

**CHAPTER 7.14 TRATAMIENTO COMBINADO DE ADSORCIÓN Y
DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE 4-CLOROFENOL**

C. Lobo (1); N. Bertola (1) and N. Zaritzky *(1,2)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos CONICET La Plata, Argentina.

(2) Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

RESUMEN

Los compuestos fenólicos están presentes en una amplia variedad de efluentes industriales, tales como los generados por petroquímicas, farmacéuticas y herbicidas. Entre los compuestos fenólicos se destacan por su toxicidad los clorofenoles. Si bien, el tratamiento biológico es adecuado para fenoles, su aplicación para elevadas concentraciones de clorofenoles tiene severas limitaciones debido al alto grado de toxicidad para los microorganismos. Por esa razón resulta recomendable la combinación de un pre-tratamiento fisicoquímico seguido de un tratamiento biológico. Si bien se han realizado numerosos estudios sobre la adsorción de compuestos fenólicos en carbón activado, los altos costos del carbón activado y la eliminación del carbón utilizado condujeron a la investigación de materiales alternativos más económicos tales como almidón catiónico insoluble quitina y quitosano. En el presente trabajo se analizó la remoción de 4-clorofenol (4CF) por medio de adsorción en quitosano comercial como un posible tratamiento previo al sistema biológico. Posteriormente, se analizó el empleo de un reactor biológico de barros activados (BA) que fueron previamente aclimatados a 300 mg/L de fenol para la biodegradación de 4CF. En los ensayos de adsorción se estudió la remoción de 7.7 mM de 4CF en suspensiones 4g/L y 1g/L de quitosano a pH=4.5, 25°C. En los ensayos biológicos se caracterizó la biodegradación de 0.78mM de 4CF y se estudió el efecto de pulsos sucesivos sobre los BA mediante la técnica de respirometría abierta (método ISO 8192, OECD 301F). En cada ensayo la concentración de 4CF se determinó por el método colorimétrico de 4-aminoantipirina y como demanda química de oxígeno (DQO).

En los ensayos de adsorción, la remoción de 7.7mM de 4CF fue de 15.4% para 4g/L quitosano, alcanzándose el equilibrio en un tiempo de 213 h. Se analizó la cinética de adsorción de 4CF en quitosano y se realizó el ajuste a la ecuación de Langmuir obteniéndose una constante de adsorción máxima (q_{max}) de 56.3 mg4CF/g quitosano y una constante de Langmuir (K_L) de 0.004 L/mg4CF. Por otra parte, en los ensayos de respirometría se determinó que los BA previamente aclimatados a fenol fueron capaces de biooxidar 0.78 mM de 4CF, con una remoción de 99.3% para anillos aromáticos y de 82.3% para DQO. Cuando se adicionaron pulsos sucesivos de 4CF, se observó una disminución en la biodegradación. La concentración acumulada de sustrato que redujo un 50% la velocidad específica de consumo de oxígeno (EC50) fue 2.25mM para 4CF, mientras que el coeficiente de oxidación (yO/S) se mantuvo constante con un valor de 2.15mmol4CF/mmolO₂.

*Author for correspondence: zaritzkynoemi@gmail.com

En conclusión, la optimización de la adsorción de 4CF en biopolímeros como el quitosano podría ser una alternativa para disminuir la concentración del contaminante al inicio del tratamiento biológico, evitando así la inhibición de los barros activados.

Palabras clave: 4-clorofenol, adsorción, biodegradación, barros activados

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos están presentes en una amplia variedad de efluentes industriales, tales como los generados por petroquímicas, farmacéuticas y herbicidas¹. Entre los compuestos fenólicos se destacan por su toxicidad los clorofenoles, debido a ello han sido clasificados como contaminantes prioritarios por *United States Environmental Protection Agency (US EPA)*².

