bioregeneracji aktywnego węgla w warunkach beztlenowych (Craveiro, 1991).

Badane ścieki ropopochodne wytworzone na polu naftowym Santander w Kolumbii składają się z wód złożowych powstałych podczas wydobywania ropy, oraz z wody technologicznej używanej w tym procesie. Ścieki są fizycznie oddzielane od ropy i doprowadzane do szeregu oddzielaczy oleju, a następnie są gromadzone w dwóch lagunach na ścieki zawierających beztlenowce względne. Z tych zbiorników około 3 do 4 litrów wody na minutę jest zrzucane do strumienia. Na tym etapie zawartość fenolu w ściekach waha się od 4 do 8 mg/l, co znacznie przekracza maksymalne dopuszczalne stężenie dla zrzucanych ścieków zgodnie z wymaganiami kolumbijskich przepisów wynoszące 0,2 mg/l.

Rozważając liczne wady procesu tlenowego oraz biorąc pod uwagę, że nie ma dotychczas wiadomości o badaniach nad biodegradacją fenoli w reaktorach beztlenowych ze złożem stacjonarnym, nasz program badawczy ocenił możliwość biodegradacji fenolu w reaktorze beztlenowym z przepływem cieczy ku górze, ze złożem stacjonarnym pokrytym warstwą biofilmu bakterii uprzednio zaadaptowanych do fenolu. Dokonano optymalizacji procesu na skalę laboratoryjną stosując eksperyment czynnikowy typu 2^2 (dwa poziomy zmiennej i dwie zmienne). Zmiennymi badanymi był hydrauliczny czas retencji (HRT) oraz obecność lub brak warstwy granulowanego węgla aktywnego. Jako zmienną zależną wybrano stężenie fenolu w cieczy opuszczającej reaktor. Badanie zostało pomyślane w celu wykazania znacznego obniżenia

is the use of air and photolysis with the addition of adapted bacterial broth to remove phenol. These kinds of technologies have been tested in ECOPETROL's fields since 2005.

Other authors have studied the possibility to combine the biotechnologies with the adsorption in activated carbon. The use of activated carbon is substantially interesting because the effective removal of phenol can be guaranteed when biological processes are not totally effective. Several studies have been undertaken. One of these is the biodegradation of phenol and aromatic amines with adapted bacteria in a fluidized bed of sand and activated carbon (Kock et al, 1991). Other researchers have concluded that anaerobic degradation of phenol with methane and carbon dioxide production occurs at the same time as phenol adsorption in GAC. One particular study demonstrated the bacterial bioconversion of the previously adsorbed phenol into carbon dioxide and methane in absence of another carbon source. This indicated the possible bio-regeneration of the activated carbon in anaerobic conditions (Craveiro, 1991).

The petroleum wastewater studied, generated in an oil field in Santander – Colombia, consists of the sum of the produced formation waters obtained during oil extraction and the water applied during the same processes. This wastewater is physically separated from the petroleum and is conducted to a series of oil traps, and finally it is temporarily stored in two facultative lagoons. From these lagoons, approximately 3 to 4 liters per second (48 to 63 gal/min) are discharged to the creek. At that point, the wastewater phenol concentration ranges from 4 to 8 mg/l, which widely surpasses the maximum phenol concentration for wastewater discharge accepted under Colombian regulations (0.2 mg/l).

Considering the numerous disadvantages of aerobic processes, and taking into account that there have not been enough reported studies in biodegradation of phenol in fixed-bed anaerobic reactors, the project evaluated phenol biodegradation in up-flow fixed-bed anaerobic reactors with a bacterial biofilm layer previously adapted to phenol. The laboratory-scale process was optimized applying a 2^2 experimental design (two levels and two variables). HRT and absence or presence of a GAC layer, were the variables studied. The response variable selected was phenol concentration in the effluent of the reactors. The research was conceived with the purpose of demonstrating a significant decrease of phenol concentration in the effluent of the bioreactors, which could be attributed to bacterial

stężenia fenolu w cieczy opuszczającej bioreaktory, co można by przypisać biodegradacji fenolu przez bakterie. Obecność lub brak warstwy granulowanego węgla aktywnego w tych eksperymentach miały na celu wykazanie jego dodatniego wpływu na usuwanie fenolu w sytuacji, gdy adaptowane mikroorganizmy są narażone na działanie wysokich stężeń fenolu (substancji toksycznej).

Materiały i metody

Procedura doświadczalna

W pierwszym etapie programu badawczego dokonano oceny możliwości biodegradacji fenolu przez badanie rodzimej flory drobnoustrojowej obecnej w ściekach. Przeprowadzono fizykochemiczną i mikrobiologiczną charakterystykę w celu wskazania potencjalnych drobnoustrojów nadających się do biodegradacji fenolu. Niektóre z tych drobnoustrojów wybrano w celu ich zaadaptowania i użycia w procesach bioaugmentacji.

Próbki ścieków i szlamów zostały pobrane z różnych zbiorników ścieków przed ich zrzuceniem. Procedura pobierania próbek była przeprowadzona zgodnie z normą 1060 EPA [Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska]. Próbkę związków pobrano w celu przeprowadzenia analizy następujących parametrów ścieków: BZT, ChZT, rozpuszczony tlen, oleje i smary, suma zawiesin stałych, całkowita zawartość fenoli, suma węglowodorów ropopochodnych. Pobrano osiem próbek mikrobiologicznych: po połowie z wody i ze szlamu. Próbki te poddano obróbce zgodnie z standardowymi procedurami mikrobiologicznymi a następnie zrobiono posiew na zmodyfikowanej pożywce bakteryjnej (agar): substancja odżywcza, wyciąg z mózgow i serc, ekstrakt drożdży i podłoże *rose bengal*. Posiew zrobiono łącznie na 128 szalkach – 64 dla ścieków i 64 dla szlamów. Podłoże bakteryjne zostało zmodyfikowane za pomocą ścieków ropopochodnych, przy czym każde zawierało po 50% objętościowo ścieków i wody destylowanej. Gdy drobnoustroje na szalkach już się rozwinęły, przygotowano kilka cienkich warstw do obserwacji mikroskopowej. Wśród mikroorganizmów stwierdzonych w próbce, bakterie przeważały nad grzybami. Do procesu adaptacji wybrano różne bakterie, biorąc pod uwagę następujące właściwości: szczególną morfologię bakterii, bakterie *mucilaginous*, *endospory* oraz wyizolowane kolonie. Ponadto bakterie te zostały pogrupowane na gram dodatnie, gram ujemne lub należące do rodzaju *Pseudomonas*.

Wszystkie wybrane wcześniej mikroorganizmy były kolejno adaptowane do coraz to większego stężenia fenolu (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 i 10 mg/l). Proces adaptacji przeprowadzono przez dokonywanie kolejnych posiewów na zmodyfikowanym bulionie

biodegradacji. The presence or absence of the GAC layer was introduced in the experiments with the intention of demonstrating its positive contribution to phenol removal when the adapted microorganisms are exposed to relatively high (toxic) phenol concentrations.

Materials and methods

Experimental procedure

The first stage in the project evaluated the phenol biodegradation potential through the study of the native microbial flora present in the wastewater. A physicochemical and microbiological characterization was performed in order to identify potential microorganisms, adequate for phenol biodegradation. Some of these microorganisms were selected for the adaptation and bio-augmentation processes.

Wastewater and sludge samples were collected in different wastewater deposits prior to its discharge. The sampling procedures were conducted according to the EPA Standard Methods, method 1060. A unique compound sample was collected for the wastewater parameters analysis: BOD, COD, dissolved oxygen, oil and grease, total suspended solids, total phenols, TPH. Eight microbiological samples were collected, half of them corresponding to wastewater and the other half to sludge. These samples were treated according to the standard microbiological procedures and then sowed in the following modified culture media (agar): nutrient, brain-heart, yeast extract and *rose bengal*. A total of 128 plates were sowed, 64 for wastewater samples and 64 for sludge samples. The culture media was modified with the petroleum wastewater, each medium prepared contained 50% wastewater and 50% distilled water in volume. Once microorganisms had grown in the plates, several laminas were prepared for microscopic observation. Among the microorganisms found, bacteria were prevalent over fungi. Different bacteria were selected for the adaptation process taking into account presence of the following characteristics: special bacterial morphology, *mucilaginous bacteria*, *endospores*, and isolated colonies. Furthermore, these bacteria were grouped as gram positive, gram negative or belonging to the gender *Pseudomonas*.

All previously selected microorganisms were adapted sequentially to increasing phenol concentrations (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/l). The adaptation process was conducted by consecutive inoculations in modified aqueous brain heart broth (50% distilled water +50% wastewater effluent) with

z mózgow i serc (50% wody destylowanej + 50% ścieków) o odpowiednim stężeniu fenolu. Proces prowadzono w warunkach beztlenowych, przy czym po przeprowadzeniu posiewu pojemniki szczelnie zamknięto. Do procesu bioaugmentacji przygotowano 25 litrów zmodyfikowanego ciekłego podłoża. Przygotowane podłoże ciekłe zawierało 0,3% melasy (jako pożywki) i 0,1% dwuzasadowego fosforanu potasu (suplement fosforowy). Stężenie fenolu skorygowano do wartości 10 mg/l a pojemnik szczelnie zamknięto dla zapewnienia warunków beztlenowych.

Optymalizacja

W celu zoptymalizowania procesu biodegradacji zastosowano eksperyment czynnikowy typu 2². Badano dwie zmienne: hydrauliczny czas retencji (HRT) dla maksymalnego i minimalnego poziomu oraz obecność lub brak warstwy granulowanego węgla aktywnego. Stężenie fenolu było zmienną zależną. W tabeli 1 przedstawiono pełny zakres przeprowadzonych doświadczeń. Doświadczenia wykonano trzykrotnie dla trzech różnych stężeń fenolu: niskiego, średniego i wysokiego – odpowiednio dla 2, 6 i 10 mg/l. Doświadczenia przeprowadzono w bioreaktorach na skalę laboratoryjną.

