

**UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE ENGENHARIA**

**PURIFICAÇÃO DE AR CONTAMINADO COM TOLUENO
USANDO UMA CULTURA DE
Pseudomonas putida (DSM 548)**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente, ramo Tratamento de Águas e Águas Residuais

Sob a supervisão de:
Professor Doutor Rui Boaventura e
Doutora Elisa Ramalho



Natália Maria de Bessa Pacheco Rego

Novembro de 2000

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho quero agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram.

Em primeiro lugar, os meus agradecimentos aos meus orientadores, que confiaram em mim para a realização deste trabalho: Professor Doutor Rui Boaventura e Doutora Elisa Ramalho. Ao Professor Rui Boaventura, pela sua permanente disponibilidade e inesgotável paciência na discussão proveitosa que revelou para comigo durante a elaboração deste trabalho. À Doutora Elisa, que com as suas sugestões, a sua enorme argúcia e inteligência, soube orientar-me para o que de facto era importante. Um especial agradecimento pela sua generosidade, humanismo e simpatia, contribuindo para que, desde o início, eu me entregasse com grande motivação e empenho na realização deste trabalho.

A todos os meus colegas e amigas do laboratório, pela boa camaradagem e apoio demonstrados desde o início, em particular pelo óptimo ambiente de trabalho que me proporcionaram.

À minha colega Olga Freitas, que na fase final da escrita, me prestou grande apoio e incentivo nas horas de maior desânimo.

Ao ISEP, que disponibilizou o laboratório de tecnologia química para a execução do trabalho experimental, em particular à Engenheira Ana Carneiro pelo apoio material concedido.

Por último, um agradecimento muito sentido à minha família, em particular à minha irmã, pelo seu grande coração que é bem reconhecido, e à minha futura família, Pedro, que desde sempre esteve a meu lado.

A todos, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

O presente trabalho tem como principal objectivo avaliar as possibilidades de degradação biológica do tolueno presente numa corrente de ar, usando uma cultura de *Pseudomonas putida* (DSM 548), em reactor contínuo, perfeitamente agitado com biomassa em suspensão e em reactor de biofilme.

A investigação realizada contemplou essencialmente os seguintes aspectos:

- Aclimação e desenvolvimento de culturas puras de *Pseudomonas putida* num meio contendo tolueno como substrato limitante;
- Operação do reactor biológico de biomassa em suspensão, a temperatura e pH controlados, para determinação da cinética de crescimento da *P. putida*, cinética de biodegradação do tolueno e rendimento biológico;
- Arranque e funcionamento do reactor de biofilme para determinar a eficiência global de remoção de tolueno, para várias condições operatórias, numa perspectiva da sua aplicação futura à escala industrial.

O estudo cinético de degradação de tolueno com biomassa em suspensão foi conduzido num reactor (volume = 5 litros), que opera de forma contínua para a fonte de carbono, e descontínua para o meio de cultura.

Para o estudo da operação à escala laboratorial do reactor de biofilme, utilizou-se um leito percolador de estágio único, com recirculação total da solução de nutrientes, consistindo numa coluna (altura = 94 cm, diâmetro = 20 cm) com um enchimento de anéis do tipo polipropileno "Raflux Rings". Este tipo de enchimento foi seleccionado devido à sua elevada área específica, que entre outras vantagens, permite uma elevada transferência de massa do contaminante da fase gasosa para o biofilme, assim como a minimização das perdas de carga ao longo do leito.

O estudo cinético de crescimento da *P.putida* teve como finalidade avaliar parâmetros como a velocidade específica de crescimento e tempo de aclimatação das bactérias, para uma gama de concentrações de tolueno na corrente gasosa de entrada entre 0,2 e 4 mg/l, e para dois caudais da corrente gasosa distintos (5,6 e 10,5 l/min), de forma a procurar um modelo que traduzisse adequadamente o processo. Os perfis obtidos mostram que a concentração de biomassa aumenta a uma velocidade que se admite de 1ª ordem relativamente à sua concentração. Com base nos resultados experimentais obtidos, verificou-se que o modelo de Haldane representava adequadamente o processo, tendo-se determinado os seguintes parâmetros cinéticos para os ensaios com $Q_{gás} = 5,6$ l/min:

- velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{máx} = 30 \pm 0,22$ dia⁻¹;
- constante de saturação para o substrato, $K_s = 3,17 \pm 0,24$ mg/l;
- constante de inibição para o substrato, $K_i = 1,77 \pm 0,14$ mg/l;

e para os ensaios com $Q_{gás} = 10,5$ l/min,

- $\mu_{máx} = 40 \pm 8,10$ dia⁻¹;
- $K_s = 7,64 \pm 3,02$ mg/l;
- $K_i = 2,83 \pm 1,25$ mg/l.

Do estudo da biodegradação do tolueno nas condições operatórias estabelecidas, registou-se: uma eficiência máxima de remoção de poluente de 90 %, para uma concentração no gás de entrada entre 0,2 e 0,4 mg/l e $Q_{gás} = 5,6$ l/min; e um rendimento biológico máximo, $Y_{obs} = 1,2$ mg_{biomassa}/mg_{tolueno}, para $Q_{gás} = 5,6$ l/min. Observou-se a existência de um período de aclimatação variável (7 a 25 horas) anterior à fase exponencial de crescimento da biomassa, sendo esta acompanhada de um decréscimo do pH associado à biodegradação.

O controlo de operação do leito percolador centralizou-se na quantificação da acumulação do biofilme no decorrer do tempo, em três zonas distintas da coluna (Base, Meio e Topo). Uma vez atingido o estado pseudo-estacionário, procedeu-

se à avaliação da eficiência de remoção e capacidade de eliminação do tolueno, para diferentes caudais da corrente gasosa (9,5 a 36 l/min) e diferentes concentrações de tolueno no gás de entrada (0,5 a 2 mg/l). Para uma carga de tolueno, entre 7 e 160 $\text{g}_{\text{tolueno}}/\text{m}_{\text{leito}}^3\text{h}$, a eficiência de remoção decresce exponencialmente com o aumento da carga de tolueno afluyente ao reactor. Na gama de caudais operados, atinge-se uma eficiência de remoção máxima entre 90 e 100% para concentrações de tolueno na corrente gasosa de entrada inferiores a 0,5 mg/l. Nas condições operatórias estudadas, a capacidade de eliminação aumenta com a carga de tolueno, segundo uma função exponencial até um dado valor limite, atingindo o valor máximo 60-70 $\text{g}_{\text{tolueno}}/\text{m}_{\text{leito}}^3\text{h}$ para uma carga de tolueno superior a 120 $\text{g}_{\text{tolueno}}/\text{m}_{\text{leito}}^3\text{h}$.

Ao fim de 30 dias de operação, o biofilme aderido a cada anel apresentava as seguintes características:

- espessura média, $L_f = 540 \mu\text{m}$;
- volume, $V_f = 0,99 \text{ cm}^3$;
- massa específica húmida, $\rho_f = 480 \text{ mg}_{\text{biomassa}}/\text{cm}_{\text{biofilme}}^3$;
- massa específica seca, $X_f = 35 \text{ mg}_{\text{biomassa}}/\text{cm}_{\text{biofilme}}^3$;
- porosidade do leito com biofilme, $\varepsilon_f = 0,65$;
- concentração de biomassa aderida no reactor, $X_r = 9,1 \text{ mg}/\text{cm}_{\text{leito}}^3$.

ABSTRACT

The main objective of the present work, is to evaluate the biodegradation possibilities of toluene, present in a air stream, by a culture of *Pseudomonas putida* (DSM), carried out in a continuous-flow stirred-tank by suspended biomass and in a biofilm reactor.

The research carried out mainly dealt with the following items:

- Acclimation and development of pure cultures of *Pseudomonas putida* in a medium with toluene as limited growth substrate;
- Operation of suspended biomass bioreactor, with controlled conditions of temperature and pH, for the growing kinetics of *P.putida*, degradation kinetics of toluene and biological yield determination;
- Start up and operation of the biofilm reactor in order to determine the global efficiency for the toluene elimination, at different operating conditions, in a perspective of its future application to industrial scale.

The kinetic study of toluene degradation with suspended biomass was carried out in a reactor (volume = 5 liters), operating in a continuous-flow mode for the carbon source and in a batch mode for the culture medium.

For the study of a laboratory scale biofilm reactor operation, it was used a single-stage trickle-bed bioreactor, with total recirculation of the nutrient solution, consisting of a column (height = 94 cm, diameter = 20 cm) with a packing material of rings type polypropylene "Raflux Rings". This packing material was selected due to its large specific area, that among other advantages, allows a high mass transfer of the contaminant between the gas phase and the biofilm, as well to minimise the pressure drop through the bed.

The study of the growing kinetics of *P.putida* aims to evaluate the bacteria specific growth rate and acclimation time, for a range of toluene concentration in the inlet

gas stream between 0.2 and 4 mg/l, and for two gas flow rates (5.6 and 10.5 l/min), to achieve a model that adequately describes the process. The profiles obtained show that cells concentration follows a first order kinetic model. It was verified that the Haldane kinetic model fits the experimental data, and the following kinetic parameters were determined for $Q_{\text{gás}} = 5.6$ /min:

- specific growth rate, $\mu_{\text{máx}} = 30 \pm 0.22 \text{ day}^{-1}$;
- half-saturation constant, $K_s = 3.17 \pm 0.24 \text{ mg/l}$;
- substrate inhibition constant, $K_i = 1.77 \pm 0.14 \text{ mg/l}$;

and for $Q_{\text{gás}} = 10.5$ l/min,

- $\mu_{\text{máx}} = 40 \pm 8.10 \text{ day}^{-1}$;
- $K_s = 7.64 \pm 3.02 \text{ mg/l}$;
- $K_i = 2.83 \pm 1.25 \text{ mg/l}$.

In the study of toluene biodegradation in the prevailing operating conditions, it was observed: a maximum removal efficiency of 90 %, for a concentration in the inlet gas stream between 0.2 and 0.4 mg/l and $Q_{\text{gás}} = 5.6$ l/min; and a maximum biological yield of $2.6 \text{ g}_{\text{biomass}}/\text{g}_{\text{toluene}}$, for $Q_{\text{gás}} = 10.5$ l/min and toluene concentration in the inlet gas stream of 1.7 mg/l. It was observed a variable acclimation period (7 to 25 hours) preceding the exponential-growth phase, followed for a decrease of pH values associated to the biodegradation. The high values for the intrinsic biological yield and maintenance coefficient, revealed a high consumption of toluene for cell maintenance, relatively to the toluene effectively used for the cell production.

The control of the trickle-bed operation was focused in the measurement of biofilm accumulation over the time, at three column depths (Bottom, Middle, Top). Since pseudo-steady state conditions were reached, the toluene removal efficiency and elimination capacity were evaluated, for different gas flow rates (9.5 to 36 l/min) and different toluene concentrations in the inlet gas stream (0.5 to 2 mg/l). For a

(9,5 to 36 l/min) and different toluene concentrations in the inlet gas (0,5 to 2 mg/l). For a inlet toluene load, between 7 and 160 $\text{g}_{\text{toluene}}/\text{m}_{\text{bed}}^3\text{h}$, the removal efficiency decrease exponentially as the inlet toluene load increases. In the range of operating flow rates, it was reached a maximum removal efficiency between 90 and 100 % for a toluene concentration in the inlet gas stream under 0,5 mg/l. At the operating conditions studied, the elimination capacity increases with the inlet toluene load, as a exponential function, till a limit, reaching the maximum value of 60-70 $\text{g}_{\text{toluene}}/\text{m}_{\text{bed}}^3\text{h}$, for a inlet specific toluene load upper 120 $\text{g}_{\text{toluene}}/\text{m}_{\text{bed}}^3\text{h}$.

After 30 days of operation, the biofilm attached to each ring has the following characteristics:

- mean thickness, $L_f = 540 \mu\text{m}$;
- volume, $V_f = 0,99 \text{ cm}^3$;
- wet specific mass, $\rho_f = 480 \text{ mg}_{\text{biomass}}/\text{cm}_{\text{biofilm}}^3$;
- drying specific mass, $X_f = 35 \text{ mg}_{\text{biomassa}}/\text{cm}_{\text{biofilm}}^3$;
- bed porosity with biofilm, $\varepsilon_f = 0,65$;
- biomass concentration attached in the reactor, $X_r = 9,1 \text{ mg}/\text{cm}_{\text{bed}}^3$.

RESUMÉ

L'étude suivant a pour objectif principal d'évaluer les possibilités de dégradation biologique du toluène, present dans un circuit d'air, en utilisant une culture de *Pseudomonas putida* (DSM), dans un réacteur continue, parfaitement agité avec biomasse en suspension et dans un réacteur de biofilm.

La recherche effectuée comprend essentiellement les aspects suivants:

- L'acclimatation et le développement de cultures pures de *Pseudomonas putida* dans un milieu contenant du toluène entant que substrat limitant;
- L'étude du réacteur biologique de biomasse en suspension, à temperature et pH controlés, pour la detérmination de la cinétique de croissance de la *P.putida*, de la cinétique de biodegradation du toluène et du rendement biologique;
- Démarrage et fonctionnement du réacteur de biofilm pour detérminer l'efficacité totale d'élimination du toluène pour différentes conditions operatoires, dans une perspective de sa future application à l'échelle industrielle.

L'étude cinétique de dégradation du toluène avec biomasse en suspension a été réalisée dans un réacteur (capacité = 5 litres) qui fonctionne de façon continue pour la source de carbone, et discontinue pour le milieu de culture.

Pour l'étude de l'operation à l'échelle pilote (de laboratoire) du réacteur de biofilm, on utilise un lit percolateur à étage unique, avec recirculation totale de la solution de nutriments, ce qui consiste en une colonne (hauteur = 94 cm, diamètre = 20 cm) à aneaux de type polypropilène "Raflex Rings". Cet aneaux à été selectionné à cause de son aire spécifique élevée, qui a comme avantage de permettre un transfert de masse élevée du contaminant de la phase gazeuse au biofilm, ausi bien que la minimisation des pertes de charge au trávères du lit.

L'étude de cinétique de la croissance de la *P.putida* a comme finalité d'évaluer les paramètres tels que la vitesse spécifique de croissance et le temps d'acclimatation des bacteries, pour un intervalle de concentration de toluène dans la phase gazeuse compris entre 0,2 et 4 mg/l à l'entrée, et pour deux debits de courant gazeux distincts (5,6 et 10,5 l/min), de façon à trouver un modèle qui traduise de manière adequate le procédé. Les profils obtenus montrent que la concentration de la biomassa augmente à une vitesse que l'on admet de 1^a ordre par rapport à sa concentration. D'après les résultats expérimentaux obtenus, on vérifie que le modèle de Haldane représenté adéquatement le processus, permettant de déterminer les paramètres cinétiques suivants, pour les essais avec un debit de gaz, $Q_{gás} = 5,6$ l/min:

- vitesse spécifique maximale de croissance, $\mu_{máx} = 30 \pm 0,22$ jour⁻¹;
- constante de saturation pour le substrat, $K_s = 3,17 \pm 0,24$ mg/l;
- constante d'inhibition pour le substrat, $K_i = 1,77 \pm 0,14$ mg/l;

et pour les essais avec un debit de gaz, $Q_{gás} = 10,5$ l/min,

- $\mu_{máx} = 40 \pm 8,10$ jour⁻¹;
- $K_s = 7,64 \pm 3,02$ mg/l;
- $K_i = 2,83 \pm 1,25$ mg/l.

De l'étude de la biodegradation du toluène dans les conditions operatoires établies, on en registre: une efficacité maximale de l'élimination du polluant de 90 % pour une concentration de gaz entrant entre 0,2 et 0,4 mg/l et un debit de gaz, $Q_{gás} = 5,6$ l/min; et un rendement biologique maximal, $Y_{obs} = 2,6$ g_{biomass}/g_{toluene}, pour $Q_{gás} = 10,5$ l/min et une concentration de toluène dans le courant gazeux entrant de 1,7 mg/l. On observe l'existence d'une période d'acclimatation variable (7 à 25 heures) antérieure à la phase exponancielle de croissance de la biomassa, étant acompagné d'une diminution du pH associé à la biodegradation. Les valeurs elevées obtenues pour un rendement intrinsèque et coefficient de manutention, révélant une forte consommation de toluène pour couvrir les besoins énergétiques

des cellules par rapport à ce qui est effectivement utilisé pour la production de la biomasse.

Le contrôle de l'opération du lit percolateur se centralise dans la quantification de l'accumulation du biofilm dans le temps en trois zones distinctes de la colonne (en pied de colonne, la milieu, et en tête de colonne). Une fois atteint l'état pseudo-stationnaire, on procède à l'évaluation de l'efficacité de l'élimination et la capacité de l'élimination du toluène, pour des débits différents du courant gazeux (9,5 à 36 l/min) et des concentrations différents de toluène dans le gaz entrant (0 à 2 mg/l). Pour une charge de toluène comprise entre 7 et 160 $\text{g}_{\text{toluene}}/\text{m}_{\text{lit}}^3$, l'efficacité d'élimination décroît de façon exponentielle avec l'augmentation de la charge de toluène arrivant dans le réacteur. Dans l'intervalle de débits choisis, on atteint une efficacité de l'élimination maximale compris entre 90 et 100 % pour les concentrations de toluène inférieures à 0,5 mg/l, dans le courant gazeux entrant. Dans les conditions opératoires étudiés, la capacité d'élimination augment avec la charge de toluène, selon une fonction exponentielle jusqu'à une valeur limit donnée, atteignant une valeur maximale de 60-70 $\text{g}_{\text{toluene}}/\text{m}_{\text{lit}}^3\text{h}$ pour une charge de toluène supérieure à 120 $\text{g}_{\text{toluene}}/\text{m}_{\text{lit}}^3\text{h}$.

Après 30 jours d'opération, le biofilm dans chaque anneau, représenté les suivants caractéristiques:

- épaisseur moyenne, $L_f = 540 \mu\text{m}$;
- volume, $V_f = 0,99 \text{ cm}^3$;
- masse spécifique humide, $\rho_f = 480 \text{ mg}_{\text{biomass}}/\text{cm}_{\text{biofilm}}^3$;
- masse spécifique sèche, $X_f = 35 \text{ mg}_{\text{biomassa}}/\text{cm}_{\text{biofilme}}^3$;
- porosité du lit avec biofilm, $\varepsilon_f = 0,65$;
- concentration de la biomassa fixée dans le réacteur, $X_r = 9,1 \text{ mg}/\text{cm}_{\text{bed}}^3$.

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|--------------|
| AGRADECIMENTOS..... | III |
| RESUMO..... | IV |
| ABSTRACT..... | VII |
| RESUMÉ..... | X |
| ÍNDICE GERAL..... | XIII |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | XVI |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | XXIII |
| | |
| 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS..... | 1 |
| 1.1 ENQUADRAMENTO..... | 2 |
| 1.2 TOLUENO..... | 6 |
| 1.3 PSEUDOMONAS..... | 9 |
| 1.3.1 Condições de crescimento e nutricionais..... | 9 |
| 1.3.2 Metabolismo..... | 9 |
| 1.4 DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS..... | 10 |
| 1.4.1 Metabolismo aeróbio de hidrocarbonetos aromáticos..... | 10 |
| 1.4.2 Vias catabólicas para a degradação do tolueno..... | 15 |
| 1.4.2.1 Tolueno di-oxigenase..... | 17 |
| 1.4.2.2. Esquemas globais de regulação..... | 17 |
| 1.5 BIOFILMES..... | 18 |
| 1.5.1 Adesão dos microrganismos às superfícies..... | 18 |
| 1.5.2 Condições de fixação dos microrganismos ao suporte..... | 23 |
| 1.5.3 Estruturas especializadas na adesão..... | 24 |
| 1.5.4 Substâncias poliméricas extracelulares - EPS..... | 25 |
| 1.6 PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES | |
| GASOSOS..... | 27 |
| 1.6.1 Princípios da depuração biológica..... | 27 |
| 1.6.2 Bio-reactores utilizados na eliminação de COVs..... | 28 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 1.7 | MODELOS MATEMÁTICOS PARA O DIMENSIONAMENTO DOS REACTORES BIOLÓGICOS NA REMOÇÃO DE COVs..... | 33 |
| 1.7.1 | Cinética de crescimento celular para a biomassa em suspensão..... | 33 |
| 1.7.2 | Modelos matemáticos para a biodegradação de COVs em leitos percoladores..... | 40 |
| 1.8 | ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DO TOLUENO..... | 48 |
| | | |
| 2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 52 |
| 2.1 | CRESCIMENTO DA <i>Pseudomonas putida</i> EM DESCONTÍNUO..... | 53 |
| 2.2 | ESTUDOS CINÉTICOS DO CRESCIMENTO DA <i>P. putida</i> EM SUSPENSÃO..... | 56 |
| 2.2.1 | Instalação..... | 56 |
| 2.2.2 | Execução experimental..... | 61 |
| 2.3 | ESTUDOS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO DO TOLUENO EM REACTOR DE BIOMASSA FIXA..... | 63 |
| 2.3.1 | Instalação..... | 63 |
| 2.3.2 | Execução experimental..... | 68 |
| 2.4 | MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 72 |
| | | |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 77 |
| 3.1 | RESULTADOS DOS ENSAIOS COM BIOMASSA EM SUSPENSÃO..... | 78 |
| 3.1.1 | Condições Operatórias..... | 78 |
| 3.1.2 | Cinética de crescimento da <i>Pseudomonas Putida</i> | 79 |
| 3.1.3 | Consumo de tolueno..... | 92 |
| 3.2 | RESULTADOS DOS ENSAIOS COM BIOMASSA FIXA..... | 109 |
| 3.2.1 | Condições operatórias..... | 109 |
| 3.2.2 | Estudo da acumulação do biofilme..... | 111 |
| 3.2.3 | Características do biofilme..... | 114 |
| 3.2.4 | Eficiência de remoção do tolueno..... | 119 |
| 3.2.5 | Capacidade de eliminação do tolueno..... | 123 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4 | CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO..... | 128 |
| | 4.1 CONCLUSÕES..... | 129 |
| | 4.2 SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO..... | 134 |
| | | |
| 5 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 135 |
| | | |
| | ANEXOS..... | 140 |
| | ANEXO A - ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS DE | |
| | <i>P.putida</i>..... | 141 |
| | A.1 Preparação dos meios de cultura sólidos..... | 141 |
| | A.2 Isolamento e armazenamento da <i>Pseudomonas putida</i> | 141 |
| | ANEXO B - CURVAS DE CALIBRAÇÃO..... | 143 |
| | B.1 Curvas de calibração dos rotâmetros..... | 143 |
| | B.2 Curva de calibração para biomassa em suspensão..... | 147 |
| | B.3 Curva de calibração para o tolueno..... | 150 |
| | ANEXO C - COMPLEMENTOS DO CAPÍTULO 3.1..... | 152 |
| | C.1 Resultados experimentais de cinética de crescimento da | |
| | <i>P.putida</i> | 152 |
| | C.2 Resultados experimentais de consumo de tolueno..... | 173 |
| | ANEXO D - COMPLEMENTOS DO CAPÍTULO 3.2..... | 180 |
| | D.1 Resultados de crescimento do biofilme..... | 180 |
| | D.2 Resultados de consumo de tolueno..... | 183 |
| | ANEXO E - CURVAS DE AJUSTE À REMOÇÃO DO TOLUENO..... | 186 |
| | E.1 Percentagem de remoção de tolueno <i>versus</i> carga de | |
| | tolueno..... | 186 |
| | E.2 - Capacidade de eliminação <i>versus</i> carga de tolueno..... | 189 |
| | ANEXO F - RISCOS DE EXPOSIÇÃO A VAPORES DE TOLUENO..... | 193 |
| | ANEXO G - LEGISLAÇÃO COMUNITÁRIA EM VIGOR..... | 198 |