Está ampliamente demostrado que los compuestos fenólicos, en particular los clorados, son sumamente persistentes en el medio ambiente. Si bien han sido aislados numerosos microorganismos capaces de biodegradarlos en general, esta velocidad de biodegradación suele ser muy lenta. Además, estos compuestos químicos son tóxicos, recalcitrantes y potencialmente carcinogénicos y/o mutagénicos. Es decir, son considerados residuos peligrosos y regulados como tales – por ejemplo, por la Ley Nacional N°24051/92 (Argentina), con un límite de descarga en agua superficial de 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Decreto 831/93).

Se han estudiado diferentes métodos de remoción de clorofenoles tales como: adsorción³, degradación fotoquímica⁴ y biodegradación⁵. Varios estudios se han focalizado en la obtención de barros activados aclimatados a clorofenoles⁶. Sin embargo, este proceso requiere de largos períodos de adaptación de los microorganismos, principalmente durante la fase lag. Una estrategia promisoría para la biodegradación de clorofenoles es el empleo de biomasa con potencial afinidad para biodegradarlos.

Si bien, el tratamiento biológico es adecuado para compuestos fenólicos, su aplicación para elevadas concentraciones de clorofenoles tiene severas limitaciones debido al alto grado de toxicidad para los microorganismos. Por esa razón resulta recomendable la combinación de un pretratamiento fisicoquímico seguido de un tratamiento biológico. Si bien se han realizado numerosos estudios sobre la adsorción de compuestos fenólicos en carbón activado⁷, los altos costos del carbón activado y la eliminación del carbón utilizado condujeron a la investigación de materiales alternativos más económicos tales como almidón catiónico insoluble, quitina y quitosano.

La quitina (poli- β -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina), segundo polisacárido natural más abundante después de la celulosa, es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, y del exoesqueleto de crustáceos e insectos; es altamente insoluble en agua y solventes orgánicos. Por desacetilación se transforma en quitosano (poli- β -(1,4)-D-glucosamina-N-acetil-D-glucosamina), un polielectrolito catiónico que exhibe características fisicoquímicas de notable interés (elevada proporción de grupos amino libres, mayor solubilidad comparada con la quitina, biocompatibilidad y biodegradabilidad), lo cual hace que presente múltiples aplicaciones en medicina, industria cosmética, agricultura, biotecnología, industria alimentaria, industria papelería, y en el tratamiento de aguas y efluentes residuales e industriales.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la factibilidad de lograr remoción de 4-clorofenol (4CF) de aguas residuales por medio de una etapa primera de adsorción en quitosano comercial previo al tratamiento biológico para reducir los niveles de 4CF y la toxicidad del sistema. Posteriormente a esta etapa se analizó el empleo de barros activados (BA) que fueron previamente aclimatados a 300 mg/L de fenol para la biodegradación de 4CF y de pulsos sucesivos del contaminante. Los resultados obtenidos de adsorción se modelaron matemáticamente con la isoterma de adsorción de Langmuir; por otro lado, los resultados obtenidos mediante tratamiento biológico permitieron obtener constantes cinéticas y estequiométricas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. Las sales inorgánicas fueron de grado reactivo Anedra (San Fernando, Argentina). Quitosano de peso molecular medio, fenol (PM 94.11 Da) y 4-Clorofenol (4CF; PM 128.6 Da) de grado analítico fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

Ensayo de adsorción. Se estudió la remoción de 7.7 mM (990 mg L⁻¹) de 4CF en 4g/L de quitosano pH 4.5, luego se analizó la cinética de adsorción en 1g/L de quitosano pH 4.5, 25°C para diferentes concentraciones iniciales de 4CF 0-6.22 mM (0-800 mg L⁻¹). Luego de alcanzar el equilibrio, se determinó la concentración de 4CF. La capacidad de adsorción se calculó como:

$$q_e = \frac{(C_e - C_0) * V}{m} \quad (1)$$

donde q_e es la capacidad de adsorción en el equilibrio (mg/g), C_0 y C_e corresponden a la concentración inicial y de equilibrio de 4CF, respectivamente, V es el volumen y m la masa del adsorbente (g)⁸.