Oprócz doświadczeń opisanych w tablicy 1, przeprowadzono kilka eksperymentów kontrolnych. W tablicy 2 przedstawiono 28 zaproponowanych eksperymentów kontrolnych.

Konstrukcja bioreaktora i jego przygotowanie

Bioreaktor zaprojektowano biorąc pod uwagę właściwości typowego beztlenowego reaktora ze złożem stacjonarnym i przepływem cieczy ku górze, posiadającego kwadratową podstawę i perforowaną płytkę dla zapewnienia przepływu wody. Jako materiał konstrukcyjny wybrano szkło. Płytkę wykonano z tworzywa akrylowego [pleksi]. Szczegóły zaprojektowanego modelu przedstawiono na rys. 1. Reaktor miał maksymalną objętość 5 l. Uwzględniając obecność złoża nośnika (o porowatości wynoszącej 50%), objętość ta zmniejszyła się do około 2,5 l. Reaktory pracowały w systemie

the corresponding phenol concentration. The process was held under anaerobic conditions, after inoculation the containers were completely sealed. 25 liters of modified liquid growth media were prepared for the bioaugmentation process. The liquid media was prepared with a 0.3% and 0.1% content of molasses (for nutrition) and dibasic potassium phosphate (phosphorus supplement) respectively. The phenol concentration was adjusted to 10 mg/l and the container was sealed to guarantee anaerobic conditions.

Optimization

A 2² factorial experimental design was used to optimize the biodegradation process. Two variables were studied: HRT in a maximum and minimum level and the presence or absence of a GAC layer. Phenol concentration was the response variable. Table 1 shows the complete set of experiments conducted. These experiments were conducted by triplicate on three different phenol concentrations, low, medium and high, corresponding to 2, 6 and 10 mg/l. The experiments were performed in laboratory scale bioreactors.

In addition to the experiments described in table 1, several controls were established. Table 2 shows the 28 control experiments proposed.

Bioreactor Design and preparation

The bioreactor was designed taking into account the characteristics of a regular up-flow fixed-bed anaerobic reactor, with a rectangular base and a perforated plate for water distribution. Glass was the material selected for construction. The plate was elaborated in acrylic. The designed model is detailed in figure 1. The reactor had a maximum capacity of 5 liters. Along with the support media (50% porosity), the volume decreased to 2,5 liters, approximately. The reactors were batch operated. Stratified crushed stone was used as the support media. Its

Tablica 1
Prowadzone doświadczenia

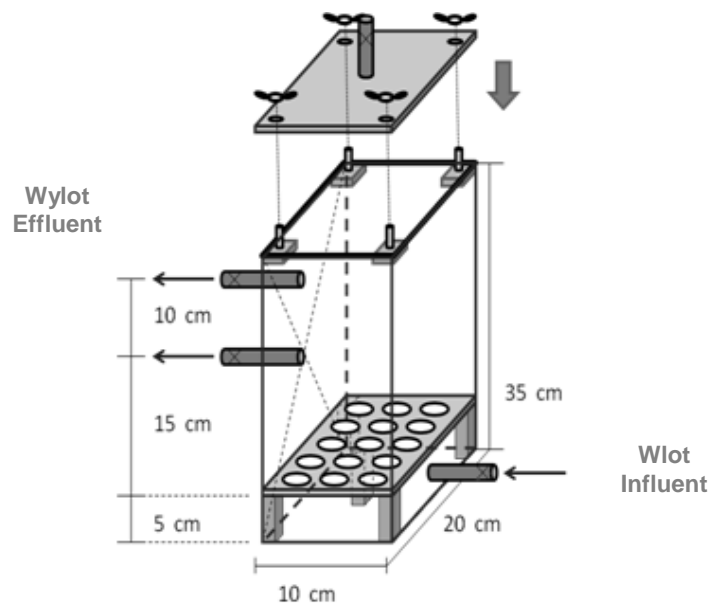
Table 1
Conducted experiments

Reaktor Reactor	2 mg/l		6 mg/l		10 mg/l	
	RT	GAC	RT	GAC	RT	GAC
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	+	-
3	-	+	-	+	-	+
4	+	+	+	+	+	+
RT: czas retencji: (-) = 18 godzin, (+) = 24 godziny retention time: (-) = 18 hours, (+) = 24 hours						
GAC: granulowany węgiel aktywny: (-) = nieobecny, (+) = obecny granular activated carbon: (-) = absence, (+) = presence						

Tablica 2
Doświadczenia kontrolne. HRT: hydrauliczny czas retencji. GAC: granulowany węgiel aktywny

Table 2
Control experiments. HRT: Hydraulic retention time. GAC: granular activated carbon

Zerowy hydrauliczny czas retencji Absence of Hydraulic Retention Time					
2 mg/l		6mg/l		10 mg/l	
HRT	GAC	HRT	GAC	HRT	GAC
0	-	0	-	0	-
0	+	0	+	0	+
Wpływ światła bez stosowania warstwy drobnoustrojów Light effect without a microbial layer			Wpływ światła w przypadku stosowania warstwy drobnoustrojów Light effect with a microbial layer		
HRT	GAC	Światło Light	HRT	GAC	Światło Light
-	+	+	-	+	+
-	-	-	-	-	-
-	-	+	-	-	+
-	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+
+	-	-	+	-	-
+	-	+	+	-	+
+	+	-	+	+	-



Rys. 1
Model bioreaktora użytego do eksperymentów

Fig. 1
Standard Bioreactor model

wsadowym. Jako nośnik zastosowano rozkruszone kamienie układane warstwami. Ich właściwości przedstawiono w tablicy 3. Warstwę granulowanego węgla aktywnego umieszczono w zamkniętej siatce na wierzchu rozkruszonych kamieni.

Badania przeprowadzono przy użyciu niezawierającej chloru wody, stosując odpowiednie ilości

characteristics are included in table 3. The GAC layer was distributed on top the crushed stone.

The tests were conducted using chlorine free water and the corresponding amount of phenol, obtaining the concentrations described previously (2, 6 and 10 mg/l). Mariotte Bottles were used to

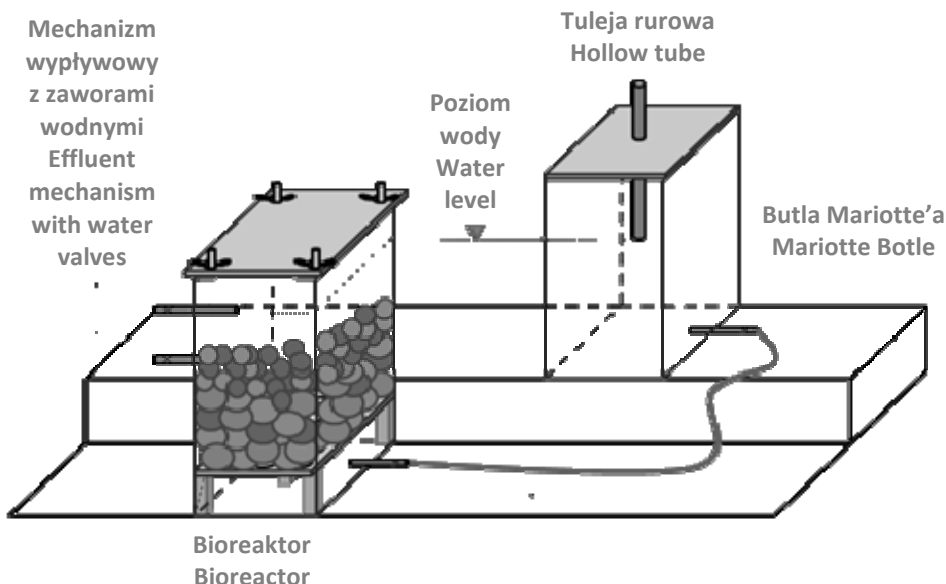
fenolu tak, by otrzymać opisane poprzednio stężenia (2, 6 i 10 mg/l). Użyto butli Mariotte'a do utrzymania zarówno właściwego poziomu wody w reaktorze jaki i strumienia wody skierowanego ku górze, jak to przedstawiono na rys. 2.

control both the water level in the reactor and the up-flow current, as shown in figure 2.