ÍNDICE DE FIGURAS

1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Figura 1.1 | Estrutura química dos BTX..... | 6 |
| Figura 1.2 | Vias catabólicas convergentes para a formação de catecol (Charles <i>et al</i> , 1981)..... | 11 |
| Figura 1.3 | Enzimas envolvidas na oxidação bacteriana de hidrocarbonetos aromáticos (Gibson <i>et al</i> , 1984)..... | 13 |
| Figura 1.4 | Orto-clivagem e meta-clivagem do anel aromático (Houghton <i>et al</i> , 1994)..... | 14 |
| Figura 1.5 | Catabolismo aromático pela via β - cetoadipato, para diferentes compostos aromáticos, cujos compostos finais entram no ciclo dos ácidos carboxílicos (Houghton <i>et al</i> , 1994)..... | 15 |
| Figura 1.6 | Métodos alternativos para o ataque inicial do tolueno: a) hidroxilação imediata do anel; b) oxidação prévia do grupo metilo (Charles <i>et al</i> , 1981)..... | 16 |
| Figura 1.7 | Oxidação do tolueno a <i>cis</i> - tolueno di-hidrodiol (Gibson <i>et al</i> , 1984)..... | 17 |
| Figura 1.8 | Representação esquemática da formação de biofilme (adaptação de Boaventura, 1986)..... | 20 |
| Figura 1.9 | Representação esquemática do fluxo dos diferentes componentes no biofilme (adaptação de Boaventura, 1997)..... | 22 |
| Figura 1.10 | Representação esquemática do metabolismo aeróbio dos compostos orgânicos..... | 28 |
| Figura 1.11 | Representação esquemática de um <i>bioscrubber</i> (Internet 3, 2000)..... | 30 |
| Figura 1.12 | Representação esquemática de um biofiltro (Internet 4, 2000)..... | 32 |
| Figura 1.13 | Fases de crescimento de uma cultura em reactor <i>batch</i> | 35 |
| Figura 1.14 | Cinética de crescimento celular segundo o modelo de Monod e de Haldane..... | 40 |
| Figura 1.15 | Representação esquemática dos perfis da concentração de substrato limitante nas diferentes fases do biofilme (Alonso <i>et al</i> , 1998)..... | 42 |
| Figura 1.16 | Representação geométrica do material de enchimento utilizado nos leitos percoladores (Alonso <i>et al</i> , 1998)..... | 42 |
| Figura 1.17 | Modelos de dimensionamento do leito percolador (Alonso <i>et al</i> , 1996)..... | 44 |

2 MATERIAIS E MÉTODOS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 2.1 | Crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> em descontínuo..... | 55 |
| Figura 2.2 | A) Matraz contendo solução mineral com fenol imediatamente após a inoculação com <i>P. putida</i> . B) Matraz contendo uma suspensão bacteriana de <i>P. putida</i> , crescidas com fenol, ao fim de 24 horas..... | 56 |
| Figura 2.3 | Esquema da instalação utilizada para a determinação dos parâmetros cinéticos de degradação do tolueno pela <i>Pseudomonas putida</i> em reactor semi - <i>batch</i> | 57 |
| Figura 2.4 | Imagem da instalação utilizada para os ensaios de crescimento da <i>P. putida</i> em suspensão..... | 57 |
| Figura 2.5 | Fotografia da câmara de contaminação e dos rotâmetros R1 e R2..... | 59 |
| Figura 2.6 | Fotografia do reactor semi- <i>batch</i> sem meio de cultura..... | 60 |
| Figura 2.7 | A) Recolha de amostras gasosas no ponto de amostragem. B) Recolha de amostras líquidas..... | 62 |
| Figura 2.8 | Esquema da instalação utilizada para o estudo de degradação do tolueno com <i>P. putida</i> num leito percolador..... | 63 |
| Figura 2.9 | Fotografia da instalação do leito percolador após o arranque..... | 64 |
| Figura 2.10 | Imagem do enchimento do leito percolador com biofilme..... | 65 |
| Figura 2.11 | Anéis do tipo 'Raflux Rings'..... | 66 |
| Figura 2.12 | Distribuidor do líquido no topo do leito percolador..... | 67 |
| Figura 2.13 | Fotografia do depósito de nutrientes..... | 68 |
| Figura 2.14 | Técnica para a determinação da concentração de tolueno na fase líquida..... | 73 |

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 3.1 | Variação da concentração de tolueno na fase líquida e na corrente gasosa de saída em função da concentração de tolueno alimentada ao reactor, para $Q_{gás} = 5,6$ l/min..... | 79 |
| Figura 3.2 | Variação da concentração de tolueno na fase líquida e na corrente gasosa de saída em função da concentração de tolueno alimentada ao reactor, para $Q_{gás} = 10,5$ l/min..... | 79 |
| Figura 3.3 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,264 \pm 0,018$ mg/l..... | 81 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Figura 3.4 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,344 \pm 0,021$ mg/l..... | 81 |
| Figura 3.5 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,398 \pm 0,016$ mg/l. | 81 |
| Figura 3.6 | a) Evolução da concentração de biomassa com o tempo. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,616 \pm 0,029$ mg/l..... | 82 |
| Figura 3.7 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,851 \pm 0,021$ mg/l..... | 82 |
| Figura 3.8 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $1,348 \pm 0,048$ mg/l..... | 82 |
| Figura 3.9 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $1,608 \pm 0,056$ mg/l. | 83 |
| Figura 3.10 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $2,004 \pm 0,047$ mg/l. | 83 |
| Figura 3.11 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $2,996 \pm 0,206$ mg/l. | 83 |
| Figura 3.12 | Variação da velocidade específica de crescimento com a concentração de tolueno na corrente de entrada..... | 85 |
| Figura 3.13 | Variação da velocidade específica de crescimento com a concentração de tolueno na suspensão bacteriana..... | 85 |
| Figura 3.14 | Evolução do tempo de aclimação com a concentração de tolueno na suspensão bacteriana..... | 86 |
| Figura 3.15 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,159 \pm 0,013$ mg/l..... | 87 |
| Figura 3.16 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,374 \pm 0,014$ mg/l..... | 87 |
| Figura 3.17 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,694 \pm 0,025$ mg/l..... | 88 |
| Figura 3.18 | a) Evolução da concentração de biomassa com o tempo. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $1,251 \pm 0,072$ mg/l..... | 88 |
| Figura 3.19 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $1,729 \pm 0,060$ mg/l..... | 88 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Figura 3.20 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $1,969 \pm 0,079$ mg/l. | 89 |
| Figura 3.21 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $2,676 \pm 0,177$ mg/l. | 89 |
| Figura 3.22 | a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $4,178 \pm 0,231$ mg/l. | 89 |
| Figura 3.23 | Evolução da velocidade específica de crescimento com a quantidade de tolueno presente na corrente gasosa de entrada..... | 90 |
| Figura 3.24 | Ajuste da velocidade específica de crescimento <i>versus</i> concentração de tolueno presente na suspensão bacteriana ao modelo de Haldane..... | 90 |
| Figura 3.25 | Tempo de aclimação <i>versus</i> concentração de tolueno presente na suspensão bacteriana..... | 91 |
| Figura 3.26 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,264 \pm 0,018$ mg/l na corrente de entrada..... | 92 |
| Figura 3.27 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,344 \pm 0,026$ mg/l na corrente de entrada..... | 93 |
| Figura 3.28 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,398 \pm 0,016$ mg/l na corrente de entrada..... | 93 |
| Figura 3.29 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,616 \pm 0,029$ mg/l na corrente de entrada..... | 94 |
| Figura 3.30 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,851 \pm 0,020$ mg/l na corrente de entrada..... | 94 |
| Figura 3.31 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $1,348 \pm 0,048$ mg/l na corrente de entrada..... | 94 |
| Figura 3.32 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $1,608 \pm 0,056$ mg/l na corrente de entrada..... | 95 |
| Figura 3.33 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $2,004 \pm 0,047$ mg/l na corrente de entrada..... | 95 |
| Figura 3.34 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $2,966 \pm 0,206$ mg/l na corrente de entrada..... | 95 |

| | | |
|--------------------|---|------------|
| Figura 3.35 | Variação da velocidade de consumo de substrato com a concentração de tolueno na suspensão bacteriana..... | 97 |
| Figura 3.36 | Rendimento biológico em função da concentração de tolueno na suspensão bacteriana..... | 99 |
| Figura 3.37 | a) Evolução temporal do logaritmo da concentração de biomassa <i>versus</i> evolução da concentração de tolueno. b) Evolução temporal da percentagem de remoção do tolueno <i>versus</i> concentração de tolueno..... | 100 |
| Figura 3.38 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,159 \pm 0,013$ mg/l na corrente de entrada..... | 101 |
| Figura 3.39 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,374 \pm 0,014$ mg/l na corrente de entrada..... | 101 |
| Figura 3.40 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,625 \pm 0,014$ mg/l na corrente de entrada..... | 101 |
| Figura 3.41 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $1,251 \pm 0,072$ mg/l na corrente de entrada..... | 102 |
| Figura 3.42 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $1,729 \pm 0,06$ mg/l na corrente de entrada..... | 102 |
| Figura 3.43 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $1,969 \pm 0,079$ mg/l na corrente de entrada..... | 102 |
| Figura 3.44 | a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $2,676 \pm 0,177$ mg/l na corrente de entrada..... | 103 |
| Figura 3.45 | Variação da velocidade específica de consumo de tolueno em função da concentração de tolueno presente na suspensão bacteriana..... | 103 |
| Figura 3.46 | Rendimento biológico em função da concentração de tolueno na suspensão bacteriana..... | 104 |
| Figura 3.47 | Inverso do rendimento biológico observado <i>versus</i> inverso da velocidade específica de crescimento para $Q_{gás} = 5,6$ l/min..... | 106 |
| Figura 3.48 | Inverso do rendimento biológico observado <i>versus</i> inverso da velocidade específica de crescimento para $Q_{gás} = 10,5$ l/min..... | 106 |
| Figura 3.49 | Variação da concentração de biomassa e do pH com o tempo no ensaio apresentado na figura 3.11..... | 107 |
| Figura 3.50 | Variação da concentração de biomassa e do pH com o tempo nos ensaio apresentado na figura 3.18..... | 108 |

| | | |
|--------------------|--|------------|
| Figura 3.51 | Varição da concentração de biomassa e do pH com o tempo no ensaio apresentado na figura 3.21..... | 108 |
| Figura 3.52 | Evolução temporal da concentração de biomassa aderida aos anéis do enchimento no leito percolador, em três posições distintas..... | 112 |
| Figura 3.53 | Evolução temporal da concentração de biomassa aderida aos anéis do enchimento no leito percolador, em três posições distintas..... | 113 |
| Figura 3.54 | Aspecto da enchimento com biofilme..... | 115 |
| Figura 3.55 | Imagem do anel do enchimento vista da topo (A) e de lado (B)..... | 115 |
| Figura 3.56 | Dimensões do anel sem biofilme..... | 116 |
| Figura 3.57 | Metodologia para determinação da espessura do biofilme numa partícula do enchimento..... | 116 |
| Figura 3.58 | Percentagem de remoção de tolueno <i>versus</i> carga de tolueno à entrada do reactor, para diferentes caudais de gás..... | 120 |
| Figura 3.59 | Percentagem de remoção de tolueno <i>versus</i> concentração de tolueno à entrada do reactor para diferentes caudais de gás..... | 121 |
| Figura 3.60 | Ajuste da percentagem de remoção de tolueno <i>versus</i> carga de tolueno a uma função do tipo exponencial..... | 122 |
| Figura 3.61 | Percentagem de remoção em função da concentração de tolueno alimentada ao reactor antes e depois da acumulação de biomassa..... | 123 |
| Figura 3.62 | Capacidade de eliminação <i>versus</i> carga de tolueno à entrada do reactor, para diferentes caudais de gás..... | 125 |
| Figura 3.63 | Capacidade de eliminação <i>versus</i> concentração de tolueno à entrada do reactor para diferentes caudais de gás..... | 125 |
| Figura 3.64 | Ajuste da EC em função da carga de tolueno..... | 126 |

ANEXO B - CURVAS DE CALIBRAÇÃO

| | | |
|-------------------|---|------------|
| Figura B.1 | Curva de calibração do rotâmetro R1 da instalação do reactor semi- <i>batch</i> ... | 145 |
| Figura B.2 | Curva de calibração do rotâmetro R1 da instalação do leito percolador..... | 146 |
| Figura B.3 | Curva de calibração da [biomassa] <i>versus</i> D_{660nm} | 149 |
| Figura B.4 | Curva de calibração de [tolueno] <i>versus</i> área..... | 151 |

ANEXO E - CURVAS DE AJUSTE À REMOÇÃO DE TOLUENO

| | | |
|--------------------|--|------------|
| Figura E.1 | Varição da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{gás} = 9,5$ l/min e $[biomassa]_{aderida} = 2,062$ g/l _{reactor} | 186 |
| Figura E.2 | Varição da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{gás} = 13,7$ l/min e $[biomassa]_{aderida} = 5,303$ g/l _{reactor} | 187 |
| Figura E.3 | Varição da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{gás} = 19,0$ l/min e $[biomassa]_{aderida} = 7,820$ g/l _{reactor} | 187 |
| Figura E.4 | Varição da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{gás} = 24,8$ l/min e $[biomassa]_{aderida} = 8,681$ g/l _{reactor} | 188 |
| Figura E.5 | Varição da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{gás} = 31,0$ l/min..... | 188 |
| Figura E.6 | Varição da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{gás} = 36,0$ l/min..... | 189 |
| Figura E.7 | Capacidade de eliminação <i>versus</i> carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 9,5 l/min..... | 189 |
| Figura E.8 | Capacidade de eliminação <i>versus</i> carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 13,7 l/min..... | 190 |
| Figura E.9 | Capacidade de eliminação <i>versus</i> carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 19 l/min..... | 190 |
| Figura E.10 | Capacidade de eliminação <i>versus</i> carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 24,8 l/min..... | 191 |
| Figura E.11 | Capacidade de eliminação <i>versus</i> carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 31 l/min..... | 191 |
| Figura E.12 | Capacidade de eliminação <i>versus</i> carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 36 l/min..... | 192 |

ÍNDICE DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Tabela 1.1 | Efeitos agudos de exposição a vapores de tolueno (Internet 1, 2000)..... | 4 |
| Tabela 1.2 | Propriedades físicas e químicas do tolueno (Internet 2, 2000)..... | 7 |
| Tabela 1.3 | Características diferenciadoras das diferentes tecnologias de purificação biológica de efluentes gasosos..... | 29 |
| Tabela 1.4 | Parâmetros cinéticos e rendimento biológico na degradação de tolueno por <i>Pseudomonas</i> (Mirpuri <i>et al</i> , 1996)..... | 48 |

2 MATERIAIS E MÉTODOS

| | | |
|-------------------|------------------------------------|-----------|
| Tabela 2.1 | Composição do meio de cultura..... | 53 |
|-------------------|------------------------------------|-----------|

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

| | | |
|-------------------|--|------------|
| Tabela 3.1 | Parâmetros do modelo cinético de Haldane..... | 91 |
| Tabela 3.2 | Biomassa húmida e seca, e humidade no biofilme de cada anel, em três posições distintas da coluna..... | 115 |
| Tabela 3.3 | Funções de ajuste às curvas de % Remoção <i>versus</i> C de tolueno..... | 120 |
| Tabela 3.4 | Funções de ajuste às curvas de EC <i>versus</i> C de tolueno..... | 124 |

ANEXO B - CURVAS DE CALIBRAÇÃO

| | | |
|-------------------|--|------------|
| Tabela B.1 | Dados para a construção da curva de calibração do rotâmetro R1 da instalação do reactor semi- <i>batch</i> | 144 |
| Tabela B.2 | Dados para a construção da curva de calibração do rotâmetro R1 da instalação do leito percolador..... | 145 |
| Tabela B.3 | Resultados obtidos nos ensaios realizados para a construção da curva de calibração de [biomassa] <i>versus</i> D. _{0.660nm} | 148 |
| Tabela B.4 | Resultados para a construção da curva de calibração de [tolueno] <i>versus</i> área..... | 151 |

ANEXO C - COMPLEMENTOS DO CAPÍTULO 3.1

| | | |
|--------------------|--|------------|
| Tabela C.1 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $0,264 \pm 0,0183$ mg/l..... | 152 |
| Tabela C.2 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $0,344 \pm 0,0206$ mg/l..... | 153 |
| Tabela C.3 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $0,398 \pm 0,0156$ mg/l..... | 154 |
| Tabela C.4 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $0,616 \pm 0,029$ mg/l..... | 156 |
| Tabela C.5 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $0,851 \pm 0,02$ mg/l..... | 157 |
| Tabela C.6 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $1,348 \pm 0,048$ mg/l..... | 158 |
| Tabela C.7 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $1,608 \pm 0,056$ mg/l..... | 159 |
| Tabela C.8 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $2,004 \pm 0,047$ mg/l..... | 160 |
| Tabela C.9 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $2,966 \pm 0,206$ mg/l..... | 161 |
| Tabela C.10 | Resultados dos parâmetros de crescimento da <i>P. putida</i> | 163 |
| Tabela C.11 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $0,159 \pm 0,013$ mg/l..... | 163 |
| Tabela C.12 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $0,374 \pm 0,014$ mg/l..... | 164 |
| Tabela C.13 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $0,694 \pm 0,025$ mg/l..... | 165 |
| Tabela C.14 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $1,251 \pm 0,072$ mg/l..... | 166 |
| Tabela C.15 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $1,729 \pm 0,06$ mg/l..... | 168 |

| | | |
|--------------------|---|------------|
| Tabela C.16 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $1,968 \pm 0,079$ mg/l..... | 169 |
| Tabela C.17 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $2,676 \pm 0,177$ mg/l..... | 170 |
| Tabela C.18 | Resultados experimentais da cinética de crescimento da <i>Pseudomonas putida</i> para [tolueno] = $4,178 \pm 0,231$ mg/l..... | 171 |
| Tabela C.19 | Resultados dos parâmetros de crescimento da <i>P. putida</i> | 172 |
| Tabela C.20 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $0,264 \pm 0,018$ mg/l..... | 173 |
| Tabela C.21 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $0,344 \pm 0,021$ mg/l..... | 173 |
| Tabela C.22 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $0,398 \pm 0,016$ mg/l..... | 174 |
| Tabela C.23 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $0,616 \pm 0,029$ mg/l..... | 174 |
| Tabela C.24 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $0,851 \pm 0,020$ mg/l..... | 174 |
| Tabela C.25 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $1,248 \pm 0,048$ mg/l..... | 175 |
| Tabela C.26 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $1,608 \pm 0,056$ mg/l..... | 175 |
| Tabela C.27 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $2,004 \pm 0,029$ mg/l..... | 176 |
| Tabela C.28 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $2,996 \pm 0,206$ mg/l..... | 176 |
| Tabela C.29 | Valores dos parâmetros de consumo de tolueno..... | 176 |
| Tabela C.30 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $0,159 \pm 0,013$ mg/l..... | 176 |
| Tabela C.31 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $0,374 \pm 0,014$ mg/l..... | 177 |
| Tabela C.32 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $0,694 \pm 0,025$ mg/l..... | 177 |

| | | |
|--------------------|---|------------|
| Tabela C.33 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $1,251 \pm 0,072$ mg/l..... | 178 |
| Tabela C.34 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $1,729 \pm 0,060$ mg/l..... | 178 |
| Tabela C.35 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $1,969 \pm 0,079$ mg/l..... | 179 |
| Tabela C.36 | Resultados experimentais de consumo de tolueno para [tolueno] = $2,676 \pm 0,177$ mg/l..... | 179 |
| Tabela C.37 | Valores dos parâmetros de consumo de tolueno..... | 179 |

ANEXO D - COMPLEMENTOS DO CAPÍTULO 3.2

| | | |
|-------------------|--|------------|
| Tabela D.1 | Resultados de acumulação de biofilme no enchimento na 1ª fase de arranque..... | 180 |
| Tabela D.2 | Resultados de acumulação de biofilme no enchimento na 2ª fase de arranque..... | 181 |
| Tabela D.3 | Resultados de consumo de tolueno para $Q_{gás}=9,5$ l/min..... | 183 |
| Tabela D.4 | Resultados de consumo de tolueno para $Q_{gás}=13,5$ l/min..... | 183 |
| Tabela D.5 | Resultados de consumo de tolueno para $Q_{gás}=19$ l/min..... | 184 |
| Tabela D.6 | Resultados de consumo de tolueno para $Q_{gás}= 24,8$ l/min..... | 184 |
| Tabela D.7 | Resultados de consumo de tolueno para $Q_{gás}= 31$ l/min..... | 185 |
| Tabela D.8 | Resultados de consumo de tolueno para $Q_{gás}= 36$ l/min..... | 185 |

ANEXO F - RISCOS DE EXPOSIÇÃO A VAPORES DE TOLUENO

| | | |
|-------------------|---|------------|
| Tabela F.1 | Health Data from Inhalation Exposure..... | 196 |
|-------------------|---|------------|

1 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

- 1.1 ENQUADRAMENTO
- 1.2 TOLUENO
- 1.3 *PSEUDOMONAS*
- 1.4 DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS
- 1.5 BIOFILMES
- 1.6 PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES GASOSOS
- 1.7 MODELOS MATEMÁTICOS PARA DIMENSIONAMENTO DOS REACTORES BIOLÓGICOS NA REMOÇÃO DE COVs
- 1.8 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DO TOLUENO

1.1 ENQUADRAMENTO

O desenvolvimento industrial e urbano tem originado em todo o mundo um aumento crescente da emissão de poluentes atmosféricos. O acréscimo das concentrações destas substâncias na atmosfera, a sua deposição no solo, nos vegetais e nos materiais é responsável por danos na saúde, redução da produção agrícola, danos nas florestas e, de uma forma geral, desequilíbrios nos ecossistemas.

Em Portugal, os problemas de qualidade do ar não afectam o território de uma forma sistemática, encontrando-se localizados em algumas áreas onde é maior a concentração urbana e a presença de grandes unidades industriais.

No entanto, a poluição do ar, devido às características da circulação atmosférica e à permanência de alguns poluentes na atmosfera por largos períodos de tempo, apresenta um carácter transfronteira e é responsável por alterações ao nível planetário, o que obriga à conjugação de esforços a nível internacional.

São conhecidos os efeitos nocivos dos solventes orgânicos integrados no grupo dos compostos orgânicos voláteis (COVs). Por um lado, têm capacidade de produzir oxidantes fotoquímicos com óxidos de nitrogénio na presença de luz solar, os quais disseminando-se na atmosfera, provocam alterações metabólicas nos organismos vivos. Por outro lado, os solventes orgânicos estão indiciados como potenciais carcinogénicos. Certas indústrias, e em particular as indústrias do mobiliário, química, farmacêutica e do calçado, manipulam quantidades muito significativas de solventes orgânicos, pelo uso de colas, diluentes de esmaltes, tapa-poros, vernizes, tintas, etc.. As fontes móveis, sobretudo os transportes rodoviários, são uma fonte importante de COVs, essencialmente devido às emissões dos gases de escape, mas também como resultado da evaporação de combustíveis.