Barros Activados y condiciones de cultivo. Los barros activados fueron cultivados en un reactor semicontinuo de escala laboratorio (2.5 L); el tiempo de residencia hidráulico fue de 3.3 días y el tiempo de residencia celular de 20 días. La concentración de oxígeno disuelto fue mayor a 4 mgO₂ L⁻¹, la concentración de biomasa fue de 4 g L⁻¹ y el pH final fue ajustado en 8. La biomasa fue aclimatada con un medio de cultivo con 300 mg L⁻¹ de fenol como única fuente de carbono y energía⁹. Cuando se alcanzó el estado estacionario, los barros activados fueron utilizados como fuente de biomasa para todos los ensayos de respirometría.

Procedimientos Analíticos. La concentración de biomasa fue determinada como sólidos suspendidos totales (SST, g L⁻¹) y la concentración de 4CF fue medida por el método 4-amino antipirina y como Demanda Química de Oxígeno (DQO, mgL⁻¹)¹⁰.

Respirometría. Los ensayos respirométricos fueron realizados en un respirómetro de 500 mL de volumen. La muestra de barros fue agitada y aireada de modo que la concentración de oxígeno disuelto (OD) en todo momento del ensayo fuera mayor a 4 mgO₂ L⁻¹. La concentración de OD se determinó con un electrodo de oxígeno (YSI modelo 5739) conectado a una computadora la cual almacenaba 1 dato/seg. Antes de cada pulso del compuesto a estudiar se determinó el coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_L a$) y la velocidad de respiración endógena (OUR_{en}) mediante un método dinámico¹¹. Posteriormente, se determinó la velocidad de respiración exógena (OUR_{Ex}) que se produce en respuesta al agregado del compuesto ensayado. A partir del balance de masa de OD en el reactor se obtiene:

$$OUR_{Ex} = k_L a(C_e - C) - \frac{dC}{dt} \quad (2)$$

donde C_e es la concentración de OD en ausencia de sustrato y C es la concentración de OD instantánea. A partir de los datos de C en función del tiempo, se puede calcular el término dC/dt mediante una derivación numérica; asumiendo que OUR_{en} es constante durante todo el experimento; la ecuación (2) permite calcular la velocidad de respiración asociada al consumo del sustrato agregado (OUR_{Ex}). La velocidad específica de respiración (q_{Ex} , mgO₂ gSST⁻¹ h⁻¹) se calculó como el cociente entre OUR_{Ex} y la concentración de barros en el respirómetro (X).

El coeficiente de oxidación (yO/S) correspondiente al compuesto estudiado, representa la cantidad de oxígeno consumido por unidad de sustrato oxidado y se calculó mediante la siguiente expresión:

$$yO/S = \frac{OC}{S_0} = \frac{\int_0^t OUR_{Ex} dt}{S_0} \quad (3)$$

donde OC es el oxígeno consumido durante la oxidación del sustrato y S_0 es la concentración inicial del compuesto estudiado¹².

Para realizar los ensayos respirométricos se tomó una muestra de barros del reactor en estado estacionario, los barros activados aclimatados a 300 mg L⁻¹ de fenol fueron centrifugados a 2000 rpm y resuspendidos en 500 mL de buffer fosfato (K₂HPO₄ 1000 mg L⁻¹, KH₂PO₄ 500 mg L⁻¹). El pH fue ajustado en 7,5 por medio de adición de gotas de una solución concentrada de NaOH o H₂SO₄. Los barros activados lavados fueron colocados en el respirómetro y se comenzó la aireación de los mismos hasta obtener una lectura de OD constante, la cual indicaba una velocidad de respiración endógena constante. La aireación fue mantenida estable en 1 L min⁻¹ utilizando un caudalímetro de alta precisión (Bruno Schilling). Cuando se alcanzó una concentración estable de OD se adicionó un pulso de 0.78 mM (100 mg L⁻¹) de 4CF. Por otro lado, se adicionaron 5 pulsos sucesivos de 0.64 mM de 4CF.