Tablica 3
Charakterystyka złoża nośnika. Każdy zbudowany bioreaktor charakteryzowały te same parametry

Table 3
Support media characteristics. Each bioreactor was constructed using the same specifications

Parametr Characteristics		Wartość Value
Całkowita wysokość złoża (cm) Total Bed height (cm)		20
Przybliżona porowatość złoża (%) Approximated Bed porosity (%)		45
Strata ciśnienia (cm) [słupa wody] Head loss (cm)		< 1
Standardowy handlowy granulowany węgiel aktywny (kg) Standard comercial GAC (kg)		0,25
Przybliżona wysokość warstw złoża (cm) Approximated height of the bed layers (cm)		
Warstwa 1. 1 st Layer	Θ_1 (5 – 7 cm)	10
Warstwa 2. 2 nd Layer	Θ_2 (3 – 5 cm)	5
Warstwa 3. 3 rd Layer	Θ_3 (1 – 3 cm)	5
Warstwa 4. 4 th Layer	GAC	2



Rys. 2
Rozprowadzenie wody: do reaktora podłączono butle Mariotte'a aby zapewnić odpowiedni poziom wody i skierowany ku górze strumień w reaktorze

Fig. 2
Water distribution, a Mariotte bottle was connected to the bioreactor in order to maintain both the water level and the up-flow current

Przed przeprowadzeniem eksperymentów laboratoryjnych, wypełnione reaktory poddano wstępnemu przygotowaniu, które polegało na dodaniu roztworu gumy arabskiej (czynnik zapewniający przywieranie) i augmentowanej pożywki z drobnoustrojami. Roztwór gumy arabskiej pozostawał przez 2 dni wewnątrz bioreaktora. Augmentowana pożywka z drobnoustrojami pozostawała w reaktorze (czas retencji) przez jeden tydzień. Zarówno gumę arabską jak i pożywkę z drobnoustrojami usunięto z reaktorów po upływie czasu retencji. Wstępne przygotowanie było pomyślane w celu zwiększenia przylegania pożywki z drobnoustrojami do warstwy wypełnienia reaktora, co przyczyniło się do wytworzenia odpowiedniej warstwy z drobnoustrojami, czyli biofilmu. Aby potwierdzić fakt wytworzenia się biofilmu monitorowano zmętnienie w ciągu całego tygodnia. Oprócz zmętnienia, stwierdzono także przyrost masy mierzonej na wybranych kamieniach w bioreaktorze, wskazujący na wytworzenie się błony biologicznej (biofilmu).

Metody analityczne

Zawartość fenolu oznaczano stosując standardowe techniki fotometryczne odpowiadające technice Spectroquant Nova 60 firmy Merck. Przeprowadzona procedura, która obejmowała stosowanie odpowiedniego zestawu fotometrycznego do oznaczania fenolu, była analogiczna do procedury EPA 420.1 i do US Standard Methods 5530. Dla zapewnienia pewności wyników przebadano kilka krzywych kalibracyjnych dla fenolu (zależność pomiędzy stężeniem a absorbancją) zarówno dla niskich jak i wysokich stężeń przy różnych długościach fali (450, 500 i 525 nm). Wybrane długości fali odpowiadały zakresom zalecanym dla próbek zabarwionych na czerwono (barwa uzyskana w próbkach przy użyciu wybranego zestawu fotometrycznego do fenolu). Krzywa kalibracyjna dla wąskiego zakresu zmiennej została opracowana przy użyciu następujących stężeń: próbka ślepa, 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,5 mg/l i 1 mg/l. Krzywą kalibracyjną dla szerokiego zakresu zmiennej otrzymano dla następujących stężeń: próbka ślepa, 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l, 10 mg/l oraz 12 mg/l. Każde ze stężeń kalibracyjnych otrzymano przez sporządzanie kolejnych rozcieńczeń roztworu wyjściowego o stężeniu 1000 mg/l.

Analiza wpływu zmiennych doświadczalnych

Dane otrzymane z doświadczeń były przetwarzane w sposób przedstawiony w tabelicy 4: y_1 do y_4 odpowiadają średniej wartości z trzykrotnie wykonywanych doświadczeń. Jak pokazano w tabelicy 4, uzyskano kilka rodzajów danych i wyników:

- średnia: oznacza wartość środkową, wokół której inne są rozłożone,
- poszczególne wartości zmiennej zależnej lub wpływ zmiennych: [Wpływ obecności węgla aktywnego

Prior to the laboratory experiments, the packed reactors were exposed to a preliminary treatment. This preliminary treatment included the addition of both the dissolution of Arabic gum (adherent agent) and the augmented microbial broth. The arabic gum dissolution remained 2 days inside the bioreactor. The augmented microbial broth had a one week retention time. Both the Arabic gum and the microbial broth were taken out of the reactors when the retention time was completed. This treatment was conceived in order to enhance the adhesion of the microbial broth to the packed layer, contributing to the formation of the corresponding microbial layer or biofilm. In order to confirm the biofilm formation, turbidity was monitored during a complete week. In addition to turbidity, increases in mass were also determined as an indication of biofilm formation.

Analytical methods

Phenol was determined using standard photometric techniques compatible with Merck's Spectroquant Nova 60. The procedure conducted, which involved the use of the appropriate phenol photometric kit, is analogue to EPA 420.1 and US Standard Methods 5530. To ensure reliability, several phenol calibration curves (concentration vs. absorbance) were tested for both low and high concentration levels at different wave lengths (450, 500 and 525 nm). The wavelengths selected correspond to the recommended range for red colored samples (color obtained in the samples when using the selected phenol photometric kit). The low range calibration curve was elaborated with the following concentrations: blank, 0.05 mg/l, 0.1 mg/l, 0.2 mg/l, 0.5 mg/l and 1 mg/l. The high range calibration curve was obtained with the following concentrations: blank, 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l, 10 mg/l and 12 mg/l. Each calibration concentration was obtained by successive dilutions from a 1000 mg/l initial solution.

Experimental design analysis

The data obtained from the experiments were processed as shown in table 4, y_1 to y_4 correspond to the mean of the experiments conducted by triplicate. As shown in table 4, several data and responses were obtained:

- The mean: indicates the central value, around which the others are distributed.
- Individual response or principal effects: (Response to C^+ or HRT) indicates the variation

Tablica 4
Sposób wyrażenia wpływu zmiennych doświadczalnych na wynik

Table 4
Experimental design responses

HRT (h)	GAC		Średnia Mean	Wpływ użycia GAC Response to C+
	C –	C +		
18	Y ₁	Y ₃	(Y ₁ + Y ₃)/2	Y ₃ – Y ₁
24	Y ₂	Y ₄	(Y ₂ + Y ₄)/2	Y ₄ – Y ₂
Średnia Mean	X ₁	X ₂	(X ₁ + X ₂)/2	[(Y ₃ – Y ₁) + (Y ₄ – Y ₂)]/2
Wpływ wydłużenia HRT: 24 h – 18 h Response to HRT: 24 h – 18 h	Y ₂ – Y ₁	Y ₄ – Y ₃	[(Y ₂ – Y ₁) + (Y ₄ – Y ₃)]/2	

(GAC) lub czasu retencji (HRT) na wynik] oznacza zmianę zmiennej zależnej, przy zmianie wartości zmiennej niezależnej. Obliczono je jak przedstawiono w tablicy 4.

Wyniki i dyskusja analizowanych ścieków

Wyniki przeprowadzonej charakterystyki fizykochemicznej przedstawiono w tablicy 5. Stężenie fenolu oznaczone w pobranej próbce wody (maj 2007) wynosiło 8,02 mg/l. Wynik ten był skrajnie wysoki biorąc pod uwagę, że maksymalne dopuszczalne stężenie w ściekach wynosi 0,2 mg/l. W innych próbkach pobranych w tym samym miejscu stężenie fenolu wahało się od 4,6 mg/l (marzec 2007) do 0 mg/l (październik 2007). Tę zmienność stężenia fenolu można przypisać warunkom klimatycznym na tym obszarze a także wymaganej wielkości wydobycia ropy na polu naftowym.

in the response when a variable changes. It was calculated as expressed in table 4.

Results and discussion

The results of the physicochemical characterization are included in table 5. Phenol concentration detected in the water sample taken (May, 2007), was 8.02 mg/l. This reading was extremely high considering that 0.2 mg/l is the maximum concentration permitted in wastewaters effluents. In other samples taken in the same location, phenol concentration ranged from 4.6 mg/l (March, 2007) to 0 mg/l (October, 2007). This variability could be attributed to the climatic behavior in the area, as well as the oil production demand in the oil field. This variation

Tablica 5
Wyniki analiz chemicznych. (maj 2007).
Kolumna z metodami odpowiada metodom stosowanych w normach USA

Table 5
Chemical analyses results. (May, 2007).
The method column corresponds to the US Standard method applied

Analiza Analysis		Wynik Result	Metoda Method
ChZT COD	(mg O ₂ /l)	1199,4	5220-B
BZT BOD	(mg O ₂ /l)	384,0	5210-B
Suma zawiesin stałych Totalsuspended solids	(mg /l)	40,0	2540-D
Oleje i smary Oil and grease	(mg /l)	32,0	5520-D
Rozpuszczony tlen Dissolved oxygen	(mg O ₂ /l)	1,202	4500-O-C
Fenol Phenol	(mg/l)	8,02	5530-C
Bar Barium	(mg/l)	N.D	3500-BA
TPH – suma ropopochodnych TPH	(mg/l)	7,4	SM 5520 F

Zmienność ta wykazała także potrzebę prowadzenia badań nad zachowaniem bakterii przy różnych stężeniach fenolu.

Stwierdzono wzrost mikroorganizmów na wszystkich 128 szalkach. Obecność bakterii stwierdzono na 64 szalkach, na których wykonano posiew na wzrost bakterii. Niektóre bakterie rozwijały się nawet na szalkach z obecnością grzybów (ekstrakt z drożdży). Zaobserwowano także wzrost drożdży. Można było zauważyć różną morfologię bakterii, z przewagą bakterii gram ujemnych i *Bacillus cocci*. Obecna była także pokaźna ilość bakterii gram dodatnich, w szczególności *Bacillus cocci*. Rozpoznano pięć różnych gatunków z rodzaju *Pseudomonas*. Wykryto znaczącą ilość przedstawicieli *Bacillus mucilaginosus* a także pojedynczych bakterii, w sumie 14 kolonii. Stwierdzenie obecności przedstawicieli *Bacillus mucilaginosus* ma duże znaczenie przy stosowaniu złoża stacjonarnego, ponieważ mogą się one przyczynić do tworzenia błony biologicznej. Są one także oznaką bogatej populacji bakteryjnej. Grzyby zaklasyfikowano do następujących rodzajów: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* oraz *Phoma*.