Em Portugal, entre as fontes de COVs (DGA, 1995), destacam-se :

- Combustão industrial: 2,6%
- Processos produção: 21,5%
- Combustão resid./comerc./serviços: 9,1%
- Outras fontes fixas: 6,5%
- Transportes rodoviários: 29,0%
- Outras fontes móveis: 2,0%

O sector dos transportes constitui o principal emissor de compostos orgânicos voláteis sendo natural que a área metropolitana de Lisboa e o próprio concelho de Lisboa, apresentem as emissões mais elevadas, pelas características inerentes à sua situação geográfica e ao seu estatuto de capital. A zona central do Porto é bastante antiga, com ruas estreitas ladeadas por casas altas, o que torna difícil a dispersão dos poluentes, cabendo sem dúvida ao tráfego automóvel a maior responsabilidade na sua emissão. Em Matosinhos estão localizadas as mais importantes unidades industriais, sendo a mais importante no que diz respeito a emissões de poluentes, a refinaria da Petrogal.

Dos COVs destaca-se o tolueno, que é um hidrocarboneto aromático que devido à sua elevada pressão de vapor se liberta facilmente para a atmosfera. A sua pressão parcial e a densidade do vapor em relação ao ar levam-no a ser um solvente com alta volatilidade e os seus vapores a permanecerem a baixas alturas, o que aumenta a penetração pelas vias respiratórias. É classificado como um composto potencialmente tóxico na medida em que penetra rapidamente no organismo principalmente pela via respiratória, onde actua como irritante. Contudo, a sua acção é predominante sobre o sistema nervoso central, causando, entre outros efeitos, fadiga, dor de cabeça, confusão etc.. A tabela 1.1 procura ilustrar os principais efeitos da exposição a vapores de tolueno.

Tabela 1.1 - Efeitos agudos da exposição a vapores de tolueno (Internet 1, 2000).

| Concentração de vapores de tolueno (ppm) | Tempo de exposição | Resposta |
|---|---------------------------|--|
| 50-100 | 8 horas | Leve sonolência e dor de cabeça |
| 200 | 8 horas | Fadiga, fraqueza muscular, dor de cabeça e náusea |
| 300-400 | 8 horas | Dor de cabeça, fadiga, confusão mental, leve incoordenação |
| 600 | 3 horas | Tontura, dor de cabeça, confusão mental |
| 5000-10000 | 1 minuto | Embriaguez, coma |

Tendo como ano de referência o ano de 1985, a produção anual deste composto rondava entre os 6,5 a 10 milhões de toneladas (Internet 2, 2000). A nível mundial os principais produtores foram:

- EUA - 2 390 000 toneladas
- Japão - 784 000 toneladas
- Canadá - 430 000 toneladas
- RFA - 358 000 toneladas
- Itália - 312 000 toneladas
- México - 216 000 toneladas
- França - 39 000 toneladas

Para uma produção anual de 6,2 milhões de toneladas, estima-se que as principais emissões assumem os seguintes valores:

- Emissões difundidas no ar por refinarias - 2 500 000 toneladas/ano
- Evaporação de combustíveis - 50 000 toneladas/ano
- Gases de escape de veículos - 2 000 000 toneladas
- Evaporação de solventes - 1 000 000 toneladas/ano
- Emissões de indústrias químicas - 100 000 toneladas/ano

É portanto ponto assente de que o uso dos COVs deverá ser reformulado e que deverão ser implementadas medidas de tratamento para eliminar emissões destes compostos para atmosfera que põem em risco a saúde pública, os ecossistemas bem como o nosso Planeta.

As tecnologias convencionais utilizadas nos últimos anos para o tratamento de efluentes gasosos incluíam processos de tratamento físico e químico tais como: "scrubbing", adsorção em carvão activado, oxidação química e incineração. Actualmente o mercado é dominado por duas tecnologias de incineração: a combustão térmica e a combustão catalítica. Contudo a aplicação destas tecnologias envolve elevados custos de investimento, de operação e energéticos. Além disso, os efluentes gasosos industriais são caracterizados por elevados caudais e concentrações reduzidas de compostos tóxicos, pelo que estes sistemas de tratamento apresentam-se bastante dispendiosos tornando infrutíferos os avultados investimentos envolvidos.

O princípio da infalibilidade microbiana, defende que não existe nenhum composto orgânico produzido naturalmente que não possa ser utilizado, nas condições apropriadas, como fonte de carbono e energia por algum microrganismo (Stanier *et al*, 1976). Com efeito, a comunidade microbiana como um todo tem uma grande versatilidade metabólica, sendo os microrganismos extraordinariamente diversificados quanto ao tipo e número de compostos que conseguem utilizar, quer para a síntese de constituintes celulares, quer como combustíveis para a produção de energia. É com base nesta teoria que os processos biológicos revolucionaram os sistemas de tratamento de efluentes gasosos.

Sendo o tolueno um composto orgânico natural, propõe-se neste trabalho o estudo das possibilidades de sua eliminação de efluentes gasosos por via microbiológica, usando uma bactéria específica, a *Pseudomonas putida*, em dois tipos de reactores, nomeadamente, num reactor contínuo perfeitamente agitado com biomassa em suspensão e num reactor de biofilme (tipo leito percolador).

1.2 TOLUENO

O tolueno é um composto orgânico volátil, pertencente ao grupo dos BTX (benzeno, tolueno e xileno). Trata-se de um composto volátil, na medida em que possui uma baixa solubilidade em água e elevada constante de Henry ($> 0,001-0,01 \text{ atm.m}^3/\text{mol}$), passando deste modo, facilmente à fase gasosa por desabsorção com ar, (Wübker *et al*, 1997).

O tolueno possui a estrutura de anel benzénico com um substituinte metil. A figura 1.1 apresenta a estrutura química dos BTX.

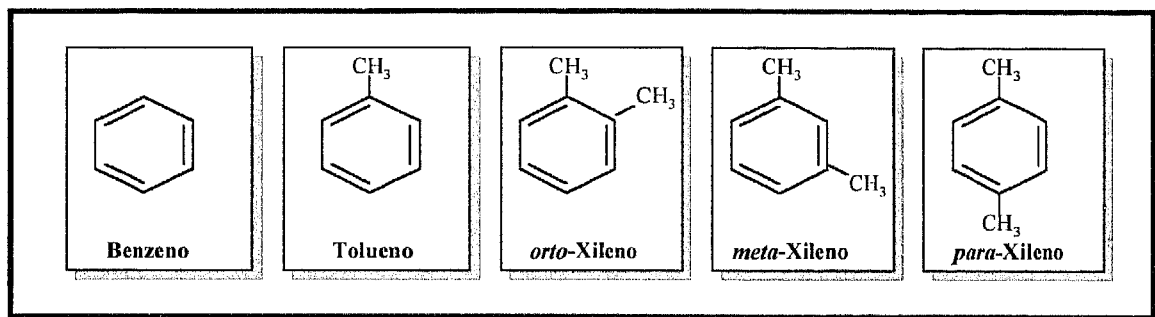


Figura 1.1- Estrutura química dos BTX.

Muitas dúvidas subsistem relativamente à verdadeira origem dos hidrocarbonetos aromáticos, tendo-se vindo a intensificar grandes investigações nesta matéria. Segundo alguns autores o tolueno possui origem biogénica, tendo sido produzido por pirólise de material orgânico a temperaturas intermédias (400 a 800 °C). A maioria dos compostos aromáticos não possui origem biossintética. Contudo possuem uma origem pirolítica natural, pelo que ao longo de um certo período evolucionário, contactaram com muitas espécies vivas, não sendo surpreendente que hoje em dia haja uma grande variedade de microrganismos capazes de degradar estes compostos. No entanto, estes produtos podem também ser sintetizados por processos de conversão, a elevada temperatura, do carvão a coque, desidrogenação catalítica do naftaleno altamente puro, combustão de resinas naturais (por exemplo, durante incêndios florestais, etc.).

É comum encontrarem-se pequenas moléculas de compostos aromáticos como o benzeno, tolueno, etilbenzeno, m-, o-, e p-xileno e naftaleno em muitos tipos de solos. Tal deve-se essencialmente à elevada capacidade de adsorção da matéria orgânica do solo. O baixo peso molecular dos hidrocarbonetos aromáticos torna também bastante propícia a sua presença na atmosfera. A tabela 1.2 resume as principais propriedades físicas e químicas do tolueno.

Tabela 1.2 - Propriedades físicas e químicas do tolueno (Internet 2, 2000).

| | |
|--|--|
| Nome químico | ⇒ tolueno, metil benzeno, fenilmetano ou toluol |
| Fórmula molecular | ⇒ C ₆ H ₅ CH ₃ . |
| Peso molecular | ⇒ 92,15 g/mol |
| Massa específica | ⇒ 86,69 g/m ³ |
| Ponto de ebulição | ⇒ 110,6 °C a 760 mmHg |
| Ponto de fusão | ⇒ -95 °C a 760 mmHg |
| Ponto de inflamação | ⇒ ≥ 4,5 °C |
| Pressão de vapor | ⇒ 36,7 mmHg a 30 °C |
| Densidade do vapor no ar | ⇒ 3,2 |
| Coefficiente de partição octanol/água | ⇒ log _{K_{ow}} = 2,79 |
| Cor | ⇒ Transparente |
| Inflamabilidade | ⇒ Inflamável |
| Temperatura de ignição | ⇒ 535 °C |
| Odor | ⇒ Fresco e doce, detectável para concentrações acima dos 0,2 ppm |
| Meio óptico | ⇒ Refractário |
| Solubilidade | ⇒ Muito pouco solúvel em água (<0,1 %), muito solúvel em acetona, clorofórmio e éter |
| Efeito do aquecimento | ⇒ Emite fumos tóxicos |

USOS

O seu maior campo de aplicação reside na indústria petrolífera como constituinte das misturas de gasolina, fazendo parte em 10 % da sua composição. Este

composto é também um intermediário utilizado na síntese de benzeno, tolueno di-isocianato, cloreto de benzil, fenol, ácido benzóico, cresol e tolueno vinilo. Dada a sua elevada capacidade de dissolver determinadas substâncias, é utilizado como solvente em tintas, colas, pinturas, vernizes, borracha, óleos, diluente de resinas, em pesticidas e insecticidas, bem como em produtos de limpeza. O tolueno encontra também aplicação na produção de polímeros usados na manufactura de *nylon*, plásticos, poliuretanos, corantes, produtos cosméticos e farmacêuticos.

EFEITOS DO TOLUENO NO MEIO AMBIENTE (Internet 2, 2000)

Água:

Nos meios aquáticos, apesar da sua elevada volatilidade, escapando-se parcialmente para a atmosfera, a sua solubilidade é suficiente para provocar a contaminação das águas superficiais e subterrâneas.

Ar:

Devido à sua elevada pressão de vapor existe sobretudo na forma gasosa contribuindo para a poluição atmosférica.

Solo:

O tolueno é adsorvido sobretudo por partículas de argila e matéria orgânica. A capacidade de adsorção aumenta à medida que o pH do meio diminui.

TEMPO DE VIDA MÉDIA

Estima-se que o tempo de vida média do tolueno no ar é de aproximadamente 60 horas (reage com OH^{*}). Durante o Verão, nos climas nórdicos, o tempo de permanência na atmosfera ronda os 4 dias, enquanto no Inverno poderá estender-se a semanas ou meses.

De acordo com a Portaria nº 286/93 de 12 de Março, o limite máximo de emissão de tolueno, a que ficam sujeitas as fontes fixas de todos os estabelecimentos industriais, é de 55 mg/m³.

1.3 PSEUDOMONAS

As *Pseudomonas* são bactérias Gram (-), estritamente aeróbias, catalase-positivas, oxidase-positivas. Estas bactérias têm a forma de bastonete direito ou curvo, mas nunca helicoidais, com um diâmetro de 0,5 a 1,0 μm e comprimento entre 1,5 a 5,0 μm . Muitas espécies acumulam poli- β -hidroxibutirato como material de reserva de carbono. Movem-se por flagelação polar e as suas culturas podem produzir pigmentos fluorescentes difusíveis, particularmente em meios deficientes em ferro. Estas bactérias podem isolar-se a partir da água e particularmente a partir do solo (Krieg *et al*, 1984).

1.3.1 Condições de crescimento e nutricionais

A maioria das espécies de *Pseudomonas* podem crescer em meios minerais com iões amónio ou nitrato e compostos orgânicos simples como única fonte de carbono. Apenas algumas espécies requerem a adição de factores orgânicos de crescimento. Esta capacidade de crescer em meios minerais simples constitui a base que caracteriza em termos nutricionais estas espécies. Podem distinguir-se umas das outras pelo número e tipo de compostos orgânicos requeridos como fonte de carbono. Em termos nutricionais são quimio-heterotróficas, podendo algumas espécies crescer em condições autotróficas utilizando H_2 ou CO como fonte de energia. O crescimento verifica-se para temperaturas entre 25 e 30°C, sendo, para a maioria das espécies, óptimo a 28°C, (Krieg *et al*, 1984). Não há crescimento a partir de 41°C. Nenhuma das espécies tolera condições ácidas, estando o pH óptimo situado entre 6 e 8.

1.3.2 Metabolismo

O metabolismo das *Pseudomonas* é tipicamente respiratório, utilizando o oxigénio como aceitador terminal de electrões. Não fixam azoto molecular e não desnitrificam, mas algumas espécies podem utilizar nitrato como aceitador terminal de electrões, reduzindo nitrato a nitrito.

1.4 DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS

A capacidade das bactérias utilizarem hidrocarbonetos aromáticos como substrato para o seu crescimento foi inicialmente demonstrada por Stomer (referido em Gibson *et al*, 1984) que, tendo isolado e crescido *Bacillus hexacarbovorum* em meio contendo tolueno e xileno, verificou que este microrganismo utilizava estes compostos como fonte de carbono e energia. Wagner (referido em Gibson *et al*, 1984), isolou duas bactérias, a *Bacterium benzoli* a e b, tendo verificado que ambas eram capazes de crescer utilizando benzeno, tolueno e xileno como fonte de carbono. Estes estudos foram aprofundados e alargados por Gray e Thornton (referido em Gibson *et al*, 1984), que demonstraram a existência de um conjunto muito diversificado de bactérias em amostras de solo, capazes de metabolizar compostos aromáticos, entre os quais, naftaleno, fenol e cresol. Ao longo dos últimos anos, estes estudos têm vindo a ser revistos e desenvolvidos por diversos investigadores, sendo certo que nesta matéria muito mais haverá para descobrir e aprofundar.

1.4.1 Metabolismo aeróbio de hidrocarbonetos aromáticos

Em termos gerais pode descrever-se a degradação aeróbia dos compostos aromáticos segundo cinco fases sequenciais:

1. Penetração do substrato na célula - após hidrólise extracelular dos compostos aromáticos a compostos mais simples, estes penetram na célula, normalmente por um processo de difusão simples, embora também existam evidências de que possam estar envolvidos alguns mecanismos de transporte específicos para compostos como o benzoato e o mandelato.
2. Transformação das cadeias laterais e modificação dos elementos substituídos - de forma a gerar substratos susceptíveis de ruptura, os fenóis di-hídricos, que constituem os intermediários chave das vias metabólicas.
3. Ruptura do anel benzénico - constitui o passo fundamental no metabolismo dos compostos aromáticos.
4. Conversão dos produtos de clivagem em intermediários alifáticos.
5. Utilização dos intermediários alifáticos - para o metabolismo central da célula.

I - Formação de substratos hidroxiláveis para a clivagem do anel

Os substratos hidroxiláveis para a clivagem do anel benzênico são na sua maioria fenóis di-hídricos ou alguns tri-hídricos (Dagley, 1978), destacando-se, entre estes, como os mais importantes, o catecol (figura 1.2), e o ácido protocatecuico. Os dois grupos hidroxilo podem estar na posição *orto* ou *para*, relativamente um ao outro. O catecol, sendo o mais comum, pode ser formado através de diferentes vias, a partir do fenantreno, naftaleno, fenol, benzeno ou de compostos aromáticos 1,2-di-substituídos como os ácidos mandélico, benzóico, antranílico e salicílico, tal como mostra a figura 1.2.

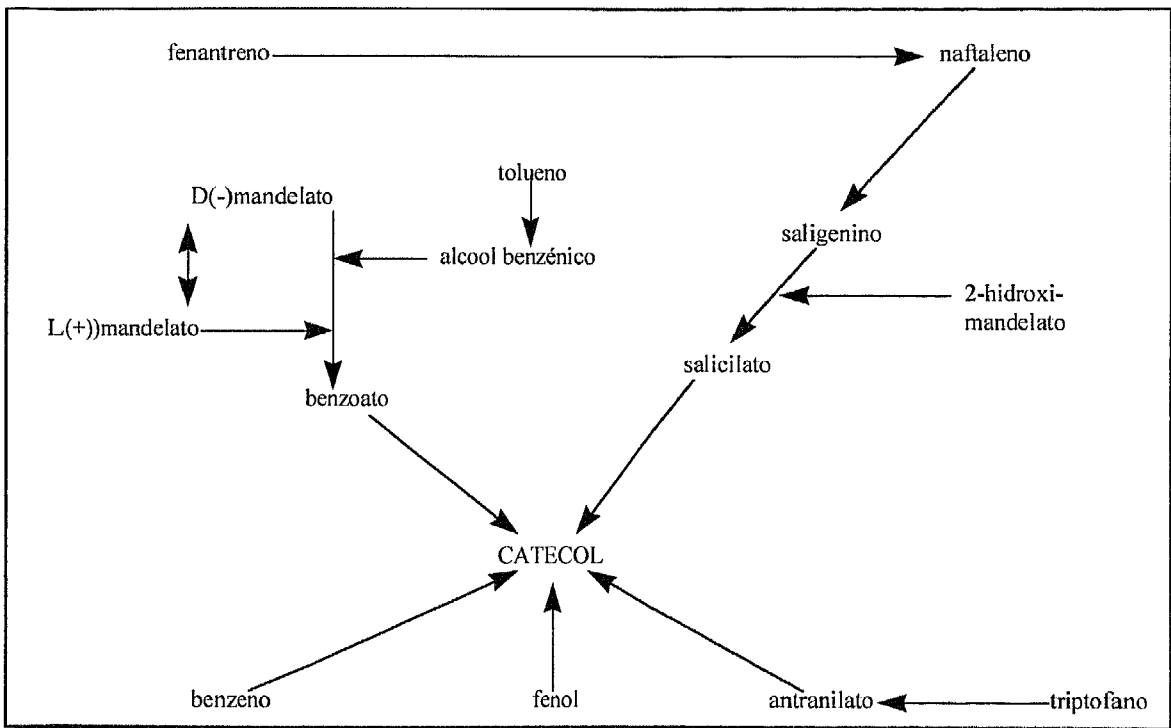
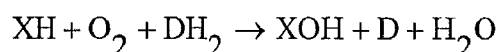


Figura 1.2 - Vias catabólicas convergentes para a formação de catecol (Charles *et al*, 1981).

Geralmente, a modificação dos substituintes do anel benzênico ocorre antes da clivagem do anel, mas nem sempre, dependendo dos microrganismos envolvidos bem como do composto, tal como se poderá verificar mais adiante. Pode também ocorrer em alguns casos a migração dos grupos hidroxilo ao longo do anel aromático.

Basicamente, a hidroxilação dos compostos aromáticos envolve a incorporação da molécula de oxigénio no substrato (Hayaishi, referido em Charles *et al*, 1981). Desde que o oxigénio esteja presente no estado triplico com dois electrões *spin* desemparelhados, reage lentamente com os compostos orgânicos. Uma vez que o oxigénio se encontra na forma molecular, só pode intervir na oxidação biológica após activação enzimática para o seu estado simples. Esta fissão da molécula de oxigénio é catalisada por enzimas pertencentes a três dos principais grupos enzimáticos: oxidases, mono-oxigenases e di-oxigenases.

As mono-oxigenases incorporam o oxigénio em substratos de acordo com a equação geral:



sendo XH, o substrato a ser hidroxilado e DH_2 o dador de hidrogénio. Neste tipo de reacção um átomo de oxigénio é incorporado no substrato orgânico e o outro átomo é reduzido a água. O agente redutor pode ser NADH ou NADPH. Por exemplo, o núcleo benzénico é, com poucas excepções, hidroxilado por flavoproteínas que utilizam NADPH como dador de electrões externo para reduzir a flavina ligada à enzima e assim activá-la para a reacção com O_2 (Neujar, 1990).

A figura 1.3 ilustra a importância das oxigenases e di-oxigenases na oxidação bacteriana de hidrocarbonetos aromáticos. Segundo Gibson e Subramanian (1984), as di-oxigenases envolvidas na formação de *cis*- dióis, encontram-se exclusivamente nos organismos procariotas, não tendo sido detectadas noutras formas de vida.

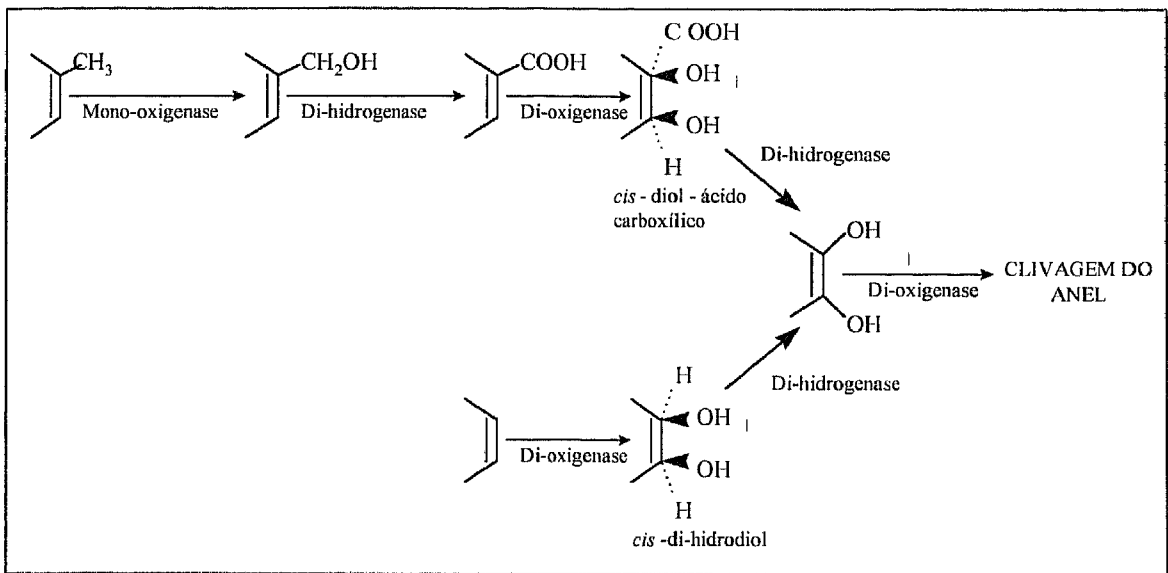


Figura 1.3 - Enzimas envolvidas na oxidação bacteriana de hidrocarbonetos aromáticos (Gibson *et al*, 1984).