RESULTADOS

Adsorción de 4CF en quitosano. En los ensayos de adsorción, se estudió la remoción de concentraciones elevadas de 4CF 7.7mM (990 mg L⁻¹) en 4g L⁻¹ quitosano. El tiempo empleado en alcanzar el equilibrio fue de 213 h, con un porcentaje de remoción de 15.4 %.

En la **Figura 1** se muestra la isoterma de adsorción que relaciona la capacidad de adsorción y la concentración de 4CF en el equilibrio. La ecuación de Langmuir ha sido aplicada ampliamente para procesos de adsorción de compuestos orgánicos:

$$q_e = \frac{K_L q_{max} C_e}{1 + K_L C_e} \tag{4}$$

donde q_e es la capacidad de adsorción en condiciones de equilibrio (mg g⁻¹), C_e es la concentración de 4CF en el equilibrio, q_{max} y K_L corresponden a la máxima capacidad de adsorción (mg g⁻¹) y la constante de Langmuir, respectivamente. A partir del ajuste no lineal de q_e en función de C_e ¹³, se obtuvo un q_{max} 56.3 mg4CF(g quitosano)⁻¹ y una constante de Langmuir ($K_L= 0.004$ L (mg4CF)⁻¹ ($r^2=0.98$)). Estos valores fueron mayores a los obtenidos por Li y col⁸; quienes obtuvieron un $q_{max}=2.58$ mg g⁻¹ y $K_L= 0.001$ mg g⁻¹ para quitosano a pH 7, 30°C. Zhou y col, 2014¹³, estudiaron la adsorción de compuestos fenólicos en quitosano modificado químicamente.

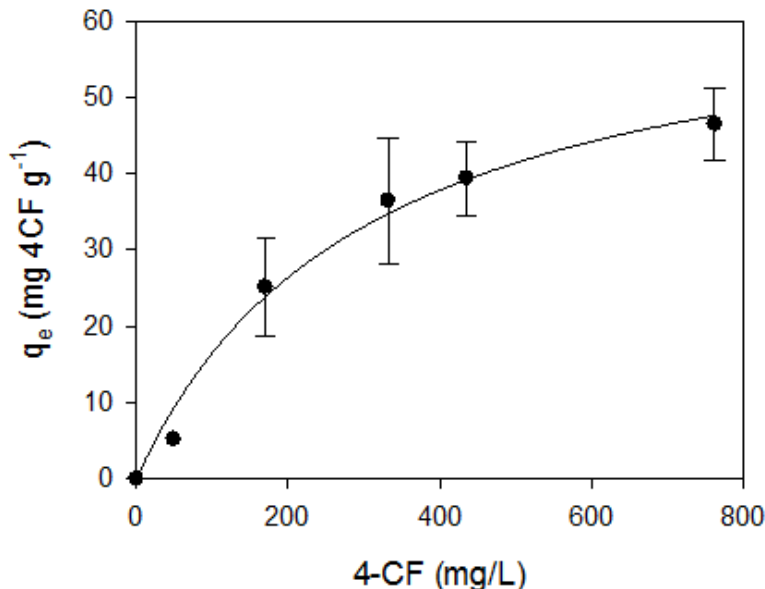


FIGURA 1. Isotherma de adsorción de 4-clorofenol en quitosano pH 4.5, 25°C. La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación de Langmuir

Los valores de q_{max} obtenidos para quitosano modificado con β -ciclodextrina y quitosano con salicilaldehído fueron del orden obtenido en el presente trabajo: 37.04 y 31.27 mg4CF g⁻¹., respectivamente.