Proces adaptacji przebiegł pomyślnie dla wszystkich wybranych grup. Zmiany zabarwienia i zmętnienia w wodnych kulturach były oznaką stałego wzrostu. Po przeprowadzeniu prób optymalizacyjnych pobrano kilka próbek z bioreaktorów do przeprowadzenia wstępnej oceny możliwości biodegradacji przez bakterie. Bakterie te odpowiadają różnym mikroorganizmom w mieszanych adaptowanych zespołach różnych bakterii, które były w stanie rozkładać fenol w warstwie złoża stacjonarnego. Oznaczono następujące bakterie: *Bacillus* rodzaj I, *Bacillus* rodzaj II, *Bacillus* rodzaj III, *Bacillus* rodzaj IV, *Bacillus* rodzaj V, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Lactobacillus* spp., *Diplococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Alkaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., oraz *Corynebacterium* spp. (Rys. 3).

Podczas procesu optymalizacji stężenie fenolu oznaczano pośrednio, stosując krzywe kalibracyjne (stężenie w funkcji absorbancji). Spośród trzech badanych długości fali, do analiz wybrano długość fali 525 nm, ponieważ wykazała ona odpowiednią liniowość (współczynnik korelacji bliski 1) zarówno dla wąskiego jak i szerokiego zakresu stężeń. Wykres na rysunku 4 przedstawia otrzymane krzywe kalibracyjne.

Rysunek 5 przedstawia zmianę zmętnienia podczas wstępnego działania za pomocą cieczy z mikroorganizmami. Każdy z wykresów odnosi się do określonego bioreaktora. Zmętnienie zmieniało się w czasie. Pierwszego dnia zmętnienie było niskie na skutek dodania wodnego roztworu pożywki do cieczy z mikroorganizmami (efekt rozcieńczenia). Bioreaktory 10 i 12 wykazały odmienne zachowanie, co można przy-

also exposed the need to study bacterial behavior in different phenol concentrations.

Microorganism growth was found in all the plates. Bacteria were found in all the 64 plates conceived for its growth. Some bacteria even grew in fungi (yeast-extract) plates. Fungal growth was also observed. Different bacterial morphology was evident, with predominance of gram negative bacillus and *Bacillus cocci*. There was also a significant quantity of gram positive bacteria, especially *Bacillus cocci*. Five different species from the gender *Pseudomonas* were identified. A noteworthy number of mucilaginous bacteria were detected, as well as isolated bacteria, 14 colonies in total. Mucilaginous bacteria represent an important finding in fixed-bed treatments because they can contribute to the biofilm formation. They were also an indication of abundant bacterial population. Fungi were classified in the following gender: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* and *Phoma*.

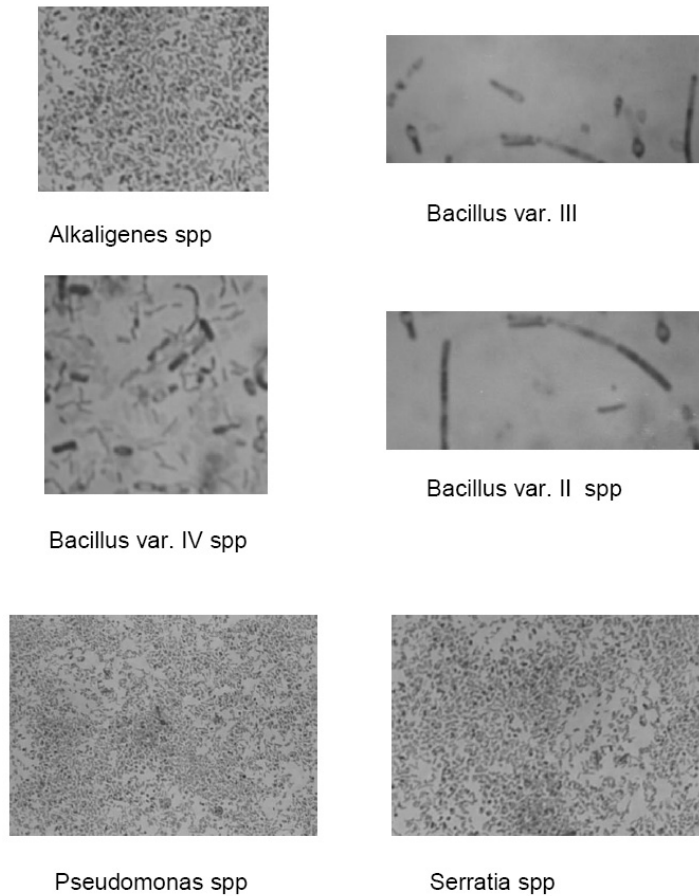
The adaptation process was successful for all selected groups. Changes in color and turbidity in the aqueous culture media were an indication of continuous growth. After conducting the optimization tests, several samples from the bioreactors were collected to perform an initial assessment of potential degradation bacteria. These bacteria corresponded to the different microorganisms in the mixed adapted pool consortia that were able to degrade phenol in the packed stratum. The bacteria identified were: *Bacillus* var I, *Bacillus* var II, *Bacillus* var III, *Bacillus* var IV, *Bacillus* var V, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Lactobacillus* spp., *Diplococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Alkaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., and *Corynebacterium* spp. (Fig 3).

During the optimization process, phenol concentration was determined indirectly using the calibration curves (concentration vs. absorbance). Among the three studied wavelengths, the 525 nm wavelength was selected for the analyses because it showed an adequate linearity (correlation coefficient close to 1), both for low and high range concentrations. Graph in figure 4 shows the calibration curves obtained.

Figure 5 shows the evolution of turbidity in the preliminary treatment with microbial broth. Each one of the series relates to a particular bioreactor. Turbidity was variable in time. On day 1, turbidity was low because of the addition of aqueous growth media to the microbial broth (dilution). Bioreactors 10 and 12 showed a different behavior, which could be attributed to normal starting fluctuations. On the

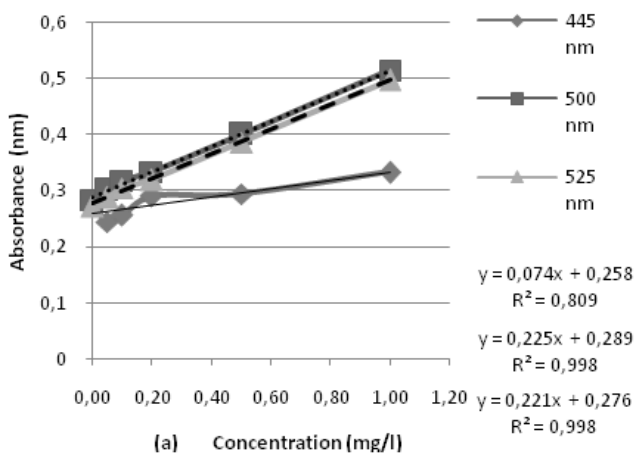
pisać normalnym fluktuacjom występującym na początku procesu. W kolejnych dniach zmętnienie narastało, zmniejszyło się w trzecim dniu, i stopniowo wzrastało w dniu piątym i szóstym. W każdym z reaktorów zaobserwowano wyraźną tendencję.

following days turbidity increased, decreased on day 3 and progressively increased during days 5 and 6. An exact tendency was observed in each reactor.



Rys. 3
Bakterie zidentyfikowane w próbkach biofilmu

Fig. 3
Bacteria identified from biofilm samples



Rys. 4
Krzywa kalibracyjna. (a) dla wąskiego zakresu stężeń (b) dla szerokiego zakresu stężeń. Wzory krzywych linearyzacji odpowiadają wartościom długości fali: 445, 500 i nm

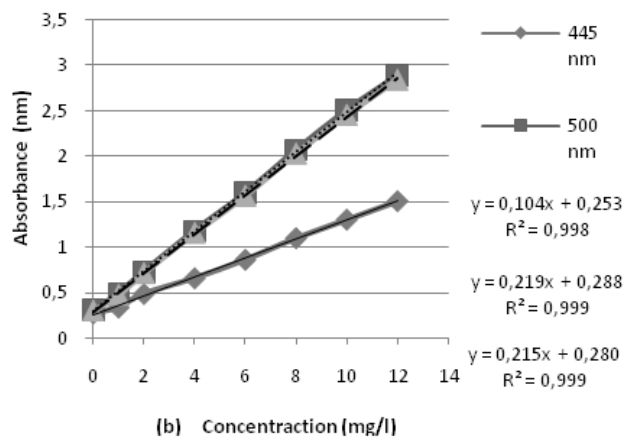
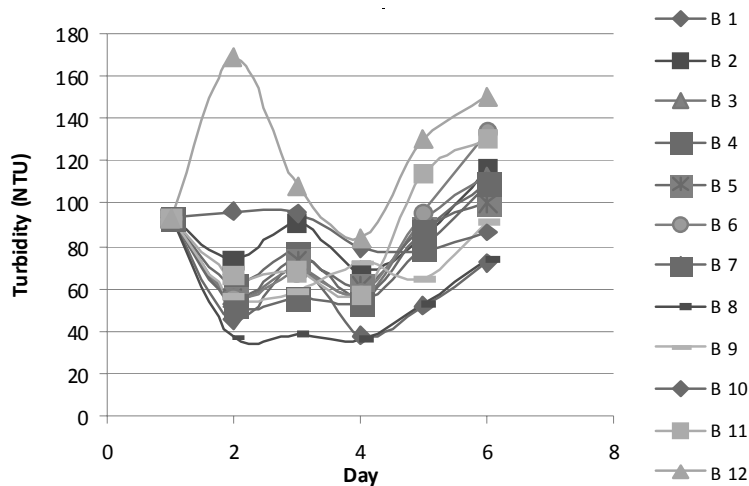


Fig. 4
Calibration curves studied. (a) Low range (b) High range. The linearization curves included in the right correspond to 445, 500 and 525 nm respectively



Rys. 5
Dane dotyczące zmętnienia zgromadzone podczas eksperymentu wstępnego

Fig. 5
Turbidity data collected during the preliminary treatment

Podwyższone zmętnienie świadczyło o znacznym wzroście ilości bakterii w augmentowanej cieczy. Obserwowane fluktuacje mogą być oznaką tworzenia się warstwy bakteryjnej (biofilmu) w warstwie kruszonego kamienia. Ponadto zastosowano metodę McFarlanda w celu potwierdzenia wyników zmętnienia pod względem jednostek tworzących kolonie (CFU/ml), jak to przedstawiono na rysunku 6.

