

## II-543 – ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE FENÓIS PELO FUNGO ASPERGILLUS NIGER UTILIZANDO A SACAROSE COMO FONTE DE CARBONO INDUTOR EM REATOR DE LEITO SUBMERSO

**Paula Cristina Lima Monteiro<sup>(1)</sup>**

Graduanda nos cursos de Tecnologia em Processos Químicos e Tecnologia em Agroecologia – IFAM.

**Libertalamar Bilhalva Saraiva<sup>(2)</sup>**

Graduada em Eng. Química na FURG (1980), Mestrado em Engenharia de Alimentos, FURG (2000). Doutorado em Eng. Química, UFRN (2007), Professora de Tecnologia em Tratamentos de Resíduos, Estudo das Águas Industriais e Operações Unitárias no IFAM, AM.

**Sônia Maria de Melo Lima<sup>(3)</sup>**

Graduada em Ciências - Universidade Federal de Juiz de Fora (1975) com Habilitação em Biologia; Mestrado em Desenvolvimento Regional - Universidade Federal do Amazonas (2004). Doutorado em Biotecnologia da UFAM (2011). Professora de Biologia e Microbiologia no IFAM.

**Almiro dos Santos Albuquerque Junior<sup>(4)</sup>**

Graduando em Tecnologia em Processos Químicos – IFAM.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. 7 de setembro, 1975 - Centro - Manaus - Amazonas Cep: 69020-120, Tel: (92) 3621-6793. [paula\\_monteiro89@hotmail.com](mailto:paula_monteiro89@hotmail.com)

### RESUMO

Os efluentes industriais possuem substâncias de natureza tóxicas como os fenóis que permanecem mesmo após os tratamentos convencionais. Dependendo da concentração de compostos fenólicos nos corpos d'água pode ocorrer um risco para o consumo humano. O uso de microrganismos para a biorremediação de substâncias tóxicas tem se mostrado viável devido à vantagem de custo e benefício, quando se compara com outras técnicas para o tratamento de efluentes. Eles atuam como decompositores importantes de compostos aromáticos na biosfera, entre eles, os fenóis, pois produzem inúmeras enzimas, as quais podem atuar sobre determinado poluente orgânico, tornando-o mais acessível à biodegradação. O trabalho objetivou avaliar a biodegradação de fenóis pelo fungo *Aspergillus niger*. E, foi dividido em duas etapas experimentais. Na primeira etapa foi avaliada a melhor fonte de carbono indutor na biodegradação de fenol pelo fungo cultivado em ágar batata, cuja cepa está disponível no acervo do IFAM, e inoculado em erlenmeyers contendo frutose, glicose e sacarose. Os resultados obtidos mostraram a sacarose como melhor fonte de carbono indutor. Na segunda etapa inoculou-se o fungo *Aspergillus niger* no reator em batelada, o qual foi operado por 80 dias, com tempo de retenção hidráulica variando de um a quatro dias. Através dos resultados obtidos pode-se inferir que a espécie *Aspergillus niger* apresentou capacidade para remoção de 600 mg/L de fenol com adição de sacarose como fonte primária de carbono, chegando a valores maiores que 99% de remoção tanto para fenol, quanto para DQO com um tempo de retenção hidráulico de 2 dias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fenol, *Aspergillus niger*, Efluente e Sacarose.

### INTRODUÇÃO

Diariamente efluentes industriais são despejados em corpos d'água e nem sempre recebem um tratamento adequado. Algumas dessas substâncias são de natureza persistente, os quais afetam não só o equilíbrio do ecossistema local, como também ao ser humano, como os compostos fenólicos. Estes apresentam grande toxicidade e são dificilmente degradados. No caso das águas residuárias dificulta o processo de tratamento biológico, suscitando dúvidas devido à possível contaminação das águas que abastecem a população (CUNHA, 1996).

Dependendo da concentração de compostos fenólicos nos corpos d'água pode ocorrer um risco para o consumo. Segundo a resolução do CONAMA a concentração de 0,5 mg/L de fenóis foi estabelecida como padrão de lançamento para qualquer tipo de efluente, sendo que no Brasil, em águas destinadas ao abastecimento, o Ministério da Saúde determinou que o limite máximo permitido de fenol é de 0,1 µg/L, a fim

de evitar danos à saúde humana (SILVA, I. E. C. et al., 2007). O Ministério da Saúde, na Portaria nº 2914 (2011) estipulou que para águas de abastecimento, concentrações máximas apenas para compostos derivados do fenol, tais como pentaclorafenol é de 9 µg/L e para 2,4,6 triclorofenol é de 0,2 mg/L.