Por lo tanto, la adsorción de 4CF en quitosano podría emplearse para disminuir la concentración de 4CF a un valor que sea factible para el tratamiento biológico.

Biodegradación de 4CF por barros activados aclimatados a fenol. En la **Figura 2** se encuentra la variación de la velocidad específica de respiración exógena (q_{EX}) y la concentración de 4CF en función del tiempo para la biodegradación de 0.78mM (100 mg L⁻¹) de 4CF. Como puede observarse, cuando se adicionó el sustrato (4CF) a $t=0$, los valores de q_{EX} se incrementaron rápidamente hasta un máximo valor de aproximadamente 2.3 mmolO₂ (gSST h)⁻¹. Finalmente, en el instante que se agotó el sustrato, q_{EX} retorno a su valor inicial (Fig.2 línea punteada).

La remoción de 4CF obtenida en el tratamiento biológico fue de 99.3%, mientras que la remoción en DQO fue de 82.3%. Esta diferencia puede atribuirse a la acumulación de un intermediario de la biodegradación de 4CF en el sobrenadante. Los porcentajes de remoción de 4CF obtenidos fueron mayores a los informados por Sahinkaya y Dilek¹⁴, quienes determinaron porcentajes de remoción en DQO de 46% para 0.87 mM de 4CF en barros activados. Por otra parte, Uysal y Turkman¹⁵, calcularon porcentajes de remoción de 4CF y DQO de 98.9 y 95.3%, respectivamente. Estos valores fueron similares a los obtenidos en el presente trabajo, sin embargo estos autores emplearon barros activados alimentados con 4CF y glucosa como co-sustrato con adición de un biosurfactante. En cambio, en el presente trabajo se empleo 4CF como único sustrato.

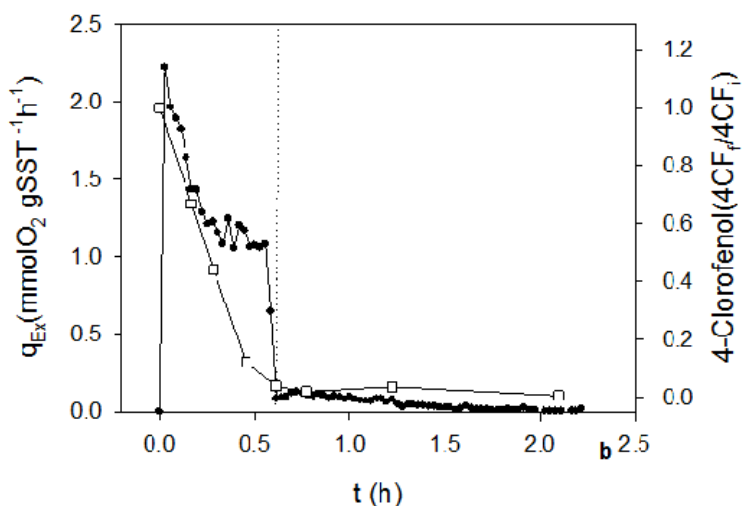


FIGURA 2. Variación de la velocidad específica de respiración exógena (q_{EX} ; ●) y concentración de 4-clorofenol (□) en función del tiempo, durante la adición de 0.78 mM de 4-clorofenol. La línea punteada indica el tiempo en el que se agota el sustrato.

Por otro lado, se estudió el efecto de la adición de pulsos sucesivos de 4CF sobre la q_{EX} en función del tiempo para barros activados aclimatados a fenol. Como puede observarse en la **Figura 3** los barros activados fueron capaces de bio-oxidar pulsos sucesivos de 0.64 mM (82.3 mg L⁻¹) de 4CF; sin embargo, q_{EX} disminuyó en función de la adición de 4CF. El valor de q_{EX} correspondiente al pulso #5 fue un 40% respecto del valor máximo inicial.