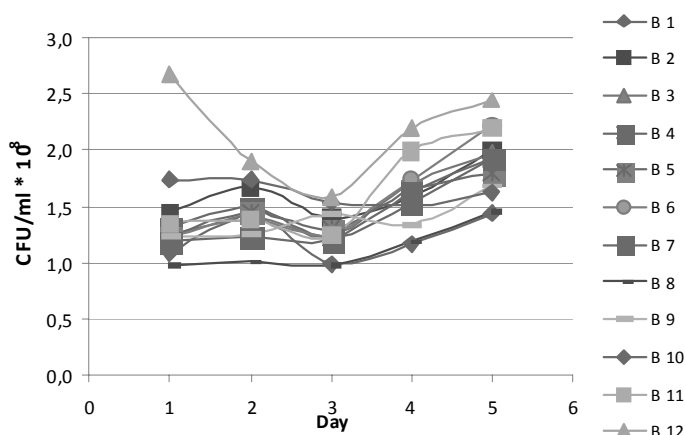
Tworzenie się warstw bakteryjnych potwierdzono porównując w czasie trwania eksperymentu masę wybranego kamienia ze złoża stacjonarnego każdego bioreaktora. Jak pokazano w tablicy 6, różnicę tę stwierdzono w każdym reaktorze, przy czym wartości te wahały się od 10 do 70 mg.

Podczas procesu optymalizacji stwierdzono wysokie wydajności procesu dla wszystkich badanych stężeń w warunkach beztlenowych. Wydajności te wahały się od 72 do 86%. Ta początkowa ocena wskazuje na wysoką zdolność do biodegradacji fenolu przy bezpośrednim

The elevated turbidity demonstrated significant increases of bacteria number in the augmented broth. The fluctuations observed may be an indication of the bacterial layer formation (biofilm) in the crushed stone strata. Also, the McFarland method was used to confirm turbidity results in terms of colony-forming units (CFU/ml), as shown in figure 6.

Bacterial layer formation was confirmed by comparing mass of a selected stone in the packed bed of each bioreactor. As revealed in table 6, this difference was found in each reactor with values ranging between 10 and 70 mg.

During the optimization process, high efficiencies were reported for all the concentrations studied under anaerobic conditions. These efficiencies ranged from 72 to 86%. This initial assessment suggests a high phenol biodegradability potential using



Rys. 6
Stężenie bakterii w każdym z bioreaktorów

Fig. 6
Bacterial concentration in each bioreactor

Tablica 6
Masa wybranych kawałków kruszonego kamienia

Table 6
Mass readings of selected crushed stone pieces

Reaktor Reactor	Masa – dzień 2. (g) Mass day 2 (g)	Masa – dzień 5. (g) Mass Day 5 (g)	Różnica (mg) Difference (mg)
1	8,3	8,33	30
2	9,87	9,93	60
3	7,2	7,27	70
4	11,66	11,71	50
5	2,83	2,86	30
6	5,26	5,27	10
7	5,29	5,31	20
8	9,96	10	40
9	8,59	8,6	10
10	4,94	4,95	10
11	12,12	12,15	30
12	13,18	13,19	10

stosowaniu wybranych i zaadaptowanych bakterii otrzymanych ze ścieków ropopochodnych. Zgodnie z tablicą 7, najbardziej sprzyjające warunki dla niskiego i wysokiego stężenia fenolu ($\cong 2,14$ i $9,30$ mg/l) uzyskano dla hydraulicznego czasu retencji wynoszącego 18 godzin w obecności warstwy granulowanego węgla aktywnego (odpowiednio 83 i 86%). W przypadku pośrednich stężeń fenolu większą wydajność uzyskano przy czasie retencji wynoszącym 18 godzin w obecności warstwy granulowanego węgla aktywnego (81%). Wyniki tych doświadczeń przedstawiono na rysunku 7.

directly selected and adapted bacteria obtained from the petroleum wastewater. According to table 7, the most favorable conditions for low and high phenol concentration ($\cong 2,14$ and $9,30$ mg/l) were obtained with a HRT of 18 hours with the presence of the GAC layer (83 and 86%, respectively). For the intermediate phenol concentration, a 24 hour HRT with GAC presence was more efficient (81%). Figure 7 shows the results of the experiments.

Tablica 7
Wyniki całościowej optymalizacji

Table 7
Global Optimization results

Ci = 2,14 mg/l			Ci = 6,13 mg/l			Ci = 9,30mg/l		
HRT	GAC	%	HRT	GAC	%	HRT	GAC	%
–	–	77	–	–	72	–	–	78
+	–	79	+	–	63	+	–	85
–	+	83	–	+	75	–	+	86
+	+	81	+	+	81	+	+	81
(%)	Wydajność usuwania fenolu Phenol removal efficiency							
HRT (–)	18 godzin 18 hours							
HRT (+)	24 godzin 24 hours							
GAC (–)	bez granulowanego węgla aktywnego absence							
GAC (+)	w obecności granulowanego węgla aktywnego presence							
Ci	początkowe stężenie w bioreaktorze oceniane za pomocą techniki Spectroquant initial bioreactor concentration evaluated with the Spectroquant							

Tablica 8 zawiera wyniki eksperymentów przeprowadzonych w reaktorze dla każdego z badanych stężeń fenolu.

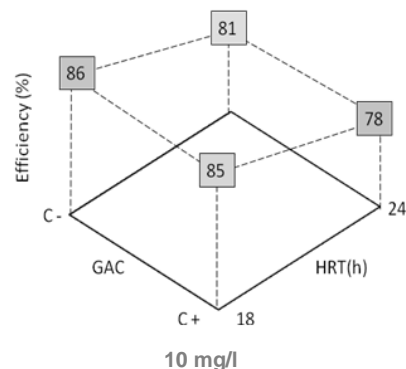
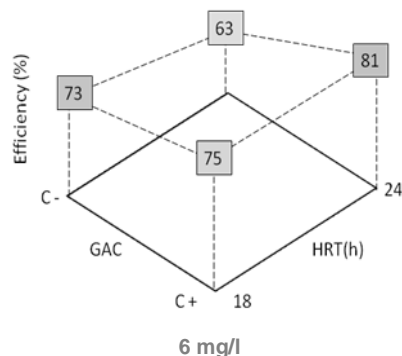
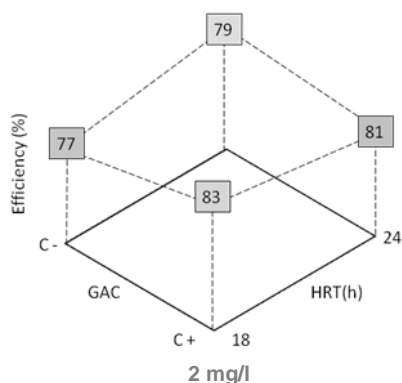
Wyniki doświadczalne dla stężenia fenolu $\cong 2$ mg/l

W obecności granulowanego węgla aktywnego wydajność usuwania fenolu wzrosła o 6% i 2,3% dla hydraulicznych czasów retencji wynoszących, odpowiednio 18 i 24 godziny. Obecność granulowanego węgla aktywnego dawała wzrost wydajności średnio o 4,1%. Ten pozytywny wpływ można przypisać zachodzącej na

Table 8 includes the experimental design responses for each studied concentration.

Experimental results for $\cong 2$ mg/l of phenol

In presence of GAC, phenol removal efficiency increased by 6 and 2,3% for HRTs of 18 and 24 hours, respectively. GAC represented an average 4,1% increase of efficiency. This positive effect could be attributed to the adsorption of phenol, which had not been yet consumed by bacteria, on the