II - Di-oxigenases e clivagem do anel

A clivagem do anel aromático é conseguida através de reacções em que ambos os átomos da molécula de oxigénio são incorporados na mesma molécula de substrato.

As di-oxigenases desempenham um papel fundamental nesta etapa, na medida em que possuem um sistema multi-enzimático, que incorpora ambos os átomos do oxigénio molecular no núcleo aromático, concomitantemente com a sua clivagem. Estas enzimas contêm usualmente elementos de transição que facilitam a reacção com o oxigénio molecular.

A ruptura do anel benzénico pode ser conduzida por dois mecanismos distintos, orto-clivagem ou meta-clivagem (figura 1.4).

Na orto-clivagem o anel aromático é quebrado entre os dois grupos hidroxilo produzindo-se ácido mucónico. Contrariamente, na meta-clivagem esta ruptura ocorre no lado adjacente aos dois grupos hidroxilo, produzindo um semi-aldeído.

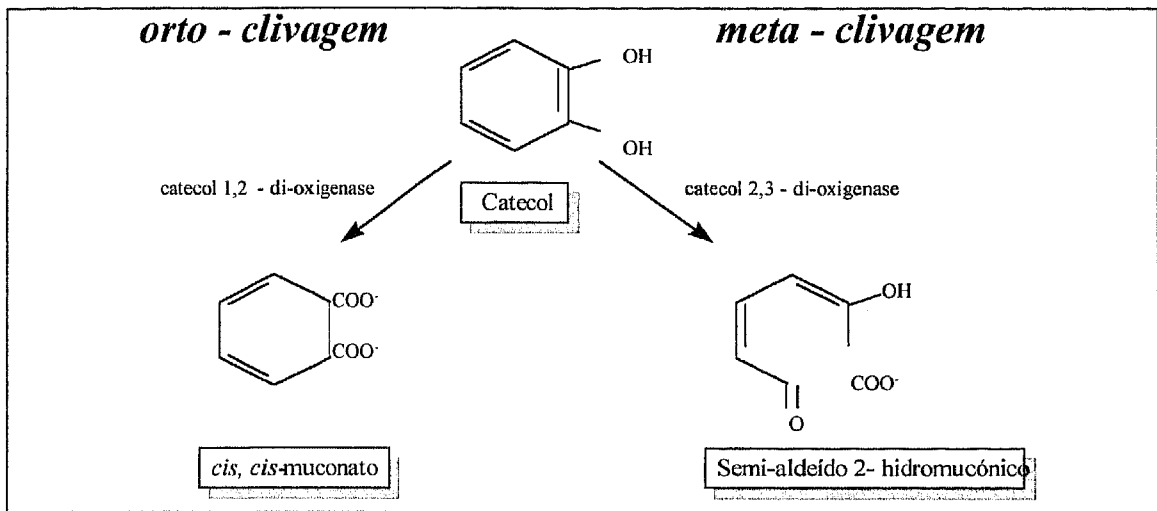


Figura 1.4 - Orto-clivagem e meta-clivagem do anel aromático (Houghton *et al*, 1994).

III - Metabolismo dos produtos de clivagem do anel

O produtos de orto-clivagem do catecol e protocatecuato são convertidos em succinato e acetil-CoA pela via β - ceto adipato (Stanier *et al*, referido em Charles *et al*, 1981). Na verdade, existe um elevado número de compostos aromáticos, estruturalmente relacionados entre si, que são metabolizados a intermediários da via β -ceto adipato, que, por sua vez, são convertidos em intermediários do ciclo de Krebs, tal como mostra a figura 1.5. O catabolismo destes compostos pode ser conduzido por enzimas da meta- ou orto-clivagem. Estas duas vias alternativas para a degradação do catecol são largamente utilizadas por uma grande variedade de *Pseudomonas*, sendo a orto-clivagem preferencialmente conduzida pelas *Pseudomonas* fluorescentes como a *Pseudomonas putida*, enquanto a meta-clivagem é mais comum nas *Pseudomonas* não fluorescentes.

Os produtos finais da meta-clivagem são intermediários anfotéricos como o acetaldeído, succinato, semi-aldeído ou acetoacetato (Dagley, referido em Charles *et al*, 1981). Estes autores sustentam que o semi-aldeído 2-hidroximucônico é hidrolisado a 2-ceto-4-hidroxivalerato e formato.

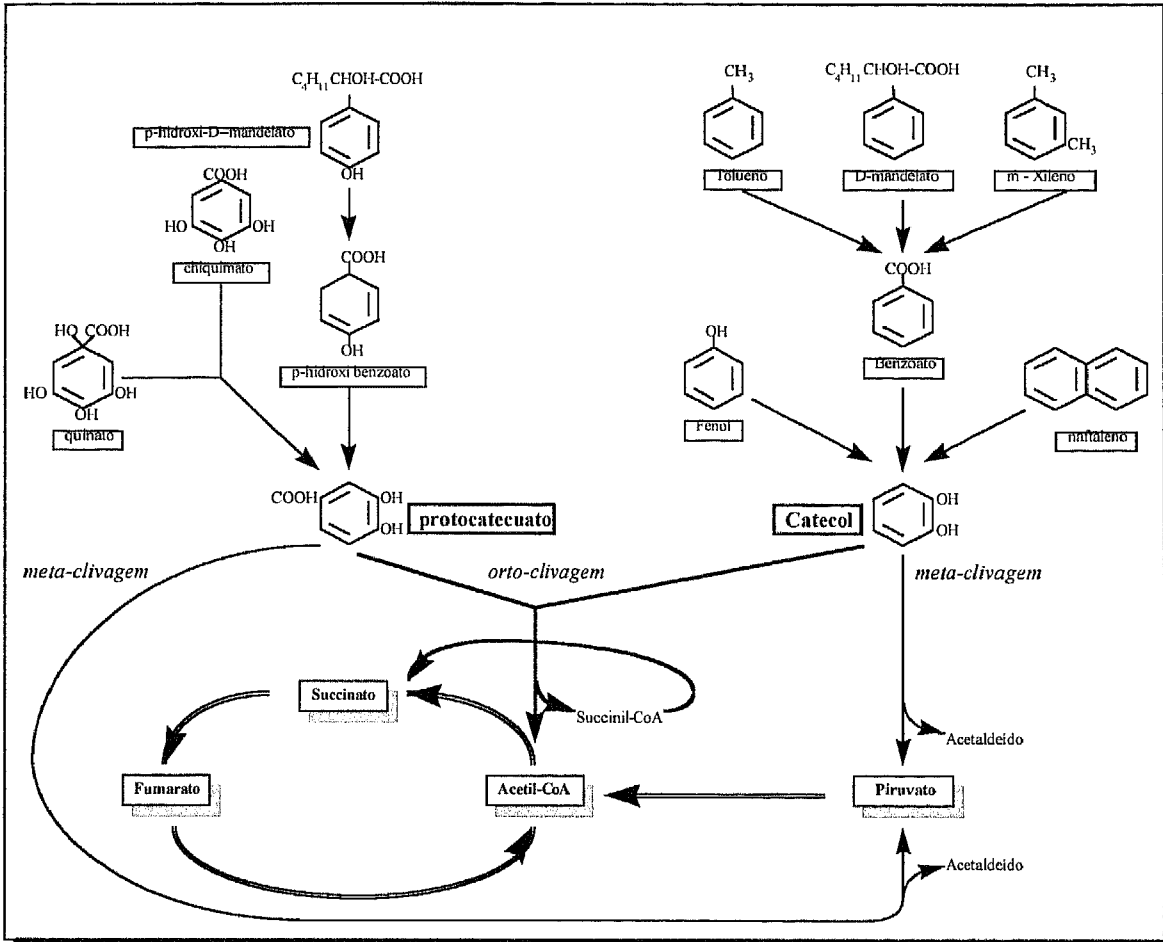


Figura 1.5- Catabolismo aromático pela via β - cetoadipato, para diferentes compostos aromáticos, cujos compostos finais entram no ciclo dos ácidos carboxílicos (Houghton *et al*, 1994).

1.4.2 Vias catabólicas para a degradação do tolueno

A presença de um substituinte alquila no anel aromático, leva a que os microrganismos possam seguir duas vias alternativas de oxidação degradativa: a) hidroxilação imediata do núcleo de benzeno seguida de clivagem do anel; b) oxidação do grupo metilo seguido de hidroxilação e clivagem do anel tal como mostra a figura 1.6.

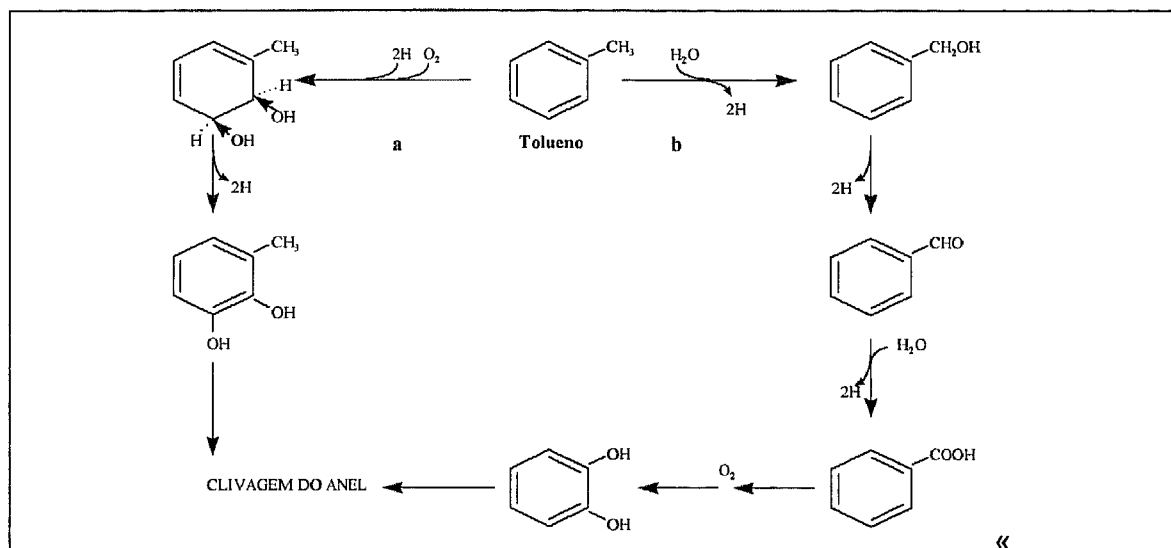


Figura 1.6 - Métodos alternativos para o ataque inicial do tolueno: a) hidroxilação imediata do anel; b) oxidação prévia do grupo metilo (Charles *et al*, 1981).

Claus & Walker (referido em Charles *et al*, 1981), realizaram estudos, em que isolaram espécies de *Pseudomonas* e *Achromobacter*, fazendo-as crescer em meios contendo tolueno como única fonte de carbono e energia. Após crescimento em tolueno, verificaram que estas oxidavam tolueno, benzeno, catecol e 3-metil-catecol. Estes resultados levaram à hipótese de que a primeira reacção oxidativa ocorria no anel aromático, tendo sido comprovada ao detectarem a presença de 3 - metil - catecol no filtrado dos meios de cultura de ambos os organismos. Estas observações foram apoiadas e desenvolvidas por estudos realizados por Nozaca *et al* (referido em Charles *et al*, 1981), que, mais uma vez, constataram que extractos celulares de *Pseudomonas mildenbergii* oxidavam tolueno a 3-metil-catecol. Ensaio subsequentes mostraram que a *Pseudomonas putida* continha uma enzima, a tolueno-di-oxigenase, que catalisava a oxidação do tolueno a cis-di-hidrodiol seguida de uma desidrogenação a 3 - metil - catecol através de uma reacção dependente de NAD (+). Kitagawa (referido em Charles *et al*, 1981) contestou estes pressupostos aludindo a que a *Pseudomonas aeruginosa* primeiro oxidava os grupos metilo do tolueno dando origem a benzoato. O benzoato, por sua vez, era convertido a catecol seguido da clivagem do anel (figura 1.6). Estes pressupostos foram apoiados por Williams *et al* (referido em Charles *et al*, 1981), que demonstraram que a *Pseudomonas putida* mt-2 também oxidava tolueno a benzoato sendo as enzimas codificadas pelo plasmídeo TOL.

1.4.2.1 Tolueno di-oxigenase

Extractos preparados a partir de células de *Pseudomonas putida*, crescidas em tolueno, revelaram conter um sistema enzimático que catalisa a oxidação de tolueno a *cis*-tolueno di-hidrodiol (figura 1.7). Esta reacção é assim catalisada por uma flavoproteína, a ferredoxin_{TOL}reductase, e uma proteína de sulfureto de ferro.

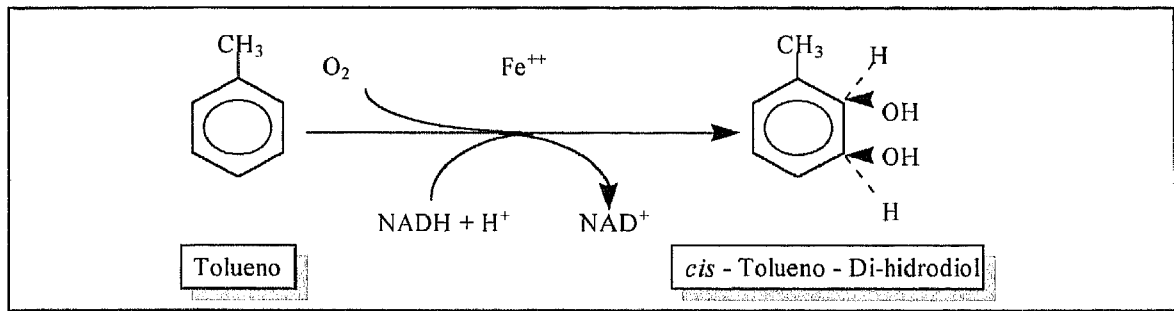


Figura 1.7 - Oxidação do tolueno a *cis*- tolueno di-hidrodiol (Gibson *et al*, 1984).

1.4.2.2. Esquemas globais de regulação

O elevado potencial de microrganismos como as *Pseudomonas* para degradarem compostos aromáticos não depende somente da presença e actividade das enzimas catabólicas que possuem, mas também da sua capacidade de adaptação a alterações. Esta capacidade é promovida pelos seus mecanismos próprios de regulação genética que conduzem a diferentes vias catabólicas.

Houghton *et al* (1994), salientam que a concentração de qualquer intermediário catabólico numa dada via metabólica depende intrinsecamente da especificidade, bem como da indução das enzimas necessárias à sua síntese, assim como as que promovem a sua posterior degradação.

O tipo de via metabólica seguida pelos principais intermediários catabólicos depende do tipo de enzimas catabólicas presentes, induzidas por outros intermediários relacionados com esses, ou precursores. O profundo conhecimento dos mecanismos que controlam a síntese e degradação destes catabolitos principais permite, assim, compreender melhor a sua elevada

capacidade de proliferarem nos seus nichos, bem como o seu potencial de adaptação a alterações, podendo vir a ser utilizadas nas diferentes tecnologias de bio-remediação.

As vias dissimilatórias do tolueno mais conhecidas são a via β -cetoadipato e a via TOL, que possuem distintos modelos de regulação, realçando-se, assim, o elevado potencial catabólico das *Pseudomonas*.

1.5 BIOFILMES

Nos sistemas aquáticos, é frequente verificar-se a deposição e crescimento de culturas microbianas sobre as superfícies livres, sempre que as condições ambientais são favoráveis ao seu desenvolvimento. Estas culturas formam uma espécie de matriz gelatinosa sobre as superfícies, constituída por uma população microbiana heterogénea e complexa, nomeadamente, protozoários, fungos, bactérias e algas.

A morfologia e desenvolvimento destes biofilmes depende largamente das características químicas e físicas do sistema em que se encontram, tais como a velocidade da fase líquida, o tipo de constituintes, a sua concentração, bem como as características da superfície.

Nos pontos seguintes serão descritos mais aprofundadamente os aspectos que afectam a adesão microbiana, a constituição dos biofilmes e o metabolismo bacteriano nos biofilmes.

1.5.1 Adesão dos microrganismos às superfícies

A adesão de um biofilme a uma superfície resulta do transporte físico, interacções físico-químicas, bem como de processos biológicos que podem

ocorrer sequencialmente ou simultaneamente. A formação do biofilme engloba a combinação dos seguintes processos:

I. Formação de um filme orgânico condicionante

Se a superfície se encontra exposta a uma solução aquosa contendo baixas concentrações de compostos orgânicos, após alguns minutos estes compostos são adsorvidos na superfície formando um filme de moléculas orgânicas (figura 1.8). Segundo análises laboratoriais este filme apresenta uma espessura máxima de 0,1 μm (Characklis *et al*, 1979).

Nos sistemas biológicos, estes compostos adsorvidos são geralmente macromoléculas, nomeadamente, glicoproteínas, proteoglicanos, polissacarídeos e/ou os seus produtos de degradação. Estas macromoléculas, que são polímeros neutros ou poli-electrólitos, desempenham um papel fundamental na adesão posterior dos microrganismos à superfície, na medida em que interactuam facilmente com outras partículas. A película de moléculas adsorvidas irá, deste modo, funcionar como um filme condicionante, na medida em que irá condicionar as fases de adesão e desenvolvimento posterior dos microrganismos.

II. Transporte para a superfície

Nesta fase, os microrganismos são transportados do seio do fluido para a superfície do suporte (figura 1.8). Os mecanismos de transporte foram estudados por Marshall *et al* (1971). Segundo este autor, para partículas com tamanhos compreendidos entre 0,01 a 0,1 μm o transporte para a superfície é dominado por difusão. Para partículas com tamanhos superiores a 0,2 μm os mecanismos de transporte incluem sedimentação, movimento *Browniano*, forças dinâmicas do fluido e hidrofobicidade do sistema celular. Se o sistema em estudo opera em regime turbulento, então o transporte das partículas ocorre através de forças dinâmicas.

III. Adesão microbiana à superfície

Após acumulação de nutrientes sobre o suporte, os microrganismos movem-se segundo um gradiente de concentração para a superfície, devendo desenvolver mecanismos próprios de fixação. Esta adesão é conseguida mediante o estabelecimento de forças físico-químicas, sendo, nesta fase, preponderante o papel desempenhado pelos polímeros extracelulares, (figura 1.8).

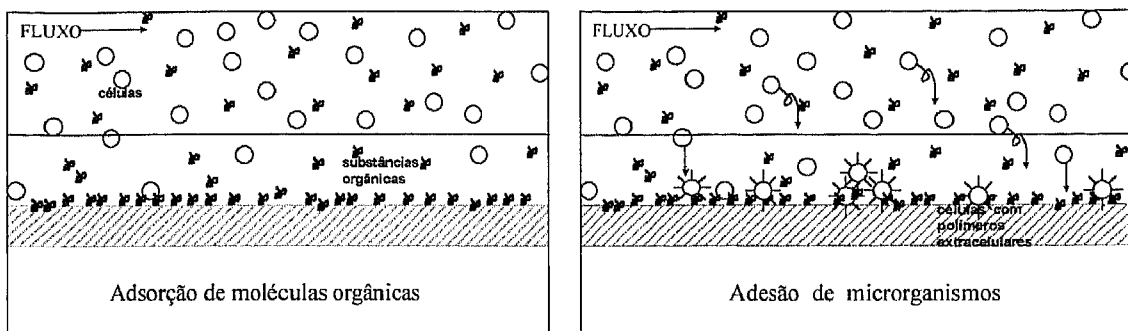


Figura 1.8 - Representação esquemática da formação de biofilme (adaptação de Boaventura, 1986).

Observou-se que muitos organismos seguem dois estados de adesão (Boaventura, 1986):

- ⇒ Primeiro dá-se uma adesão reversível, em que a ligação é rápida, podendo os organismos serem facilmente desprendidos da superfície, por lavagem através da aplicação de forças de corte ou pela sua própria capacidade de locomoção. Nesta fase prevalecem forças fracas do tipo *Van der Waals* e forças electrostáticas que mantêm os microrganismos próximos da superfície.
- ⇒ No segundo estado ocorre uma adesão irreversível. Uma vez que os microrganismos são mantidos suficientemente próximos da superfície, podem inter-agir através de forças mais fortes. Nestas condições, as células aderidas sintetizam gradualmente polímeros extracelulares, que estabelecem ligações fortes com a superfície, permitindo ligar firmemente os microrganismos. As forças que intervêm nestas ligações podem ser classificadas basicamente em três tipos:

- a) Ligações químicas (electrostáticas, covalentes, ligações de hidrogénio);
- b) Interações dipolo (dipolo-dipolo, dipolo induzido, ião dipolo);
- c) Forças de solvatação (forças de hidratação e ligações hidrofóbicas).

IV. Desenvolvimento e crescimento do biofilme

Uma vez que as células estão fixas à superfície, o biofilme pode ser desenvolvido não só pela captura de novos organismos, mas também pela própria actividade metabólica dos microrganismos aderidos. Dá-se uma conversão biológica dos nutrientes disponíveis em novas células, polímeros extracelulares e outros produtos excretados que podem servir de nutrientes para outros organismos.

À medida que os nutrientes atravessam o biofilme, irá desenvolver-se um gradiente de concentração ao longo da sua espessura, devido essencialmente a limitações difusionais. No entanto, à medida que o biofilme se vai desenvolvendo, verifica-se uma redução crescente da quantidade de nutrientes disponíveis para satisfação das necessidades nutricionais da população microbiana. Como a difusão do substrato e nutrientes é cerca de cinco vezes mais lenta que a do oxigénio, podem distinguir-se num biofilme suficientemente espesso três camadas:

- a) camada externa em crescimento - onde tem acesso o substrato, nutrientes e oxigénio dissolvido, contribuindo assim para o desenvolvimento do biofilme;
- b) camada média aeróbia - onde não se difundem o substrato e nutrientes, pelo que as células entram na fase de respiração endógena;
- c) camada interna - onde a concentração de nutrientes e oxigénio é nula, criando-se assim zonas anaeróbias no biofilme, pelo que as células entram na fase de fermentação.

A presença destas zonas depende do tipo de nutrientes, da estrutura do biofilme, da população microbiana e da taxa de fornecimento de nutrientes. A figura 1.9 ilustra o fluxo dos diferentes componentes no biofilme.