En la **Figura 3** se puede observar que los perfiles respirométricos obtenidos variaron en función de la adición de sustrato. Por ello, para evaluar el efecto tóxico de 4CF sobre la biodegradación se determinó la velocidad específica de respiración exógena media ($q_{Exmedia}$). Cuando se adiciona un pulso de sustrato oxidable en el respirómetro se obtiene un incremento de q_{Ex} , una vez que el sustrato se agota el valor de q_{Ex} retorna al valor inicial. De esta forma se puede definir el tiempo de degradación total (t_d) como el intervalo en que se observa un incremento y decrecimiento del valor de q_{Ex} . Esta estrategia fue utilizada por Buitrón y col¹⁶ como herramienta de control para optimizar el tiempo de reacción en un SBR a partir de perfiles de OD. Por lo tanto, $q_{Exmedia}$ se determinó como:

$$q_{Exmedia} = \frac{OC}{t_d \times X} \quad (5)$$

donde OC corresponde al oxígeno consumido, t_d es el tiempo total de degradación y X es la concentración de biomasa en el respirómetro. Los valores de $q_{Exmedia}$ variaron entre $1.62 \text{ mmolO}_2 \text{ gSST}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($q_{Exmedia 1}$ en el pulso #1) a $0.29 \text{ mmolO}_2 \text{ gSST}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (pulso #5). Estos valores fueron similares a los informados por Moreno-Andrade y Buitrón⁵ para barros activados durante la aclimatación a 0.77 mM de 4CF en un reactor en batch secuencial.

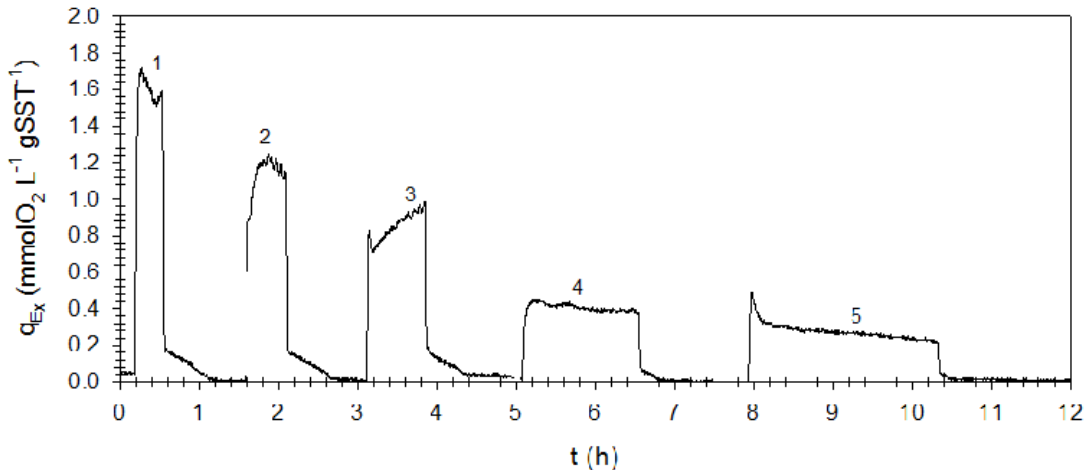


FIGURA 3. Velocidad específica de respiración exógena (q_{Ex}) en función del tiempo para barros activados aclimatados a fenol durante la adición de cinco pulsos sucesivos de 4-clorofenol

En la **Figura 4a** se puede observar la variación de $q_{Exmedia}$ para la adición de pulsos sucesivos de 4CF. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto del valor del primer pulso adicionado ($q_{Exmedia1}$). Para 4CF la concentración acumulada de sustrato correspondiente a $q_{Exmedia} / q_{Exmedia 1} = 0.5$ (EC50) fue de 2.25 mM (289 mg L^{-1}). Lim y col¹⁷, calcularon un $EC_{50} = 0.77 \text{ mM}$ basado en la velocidad específica de crecimiento de la biomasa para barros activados aclimatados a fenol. Por el contrario, Kargi y Konya¹⁸, obtuvieron un valor de $EC_{50} = 3.88 \text{ mM}$ para la biodegradación de 4CF en barros activados previamente adaptados a degradar 4CF.