Rys. 7
Wydajność usuwania fenolu

Fig. 7
Global Optimization results

Tablica 8
Wpływ czynników na wydajność usuwania fenolu

Table 8
Principal effects in terms of phenol removal efficiency

HRT (h)	GAC		Średnia	Wpływ użycia GAC
	C -	C +		
a) 2 mg/l				
18	77,1	83,0	80,0	6,0
24	78,6	80,9	79,7	2,3
Średnia Mean	77,8	81,9	79,9	4,1
Wpływ wydłużenia HRT 24 h – 18 h Response to HRT 24h – 18 h	1,5	-2,2	0,3	
b) 6 mg/l				
18	72,5	74,8	73,6	2,3
24	63,4	81,5	72,4	18,1
Średnia Mean	67,9	78,1	73,0	10,2
Wpływ wydłużenia HRT 24 h – 18 h Response to HRT 24h – 18 h	-9,1	6,7	-1,2	
c) 10 mg/l				
18	77,9	85,6	81,7	7,7
24	84,6	81,4	83,0	-3,2
Średnia Mean	81,2	83,5	82,4	2,2
Wpływ wydłużenia HRT 24 h – 18 h Response to HRT 24h – 18 h	6,8	-4,1	1,3	

powierzchni granulowanego węgla aktywnego adsorpcji fenolu, który nie został jeszcze zużyty przez bakterie. Jednakże udział granulowanego węgla aktywnego w wydajności nie jest bardzo znaczący zważywszy, że adsorpcja na granulowanym węglu aktywnym jest obserwowana częściej przy większych stężeniach fenolu. Rozpatrując wpływ hydraulicznego czasu retencji pod nieobecność warstwy granulowanego węgla aktywnego, wzrost czasu retencji z 18 do 24 godzin dał wzrost wydajności usuwania fenolu o 1,5%. Zwiększenie HRT o dalsze 6 godzin (z 18 do 24) również nie dało znaczących efektów w tych doświadczeniach. Pozostaje to w zgodności z kinetyką biodegradacji, gdzie rozkład substancji chemicznych lub zanieczyszczeń (w tym przypadku fenolu) zachodzi głównie na początku procesu. Obecność granulowanego węgla aktywnego w 24-godzinnym eksperymencie zmniejszyła wydajność o 2,2%. Efekt ten mógł pojawić się na skutek desorpcji fenolu z warstwy granulowanego węgla aktywnego. Ponadto we wstępnym okresie adsorpcji i przy niskim stężeniu fenolu brak pożywienia mógł sprawić, zmniejszony wzrost bakterii i przez to mniejszą wydajność procesu. Mimo to stwierdzono tylko niewielkie zmiany wydajności usuwania fenolu przy uwzględnieniu zmiennych GAC i HRT, co wskazuje zarówno na to, że fenol był rzeczywiście rozkładany w ciągu pierwszych 18 godzin, oraz że mechanizm adsorpcji nie miał większego znaczenia w tych eksperymentach.

Wyniki doświadczeń dla stężenia fenolu $\cong 6$ mg/l

W obecności granulowanego węgla aktywnego wydajność usuwania fenolu wzrosła o 2,3% i 18,1% dla hydraulicznych czasów retencji wynoszących, odpowiednio 18 i 24 godziny. W doświadczeniach tych obecny granulowany węgiel aktywny dawał średnio wzrost wydajności o 10,2%, co stanowiło bardziej znaczący wpływ tego czynnika. Biorąc pod uwagę wpływ hydraulicznego czasu retencji przy braku warstwy granulowanego węgla aktywnego, wzrost z 18 do 24 godzin powodował zmniejszenie wydajności usuwania fenolu o 9,1%. W obecności granulowanego węgla aktywnego wydajność wzrastała o 6,7%. Spadek wydajności w eksperymentach 24-godzinnych (bez granulowanego węgla aktywnego) mógł następować z uwagi na stres jakiego doznawały bakterie poddane działaniu trzykrotnie wyższego stężenia niż poprzednio. Mogło to powodować masowe zamieranie bakterii na powierzchni biofilmu. Te martwe struktury komórkowe mogły adsorbować fenol w trakcie procesu a następnie fenol ten ulegał desorpcji i był usuwany z cieczą wypływającą z reaktora, powodując spadek wydajności. W tym przypadku warstwa granulowanego węgla aktywnego była istotna dla zatrzymania uprzednio zdesorbowanego fenolu, zwiększając wydajność o 18,1%, jak podano wcześniej. Zjawisko to nie dotyczyło hydraulicznego czasu retencji wynoszącego 18 godzin, ponieważ fenol, który ulegał adsorpcji na strukturach komórkowych nie był prawdopodobnie obecny w wodzie obiegowej.

surface of the GAC layer. Nevertheless, this contribution is not highly significant given that GAC adsorption is more common for high phenol concentrations. Considering the effect of HRT in absence of the GAC layer, an increase from 18 to 24 hours showed a 1,5% increase of phenol removal efficiency. Increasing the HRT for 6 more hours (18 to 24) was also not significant in these experiments. This is consistent with the biodegradation kinetics, where the degradation of chemical substances or pollutants (in this case, phenol) occurs mostly at the beginning of the process. GAC presence in the 24 hour experiment decreased the efficiency by 2,2%. This effect might have occurred due to phenol desorption from the GAC layer, which could have possibly made phenol less available for bacteria, decreasing its population. Even so, only little variations were identified in removal efficiencies, when considering the variables GAC and HRT, demonstrating both that phenol was indeed biodegraded in the first 18 hours and that the adsorption mechanism was unimportant in these experiments.

Experimental results for $\cong 6$ mg/l of phenol

The presence of GAC increased phenol removal efficiency by 2,3 and 18,1% for HRTs of 18 and 24 hours, respectively. In these experiments, GAC represented an average 10,2% efficiency increase, which was more significant. Considering the effect of HRT in absence of the GAC layer, an increase from 18 to 24 hours reported a 9,1% decrease in phenol removal efficiency. In its presence, the efficiency increased by 6,7%. Efficiency might have decreased in the 24 hours experiments (without GAC) because of the stress bacteria suffered when exposed to concentrations three times higher than the previous ones. This could have caused massive bacterial dead on the surface of the biofilm. These non-living cellular structures may have absorbed phenol during the process which was then desorbed and eliminated in the effluent, causing the efficiency decrease. In this way, the GAC layer was important in retaining previously desorbed phenol which was then adsorbed onto GAC increasing the efficiency by 18,1%, as stated before. This phenomenon was not relevant for the 18 hour HRT because phenol that was absorbed on the cellular structures was probably unavailable in the circulating water.

Wyniki doświadczeń dla stężenia fenolu ≈ 10 mg/l

W obecności granulowanego węgla aktywnego wydajność usuwania fenolu wzrosła o 7,7% dla hydraulicznego czasu retencji wynoszącego 18 godzin. Z kolei dla 24-godzinnego hydraulicznego czasu retencji – przeciwnie – wydajność usuwania fenolu spadła o 3,2%. Obecność granulowanego węgla aktywnego dawała średnio wzrost wydajności o 2,2%. Dla 18-godzinnych czasów retencji, obecność granulowanego węgla aktywnego miała dodatni wpływ. Jak już wspomniano wcześniej, adsorpcja na węglu aktywnym ma większe znaczenie przy wyższych stężeniach, zgodnie z eksperymentem, w którym wzrost wydajności wyniósł 7,7%. Niemniej jednak wydajność zmniejszała się w eksperymencie 24-godzinnym, wskazując na brak fenolu na skutek jego wcześniejszej adsorpcji na węglu aktywnym. Rozpatrując wpływ czasu retencji przy braku warstwy granulowanego węgla aktywnego, wzrost czasu retencji z 18 do 24 godzin powodował 6,8% wzrost wydajności usuwania fenolu, podczas gdy w obecności warstwy granulowanego węgla aktywnego wydajność spadła do 4,1%. Można przypuszczać, że w tym momencie bakterie były w wysokim stopniu przystosowane do coraz to wyższych stężeń fenolu, co jest w istocie związane z istnieniem silniejszej warstwy biofilmu. Fakt ten wykazano dla 24-godzinnych czasów retencji, zarówno poprzez zwiększenie wydajności usuwania fenolu bez warstwy granulowanego węgla aktywnego oraz przez zmniejszenie wydajności w obecności węgla aktywnego. Adsorpcja fenolu na węglu aktywnym zmniejsza dostępność fenolu dla procesu biodegradacji przez bakterie, potwierdzając fakt opisany powyżej dla wyników uzyskanych w eksperymentach 24-godzinnych na węglu aktywnym.

Analiza optymalizacji procesu

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki, obecność warstwy granulowanego węgla aktywnego w bioreaktorze nie miała znaczącego dodatniego wpływu na proces biodegradacji, w szczególności przy wysokich stężeniach fenolu. Wydajności procesu były na ogół niższe niż 10%. Podobnie jak poprzednio, eksperymenty wykazały, że wydłużone czasy retencji nie oznaczały zwiększenia wydajności procesu. Dla niskich i dla wysokich stężeń fenolu (2 i 10 mg/l), warstwa bakterii była w stanie dokonać biodegradacji fenolu w ciągu pierwszych 18 godzin. Pokazuje to, że podwyższenie hydraulicznego czasu retencji do 24 godzin także nie miało istotnego znaczenia. W przypadku badań przeprowadzonych przy stężeniu fenolu wynoszącym 6 mg/l, testy przeprowadzone dla czasu retencji wynoszącego 24 godz. wykazały wzrost wydajności usuwania fenolu o 2%, potwierdzając, że biodegradacja fenolu w przeważającej części zachodziła w ciągu pierwszych 18 godzin. W związku z tym zarówno zastosowanie granulowanego węgla aktywnego jak i przedłużanie czasu retencji nie przynosiło znaczącego podwyższenia wydajności usuwania fenolu.

Experimental results for ≈ 10 mg/l of phenol

The presence of GAC increased phenol removal efficiency by 7,7% for a HRT of 18 hours. In contrast, for a HRT of 24 hours, the efficiency decreased by 3,2%. GAC represented an average 2,2% efficiency increase. For the 18 hours HRT, GAC had a positive effect. As stated before, adsorption on GAC is more relevant for high concentrations, consistent with the 7,7% increase in efficiency. Nonetheless, the efficiency decreased in the 24-hour experiment, revealing phenol non-availability due to prior adsorption on GAC. Considering the effect of HRT, in absence of the GAC layer, an increase from 18 to 24 hours demonstrated a 6,8% increase in phenol removal efficiency, while in presence of GAC, the efficiency decreased in 4,1%. At this point, bacteria were presumed to be highly adapted to increasing phenol concentrations which is indeed related to the existence of a stronger biofilm layer. This fact was demonstrated for a 24-hour HRT, both by the increase in phenol removal efficiency without the GAC layer, and the efficiency decrease with the GAC layer. Phenol adsorption on GAC diminishes its availability for bacterial consumption, confirming the fact previously described for the 24-hour response on GAC.