Diante dessa problemática o uso de microrganismos para a biorremediação de substâncias tóxicas tem se mostrado viável devido à vantagem de custo e benefício, quando se compara com outras técnicas para o tratamento de efluentes.

Sendo que o conhecimento sobre a fisiologia e o metabolismo dos fungos é de suma importância para a fundamentação e otimização de processos envolvendo sua aplicação em reatores, sejam na fermentação industrial – para obtenção dos mais diferentes produtos, como antibióticos, vitaminas, bebidas, conservantes, entre outros – ou na biorremediação de poluentes (RODRIGUES, 2012).

As técnicas de biorremediação podem ser usadas para descontaminação de solo e água, são classificadas em duas categorias: *in situ* e *ex situ*. (COLLERAN, 1997). A biorremediação *in situ* envolve o incremento de taxas de biodegradação de contaminantes orgânicos no solo, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas. Requer a estimulação de atividade degradativa de populações microbianas endógenas pela provisão de nutrientes e aceptores de elétrons, técnica conhecida como bioestimulação. Ou a adição de inóculos microbianos exógenos com ou sem suplementação de nutrientes, que constitui a bioaumentação. A biorremediação *ex situ* requer a remoção física do material contaminado seguido de tratamento em biorreatores, landfarming, biopilhas, compostagem e lagoas, utilizando as técnicas citadas (FURTADO, 2001).

De acordo com SANTOS E LINARDI (2004), embora o metabolismo microbiano de compostos aromáticos tenha sido intensivamente estudado, a maior parte do conhecimento sobre rotas metabólicas da degradação desses compostos encontra-se fundamentada em bactérias.

No entanto, estudos têm mostrado que os fungos atuam como decompositores importantes de compostos aromáticos na biosfera, entre eles, os fenóis (SANTOS e LINARDI, 2004), pois eles produzem inúmeras enzimas como lactase, proteases, ligninases, lipases, celulasas, entre outras, as quais podem atuar sobre determinado poluente orgânico, tornando-o mais acessível à biodegradação e no tratamento de substâncias recalcitrantes (BUMPUS *et al.* 1985). Pode-se ainda citar como fatores indicadores da aplicabilidade dos fungos sua capacidade de suportar possíveis choques nas cargas orgânicas e hidráulicas e bruscas variações de pH, luz, umidade e oxigênio (SANTAELLA *et al.* 1996).

Desde 1980 já é conhecido que os fungos do gênero *Aspergillus* degradam uma larga faixa de compostos aromáticos como lignina e que é mais rápido do que muitos outros fungos (ZIINO et al., 1999). A espécie *Aspergillus niger*, em particular, possui importante papel biotecnológico, uma vez que é utilizada na produção de ácidos inorgânicos e enzimas (JERNEJC e LEGISA, 2004). Em escala de laboratório o emprego do *Aspergillus niger* em reatores tem comprovado a eficiência desse fungo no tratamento de efluentes, como exemplo, compostos fenólicos (CELESTINO et al., 2008) e compostos nitrogenados (FREITAS NETO et al., 2007).

Segundo RODRIGUES (2006), utilizando reatores com fungos e glicose, após o terceiro dia a glicose havia sido 99% removida, após não poder mais ser detectada na água residuária, obteve-se maiores valores de remoção de fenol, uma vez que o fungo, a partir desse dia começou a usar o fenol como fonte de carbono. RIGO et al. (2006) estudaram a degradação de fenol por *Candida parapsilopsis* em reator contínuo (CSTR) pressurizado. O reator operou por 24 dias consecutivos e a entrada de afluente no reator apresentou concentrações de fenol na faixa de 300 a 900 mg/L, com remoção de 100% durante 16 dias consecutivos.

SARAIVA et al. (2009) usando glicose (50 mg/L) como fonte de carbono indutor, 100 mg/L de fenol e o fungo *Aspergillus niger* em reator de leito fixo em batelada obtiveram eficiências de remoção de DQO média (glicose mais fenol) de 57,27% para um tempo de detenção hidráulica de (TDH) de 24 horas. No mesmo ano, ainda usando glicose como fonte de carbono indutor em leito fixo em batelada, os pesquisadores obtiveram eficiências de remoção de DQO média (glicose mais fenol) de 73% com 200 mg/L de fenol afluente e 25mg/L de glicose com TDH de 24 horas.