Estas diferencias en el valor de EC50 pueden deberse a el empleo de diferentes inóculos de barros activados. En el presente trabajo los barros activados fueron aclimatados a fenol como única fuente de carbono y energía, mientras que Kargi y Konya¹⁸ emplearon 4CF como fuente de carbono durante la aclimatación de los barros activados.

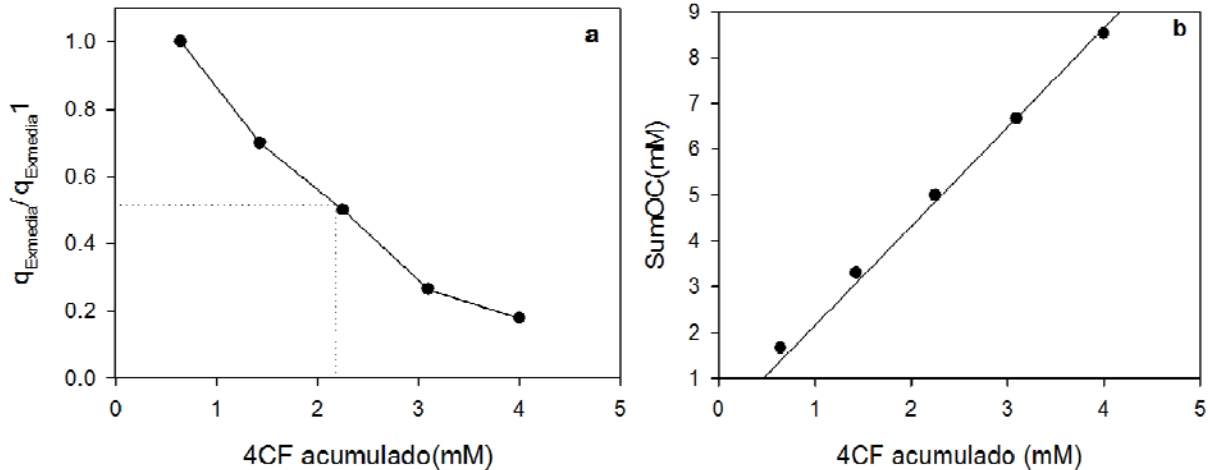


FIGURA 4. a. Variación de velocidad específica de respiración exógena media referido al valor del primer pulso ($q_{Exmedia} / q_{Exmedia1}$) en función de la concentración acumulada de 4-clorofenol. La línea punteada señala el valor de EC50. b. Oxígeno consumido acumulado en función de la concentración acumulada de 4-clorofenol.

A partir de los respirogramas obtenidos en la Fig. 3 se calculó el coeficiente de oxidación (yO/S) para 4CF como la pendiente de la regresión lineal de la suma de oxígeno consumido ($Sum(OC)$) en función de la concentración acumulada de 4CF (**Figura4b**). El valor de yO/S calculado fue de $2.15 \text{ mmolO}_2 \text{ mmol4CF}^{-1}$ ($r^2 = 0.99$). Lamentablemente, no se encontraron en literatura valores de yO/S para la biodegradación de 4CF; sin embargo, el valor obtenido de yO/S fue similar al calculado para la adición de pulsos sucesivos de otros compuestos fenólicos en barros activados aclimatados a fenol¹², tales como resorcinol ($yO/S = 2.00 \text{ molO}_2 \text{ mol resorcinol}^{-1}$) y p-hidroquinona ($yO/S = 2.06 \text{ molO}_2 \text{ mol p-hidroquinona}^{-1}$).