Global optimization analysis

Taking into account the results obtained, the presence of a GAC layer in the bioreactor did not constitute an important advantage for the biodegradation process, especially when phenol concentrations were high. The efficiencies increases were generally less than 10%. Similarly, the experiments showed that prolonged HRTs were not an indication of efficiency increases. For low and high phenol concentrations (2 and 10 mg/l), the bacterial layer was able to biodegrade phenol in the first 18 hours of HRT. This shows that raising the HRT to 24 hours was also not significant. For the tests conducted with 6 mg/l of phenol, the 24 hours HRT tests showed a phenol removal efficiency increase of 2%, confirming that most of phenol degradation occurred within the first 18 hours. According to this, both, the use of GAC, and the prolongation of the HRT do not reflect major efficiency increases.

Eksperymenty kontrolne

W tablicy 9 zestawiono dane otrzymane w eksperymentach kontrolnych. Przy „zerowym” hydraulicznym czasie retencji (szybka filtracja) obecność warstwy granulowanego węgla aktywnego była konieczna i był to jedyny mechanizm przyczyniający się do usuwania fenolu. Eksperymenty kontrolne przeprowadzone przy stosowaniu warstwy biofilmu charakteryzowała wyższa wydajność usuwania fenolu (do 97%). Bioreaktory wystawione na bezpośrednie działanie światła dziennego dawały wyższą wydajność, szczególnie przy połączeniu trzech wymienionych czynników (światła, granulowanego węgla aktywnego i hydraulicznej retencji). Zjawisko to dowiodło, w jaki sposób światło uczestniczy w biodegradacji fenolu. Brak któregośkolwiek z tych czynników powodował obniżenie wydajności. Doświadczenia te (kontrolne) przeprowadzone z warstwą biofilmu wykazywały wyższą wydajność w porównaniu z poprzednimi doświadczeniami (optymalizacyjnymi) dzięki stopniowej adaptacji warstwy bakteryjnej i dzięki wzrostowi jej wielkości.

Bioreaktory stosowane w eksperymentach kontrolnych bez obecności warstwy drobnoustrojów zostały przemyte i zdezynfekowane chlorem po wcześniejszych badaniach optymalizacyjnych. Wydajność wynoszącą 4% uzyskano bez stosowania granulowanego węgla aktywnego i bez hydraulicznej retencji w związku z wpływem światła (możliwe zachodzenie fotodegradacji). Ujemne wartości wydajności podane w tabeli 10 można przypisać desorpcji fenolu zarówno z warstwy granulowanego węgla aktywnego i martwych struktur komórkowych; (odpowiednio -47 i -6%). Ekspery-

Control experiments

Table 9 summarizes the data obtained in the control experiments. In the absence of HRT (fast filtration), the GAC layer was essential, being the only mechanism contributing to phenol removal. The control experiments conducted with biofilm layer reported elevated efficiencies (up to 97%). The bioreactors exposed to direct light showed higher efficiencies, especially when the three factors were combined (light, GAC and HRT). This phenomenon proved how light participates in phenol biodegradation. The absence of any of the factors showed lower efficiencies. These experiments (controls) illustrated higher efficiencies compared to the previous ones (optimization) thanks to the microbial layer progressive adaptation and size increase.

The bioreactors used for the control experiments in absence of a microbial layer were washed and disinfected with chlorine after being previously used in the optimization. An efficiency equivalent to 4% was obtained in absence of GAC and HRT due to the contribution of light (possible photo-degradation). The negative efficiencies reported in table 10 might be attributed to phenol desorption from both the GAC layer and other dead cellular structures (-47 and -6%, respectively). The experiments with GAC and light presence showed significant efficiencies, 59% and 45%, for 18 and 24 hours, respectively, demonstrating the significance of the GAC adsorption as well as the photo-degradation mechanism when microorganisms are absent.

Tablica 9
Wyniki badań kontrolnych pod względem wydajności procesu usuwania fenolu

Table 9
Control tests results in terms of phenol removal efficiency

Brak hydraulicznej retencji Absence of Hydraulic Retention Time								
Ci = 2,14 mg/l			Ci = 6,13 mg/l			Ci = 9,30 mg/l		
HRT	GAC	%	HRT	GAC	%	HRT	GAC	%
0	-	-13	0	-	14	0	-	17
0	+	2	0	+	19	0	+	34

Wpływ światła bez obecności warstwy bakteryjnej (biofilmu) Light effect without microbial layer (biofilm)				Wpływ światła w obecności warstwy bakteryjnej (biofilmu) Light effect with microbial layer (biofilm)			
HRT	GAC	światło	%	HRT	GAC	Światło	%
-	+	+	59	-	+	+	96
-	-	-	1	-	-	-	85
-	-	+	4	-	-	+	76
-	+	-	20	-	+	-	81
+	+	+	45	+	+	+	97
+	-	-	-6	+	-	-	81
+	-	+	4	+	-	+	86
+	+	-	-47	+	+	-	81

menty z obecnością granulowanego węgla aktywnego i światła charakteryzowała wysoka wydajność: 59% i 45% dla czasów retencji wynoszących odpowiednio 18 i 24 godziny, wykazując na znaczenie adsorpcji na granulowanym węglu aktywnym a także znaczenie mechanizmu fotodegradacji fenolu pod nieobecność mikroorganizmów.

Pod nieobecność tych trzech czynników (biofilmu, granulowanego węgla aktywnego i hydraulicznej retencji) uzyskane wydajności były bardzo niskie (1% i 4%). Fakt ten potwierdza biodegradację fenolu za pomocą biofilmu adaptowanych bakterii naniesionego na nośnik z kruszonych kamieni znajdujący się w reaktorze.

Wstępne badania pilotażowe

Po przeprowadzeniu prób laboratoryjnych i prób kontrolnych, badania w niektórych reaktorach były prowadzone przy użyciu ścieków ropopochodnych jako cieczy poddawanej oczyszczaniu. W badaniach zastosowano czas retencji wynoszący 18 godzin z możliwością przekazania ścieków wychodzących z jednego reaktora do następnego w celu uzyskania wymaganego przez normy stężenia końcowego fenolu. W tablicy 10 przedstawiono otrzymane wyniki. Wyniki te wskazują, że obecność granulowanego węgla aktywnego nie poprawia biodegradacji fenolu w tych bioreaktorach. Może się tak dzieć dlatego, że fenol adsorbuje się na warstwie granulowanego węgla aktywnego i staje się mniej dostępny dla rozkładających go bakterii: stężenie fenolu obniża się, a tym samym obniża się szybkość biodegradacji.

Uwagi końcowe

Trzy ważne fakty stwierdzone na podstawie tych badań wskazują na duże możliwości biodegradacji fenolu w badanych ściekach ropopochodnych: ogromna ilość mikroorganizmów wyizolowanych z próbek ścieków i mułu pobranych z wód odprowadzanych z pola naftowego, adaptacja bakterii do wysokich stężeń fenolu oraz wysoka wydajność usuwania fenolu uzyskana podczas eksperymentu optymalizacji. Optymalne warunki biodegradacji dla niskich i wysokich stężeń (2,14 i 9,30 mg/l)

In absence of the three factors (biofilm, GAC layer and HRT), the efficiencies obtained were quite low (1% and 4%). This evidence confirmed phenol biodegradation by means of the adapted biofilm attached to the crushed stone media inside the bioreactors.

Pre-pilot testing

After conducting the laboratory and control tests, some bioreactors were tested with oil wastewater as affluent. An 18-hour HRT was selected for the tests given the diverse findings concerning the experimental design analyses and the global analysis discussed previously. Table 10 shows the results obtained. Results show that GAC presence is not favorable for phenol biodegradation in these bioreactors. This could happen because phenol is adsorbed in the GAC layer becoming less available for bacterial degradation, phenol concentration lowers and by the same mean the biodegradation rate.

Concluding Remarks

Three important findings indicated the elevated phenol biodegradation potential of the studied petroleum wastewater: the great abundance of isolated microorganisms from wastewater and sludge samples collected in the effluent of the oil field, the bacterial adaptation to high phenol concentrations and the elevated phenol removal efficiencies obtained in the optimization experiments. The optimum biodegradation conditions for low and high phenol

Tablica 10
Wyniki wstępnych badań pilotażowych

GAC	Ci mg/l	Cf mg/l	Wydajność usuwania fenolu % Phenol removal efficiency %
+	9,69	6,49	33,02
+	8,54	6,31	26,11
-	8,46	2,16	74,47
-	9,77	4,72	51,69
Ci	stężenie w ściekach podawanych do oczyszczenia affluent concentration		
Cf	stężenie w ściekach po oczyszczaniu effluent concentration		

Table 10
Pre-pilot testing results

uzyskano w obecności warstwy węgla aktywnego przy czasie retencji wynoszącym 18 godzin. Najlepszy wynik dla pośredniego stężenia fenolu (6,13 mg/l) otrzymano dla czasu retencji wynoszącego 24 godz. przy stosowaniu warstwy węgla aktywnego. Przy podwyższeniu zawartości fenolu, użycie warstwy węgla aktywnego miało pozytywny wpływ przy czasie retencji wynoszącym 24 godziny, i przeciwnie, przy niskich stężeniach fenolu przeważająca część procesu biodegradacji zachodziła w pierwszych 18 godzinach a obecność granulowanego węgla aktywnego podwyższała wydajność procesu o 4%. Adsorpcja fenolu na powierzchni granulowanego węgla aktywnego stała się widoczna gdy nie były dostępne inne mechanizmy eliminacji fenolu, w szczególności przy badaniu wysokich stężeń. Eliminacja fenolu przebiega skuteczniej, gdy połączy się wszystkie analizowane czynniki: biodegradację przez warstwę bakterii, światło i obecność granulowanego węgla aktywnego.

concentrations (2,14 y 9,30 mg/l) were obtained with the presence of GAC and 18 hours of HRT. The best result for the intermediate phenol concentration (6,13 mg/l) was obtained with 24 hours of HRT and the presence of GAC. When phenol concentration was elevated, the use of GAC had a positive effect with a HRT of 24 hours. On the contrary, for low phenol concentrations, most of the biodegradation occurred in the first 18 hours and the GAC layer increased the efficiency by 4%. Phenol adsorption on the surface of the GAC layer became evident when there were no other mechanisms available for phenol elimination, especially when high concentrations were studied. Phenol elimination is more successful when all the analyzed factors are combined: bacterial layer biodegradation, light and GAC presence. The pre-pilot testing confirmed that phenol biodegradation is successful when oil wastewater is applied directly to bioreactors without the GAC layer.