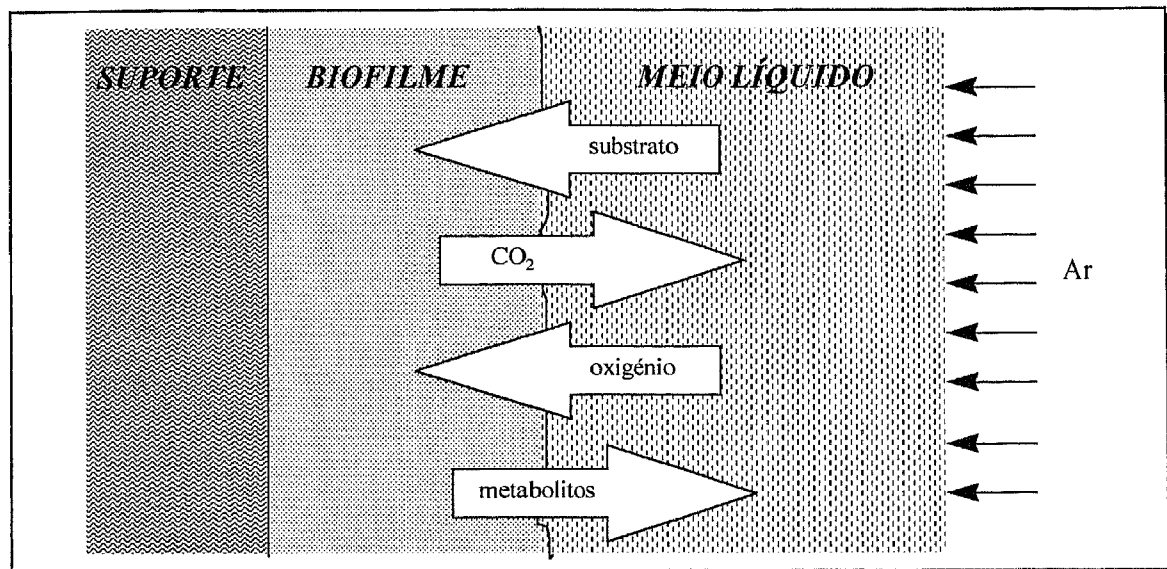


Figura 1.9 - Representação esquemática do fluxo dos diferentes componentes no biofilme (adaptação de Boaventura, 1997).

V - Desprendimento do biofilme

O desprendimento do biofilme pode resultar de duas situações:

- a) Desprendimento contínuo que depende das condições hidrodinâmicas. À medida que aumenta a espessura do biofilme intensificam-se as forças de corte sobre a superfície;
- b) Desprendimento aleatório, que se deve ao esgotamento do substrato nas camadas mais internas do biofilme e consequente enfraquecimento da matriz polimérica.

Se a espessura não ultrapassar determinados limites, o desenvolvimento do biofilme pode ser dividido em três fases:

1º Indução

Nesta fase dá-se a deposição de um biofilme primário sobre a superfície limpa.

2º Acumulação

O biofilme desenvolve-se exponencialmente ao longo do tempo, seguindo-se uma fase de acumulação com velocidade decrescente até que as forças de corte sobre o biofilme impedem uma acumulação posterior.

3ª Patamar

Nesta fase a produção do biofilme é igual à quantidade que se destaca da superfície e a espessura mantém-se constante.

1.5.2 Condições de fixação dos microrganismos ao suporte

Os principais factores que influenciam a fixação dos microrganismos são:

- *Suporte*
- *Meio de cultura*
- *Estado da cultura*

I - Suporte

O tipo de suporte influencia a quantidade de microrganismos aderidos, nomeadamente a sua composição química, mobilidade e carga superficial. O suporte deve permitir uma boa retenção dos microrganismos, deve possuir uma boa área de contacto, resistência química e mecânica. Deve ser de elevada durabilidade, ser inerte e não deve ter efeitos tóxicos na biomassa. No caso de suportes em meios de enchimento para leitos percoladores, devem permitir uma porosidade suficiente a fim de limitar as perdas de carga.

II - Meios de cultura

Como já foi mencionado atrás, a adesão microbiana depende fortemente da formação de polímeros extracelulares. Por sua vez, a formação destes

constituintes depende não só das condições físico-químicas prevalecentes no meio, como também do estado fisiológico da cultura. A fase de crescimento bacteriano que mais contribui para formação destes polímeros é a última etapa da fase exponencial e a fase estacionária. A síntese destes polímeros é também favorecida pela presença de elevadas razões carbono/azoto no meio, assim como por limitações das fontes de enxofre e fósforo, na presença de carboidratos em excesso. A composição do meio de cultura, particularmente a sua viscosidade, pH, temperatura, força iónica e o grau de agitação influenciam a fixação dos microrganismos. A presença de catiões no meio, particularmente os divalentes, também afecta a adesão microbiana às superfícies. Na verdade, na maioria dos sistemas aquáticos, os microrganismos possuem carga superficial negativa, sendo os catiões potenciais candidatos a funcionar como contra-íões. Vários estudos indicaram que os catiões Ca^{2+} e Mg^{2+} são necessários para a adesão eficiente das bactérias, contribuindo para a manutenção da estrutura da matriz polimérica extracelular.

III - Estado da cultura

Como é evidente, quanto mais elevada é a concentração de microrganismos, melhor a sua fixação porque aumenta a probabilidade do número de colisões com a superfície. Culturas mais envelhecidas também favorecem a adesão dos microrganismos devido à diminuição da mobilidade das células e ao aumento da secreção dos polímeros extracelulares.

1.5.3 Estruturas especializadas na adesão

Muitas células produzem filamentos extracelulares, acessórios que desempenham um papel fundamental no processo de adesão às superfícies bem como na adesão das bactérias entre si. De seguida são apresentados os principais tipos destas estruturas (Kent *et al*, 1988).

I - Flagelos

Estas estruturas são responsáveis pela mobilidade das bactérias. São fios muito finos de proteínas flageladas, que se estendem para lá do citoplasma através da parede celular. Podem ter um diâmetro de 0,01 a 0,02 μm e comprimento até 10 μm . Algumas bactérias que possuem estes flagelos pertencem ao género de *Pseudomonas* e *Sphaerotilus spp.*

II - Pilis

Esta forma encontra-se em muitas bactérias Gram (-), incluindo as pertencentes ao género *Pseudomonas* e *Echerichia coli*. São filamentos muito finos, acessórios das proteínas, com uma extensão que vai de 4 a 35 nm. São direitos e não estão envolvidos na mobilidade das bactérias. A sua função principal é tornar a célula aderente, podendo também fixar-se fortemente a outras bactérias.

III - Protecae

Estas estruturas aparecem sobretudo em bactérias Gram (-) pertencentes ao género *Caulobacter* e *Hyphomicrobium*. Podem ocorrer em um ou mais locais da superfície celular.

1.5.4 Substâncias poliméricas extracelulares - EPS

Além das estruturas de adesão atrás referidas, os polímeros extracelulares representam um papel crucial na fixação dos microrganismos. De facto, os maiores produtos de degradação presentes no biofilme são os polímeros extracelulares. Formam uma espécie de matriz gelatinosa altamente hidratada (98-99% de água), onde as bactérias ficam embebidas. Estas matrizes são frequentemente referidas como cápsulas, filme ou glicocalice. O termo glicocalice inclui os polissacarídeos que contêm produtos de origem bacteriana, excluindo os elementos constituintes da membrana extracelular das células Gram (-) e o peptidoglicano das células Gram (+).

Em 1983, Characklis e Cooksey estudaram o papel desempenhado pelas EPS nos biofilmes, que resumiram às seguintes funções:

1. Proporcionar forças coesivas dentro do biofilme;
2. Adsorver os nutrientes;
3. Proteger as células imobilizadas das alterações ambientais incluindo da influencia dos biocidas;
4. Adsorver metais pesados;
5. Adsorver partículas e outros detritos e aumentar a transferência intracelular do material genético.

Foram realizados diversos estudos com o objectivo de conhecer qual a composição das EPS. Alguns destes estudos consistiram em fazer crescer as células bacterianas de forma a obter material polissacarídeo a partir do meio. De seguida procedia-se a uma diálise para remover os componentes do meio de crescimento de baixo peso molecular, sendo submetidos posteriormente a uma precipitação etanólica. Existem várias teorias que procuram descrever o papel e composição dos polímeros envolvidos na adesão. Segundo Yet , Fletcher e Floodg (1973), no processo de adesão da estirpe *Pseudomonas* NCMB 2021, estão envolvidos dois tipos de polissacarídeos. O primeiro polímero participava na adesão inicial e presumia-se que existia na superfície de todas as células. O segundo polímero era produzido subsequentemente ao processo de adesão, possibilitando uma adesão mais forte com o substrato. Esta teoria foi apoiada e desenvolvida por Christensen *et al* (1985), tendo constatado que a *Pseudomonas* NCMB 2021 produzia dois polissacarídeos muito dissimilares. O primeiro era produzido só na fase logarítmica de crescimento, sendo basicamente constituído por glucose, ácido glucurónico e ácido galactorónico, conferindo à solução um aspecto viscoso. O segundo polímero era produzido na fase estacionária e contem N-acetilglucosamina, ácido 2-ceto-3-dioxioctulosónico e 6-dioxihexose não identificado. A solução deste polímero, ao contrário da anterior, não é viscosa. A produção deste polímero, está directamente relacionada com a capacidade dos organismos aderirem ao poliestireno hidrofóbico. Estudos mais recentes, identificaram os principais monossacarídeos que fazem parte destes

polímeros extracelulares, nomeadamente, açúcares neutros (D-galactose, D-glucose, D-manose, L-frutose, L-raminose), açúcares amino (N-acetilglucosamina e N-acetil-D-galactosamina) e ácidos urónicos (D-glucorónico e D-galacturónico). Os açúcares pentose como a D-ribose e D-xilose são encontrados sobretudo em leveduras e algas. Muitos polímeros extracelulares contêm grupos fosfato combinado, acetato, formato e piruvato, dispondo assim de grupos ácidos para interacções posteriores. Contudo, os polissacarídeos dominam nas estruturas poliméricas extracelulares produzidas pelas bactérias, podendo também conter outros materiais poliméricos em menores proporções, tais como, glicoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos.

1.6 PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES GASOSOS

Este capítulo procura descrever sumariamente os principais processos biológicos utilizados hoje em dia, na depuração de gases contaminados com compostos orgânicos voláteis.

As principais vantagens da utilização destes processos resumem-se a:

- Elevados rendimentos;
- Baixo custo de exploração, uma vez que não necessitam de manipulação durante o funcionamento e manutenção;
- Baixo consumo energético;
- Versatilidade perante grande variedade de gases biodegradáveis;
- Não originam novos contaminantes de difícil eliminação;
- As necessidades de produtos químicos são mínimas.

1.6.1 Princípios da depuração biológica

A purificação biológica baseia-se na capacidade de muitos microrganismos (sobretudo as bactérias, alguns fungos filamentosos ou leveduras), degradarem

os compostos orgânicos. Em condições aeróbias, estes organismos oxidam os compostos orgânicos a produtos finais (por exemplo, H_2O e CO_2), sendo parte dos compostos transformados em novo material celular. Na figura 1.10 encontra-se esquematizado o processo de metabolização dos compostos orgânicos.

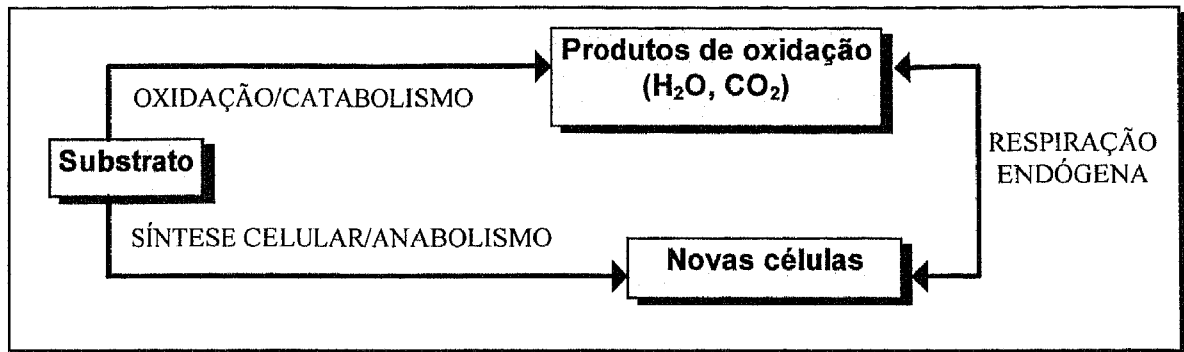


Figura 1.10 - Representação esquemática do metabolismo aeróbio dos compostos orgânicos.

Estes microrganismos reproduzem-se e auto-activam-se no seu meio de cultura, sempre que se verificam condições de temperatura, humidade e pH adequadas, assim como a presença de oxigénio e nutrientes essenciais para o seu crescimento.

Sendo assim, para que um processo de tratamento biológico possa ser aplicado, é necessário verificarem-se as seguintes condições:

- I. Os contaminantes a eliminar do ar devem ser biodegradáveis;
- II. As características do efluente devem de ser favoráveis à actividade microbiana, nomeadamente temperatura entre 10 e 40°C, humidade > 95% e pH compreendido entre 6 e 8;
- III. Deve-se garantir a ausência de substâncias inibidoras da actividade microbiana.

1.6.2 Bio-reactores utilizados na eliminação de COVs

Os primeiros estudos de tratamento de efluentes gasosos por processos biológicos incidiram basicamente na eliminação de odores e compostos inorgânicos, como os sulfuretos, mercaptanos e amónio. A maioria dos estudos

foram realizados utilizando biofiltros ou meios naturais. Contudo, mais recentemente, estes estudos foram alargados à aplicação dos bio-reactores no tratamento de efluentes contaminados com COVs.

Na verdade, na última década, tem-se verificado um aumento crescente da variedade de COVs que podem ser eliminados de efluentes gasosos utilizando bio-reactores, sendo os mais comuns o fenol, tolueno, xileno, benzeno, etilbenzeno, nitrotolueno, etc..

A utilização destes bio-reactores baseia-se essencialmente, na capacidade que os microrganismos tem de utilizar os COVs como fonte de carbono e energia para o metabolismo microbiano, dando origem a compostos inofensivos para o meio ambiente.

Basicamente, existem três grupos de sistemas de depuração: os biolavadores, vulgarmente designados por *bioscrubbers*, os leitos percoladores e os biofiltros. Distinguem-se essencialmente em dois aspectos fundamentais. Por um lado, diferem pela forma como a fase líquida opera, isto é, se é uma fase móvel contínua ou se é uma fase estacionária. Por outro lado, são classificados de acordo com o modo como se encontra a biomassa no seu interior, isto é, biomassa em suspensão na fase aquosa ou biomassa fixa num meio de enchimento. A tabela 1.3 resume as principais características que distinguem cada um dos sistemas.

Tabela 1.3 - Características diferenciadoras das diferentes tecnologias de purificação biológica de efluentes gasosos.

| Tipo de bio-reactor | Fase aquosa | Alojamento da flora microbiana |
|----------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| <i>Bioscrubber</i> | Móvel | Biomassa em suspensão |
| Biofiltro | Estacionária | Biomassa fixa |
| Leito percolador | Móvel | Biomassa fixa |

Seguidamente proceder-se-à a uma descrição mais detalhada de cada um dos bio-reactores.

Bioscrubbers

São constituídos basicamente por um compartimento de lavagem e um compartimento de regeneração. A unidade de lavagem consiste numa coluna onde a solução líquida é alimentada pelo topo através de um distribuidor uniforme de gotas de água, fluindo em contra-corrente com a corrente gasosa. Nesta unidade dá-se a transferência de massa do contaminante da fase gasosa para a fase líquida, assim como do oxigénio e outros nutrientes essenciais. Deste modo, os poluentes são oxidados biologicamente em condições aeróbias, dando origem a biomassa que é conduzida posteriormente para a unidade de regeneração. A figura 1.11 apresenta uma imagem esquemática de um *bioscrubber*.

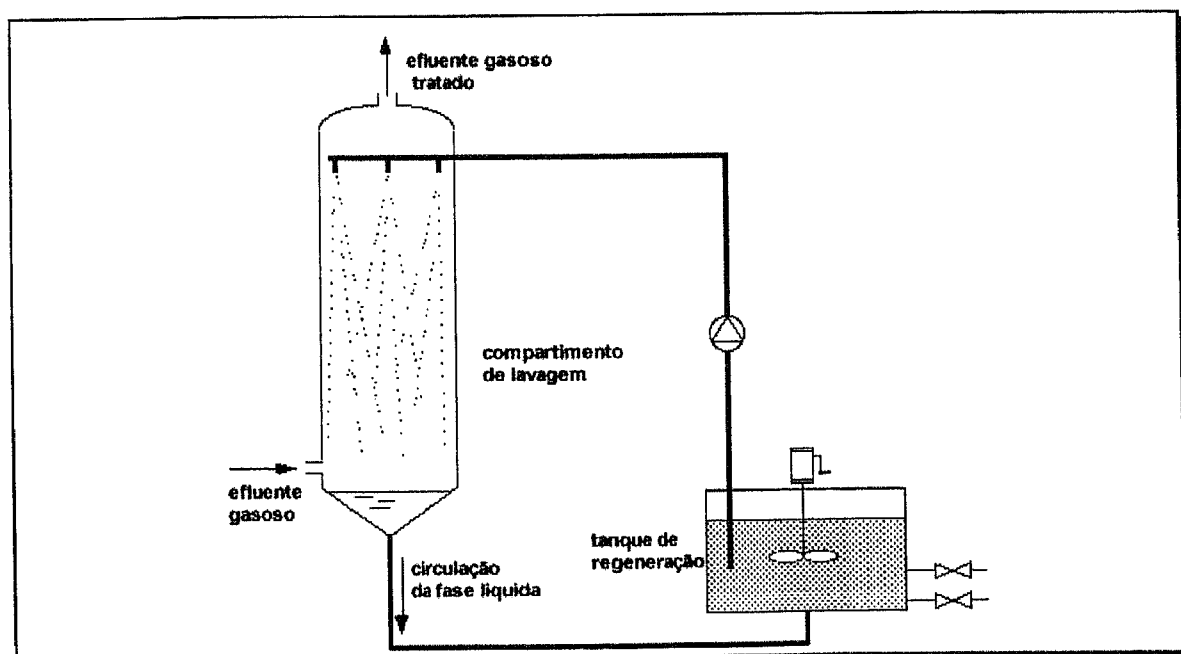


Figura 1.11 - Representação esquemática de um *bioscrubber* (Internet 3, 2000)

Estes bio-reactores já foram empregues com sucesso em alguns ramos industriais, nomeadamente, no tratamento de efluentes gasosos contendo álcoois, glicóis, cetonas, glicoeter, aromáticos, etc. (Ottendraf, 1987).

Leitos percoladores

Nestes bio-reactores, contrariamente aos *bioscrubbers*, o processo de absorção do contaminante da fase gasosa, bem como a regeneração da fase líquida, ocorrem simultaneamente na mesma unidade. Esta consiste numa coluna em cujo interior se encontra um enchimento de material inerte, que irá servir de suporte para o desenvolvimento de um biofilme microbiano ao longo do tempo. A solução mineral líquida que contem todos os nutrientes inorgânicos dissolvidos bem como o inóculo, é continuamente alimentada no topo da coluna através de um distribuidor que garanta uma distribuição uniforme em toda a secção da coluna. A corrente gasosa contendo o poluente é alimentada pela base em contra corrente com a fase líquida. Os contaminantes presentes na fase gasosa são assim absorvidos na fase líquida e depois transportados para o biofilme onde se dá o processo de degradação aeróbia. No capítulo 2 encontra-se uma descrição mais detalhada da operação em leitos percoladores.

Biofiltros

Nestes bio-reactores o efluente gasoso contaminado passa através de um meio de enchimento natural (solo, turfa, composto, etc.), ou através de uma mistura de enchimentos naturais ou sintéticos. Assim como nos leitos percoladores, o material de enchimento serve de suporte para o desenvolvimento de um biofilme constituído por bactérias ou fungos que rodeiam as partículas do material filtrante. O material do meio de enchimento também fornece os nutrientes necessários para o crescimento microbiano. O contaminante da fase gasosa é difundido no biofiltro e adsorvido no biofilme, onde se dá a oxidação biológica a CO_2 , H_2O , formação de biomassa e outros produtos. A biofiltração pode ser utilizada para tratar gases orgânicos como os COVs ou hidrocarbonetos, ou para tratar ar contaminado com substâncias tóxicas inorgânicas. A figura 1.12 apresenta esquematicamente um biofiltro .

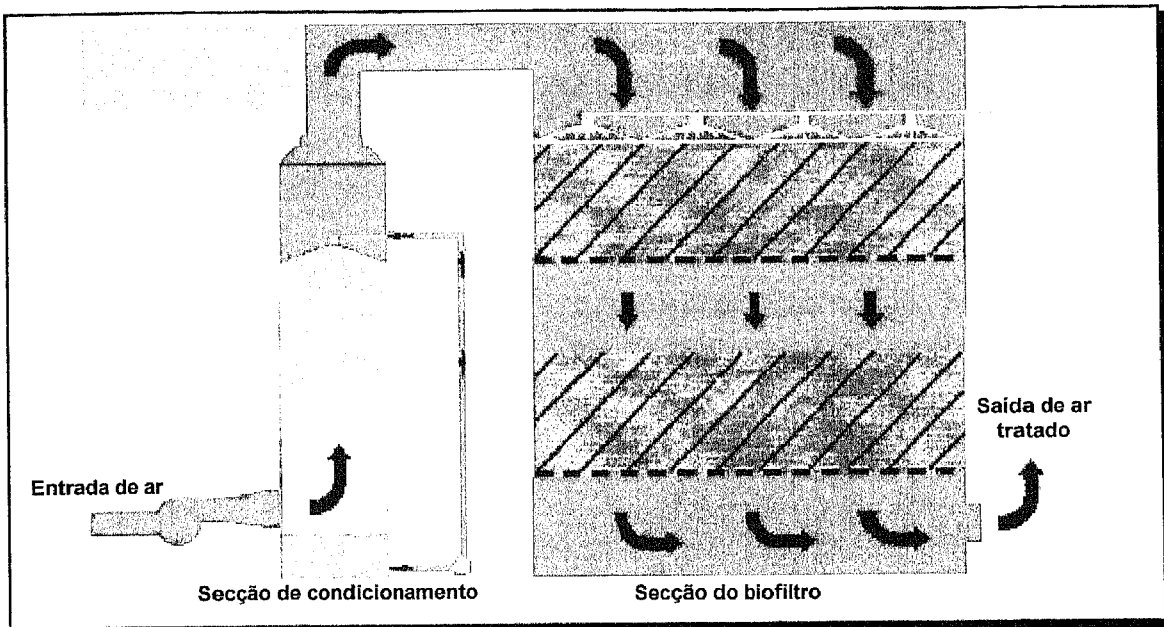


Figura 1.12 - Representação esquemática de um biofiltro (Internet 4, 2000).

A escolha de um ou outro tipo de reactor depende de vários factores. Os *bioscrubbers* e leitos percoladores caracterizam-se pela existência de duas fases móveis, uma fase gasosa e uma fase líquida, enquanto que nos biofiltros só existe a fase móvel da corrente gasosa. No caso dos contaminantes com solubilidade relativamente alta, utilizam-se preferencialmente os leitos percoladores ou os *bioscrubbers*. Os biofiltros são mais adequados para o tratamento de gases contaminados com compostos muito pouco solúveis em fase aquosa, uma vez que este tipo de reactor apresenta uma maior área superficial específica. Por sua vez, os leitos percoladores e *bioscrubbers* têm a vantagem de conseguir uma maior eliminação dos produtos inibidores e uma maior regulação das condições de operação, tais como o pH, devido à recirculação contínua da fase móvel. Além disso os leitos percoladores podem ser utilizados com vantagem na depuração de gases contaminados com substâncias voláteis, quando utilizam um suporte com uma área superficial específica significativa.

1.7 MODELOS MATEMÁTICOS PARA O DIMENSIONAMENTO DOS REACTORES BIOLÓGICOS NA REMOÇÃO DE COVs

1.7.1 Cinética de crescimento celular para a biomassa em suspensão

O crescimento de uma cultura de microrganismos num reactor *batch*, pode ser descrito basicamente por quatro fases distintas.