Este trabalho teve por objetivo estudar a degradação de fenóis pelo fungo *Aspergillus niger* utilizando a sacarose como fonte de carbono indutor reator em leite submerso.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nos laboratórios de Controle Ambiental, Micologia, Biologia e Microbiologia da Gerência Educacional de Química e Meio ambiente no Campus Manaus Centro do IFAM. A metodologia analítica utilizada foi baseada no Standard methods for the examination of water and wastewater (APWA, 1998). E o experimento foi dividido em duas etapas experimentais:

### PRIMEIRA ETAPA EXPERIMENTAL

Na primeira etapa foram testados três fontes de carbono indutor: glicose, sacarose e frutose a partir da fruta abacaxi. Os ensaios foram realizados em câmara de fluxo laminar, onde inoculou-se o *Aspergillus niger* nos reatores e em seguida colocou-se na Incubadora Shaker com agitação a 150 RPM. O qual permaneceu num período de 7, 14 e 21 dias. Sendo que a cada 7 dias efetuou-se análises de DQO para avaliar a degradação do fenol com cada uma das fontes de carbono.

**Preparo do afluente base:** O preparo do efluente base foi realizado nos Laboratórios de Controle Ambiental e Físico-Química do IFAM, Campus Manaus Centro, com concentração baseada em SILVA 2002, acrescida de fenol e uma fonte carbono indutor, conforme tabela 1.

**Tabela 1:** Composição do afluente base

Reagente	Concentração mg/L	
NH <sub>4</sub> Cl	76,1 mg/L	Base Silva (2002).
NaCl	10,1 mg/L	
KCl	4,7 mg/L	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O Anidro	46,2 mg/L	
NaHCO <sub>3</sub>	162,2 mg/L	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	16,7 mg/L	
ZnSO <sub>4</sub>	0,2 mg/L	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,2 mg/L	
CuSO <sub>4</sub>	0,2 mg/L	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 mg/L	
Clorofórmio	10 mL/L	Controle microbiológico
500 à 600 mg/L	Fenol	Contaminante
Fonte de carbono indutor	50 mg/L	-

**Obtenção da solução de esporos:** Utilizou-se o microrganismo *Aspergillus niger*, do acervo do IFAM, para inoculação em tubos de ensaio (figura 1) para posterior obtenção de uma suspensão de esporos (figura 2).



**Figura 1:** Tubos de ensaio contendo Agar Batata Dextrose

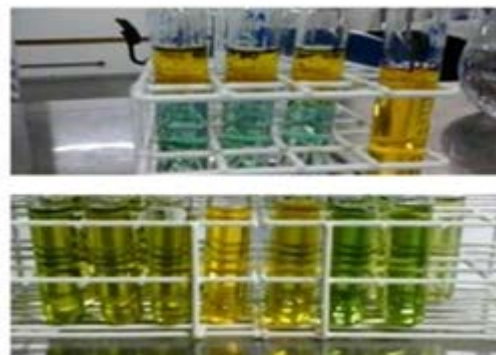


**Figura 2:** Tubos de ensaio após 7 dias de inoculação

**Avaliação da fonte de carbono indutor:** Para avaliar a fonte de carbono que se adequava melhor ao crescimento e atividade do *Aspergillus niger* frente ao substrato fenol, foi realizado um experimento em laboratório com todos os cuidados de assepsia e esterilização usando erlenmeyers como reatores. Foram utilizados 12 erlenmeyers tendo 250 mL de efluente base, todos previamente esterilizados, sendo que três com 50mg/L de glicose, três com 50mg/L de sacarose cada e três com 50mg/L em DQO em frutose e os outros três eram somente para o controle (branco) e adicionou-se um inoculo na concentração de  $2,0 \times 10^6$  de suspensão de fungo. Em seguida colocou-se na incubadora shaker SL 223 (figura 3), com temperatura 30°C e uma rotação de 150 RPM. Os reatores permaneceram incubados durante 21 dias, sendo que a cada 7 dias retirava-se uma amostra para realizar análise de DQO (figura 4).



**Figura 3:** Reatores após o preparo e a disposição dos mesmos na incubadora shaker, durante o período de execução do experimento.