Podziękowanie – Acknowledgements

We thank the Research Management Office at Pontificia Bolivariana University for their continuous support in the development of this research. We also give special thanks to Eng. Juan Diego Navarro Sarmiento, for his scientific and technical collaboration and to the Biotechnology, Bioethics and Environment Research Centre at the Autonomous University of Bucaramanga (UNAB), for their technical assistance.

Literatura – References

1. ALVES, M.M, PEREIRA, M.A, BELLOUTI, R.M., MOTA, J.A., NOVAIS, J. and MOTA, M. A new method to study interactions between biomass and packing material in anaerobic filters. *Biotechnology Techniques*, april 1998, vol. 12, no. 4, p. 277 – 283. ISSN 1573-6784.
2. AHMED, Saif, JAVED, M. Afzal, TANVIR, Shazia and HAMEED, Abdul. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that degrades 4-acetamidophenol and 4-aminophenol. *Biodegradation*, sep. 2001 vol. 12, no. 5, p. 303 – 309. 1572-9729 ISSN 1572-9729.
3. BANDYOPADHYAY, K, DAS, D, and MAITI, B.R. Kinetics of phenol degradation using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, may 1998, vol. 18, no. 5, p. 323 – 399. ISSN 1615-7605.
4. BIELEFELDT, Angela R. and STENSEL, H. David. Biodegradation of aromatic compounds and TCE by a filamentous bacteria-dominated consortium. *Biodegradation*, feb. 1999, vol. 10, no. 1, p. 1 – 13. ISSN 1572-9729.
5. Carvalho, M.F, FERREIRA, Jorge, PACHECO, C.C., DE MARCO, P., HENRIQUEZ, I. S., CORREIRA A., and CASTRO, P.M.L. Long-term performance and microbial dynamics of an up-flow fixed bed reactor established for the biodegradation of fluorobenzene *Applied Microbiology and Biotechnology*, July 2006, vol. 71, no. 4, p. 555 – 562. ISSN: 1432-0614.
6. CRAVEIRO, Fernando. Anaerobic degradation of phenol and bioregeneration of granular activated carbon. *Doctoral thesis (Ph. D), University of Microfilms International, University of Texas at Austin, USA, 1991, p. 239.*
7. DELGADO, Jacob, LEÓN, José Guillermo, SUAREZ, Carlos Alberto. Phenol removal using biodegradation techniques. *Thesis in Environmental Engineering, ECOPETROL – CIB, Universidad Pontificia Bolivariana, Bucaramanga, 1993.*

8. FIELD, Jim. *Degradación anaeróbica de compuestos orgánicos. Toxicidad metanogénica.* FIELD, Jim. SIERRA, R. *Biodegradability and toxicity lecture series, International course on Anaerobic Wastewater treatment, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, 1989.*
9. FLORES, Elías, GONZÁLEZ-INIESTRA, Margarita, FIELD, Jim, LORA-OLGUIN, Patricia and PUIG-GRAJALES, Laura. . *Biodegradation of Mixtures of Phenolic Compounds in an Upward-Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. Journal of Environmental Engineering, nov. 2003, vol. 129, no. 11, p. 999 – 1006. ISSN 0733-9372.*
10. FOLSOM, B.R., CHAPAMAN, P.J., PRITCHAR, P.H. *Phenol and trichloroethylene degradation by Pseudomonas cepacia G4: kinetics and interactions between substrates. Applied and Environmental Microbiology, may.1990, vol. 56, no. 5, p. 1279-1285. ISSN 0099-2240.*
11. GARCÍA F., Carlos A. *Biological wastewater treatment. Mexico, Limusa, 1993. p. 338. ISBN 968-18-1926.*
12. HA, Sung-Ryong, VINITNANTHARAT, Soydoa and OZAKI, Hiroaki. *Bioregeneration by mixed microorganisms of granular activated carbon loaded with a mixture of phenols. Biotechnology Letters, july 2000, vol. 22, no. 13, p. 1093 – 1096. ISSN 1573-6776.*
13. KNOLL, Gertrud; and WINTER, Josef. *Degradation of phenol via carboxylation to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology., march 1989, vol. 30, no. 3, p. 318 – 324. ISSN 0175-7598.*
14. KOCH, B et al. *Arena y carbón activado como soporte de la biopelícula para degradación microbiana de fenoles y compuestos aromáticos nitrogenados. Water Resources, 1991, vol. 25, no. 1, p. 1 – 8. ISSN 0097-8078.*
15. KRALLISH, Irina, GONTA, Svetlana, BERGAUER, Phillip and MARGESIN, Rosa. *Phenol degradation by immobilized cold-adapted yeast strains of Cryptococcus terreus and Rhodotorula creatinivora. Extremophiles, oct. 2006 vol. 10, no. 5, p. 441 – 449. ISSN 1431-0651*
16. MARGESIN, Rosa, BERGAUER, Philipp and GANDER, Silvia. *Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant Arthrobacter sp. and mesophilic Pseudomonas putida. Extremophiles, june 2004, vol. 8, no. 3, p. 175 – 258. ISSN 1431-0651*
17. MENDONCA, Elsa, MARTINS, Aida y ANSELMO, Ana Maria. *Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by Fusarium flocciferum. Electron. J. Biotechnol., abr. 2004, vol.7, no.1, p.38 – 46. ISSN 0717-3458.*
18. PRPICH, George and DAUGULIS Andrew. *Biodegradation of a phenolic mixture in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology, sep. 2006, vol. 72, no. 3, p. 607 – 615. ISSN 0175-7598*
19. PRPICH, George and DAUGULIS Andrew. *Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid-liquid two phase partitioning bioreactor. Biodegradation, aug. 2005, vol. 16, no. 16, p. 291 – 392. ISSN: 0923-9820*
20. RESTREPO, Ricardo et al. *Aplicación de Tecnologías combinadas para el tratamiento de fenoles en aguas residuales de producción. XII Congreso Colombiano de Petróleo y Gas. Asociación Colombiana de Ingenieros de Petróleos (ACIPET). ECOPETROL. 2007*
21. RIGO, M, ALEGRE, R.M. *Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from industrial wastewaters and kinetics of thebiodegradation. Folia Microbiologica, jan. 2004, vol. 49, no. 1, p. 41 – 45. ISSN 1874-9356.*
22. RINCÓN, Nancy et al. *Tiempo de retención hidráulico óptimo para el tratamiento anaerobio de aguas de producción de petróleo liviano. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia, ago. 2002, vol. 25, no. 2. ISSN 0254-0770.*
23. SAIA, F.T, DAMIANOVIC, M. H. R. Z., CATTONY, E. B. M., BRUCHA G., FORESTI, E., AND VAZOLLER, R.F. *Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a fixed-film reactor inoculated with polluted sediment from Santos-São Vicente Estuary, Brazil. Applied Microbiology and Biotechnology, june 2007, vol. 75, no. 3, p. 665- 672. ISSN 1432-0614.*

24. SHIMP Robert J. and PFAENDER, Frederick K. *Effects of Surface Area and Flow Rate on Marine Bacterial Growth in Activated Carbon Columns*. En: *Applied and Environmental Microbiology*, aug. 1982, vol. 44, no. 2, p. 475 – 477. ISSN 0099-2240.
25. SWAPNA, Thomas, SARFARAZ, Sami, MISHRA, L.C., IYENGAR, Leela. *Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial culture*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, feb.2002, vol. 18, no. 1, p. 57 – 63. ISSN 1573-0972.
26. SUNG Yeom, SEUNG, Ho Kim, YOUNG, Je Yoo and IN SANG, Yoo. *Microbial adaptation in the degradation of phenol by Alcaligenes xylosoxidans Y234*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, jan. 1997, vol. 14, no. 1, p. 1 – 73. ISSN 1975-7220.
27. WANG, Chao and LI, Yi. *Incorporation of granular activated carbon in an immobilized membrane bioreactor for the biodegradation of phenol by Pseudomonas putida*. *Biotechnology Letters*, sep. 2007, vol. 29, no. 9, p. 1307 – 1437. ISSN 0141-5492.
28. YOUNG, LY; HÄGGBLÖM Max. (1990) *The anaerobic microbiology and biodegradation of aromatic compounds*, p. 3-19. In: Kamely D, Chakrabarty A, Omenn GS (eds) *Biotechnology and Biodegradation*. *Advances in Biotechnology Series*, vol. 4. Gulf Publishing Company, Houston, cited by DELGADO, Jacob, LEÓN, José Guillermo, SUAREZ, Carlos Alberto. *Remoción de fenoles mediante la técnica de la biodegradación. Aplicación a Efluentes de Refinería. ECOPETROL – CIB*. 1993. p. 44.
29. YUCEL, Tokuz, R. *Biodegradación y remoción de fenoles en un contactor biológico rotatorio*. En: *Water Science and Technology*, Vol. 1, no. 12. 1989. p. 1751-1754.