I - Fase de aclimação

Durante esta fase, dá-se a adaptação do inóculo ao meio de cultura e às novas condições ambientais. Segundo Post *et al* (1997), esta adaptação pode ser devida a:

- I. indução enzimática necessária para a biodegradação;
- II. alterações genéticas ou mutações;
- III. desaparecimento das espécies não adaptadas ao substrato quando este constitui a única fonte de carbono;
- IV. melhor tolerância à toxicidade de xenobióticos.

A duração desta fase de aclimação depende de factores como:

- I. diversidade celular e concentração de microrganismos;
- II. tempo durante a qual se dá a formação de enzimas;
- III. razão substrato/microrganismos;
- IV. condições ambientais (concentração de nutrientes e oxigénio, pH, temperatura e salinidade);
- V. tipo de cultura: biomassa em suspensão ou biomassa fixa;
- VI. predação;
- VII. presença de substratos inibidores;
- VIII. tipo de substrato e microrganismos.

Durante esta fase, a adição de inóculo ao meio não é seguida pela multiplicação da população. No entanto, as células não estão em repouso, há algum consumo de substrato, podendo aumentar de tamanho.

A fase de aclimação também pode ser observada, quando um inóculo é introduzido num meio de cultura mais pobre. De uma forma geral, as enzimas necessitam de ser activadas por pequenas moléculas (vitaminas, cofactores), ou iões (activadores). Quando se transfere um inóculo para um meio mais pobre nessas substâncias, ocorre uma difusão dessas substâncias do interior da célula para o meio. Ocorre assim uma fase de aclimação, na qual vão ser sintetizadas essas substâncias necessárias para catalisar a formação de enzimas.

D'Adame *et al* (1984), advertem para o perigo de utilização de uma quantidade excessiva de inóculo, que pode eliminar a fase de aclimação, dificultando a identificação do início da fase exponencial.

II - Fase de crescimento exponencial

As células dividem-se a um ritmo constante, crescendo de forma exponencial a uma velocidade que é função do tempo de geração e da capacidade de processar nutrientes. Se um inóculo na fase exponencial de crescimento é introduzido num meio fresco de igual composição, continua a crescer exponencialmente não ocorrendo a fase de aclimação. Durante esta fase, a população mantém a composição química, actividade metabólica e outras características fisiológicas.

III- Fase estacionária

Quando a concentração de nutrientes essenciais é reduzida a valores que limitam o crescimento, ou quando algum metabolito se acumula no meio em concentrações inibidoras, dá-se início à fase estacionária. Durante esta fase, a população microbiana activa permanece constante. Há um equilíbrio entre a velocidade de reprodução e a velocidade de morte.

IV - Fase de decaimento

Os microrganismos morrem mais rapidamente que a produção de novas células, pelo que a biomassa diminui. Isto ocorre devido ao esgotamento de nutrientes e acumulação de substâncias inibidoras no meio. Quando os nutrientes se esgotam, as células passam a consumir o seu próprio RNA, proteínas, aminoácidos livres e peptídeos. As células morrem e sofrem a lise libertando para o meio de cultura compostos que irão servir de nutrientes para as células remanescentes.

A figura 1.13 procura ilustrar as principais fases atrás enunciadas.

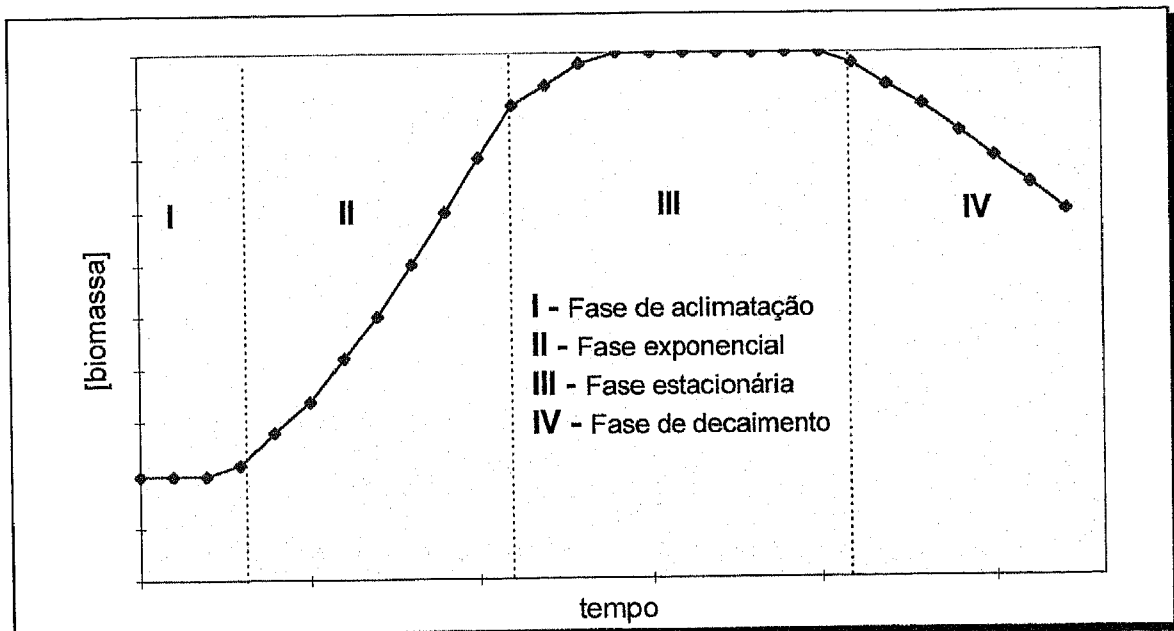


Figura 1.13 - Fases de crescimento de uma cultura em reactor *batch*.

Numa situação de crescimento microbiano por fissão binária, onde a fase de aclimação, respiração endógena e decaimento de biomassa são desprezáveis, a concentração de biomassa num reactor fechado cresce a uma velocidade que se admite de primeira ordem relativamente à concentração de biomassa.

A velocidade de crescimento das células pode, então, ser definida pela seguinte relação:

$$r_X = \mu X \quad (1.1)$$

em que:

r_X - velocidade de crescimento da biomassa, $ML^{-3}T^{-1}$

μ - velocidade específica de crescimento, T^{-1}

X - concentração de biomassa, ML^{-3}

Em reactor *batch*, fazendo um balanço mássico à biomassa, obtém-se:

$$\frac{dX}{dt} = r_X = \mu X \quad (1.2)$$

Do mesmo modo, fazendo um balanço mássico ao substrato:

$$\frac{dS}{dt} = r_S \quad (1.3)$$

sendo,

S - concentração de substrato limitante, ML^{-3}

r_S - velocidade de consumo de substrato, $ML^{-3}T^{-1}$

Tendo em conta que o rendimento biológico observado, Y_{obs} , é a biomassa produzida por unidade de substrato consumido,

$$Y_{obs} = -\frac{r_X}{r_S} \quad (1.4)$$

obtém-se,

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{obs}} X \quad (1.5)$$

Nos reactores biológicos, nem todo o substrato é utilizado para a formação de novas células. Uma parte do substrato serve também de fonte de energia para a manutenção das células já existentes, energia esta que é quantificada através de uma velocidade específica de utilização de substrato para a manutenção das células, m (T^{-1}), vulgarmente designado por coeficiente de manutenção. A quantidade de substrato utilizada única e exclusivamente para a formação das células é quantificado pelo parâmetro designado por rendimento intrínseco, Y . A equação 1.6 ilustra a relação entre estes parâmetros:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} + mX \quad (1.6)$$

Substituindo as equações 1.2 e 1.5 na equação 1.6 obtém-se a equação 1.7, mostra-se que o rendimento biológico observado, é dividido numa fracção correspondente à matéria celular sintetizada por unidade de substrato removido para síntese e outra fracção correspondente à manutenção das células, isto é,

$$\frac{1}{Y_{obs}} = \frac{1}{Y} + \frac{m}{\mu} \quad (1.7)$$

Como na fase de crescimento exponencial $\mu \gg m$, resulta que $Y_{obs} \approx Y$.

Admitindo que o crescimento segue o modelo de Monod, então a velocidade específica de crescimento é dada pela equação 1.8.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1.8)$$

em que,

μ_{max} - velocidade específica de crescimento máxima, T^{-1}

K_s - constante de saturação para o substrato, ML^{-3}

Admitindo que na fase de aclimação o consumo de substrato é desprezável, μ pode ser determinado para cada valor de concentração de substrato inicial. Admite-se também, que durante a fase de crescimento exponencial, a variação da concentração de substrato é desprezável face à concentração inicial, não provocando a variação de μ . Integrando a equação 1.9,

$$\left| \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \right|_t = \mu \Big|_{S_0, t_0} \quad (1.9)$$

obtem-se a equação 1.10 que permite determinar os valores de μ , para cada concentração inicial de substrato:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu(t - t_0) \quad (1.10)$$

sendo,

X_0 - concentração de biomassa no tempo inicial, t_0 , ML^{-3}

X_t - concentração de biomassa ao fim do tempo, t , da fase de crescimento exponencial, ML^{-3}

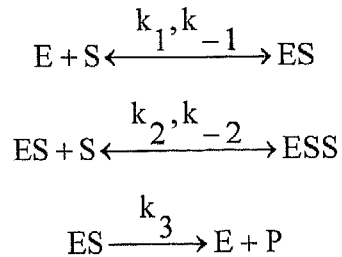
t_0 - tempo de início da fase de crescimento exponencial, T

Define-se tempo de geração ou duplicação, t_d , como o tempo ao fim da qual a concentração de biomassa duplica na fase de crescimento exponencial, isto é, $X_t = 2X_0$. Resulta, então:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1.11)$$

O modelo de Monod foi desenvolvido para culturas puras, em que o substrato não inibe o crescimento dos microrganismos. No entanto, há situações em que ocorre uma inibição por excesso de substrato, nas quais o substrato em excesso, S , pode reagir com o complexo enzima substrato, ES , tornando-o inactivo,

baixando assim a velocidade de crescimento. A inibição por excesso de substrato está esquematizada nas seguintes equações químicas:



O modelo cinético de crescimento que habitualmente se aplica nestas situações de inibição é o representado pela equação de Haldane (Roques, 1980):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (1.12)$$

em que,

K_i - constante de inibição para o substrato, ML^{-3}

Este modelo tem sido aplicado na degradação de compostos aromáticos em culturas puras e mistas, inibidas pelo substrato limitante ou por outros compostos inibitórios, como as aminas, amónia, clorofenois, naftaleno, tolueno, tricloroetileno, etc..

A figura 1.14 apresenta o perfil da curva de velocidade de crescimento *versus* concentração de substrato, segundo o modelo de Monod e segundo o modelo de Haldane.

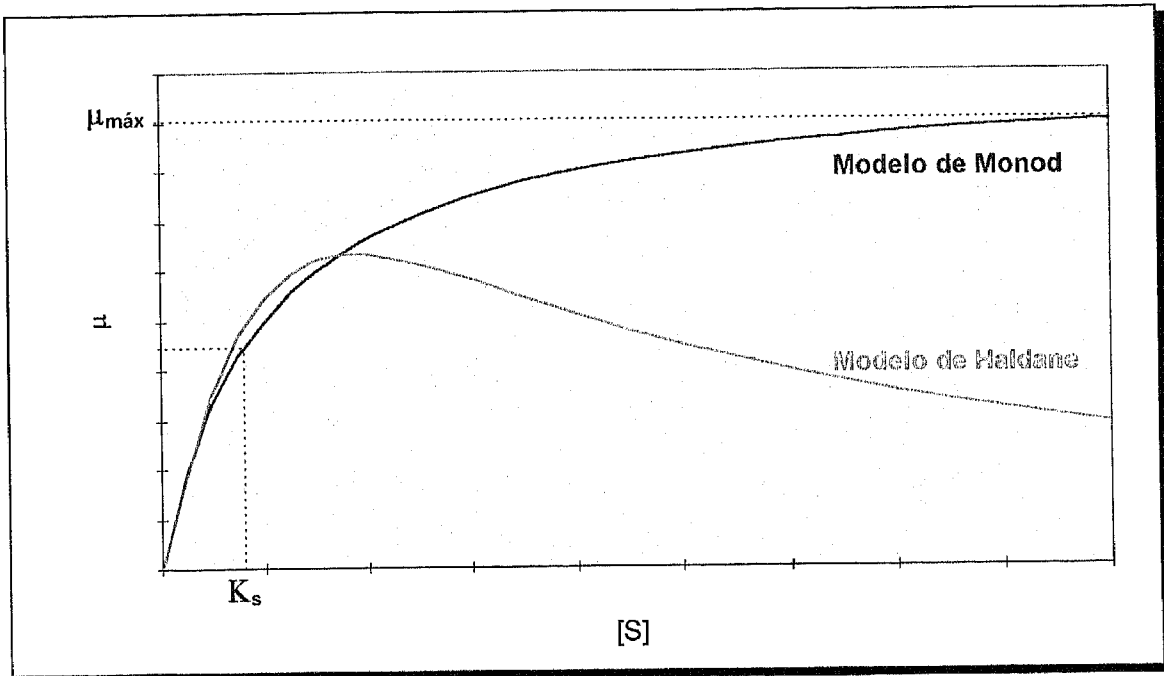


Figura 1.14 - Cinética de crescimento celular segundo o modelo de Monod e de Haldane.

Substituindo a equação 1.12 na equação 1.5 e integrando, obtém-se a seguinte equação:

$$\mu_{\max}(t - t_0) = \left[\frac{X_0 + YS_0}{YK_i} + \frac{YK_s}{X_0 + YS_0} + 1 \right] \ln \left[\frac{X_0 + Y(S_0 - S)}{X_0} \right] + \frac{YK_s \ln(S_0/S)}{X_0} - \frac{S_0 - S}{K_i} \quad (1.13)$$

1.7.2 Modelos matemáticos para a biodegradação de COVs em leitos percoladores.

Dada a complexidade dos processos que ocorrem num biofilme, é necessário aprofundar conhecimentos bem fundamentados, que permitam extrapolar resultados experimentais para o dimensionamento correcto e eficiente de um leito percolador. Muitos estudos tem vindo a ser feitos neste sentido por diversos autores, com o objectivo de desenvolver modelos matemáticos que simulem o comportamento dos reactores biológicos de leito fixo na remoção de COVs.

Dependendo do tipo de pressupostos estabelecidos, bem como das simplificações assumidas, todos eles apresentam em maior ou menor grau uma certa complexidade, bem como, dificuldade de aplicação prática. Estes modelos, procuram, assim, descrever os fenómenos físicos dinâmicos e os processos biológicos que ocorrem nos reactores, de forma a avaliar o seu desempenho e fenómenos como a acumulação de biomassa, transferência de massa, etc.. Alguns destes modelos são formulados assumindo que o reactor opera em estado estacionário, outros são desenvolvidos para o regime transiente. Não sendo objectivo do presente estudo desenvolver modelos matemáticos, será aqui apenas abordado um modelo, em que se assume que o reactor opera em regime estacionário, isto é, em que as características físicas não variam ao longo do tempo.

Genericamente, para selecção de um modelo, é necessário ter em conta os seguintes pontos:

1. Se o sistema opera em regime estacionário, transiente, semi-estacionário ou não-estacionário;
2. Quais são as fases do sistema, se são móveis ou estacionárias;
3. Quais os mecanismos de transporte do substrato e outros produtos nas diferentes fases;
4. Que tipo de reacções é que ocorrem nas diferentes fases, e como podem ser modeladas;
5. Qual ou quais os substratos do sistema;
6. Em termos espaciais, como variam os diferentes parâmetros envolvidos;
7. Qual o regime em que o opera cada uma das fases no reactor;
8. Como variam as propriedades físicas do sistema;
9. Qual a forma geométrica do material de enchimento.

Num leito percolador existem basicamente três fases: biofilme, líquido e gás. Para que o contaminante passe da fase gasosa para a fase do biofilme, terá que atravessar uma camada líquida, tendo necessariamente que vencer a respectiva

resistência à transferência de massa. A figura 1.15 procura ilustrar o perfil da concentração do substrato limitante que ocorre ao longo das três fases.

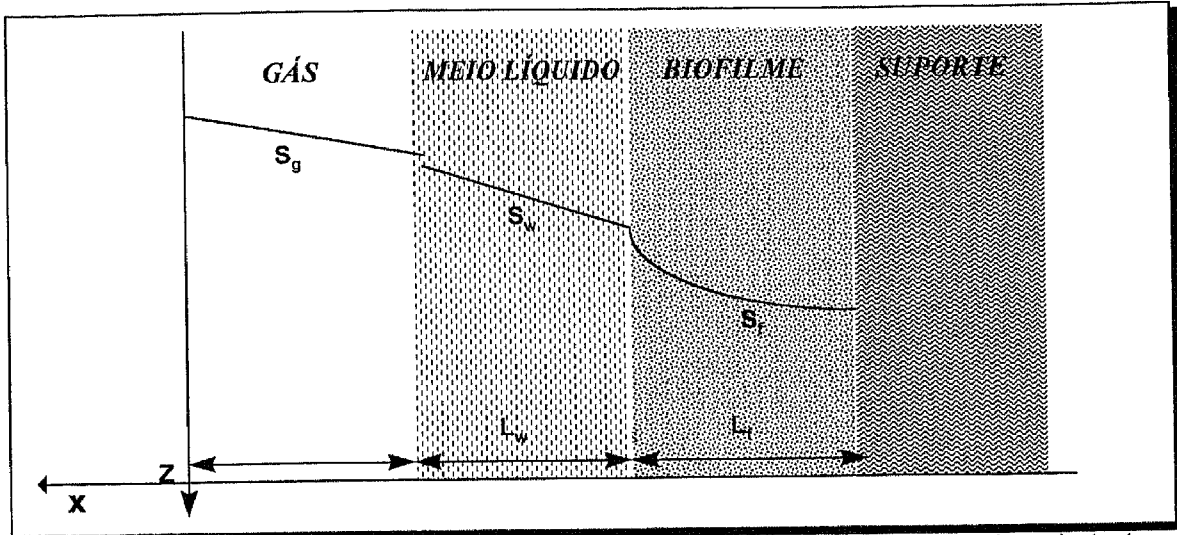


Figura 1.15 - Representação esquemática dos perfis da concentração de substrato limitante nas diferentes fases do biofilme (Alonso *at al*, 1998).

O meio de enchimento utilizado num filtro percolador, pode assumir fundamentalmente três tipos de representações geométricas (figura 1.16): esferas, tubos cilíndricos paralelos ou placas paralelas. A simulação matemática do processo, tem em conta a forma geométrica do material utilizado como suporte para o crescimento bacteriano.

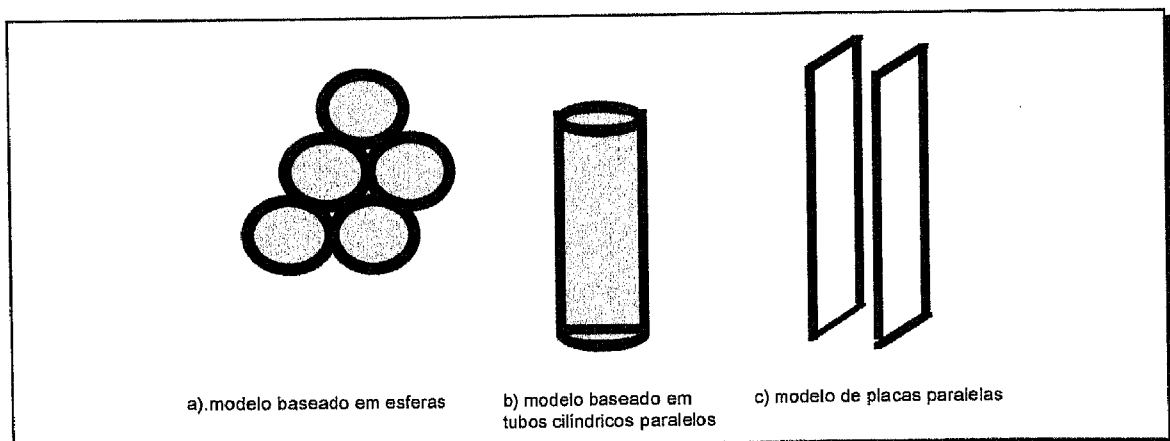


Figura 1.16 - Representação geométrica do material de enchimento utilizado nos leitos percoladores (Alonso *at al*, 1998).

Nos biofilmes podem ocorrer duas situações distintas:

1. Não existem limitações difusionais ao longo de toda a espessura do biofilme. Tal corresponde à situação em que a camada do biofilme se encontra totalmente activa, ou seja, a taxa de conversão de substrato é unicamente controlada pela velocidade da reacção. Esta situação é referida como regime reactivo.
2. Existem limitações difusionais no biofilme, pelo que, nem toda a biocamada se encontra activa. Nesta situação a taxa de conversão será controlada pela velocidade de difusão. Esta situação será referida como regime difusional.

O seguinte modelo proposto por Alonso *et al* (1997), descreve o comportamento em estado estacionário de um leito percolador que emprega um enchimento uniforme de materiais sólidos, para remover COVs da fase gasosa.

O modelo assume os seguintes pressupostos:

- ⇒ O escoamento de gás ao longo de todo o reactor é tortuoso;
- ⇒ O gás é perfeitamente misturado em toda a secção transversal do meio de enchimento;
- ⇒ A concentração do contaminante no seio da fase gasosa é constante em qualquer posição axial;
- ⇒ O meio de enchimento é modelado como um enchimento de esferas, com o mesmo volume do suporte actual;
- ⇒ O processo é uniforme em toda secção transversal do biofiltro;
- ⇒ A camada líquida tem uma resistência à transferência de massa mínima, sendo desprezada, pelo que se considera apenas a fase gasosa e a fase de biofilme;
- ⇒ A temperatura e as propriedades físicas do filtro são constantes;

- ⇒ O reactor opera em estado quasi-estacionário, uma vez que a concentração de substrato no biofilme atinge o estado estacionário antes de se verificar o crescimento significativo de biofilme;
- ⇒ O biofilme constitui a fase estacionária, sendo a difusão molecular o único mecanismo de transporte envolvido;
- ⇒ Despreza-se a difusão axial;
- ⇒ O crescimento microbiano é descrito pelo modelo de Monod;
- ⇒ Os COVs presentes constituem os únicas fontes de carbono;
- ⇒ Todos os parâmetros cinéticos e a densidade do biofilme são constantes ao longo do leito percolador;
- ⇒ A espessura do biofilme é constante em todos os pontos do leito.

Para o dimensionamento do reactor são utilizadas duas dimensões, uma longitudinal, segundo z , e uma esférica segundo r , para as partículas esféricas, tal como mostra a figura 1.17.