**Figura 4:** Tubos de ensaio com amostra sendo tratada para análise antes de ser digerida (em cima) e depois de ser digerida (em baixo).

## RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

Na primeira etapa escolheu-se a sacarose como fonte de carbono primário, pois apresentou uma maior porcentagem de remoção de DQO, como observado na tabela 2.

De acordo com PINHEIRO (2004), a sacarose, assim como a glicose, é um açúcar muito utilizado. Porém, a assimilação da sacarose envolve a conversão extracelular ou intracelular a hexoses por enzimas invertases. As hexoses são, posteriormente, convertidas intracelularmente a glicose-6-fosfato mediante enzimas da glicólise.

Durante este processo metabólico há produção de energia (ATP) e equivalentes reduzidos (NADH). A energia sob a forma de ATP é utilizada para o crescimento celular e mecanismos de manutenção. O NADH é oxidado a NAD<sup>+</sup> a partir da conversão do piruvato a etanol ou da oxidação pelo oxigênio na cadeia respiratória.

No processo de respiração, o piruvato é convertido em dióxido de carbono e água, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, com produção de redox equivalentes para a geração de ATP (PINHEIRO, 2004).

**Tabela 2:** Eficiência de remoção de fenol medida em DQO para as três fontes de carbono

ANÁLISE PARA OBTENÇÃO DO MELHOR CARBONO INDUTOR			
DQO			
Fonte de carbono primário	Frutose	Glicose	Sacarose
Eficiência (%)	82,28%	87,12%	88,46%

## SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

Na segunda etapa o experimento foi desenvolvido em um reator em batelada de leito fixo constituído de tubo de acrílico de 100 mm de diâmetro, 3 mm de espessura de parede e 0,50 m de altura, com volume útil total de 3,7 L, fechado nas extremidades com cap 100 mm e com insulfilme para evitar a fotodegradação do fenol. Alimentou-se o reator com bomba d'água pela parte superior e três descargas, sendo uma controlada com bomba. A aeração do sistema foi feita utilizando um compressor tipo aquário e o oxigênio dissolvido (OD) medido com oxímetro digital e mantido em torno de 11 mg/L, com temperatura em torno de  $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ . Controlou-se o processo pelo software Kemo Relais (software de domínio publico), figuras 5 e 6.



**Figura 5:** Reator



**Figura 6:** Software Kemo Relais Time

Preparou-se o afluente conforme a tabela 1, agora utilizando-se a sacarose como fonte de carbono indutor e uma concentração inicial de 500 mg/L de fenol.

Inoculou-se no reator contendo 2L de afluente uma suspensão de  $4 \times 10^6$  esporos/ mL de *Aspergillus niger*. Para manutenção do mesmo fez-se um repique utilizando o Agar Batata como nutriente, em uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ , durante 7 dias em tubos inclinados, para utilização dos esporos em solução no reator.

Operou-se o reator em ciclos de 1 a 4 dias de tempo de retenção hidráulica, sendo alimentado com 2L de afluente e coletando-se as amostras da entrada e saída para as análises de DQO e de fenol total.

A variação de pH foi verificada para observar a atividade metabólica do fungo. O pH de uma cultura pode variar em razão do microrganismo e de seu comportamento metabólico, assim como também à natureza do substrato. Durante todo o experimento o afluente foi ajustado para o pH entre 4 e 5. Estes valores são



considerados ótimos para o desenvolvimento do fungo. O pH foi ajustado com ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio.

## RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA

Na segunda etapa, após a inoculação da suspensão de esporos foram necessários seis dias para aclimação dos fungos no reator. O reator operou durante 80 dias com tempo de retenção hidráulica variando de um dia a quatro dias. Durante esse período utilizou-se inicialmente a concentração de 500 mg/L de fenol no afluente até o 60º dia, no qual logo em seguida subiu para 600 mg/L de fenol no afluente. Verificou-se o aumento de biomassa no reator e grande adaptabilidade do fungo. Comprovando assim que a espécie utilizada no experimento consegue sobreviver às variações na concentração de fenol. Chegando a um nível não detectável de fenol efluente e DQO efluente por três dias consecutivos na concentração de 600 mg/L de fenol, com 48 horas de retenção hidráulica. Durante todo o experimento obteve-se os seguintes resultados das análises conforme figuras 7, 8, 9 e 10:

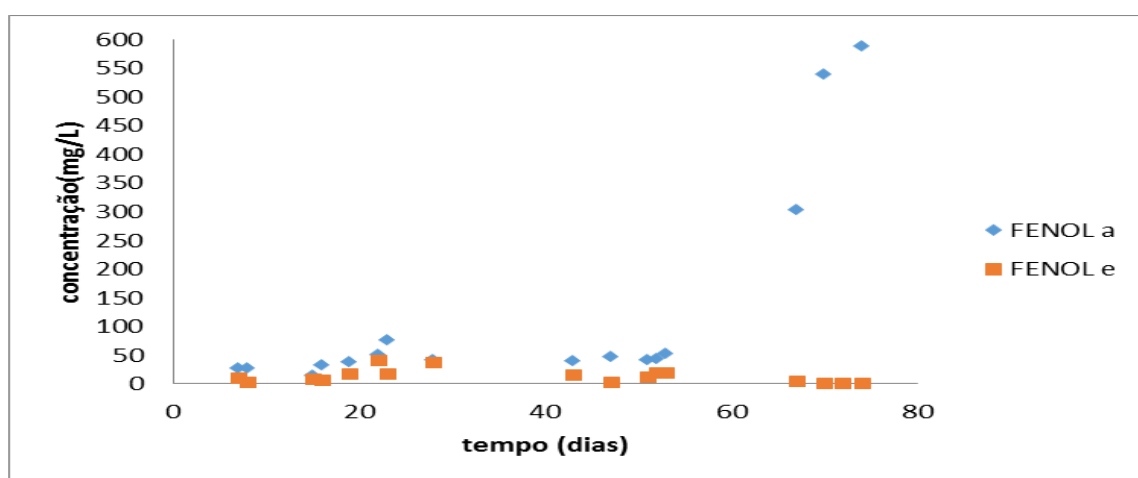


Figura 7: Resultados de fenol no afluente e efluente ao reator.

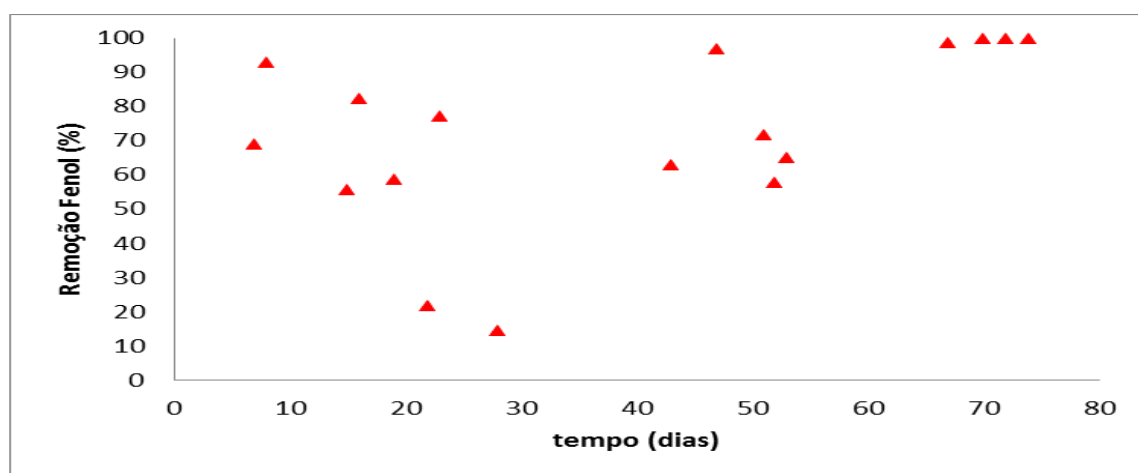


Figura 8: Eficiência de remoção do fenol.