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se estudió en una primera etapa la remoción de 4CF por medio de adsorción en quitosano a los efectos de alcanzar una concentración de 4CF adecuada para poder someterse a un proceso posterior de biodegradación en barros activados aclimatados a fenol. Cuando se adicionaron pulsos sucesivos de 4CF a los barros activados aclimatados a fenol se observó una disminución en la velocidad específica de respiración exógena debido a la inhibición de los microorganismos, sin embargo el coeficiente de oxidación yO/S se mantuvo constante.

Los resultados obtenidos demostraron que una etapa preliminar de adsorción de 4CF en biopolímeros como el quitosano podría ser una alternativa para disminuir la concentración del contaminante al inicio del tratamiento biológico, evitando así la inhibición de los barros activados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

REFERENCIAS

1. Kim, J.-H., et al., Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Process Biochemistry*, 2002. 37(12): p. 1367-1373.
2. EPA, U.S., TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CHLOROPHENOLS DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.
3. Nadavala, S.K., et al., Biosorption of phenol and o-chlorophenol from aqueous solutions on to chitosan-calcium alginate blended beads. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. 162(1): p. 482-489.
4. Pino, E. and M.V. Encinas, Photocatalytic degradation of chlorophenols on TiO₂-325mesh and TiO₂-P25. An extended kinetic study of photodegradation under competitive conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2012. 242: p. 20-27.
5. Moreno-Andrade, I. and G. Buitrón, Variation of the microbial activity during the acclimation phase of SBR system degrading 4-chlorophenol, 2004. p. 251-258.
6. Monsalvo, V.M., et al., Cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by sequencing batch reactors at different temperatures. *Bioresource Technology*, 2009. 100(20): p. 4572-4578.
7. Aktaş, Ö. and F. Çeçen, Adsorption, desorption and bioregeneration in the treatment of 2-chlorophenol with activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*, 2007. 141(3): p. 769-777.
8. Li, J.-M., et al., Adsorption of phenol, p-chlorophenol and p-nitrophenol onto functional chitosan. *Bioresource Technology*, 2009. 100(3): p. 1168-1173.
9. Nuhoglu, A. and B. Yalcin, Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*, 2005. 40(3-4): p. 1233-1239.
10. Ferro Orozco, A.M., E.M. Contreras, and N.E. Zaritzky, Simultaneous biodegradation of bisphenol A and a biogenic substrate in semi-continuous activated sludge reactors. *Biodegradation*, 2015: p. 1-13.
11. Lobo, C., N. Bertola, and E. Contreras, Error propagation in open respirometric assays *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2014. En proceso de edición.
12. Lobo, C.C., N.C. Bertola, and E.M. Contreras, Stoichiometry and kinetic of the aerobic oxidation of phenolic compounds by activated sludge. *Bioresource Technology*, 2013. 136(0): p. 58-65.
13. Zhou, L.-C., et al., Highly efficient adsorption of chlorophenols onto chemically modified chitosan. *Applied Surface Science*, 2014. 292: p. 735-741.
14. Sahinkaya, E. and F.B. Dilek, Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge—Evaluation of biokinetic coefficients. *Environmental Research*, 2005. 99(2): p. 243-252.
15. Uysal, A. and A. Turkman, Biodegradation of 4-CP in an activated sludge reactor: Effects of biosurfactant and the sludge age. *Journal of Hazardous Materials*, 2007. 148(1-2): p. 151-157.
16. Buitrón, G., et al., Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Water Research*, 2005. 39(6): p. 1015-1024.
17. Lim, J.-W., J.-Z. Tan, and C.-E. Seng, Performance of phenol-acclimated activated sludge in the presence of various phenolic compounds. *Applied Water Science*, 2013. 3(2): p. 515-525.

ISEBE Advances 2016

18. Kargi, F. and I. Konya, COD, para-chlorophenol and toxicity removal from para-chlorophenol containing synthetic wastewater in an activated sludge unit. *Journal of Hazardous Materials*, 2006. 132(2-3): p. 226-231.