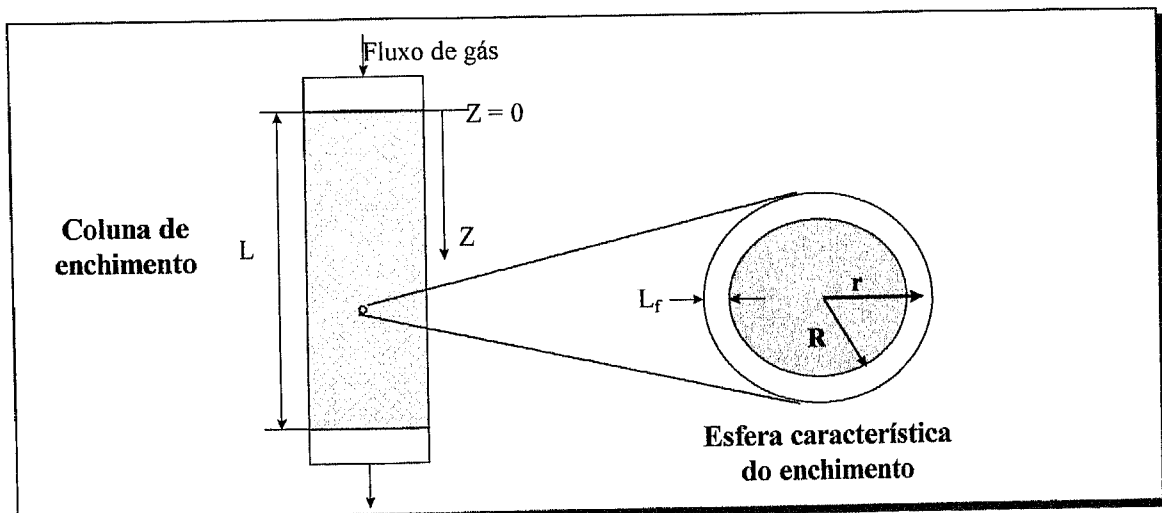


Figura 1.17 - Modelos de dimensionamento do leito percolador (Alonso *et al*, 1997).

Fazendo um balanço mássico ao substrato limitante, na fase do biofilme, a sua concentração só irá variar segundo a direcção radial das partículas esféricas. A equação de balanço mássico toma a seguinte forma:

$$D_f \left[\frac{d^2 S_f}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS_f}{dr} \right] = \frac{X_f}{Y} \left[\frac{\mu_m S_f}{K_s + S_f} \right] \quad (1.14)$$

As condições limite, estabelecem o seguinte: quando o substrato limitante se encontra na superfície da partícula esférica, não há fluxo de substrato para o interior; o substrato que se encontra na interface biofilme/líquido, está em equilíbrio com o substrato na fase gasosa, de acordo com a lei de Henry, isto é:

para $r = R$, então,

$$\frac{dS_f}{dr} = 0 \quad (1.15)$$

para $r = R + L_f$, então,

$$S_g = HS_f \Big|_{r=R+L_f} \quad (1.16)$$

sendo,

$S_f \Big|_{r=R+L_f}$ - concentração do COV na interface biofilme/líquido, ML^{-3}

S_g - concentração de COV na fase gasosa, ML^{-3}

D_f - difusividade do COV no biofilme, L^2T^{-1}

X_f - concentração de biomassa no biofilme, ML^{-3}

Y - rendimento intrínseco, $M_{biomassa}/M_{COV}$

L_f - espessura do biofilme, L

r - distância segundo a direcção radial, L

R - raio da esfera do material de suporte, L

H - constante de Henry

Uma vez que, por hipótese, se assume que a velocidade do ar contaminado, bem como a concentração de COV são constantes em cada secção transversal do leito, pode-se admitir que o escoamento do gás é do tipo pistão. Assumindo que não há degradação do contaminante na fase gasosa, que a concentração do COV à entrada do leito é constante, e que a velocidade do ar se mantém constante ao longo de z (soluções diluídas), fazendo um balanço mássico ao substrato limitante na fase gasosa, obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{dS_g}{dz} = -\frac{J a_f}{u_0} \quad (1.17)$$

sendo as condições limite:

para $z = 0$, $S_g = S_{g0}$

em que:

- J - fluxo do COV que sai da fase gasosa para o biofilme, $ML^{-2}T^{-1}$
- a_f - área superficial da interface gás/líquido por unidade de volume de leito, L^{-1}
- u_0 - velocidade superficial da corrente gasosa, LT^{-1}
- S_{g0} - concentração inicial de COV na corrente gasosa, ML^{-3}
- z - posição segundo a direcção longitudinal do leito, L

O fluxo de COV que sai da fase gasosa, é igual ao fluxo do que atravessa a superfície do biofilme. Em termos matemáticos, tal significa o seguinte:

para $r = R + L_f$

$$J = J_f = D_f \frac{dS_f}{dr} \quad (1.18)$$

sendo J_f , o fluxo do COV que atravessa a superfície do biofilme, ($ML^{-2}T^{-1}$).

A difusividade no biofilme, D_f , pode ser considerada uma fracção da difusividade do contaminante na água, segundo a seguinte expressão:

$$D_f = w_d D_w \quad (1.19)$$

em que,

D_w - difusividade do COV na água, L^2T^{-1}

w_d - razão difusividade no biofilme/difusividade na água

Na realidade, a espessura do biofilme não é constante para longos períodos de tempo, pelo que, tem interesse formular uma nova equação que caracterize matematicamente esta variação. A variação da espessura do biofilme depende basicamente de dois factores, nomeadamente, do crescimento bacteriano e do decaimento devido à lise ou morte celular. Traduzindo isto numa equação obtém-se:

$$\frac{dL_f}{dt} X_f = \left(w_d D_w \left. \frac{dS_f}{dr} \right|_{r=R+L_f} \right) Y - L_f X_f b \quad (1.20)$$

O último termo da equação anterior, refere-se à quantidade de biofilme que se perde por morte celular, sendo b , a constante cinética de morte celular (T^{-1}).

Um outro parâmetro relevante para avaliar o desempenho do sistema é a concentração de biomassa no reactor, genericamente designada por X_r (ML^{-3}). A concentração média de biomassa no reactor constitui um indicador da espessura do biofilme e pode ser calculada através da equação 1.21.

$$X_r = X_f(\varepsilon_0 - \varepsilon_f) \quad (1.21)$$

na qual:

ε_0 - porosidade do leito de enchimento limpo (sem biofilme)

ε_f - porosidade do leito de enchimento com biofilme

Contudo é de salientar que, de facto, a concentração de biomassa no reactor, varia com a altura do leito, tal como se pode constatar nos estudos realizados por Raj Mirpuri *et al* (1997), que verificaram que a espessura do biofilme varia segundo a direcção longitudinal.

1.8 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DO TOLUENO

Este capítulo tem como objectivo apresentar uma breve compilação dos resultados obtidos por alguns autores, que realizaram estudos de degradação do tolueno utilizando culturas de *Pseudomonas* ou outros microrganismos.

A tabela 1.4 apresenta um resumo desses resultados.

Tabela 1.4 - Parâmetros cinéticos e rendimento biológico na degradação de tolueno por *Pseudomonas* (Mirpuri *et al*, 1996).

| Estirpe bacteriana | μ_{max} (dia ⁻¹) | K_s (mg/l) | K_i (mg/mg) | Y (mg/mg) | [tolueno] (mg/l) | Referência |
|----------------------|----------------------------------|--------------|---------------|-------------|------------------|-----------------------------|
| <i>P. B1</i> | 13,3 ± 1,83 | 1,96 ± 0,91 | - | 1,22 ± 0,10 | 1 - 10 | Chang <i>et al</i> (1993) |
| <i>P. X1</i> | 10,84 ± 2,77 | 1,97 ± 1,26 | - | 0,99 ± 1,26 | 1 - 10 | Chang <i>et al</i> (1993) |
| <i>P. putida</i> | 17,28 | 15,07 | 44,43 | 0,64 | 5 - 70 | Oh <i>et al</i> (1994) |
| <i>P.putida</i> T2 | 3,1 | 0,43 | - | 0,28 | 0,1 - 4 | Button (1985) |
| <i>P. putida</i> 54G | 10,08 ± 1,2 | 3,98 ± 0,78 | 42.78±3.87 | 0,9 ± 0.13 | 1 - 50 | Mirpuri <i>et al</i> (1996) |

Mirpuri *et al* (1996) realizaram estudos comparativos de degradação de tolueno com *Pseudomonas putida* 54G em biofilmes e em suspensão. Nos estudos cinéticos com biomassa em suspensão, a cultura foi-se desenvolvendo num reactor *batch*, a 24 °C, sendo alimentado com uma corrente de vapor de tolueno numa concentração que variou entre 1 e 50 mg/l. Todos os ensaios realizados apresentaram uma fase de aclimação seguida de uma fase de crescimento, após aproximadamente 10 horas. Para concentrações de tolueno superiores a 20 mg/l a fase de aclimação é mais curta e a velocidade de crescimento diminui. Obtiveram um rendimento de $0,9 \pm 0,13 \text{ mg}_{\text{biomassa produzida}}/\text{mg}_{\text{tolueno degradado}}$. Os parâmetros cinéticos obtidos para a degradação do tolueno foram: velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{\text{máx}}=10,08 \pm 1,2 \text{ d}^{-1}$, constante de saturação $K_s = 3,98 \pm 1,28 \text{ mg/l}$ e constante de inibição, $K_i = 42,78 \pm 3,87 \text{ mg/l}$, segundo o modelo de Haldane. A cinética de crescimento de biofilmes foi estudada, alimentando tolueno a um leito percolador, com uma concentração na corrente gasosa de entrada entre 150 e 300 ppm e temperaturas entre 18 e 23 °C. Foi adicionado um inóculo de *Pseudomonas putida* previamente adaptadas ao vapor de tolueno. Determinaram os perfis da produção de biomassa bem como a espessura do biofilme ao longo da coluna, tendo verificado que apresentavam valores mais elevados na base da coluna decrescendo à medida que se aproximavam do topo, podendo este facto estar associado à existência de um gradiente de concentração de tolueno. Constataram também que estas diferenças de espessura, observadas entre a base e o topo da coluna, decresciam com o tempo enquanto que a eficiência de remoção de tolueno aumentava. Obtiveram um tempo de duplicação para a *Pseudomonas putida* de 5,8 horas com uma concentração de tolueno na solução líquida de 3 mg/l. Verificaram uma actividade específica mais elevada, cerca de $0,14 \text{ mg}_{\text{tolueno degradado}}/\text{mg}_{\text{biomassa}}\text{h}$, para os ensaios conduzidos com concentrações de tolueno mais reduzidas, de 150 ppm. Assim, embora um aumento da concentração de tolueno possa conduzir a um aumento da produção de biomassa, este incremento pode traduzir-se numa perda da actividade da biomassa, formando-se uma maior quantidade de biomassa inactiva. Constataram uma actividade específica da *Pseudomonas putida* no biofilme, cerca de 3 a 5 vezes inferior à observada com as bactérias em

suspensão, o que implica que se tenha formado maior quantidade de biomassa inactiva no biofilme.

Bibeau *et al* (1997) utilizaram um biofiltro, contendo um enchimento de turfa, para estudar a purificação de uma corrente gasosa contaminada com tolueno, usando uma cultura de *Pseudomonas*. O bio-reactor era alimentado de modo intermitente, apenas uma vez por dia, com 2 litros de uma solução mineral adequada a estes microrganismos, circulando em contra-corrente com a corrente gasosa contaminada com tolueno. Ao fim de 93 dias e em condições de estado *pseudo-estacionário*, atingiu-se uma capacidade máxima de eliminação de tolueno de $70 \text{ g/m}^3\text{h}$, para uma carga de tolueno à entrada do reactor de $190 \text{ g/m}^3\text{h}$. Neste estudo constataram que dependendo da concentração inicial de tolueno, se podem observar duas situações distintas. Para concentrações iniciais inferiores a $2,2 \text{ mg/l}$ a taxa de conversão de tolueno é uma função decrescente da concentração de tolueno afluyente ao reactor, ou seja, no biofilme ocorrem limitações difusionais. Para valores entre 3 e 6 mg/l a eficiência de remoção é constante, entre 30 e 40 %, pelo que, nestas condições, domina o regime reactivo no biofilme, em que a taxa de biodegradação é independente da concentração do tolueno no gás de entrada. Do mesmo modo, verificaram que a capacidade de eliminação no biofiltro é uma função crescente da carga de tolueno inicial para valores até $250 \text{ g/m}^3\text{h}$, estabilizando para valores superiores a este.

Weber *et al* (1995) realizaram estudos, cujo objectivo principal residia em encontrar formas alternativas de prevenir a acumulação excessiva de biomassa nos leitos percoladores. Compararam também a eficiência de remoção do tolueno utilizando dois tipos de inóculo, uma cultura de fungos adaptados ao tolueno e uma cultura enriquecida de bactérias recolhidas de uma amostra de água de rio. Utilizando uma cultura bacteriana como inóculo e uma carga de tolueno à entrada do reactor de $65 \text{ g/m}^3\text{h}$, registaram uma taxa de remoção de tolueno de $30 \text{ g/m}^3\text{h}$. Contudo, quando os nutrientes presentes no reactor foram consumidos, a taxa de remoção do tolueno decresceu para cerca de $13 \text{ g/m}^3\text{h}$. Durante um período de 120 dias obtiveram uma eficiência média de remoção de tolueno de 26 %.

Verificaram que, quando o tolueno era alimentado ao reactor a uma carga inferior de $10 \text{ g/m}^3\text{h}$, conseguia-se atingir uma eficiência de remoção média de 80 %. Por sua vez, utilizando como inóculo uma cultura de fungos, observaram taxas de remoção de tolueno superiores, tendo atingido durante um período de 375 dias uma taxa de remoção média de $27 \text{ g/m}^3\text{h}$. Uma das soluções que testaram, para evitar a excessiva formação de biomassa, foi a de limitar a quantidade de nutrientes fornecidos para o crescimento dos microrganismos. Como resultado, observaram um decréscimo na taxa de remoção do tolueno. Para contornar este decréscimo, adicionaram ao meio 200 g de NH_4Cl , tendo verificado taxas mais elevadas de remoção de tolueno. Estudaram também, o efeito da aplicação de uma solução de NaOH para remover a biomassa em excesso. Ao fim de cada duas semanas de operação adicionou-se NaOH 0,1 M, tendo observado a formação de espuma, indicando a libertação de proteínas devido à lise celular. Ao fim de 50 dias a quantidade de biomassa formada no reactor equivalia à quantidade de biomassa que era removida com a solução de NaOH . Para uma carga de tolueno à entrada do reactor de $65 \text{ g/m}^3\text{h}$, registaram-se taxas de remoção média de tolueno de $36 \text{ g/m}^3\text{h}$.

A obstrução e reduzida eficiência dos leitos percoladores resultante da produção de biomassa em excesso foi alvo de estudo por outros autores como Schondüre *et al* (1995). Para tal conduziram ensaios num leito percolador, inoculado com lamas activadas recolhidas de uma ETAR industrial, tendo como única fonte de carbono o tolueno. Testaram o efeito da variação de parâmetros fisiológicos importantes, como a fonte de azoto, o fornecimento de determinados nutrientes essenciais e a concentração de sais inertes. Comparando a utilização de nitrato ou amónia como fonte de azoto, verificaram que atingiam taxas de degradação máximas de $110 \text{ g/m}^3\text{h}$ utilizando amónia, comparativamente aos $30 \text{ g/m}^3\text{h}$ que se obtinham utilizando nitrato. O crescimento da biomassa foi 50 % inferior com nitrato, relativamente ao observado utilizando amónia como fonte de azoto. Confirmaram que a presença de iões no meio de cultura, faz diminuir a capacidade de utilização da água pelas células e limita a actividade biológica. De facto, aumentando a concentração de sais inertes verificaram uma diminuição do crescimento da biomassa assim como da eficiência de degradação.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

- 2.1 CRESCIMENTO DA *Pseudomonas putida* EM
DESCONTÍNUO
- 2.2 ESTUDOS CINÉTICOS DO CRESCIMENTO DA *P. putida*
EM SUSPENSÃO
- 2.3 ESTUDOS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO DO TOLUENO
EM REACTOR DE BIOMASSA FIXA
- 2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1 CRESCIMENTO DA *Pseudomonas putida* EM DESCONTÍNUO

A bactéria seleccionada foi a *Pseudomonas putida* DSM 548. Foram isolados dois tipos de culturas de *Pseudomonas putida*, uma de bactérias não adaptadas ao fenol em meio NB (*Nutrient Broth*), e outra de bactérias adaptadas ao fenol com meio enriquecido pelo procedimento apresentado no Anexo A. As bactérias foram armazenadas em tubos de agar nutriente inclinados, a 4°C no frigorífico. As culturas puras isoladas foram preservadas por congelamento em *ependorfs* com glicerol a 30%. A composição do meio de cultura está apresentada na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Composição do meio de cultura.

| | Componente | Concentração (g/l) |
|--|--|--------------------|
| Macronutrientes | CaCl ₂ .H ₂ O | 0,015 |
| | NaCl | 5,000 |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,200 |
| | FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,010 |
| Micronutrientes (Solução traço) | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,080 |
| | KBr | 0,210 |
| | MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,220 |
| | LiCl | 0,510 |
| | BaCl ₂ .2H ₂ O | 1,300 |
| | ZnCl ₂ | 0,340 |
| | SnCl ₂ .2H ₂ O | 0,790 |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,320 |
| | MnSO ₄ .5H ₂ O | 0,130 |
| | H ₃ BO ₃ | 0,260 |
| Solução tampão | k ₂ HPO ₄ | 1,000 |
| | NH ₄ H ₂ PO ₄ | 5,000 |
| Fonte de carbono | Fenol | 0,200 |

A escolha da composição da solução mineral teve em conta o trabalho desenvolvido por Monteiro (1998), com algumas alterações nomeadamente no

que respeita à composição da solução tampão e à concentração de NaCl. Inicialmente as bactérias foram crescidas em meio líquido utilizando fenol como única fonte de carbono.

Prepararam-se soluções stock de solução traço (10 vezes concentrada) e de fonte de carbono, uma vez que estas não podiam ser esterilizados por auto-clavagem juntamente com a solução mineral. A solução de micronutrientes foi esterilizada por filtração através de uma membrana esterilizada. A solução macronutrientes foi esterilizada por auto-clavagem, a 121 °C durante 20 minutos, numa Uniclave 88.

Como já foi mencionado atrás, uma das condições que afecta o crescimento das bactérias é o pH. As experiências para a determinação dos parâmetros cinéticos devem ser realizadas a pH constante, sendo este conseguido mediante a adição de uma solução tampão (di-hidrogenofosfato de amónia e hidrogenofosfato de di-potássio). O pH da solução mineral foi ajustado a 6,8 com NaOH concentrado. Dado que a *Pseudomonas putida* tem um crescimento óptimo a 28°C (Krieg R. G. *et al*, 1984), esta foi a temperatura seleccionada para o seu crescimento.

A preparação do inóculo para arranque do reactor semi-*batch*, ocorreu em duas etapas:

1ª Etapa

Em condições estéreis, numa câmara de fluxo laminar MCU-131BNF, Sanyo, adicionou-se 1 ml de solução traço previamente esterilizada e 400 µl de fenol (50 g/l), para 100 ml de meio mineral líquido previamente esterilizado, contido num matraz de 250 ml tapado com algodão cardado. Com o auxílio de uma ansa estéril, fez-se uma repicagem da cultura pura de *P.putida* adaptada ao fenol na solução mineral. Colocou-se a crescer a cultura de inóculo numa incubadora orbital Certomat-H, B.Braun, a 28°C e 150 rpm durante cerca de 24 horas. Na figura 2.1 é apresentada uma imagem do crescimento da *P.putida* em *batch* numa incubadora orbital.

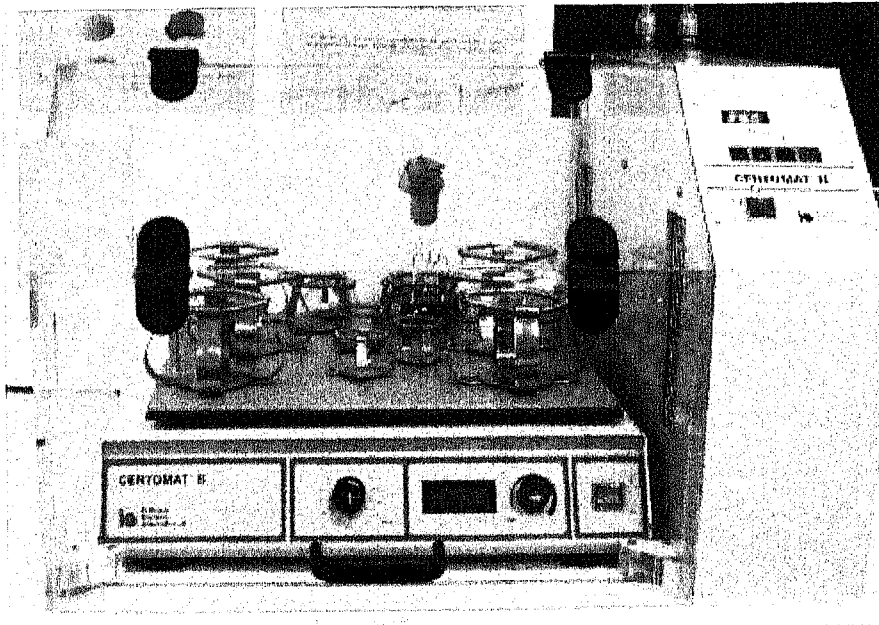


Figura 2.1 - Crescimento da *Pseudomonas putida* em descontínuo.

2ª Etapa

Ao fim de 24 horas ressuspendeu-se, em condições estéreis, 15 ml da cultura de bactérias crescidas com fenol em cada um de dois matrizes de 1 litro contendo 500 ml de meio mineral líquido previamente esterilizado. De mesmo modo, adicionou-se 5 ml de solução traço e 2 ml de solução de fenol (50 g/l), e colocaram-se a crescer nas mesmas condições durante 24 horas.

A figura 2.2 apresenta o aspecto da cultura de *Pseudomonas putida*, imediatamente após a inoculação asséptica e depois de terem sido crescidas em meio mineral líquido nas condições anteriormente apresentadas.

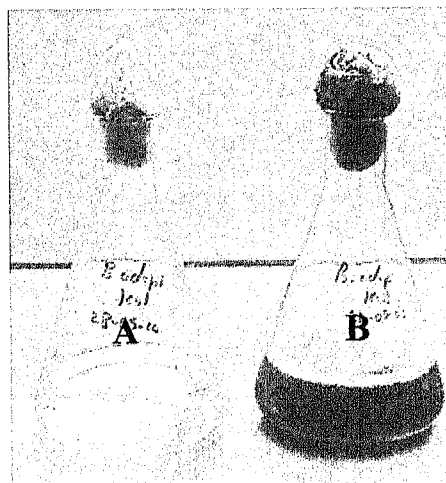


Figura 2.2. - A) Matraz contendo solução mineral com fenol imediatamente após a inoculação com *P. putida*. B) Matraz contendo uma suspensão bacteriana de *P. putida*, crescidas com fenol, ao fim de 24 horas.

2.2 ESTUDOS CINÉTICOS DO CRESCIMENTO DA *P. putida* EM SUSPENSÃO

2.2.1 Instalação

Os ensaios realizados para a determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento da *Pseudomonas putida* DSM 548 em suspensão, foram conduzidos utilizando a instalação esquematizada na figura 2.3. Nos pontos seguintes será apresentada uma descrição sumariada das principais unidades que a constituem.

Na figura 2.4 pode-se observar uma fotografia de toda instalação.