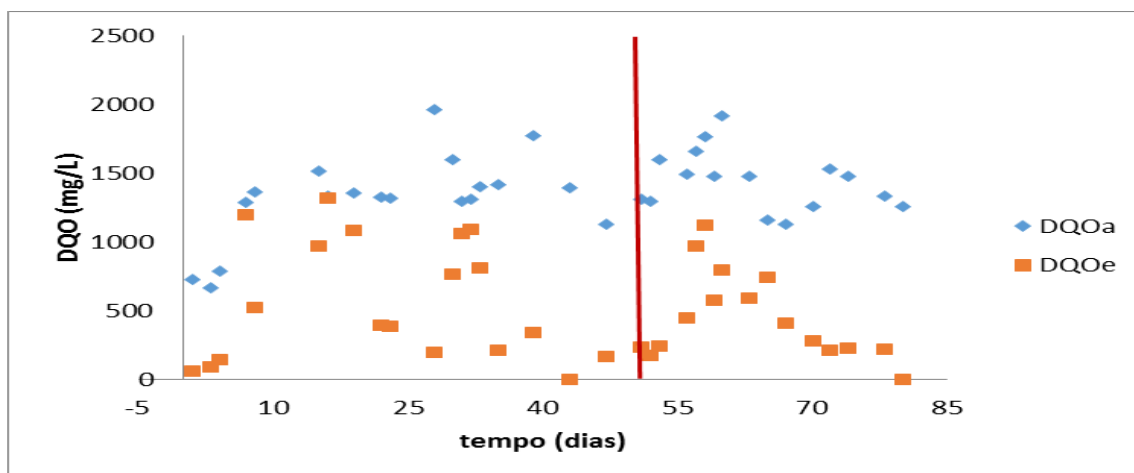


Figura 9: Resultados afluente e efluente na análise da DQO.

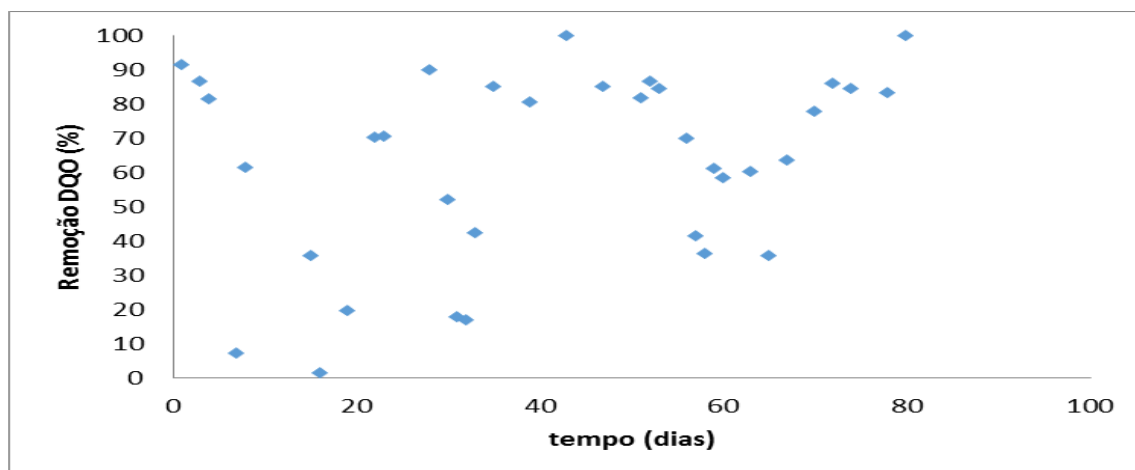


Figura 10: Eficiência da remoção da DQO.

PASSOS (2006) obteve degradação total de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus niger* até uma concentração de  $989 \pm 15 \text{ mg/L}$ , com diferentes velocidades de reação com 72 horas para degradar  $320 \pm 0,57 \text{ mg/L}$  de fenol.

Em 2010 SARAIVA et al., trabalhando com reator em batelada de leito submerso, com os fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma sp* e resíduo de processamento de cupuaçu como fonte de carbono indutor, conseguiram com os dois fungos em simbiose, o tempo de retenção hidráulico fixado em 24 horas uma remoção total em torno de 90% com 300 mg/L de fenol afluente e 50 mg DQO/L de resíduo de cupuaçu.

Saraiva et al. (2011) obteve em uma concentração de 600 mg/L de fenol uma degradação média de 73% em reator sequencial em batelada com *Aspergillus niger* e *Trichoderma sp*. Rodrigues (2006) que utilizou reatores de fluxo contínuo inoculados com *Aspergillus niger* o percentual de 100% de remoção de fenol.

## CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos pode-se inferir que a espécie *Aspergillus niger* apresentou capacidade para remoção de fenol presente no afluente base com adição de sacarose como fonte de carbono, chegando a um nível não detectável tanto para a remoção de Fenol Total, quanto para DQO com um tempo de retenção hidráulico de 2 dias. Os resultados mostram que a remoção de fenol é viável em reator em batelada. Há

necessidade de dar continuidade na pesquisa com concentrações maiores de fenol, TDH menores, outras fontes de carbono primário indutor.

## AGRADECIMENTOS

A FAPEAM pelo apoio financeiro ao Projeto de Iniciação Científica, agradecemos ainda, o contínuo apoio do IFAM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20a. ed. Washington: American Public Health Association.
2. BUMPUS, J. A.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST, S. D. **Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus**. SCIENCE. 1985.
3. CELESTINO, P.; LOPES, M.; SOUZA, E.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. **Uso de reator em batelada repetida com biomassa fúngica para o tratamento de água residuária da indústria de beneficiamento de castanha de caju**. II: II JORNADA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA DA REGIÃO SUL. **Anais...** Pelotas: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, 2008. CD-ROM.
4. COLLERAN, E. SANTOS, V. L., LINARDI, V. R. (2004). **Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potential**. Process Biochemistry. 39: 1001-1006. 2, p. 3-22, 1997.
5. CONAMA. Resolução n. 273, de 29 de novembro de 2000. **Dispõe sobre prevenção e controle da poluição em postos de combustíveis e serviços**, 2010. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2000>> Acesso em: 15 jan. 2010.
6. Cunha C. D. **Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo**. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 1996. 97pp.
7. FREITAS NETO, M. A.; FELIX, J. P. L.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. **Remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias de refinarias de petróleo através de reatores biológicos com fungos**. Revista tecnologia, Fortaleza, v. 28, n. 1. P. 85 -96, Jun. 2007.
8. FURTADO, <http://www.biolimp.com.br,2001>, consultado em 09 de março de 2004.
9. JERNEJC, K.; LEGISA, M. A drop of intracellular pH stimulates citric acid accumulation by some strains of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 112, n. 8, p. 289 – 297, 2004.
10. MINISTÉRIO DA SAÚDE (2011). **Portaria GM nº 2914 de 2011**.
11. PASSOS, C.T. **Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus sp.*** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Alimentos, FURG. 2006.
12. PINHEIRO, R. I. C. **Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras**, 2004. 103f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biologia) – Universidade do Minho, Minho, 2004.
13. RIGO, M.; COUTINHO, M.R.; ALVAREZ, D.C.; BEZERRA, J.R.M.V; BRANCO, I.G.; MONTE ALEGRE, R. Biodegradação de Fenol por *Candida parapsilopsis* em Reator Contínuo (CSTR) Pressurizado. Revista Ciencias Exatas e Naturais, vol. 8 no2, Jul/Dez 2006.
14. RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. São Carlos, SP. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2006.
15. RODRIGUES, K.; MARINHO, G. **Fungos e águas residuárias industriais**. Coordenação Laboratório de Tecnologia Ambiental do IFCE. – Recife : Imprima, 199p. 2012.
16. SANTAELLA, S. T. CAMPOS, J. R., LINARES, T. **Perspectivos de remoção de cor (substâncias húmicas) de água destinada ao tratamento biológico**. Revista sanitária e ambiental. 1996.
17. SARAIVA, L.; REGO, E. F. ;VIEIRA, P.G.A.; LIMA, S. **Biodegradação de compostos orgânicos fenólicos com *Aspergillus sp.* Selvagem de solo amazônico**. Anais do 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2009.



18. SARAIVA, L.; CARVALHO, A. P. E.; LIMA, S. **Oxidação biológica de compostos orgânicos fenólicos em reator de batelada utilizando resíduo de cupuaçu como fonte de carbono indutor.** Anais do V CONNEPI. 2010.
19. SARAIVA, L.; LIMA, S; OLIVEIRA, E.; CARVALHO, A. P. M. **Biodegradação de compostos orgânicos fenólicos por *Aspergillus sp* e *Trichoderma sp*.** Anais do 26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2011.
20. SILVA, I. E. C; et al. **Fungos filamentosos degradadores de compostos fenólicos isolados de águas residuárias de postos de combustíveis.** Revista de Biologia e Saúde da UNISEP Biology & Health Journal – v.1, n.1, 2. 2007.
21. ZIINO, M., CURTO, R.B.L., SALVO, F., SIGNORINO, D., CHIOFALO, B., GIUFFRIDA, D., Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture, **Bioresource Technology**, v. 67, p. 7-11, 1999.