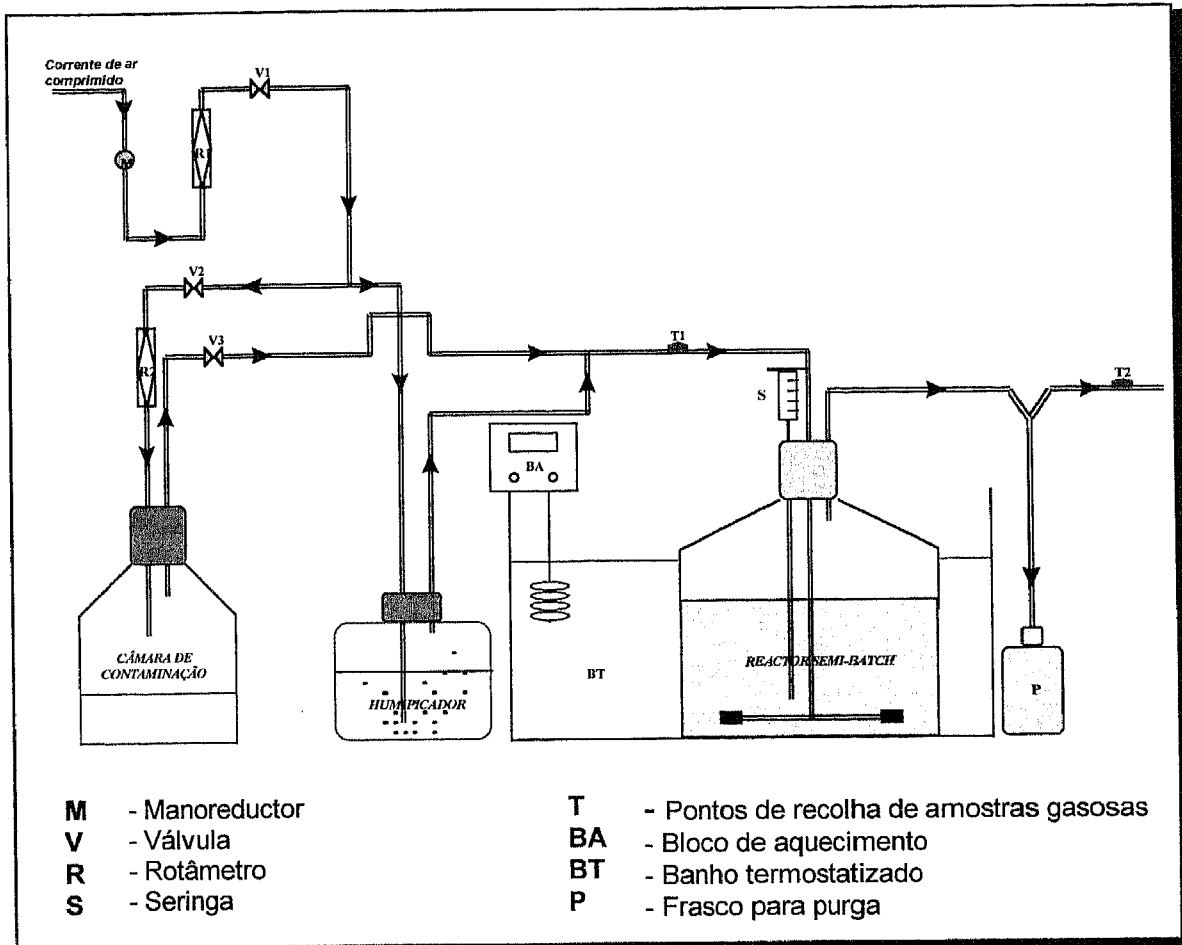


Figura 2.3 - Esquema da instalação utilizada para a determinação dos parâmetros cinéticos de degradação do tolueno pela *Pseudomonas putida*, em reactor semi-batch.

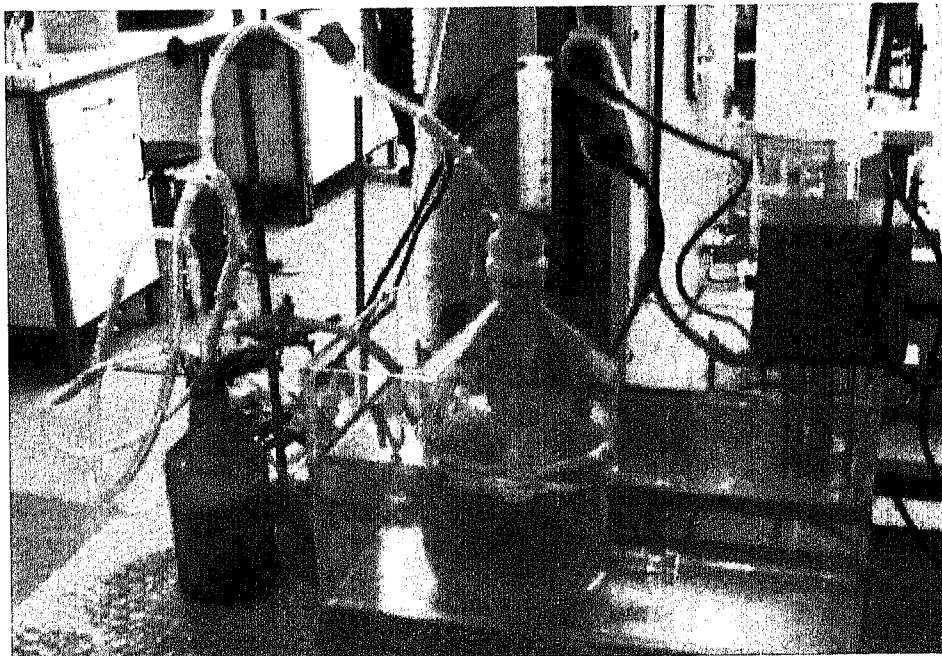


Figura 2.4 - Imagem da instalação utilizada para os ensaios de crescimento da *P. putida* em suspensão.

O rotâmetro R1 tem como função principal, regular o caudal de ar que é debitado para o reactor a uma dada pressão. O ar comprimido provém do compressor, com uma pressão fixada em 3 bar através do manoreductor. O rotâmetro é do tipo FP-1/4-41-G-3/37, tendo sido previamente calibrado à pressão de funcionamento do reactor, pelo procedimento descrito em anexo B.1. A curva de calibração obtida, para uma pressão de 3 bar, é (Anexo B.1):

$$Q_{\text{gás}} (\text{l/min}) = 0,481 \times (\%) + 0,751 \quad (2.1)$$

em que % representa a percentagem indicada no rotâmetro.

O rotâmetro R2 é do tipo FP-1/8-20-P-3/37, tendo como função regular a fracção de ar que é alimentada à câmara de contaminação.

A câmara de contaminação consiste num frasco de vidro com um volume interno de 1 litro, que contem cerca de 100 ml de tolueno puro. O frasco encontra-se devidamente vedado com uma rolha de vidro dotada de dois orifícios, que comunicam com o exterior através de dois tubos de vidro. O primeiro tubo, ligeiramente mais comprido que o segundo, admite uma fracção da corrente de ar comprimido alimentada ao reactor. A corrente de ar que entra neste frasco, tem como função promover a evaporação de uma dada quantidade de tolueno à superfície do líquido, que é misturada com a fracção de ar proveniente do rotâmetro R1 e que passa directamente pelo humificador. Por sua vez, o segundo tubo permitirá assim, a saída do ar contaminado com tolueno. A concentração de tolueno que é alimentada ao reactor é, deste modo, regulada pela fracção de ar debitada para a câmara de contaminação. A figura 2.5 apresenta uma fotografia desta unidade.

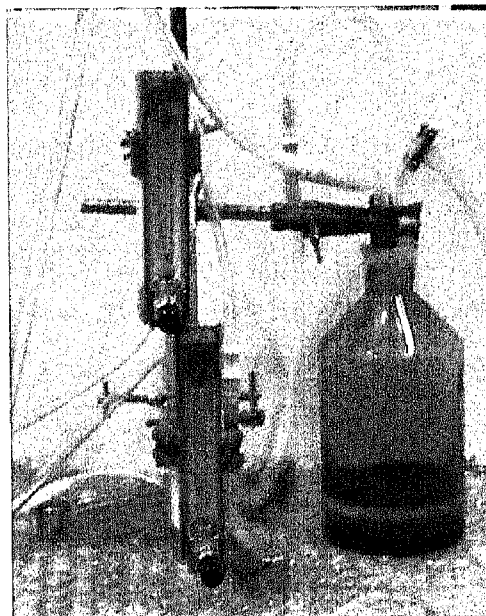


Figura 2.5 - Fotografia da câmara de contaminação e dos rotâmetros R1 e R2.

O humificador tem como função criar uma corrente de ar saturada com água, mediante o borbulhamento de ar na água. Consiste num frasco de vidro, contendo um pequeno volume de água. Neste recipiente através de um tubo de vidro que está imerso na água, é introduzida a restante fracção de corrente que não entrou na câmara de contaminação, proveniente do primeiro rotâmetro, saindo deste modo, ar saturado com água. A corrente de ar à saída desta unidade, é misturada com a corrente de ar contaminada com tolueno proveniente da câmara de contaminação, sendo alimentada ao reactor.

Os septos de amostragem são vedantes através dos quais são recolhidas, usando uma seringa, amostras gasosas representativas, para posterior determinação da concentração de tolueno à entrada e saída do reactor por cromatografia gasosa.

O reactor *semi-batch* consiste num frasco de vidro com um volume interno de 5 litros, onde é colocada a cultura bacteriana a crescer. Trata-se de um reactor *semi-batch*, na medida em que opera de forma contínua para a fonte de carbono, neste caso o tolueno, e descontínua para o meio de cultura. Este reactor encontra-se devidamente vedado através de uma rolha de cortiça, contendo três

orifícios comunicantes com o exterior. A corrente de ar contaminada com tolueno é alimentada ao reactor, através de um orifício por meio de um tubo de vidro. Este tubo fica imerso na cultura próximo da base do reactor, apresentando na extremidade uma derivação em T ligada a dois difusores de bolhas finas, promovendo, deste modo, uma melhor transferência do tolueno da fase gasosa para a fase líquida, bem como uma distribuição mais homogênea. Noutra orifício encontra-se uma seringa acoplada a um tubo de vidro que se encontra imerso na cultura, através da qual são recolhidas amostras para posterior análise. Por último, no terceiro orifício, encontra-se um pequeno tubo de vidro, que permite a saída da corrente gasosa. O reactor encontra-se imerso num banho termostático a 28°C, com um bloco de aquecimento do tipo Thermomix-B, D-3508 Melsungen, B.Braun. A figura 2.6 apresenta uma imagem mais pormenorizada do reactor semi-*batch*.

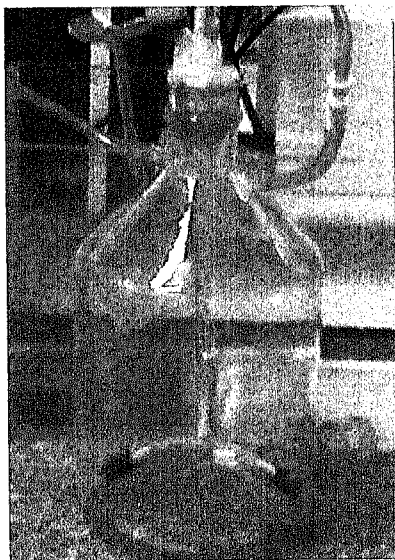


Figura 2.6 - Fotografia do reactor semi-*batch* sem meio de cultura.

Por último, o frasco de recolha do líquido condensado consiste num recipiente de plástico com uma capacidade de 1,5 litros, cuja função é de recolher o líquido que se forma por condensação na corrente gasosa de saída do reactor. A recolha deste líquido permite evitar o entupimento do tubo de saída do reactor.

2.2.2 Execução experimental

Antes do início dos ensaios é necessário esterilizar o reactor semi-*batch*, para evitar a contaminação da cultura por outros microrganismos. Para tal, o reactor é lavado com uma solução de hipoclorito, bem como todo o material que contacta directamente com a suspensão bacteriana.

Após a operação de limpeza, para o arranque do reactor procedeu-se segundo os seguintes passos

- I. Transferiu-se 2 litros de solução mineral sem fonte de carbono para o reactor semi- *batch* depois tapado com algodão cardado, e esterilizou-se por auto-clavagem a 121 °C durante 20 minutos.
- II. Após a esterilização, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e montou-se o frasco na instalação, de acordo com o esquema apresentado na figura 2.3, em condições estéreis através de uma chama de Bico de *Bunsen*.
- III. Ligou-se a válvula do ar comprimido e regulou-se o caudal pretendido através do rotâmetro R1.
- IV. Ajustou-se a fracção de ar alimentada à câmara de contaminação, através do rotâmetro R2, de modo a obter a concentração de tolueno pretendida na corrente de entrada.
- V. Ligou-se o bloco de aquecimento a 28 °C.
- VI. Em condições estéreis inoculou-se o reactor com 1 litro de suspensão de *Pseudomonas putida* crescidas em fenol, segundo o procedimento apresentado no ponto 2.1.

Após o arranque da instalação, ao longo da operação, eram realizados periodicamente os seguintes ensaios:

- a) Recolha de amostras gasosas nos pontos de amostragem T1 e T2, com o auxílio de uma seringa, para determinar a concentração de tolueno à entrada e saída do reactor, por cromatografia gasosa.
- b) Através da seringa do reactor recolha de amostras líquidas, para analisar a concentração de biomassa ao longo do tempo, por fotometria, bem como o pH da suspensão bacteriana.
- c) Durante a fase de aclimação das bactérias, recolha de amostras líquidas para frascos do tipo *vial*, para determinar a concentração de tolueno na fase líquida pelo método de *headspace*.
- d) Monitorização da concentração de tolueno na corrente de entrada no reactor.

As imagens apresentadas na figura 2.7, procuram ilustrar duas das operações executadas periodicamente ao longo da operação.

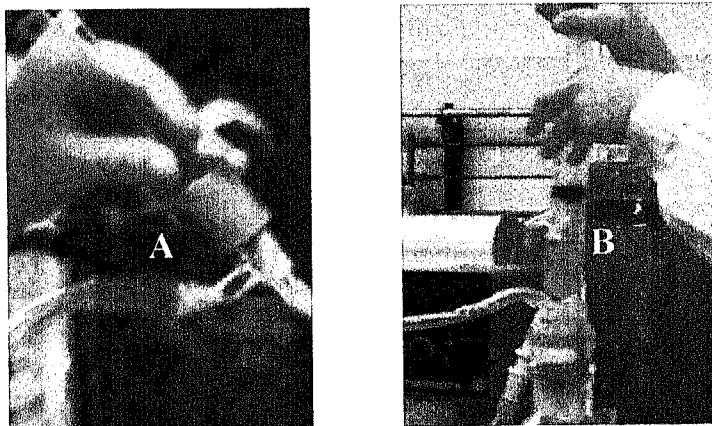


Figura 2.7 - A) Recolha de amostras gasosas no ponto de amostragem. **B)** Recolha de amostras líquidas.

Cada um dos ensaios cinéticos de crescimento da *P.putida* demora entre 2 e 3 dias.

2.3 ESTUDOS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO DO TOLUENO EM REACTOR DE BIOMASSA FIXA

2.3.1 Instalação

Os estudos cinéticos de crescimento da *P. putida* e biodegradação do tolueno num reactor de biomassa fixa, foram conduzidos utilizando um leito percolador com um enchimento de anéis 'Raflex Rings', na instalação apresentada na figura 2.8.

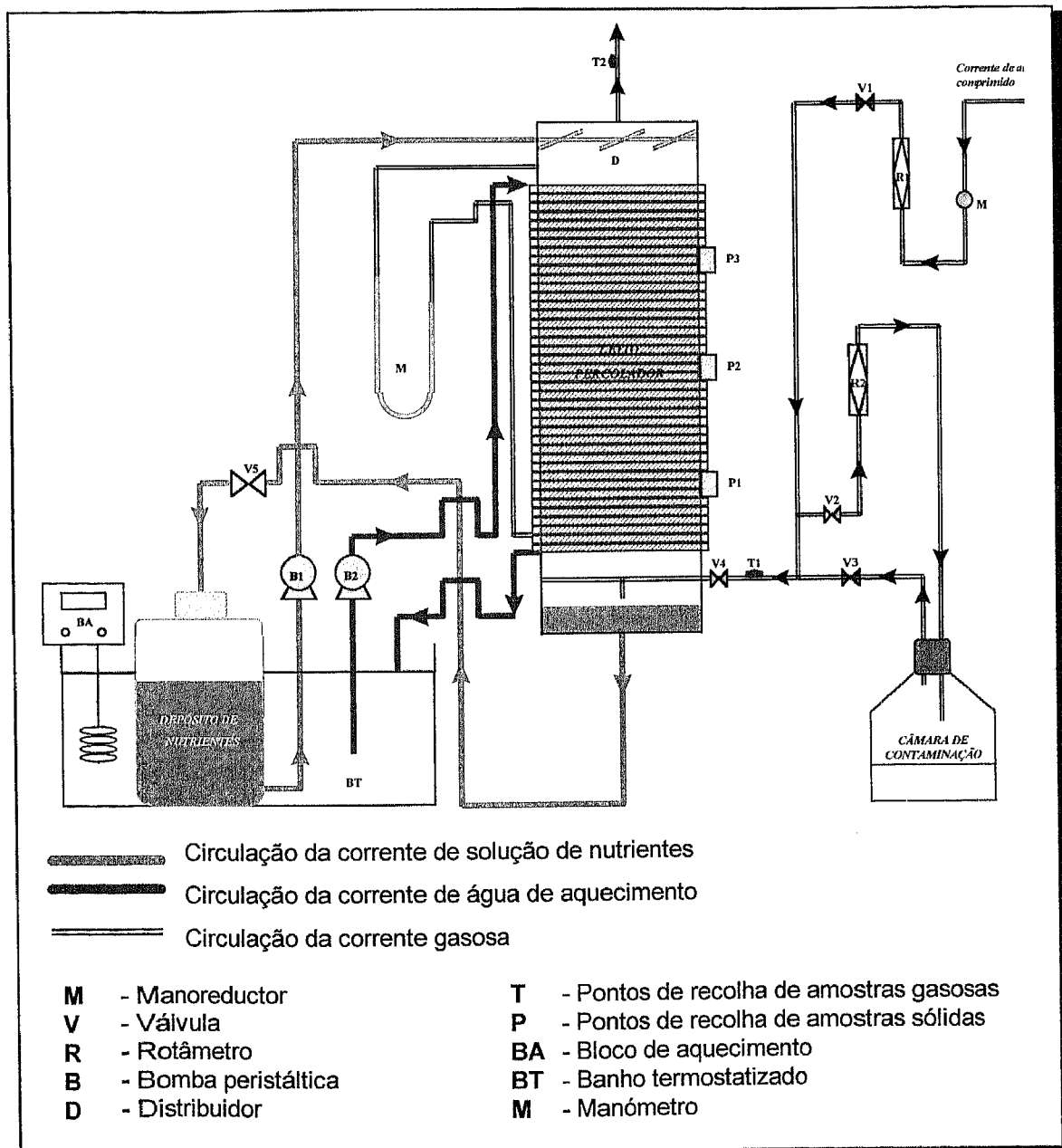


Figura 2.8 - Esquema da instalação utilizada para o estudo de degradação do tolueno com *P. putida* num leito percolador.

A figura 2.9 apresenta uma fotografia de toda a instalação imediatamente após o arranque.

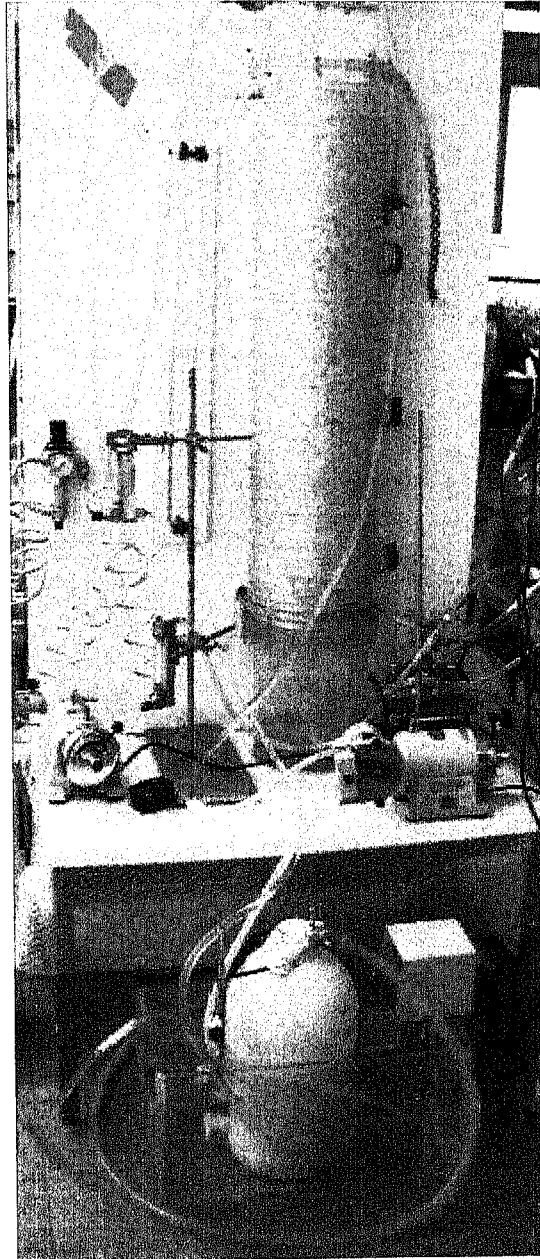


Figura 2.9 - Fotografia da instalação do leito percolador após o arranque.

A instalação possui dois rotâmetros (R1 e R2) do tipo FP-1/4-41-G-3/37 e FP-1/8-20-P-3/37, cujas funções são idênticas às dos rotâmetros utilizados na instalação do reactor *semi-batch*. O rotâmetro R1 foi calibrado à pressão de 1 bar, pressão seleccionada para evitar pressões demasiados elevadas no reactor, que poderiam danificá-lo. A curva de calibração obtida toma a seguinte forma:

$$Q_{\text{gás}} (\text{l/min}) = 0,485 \times (\%) - 3,934 \quad (2.2)$$

A câmara de contaminação é idêntica à do reactor *semi-batch*, tendo como função produzir um efluente gasoso contaminado com tolueno, cuja concentração depende da percentagem de ar que entra neste dispositivo bem como da altura do tolueno contido.

O leito percolador consiste numa coluna em acrílico, com as seguintes dimensões:

- Altura total = 143,5 cm
- Altura do enchimento = 94 cm
- Diâmetro interno = 19,5 cm
- $A_t = 298,5 \text{ cm}^2$ (área transversal)
- $V_{\text{enchimento}} = 28$ litros (volume total na zona do enchimento)
- $\varepsilon = 0,91$ (porosidade do leito de enchimento)

Na figura 2.10 é apresentada uma imagem pormenorizada do enchimento com biomassa.



Figura 2.10 - Imagem do enchimento do leito percolador com biofilme.

O material do enchimento é constituído por anéis de polipropileno 'Raflux Rings' (figura 2.11), que apresentam as seguintes características:

- $V \approx 0,5$ ml (volume do material plástico)
- $A_s = 17,81$ cm² (área superficial total de cada anel)
- $A_e = 35,62$ cm⁻¹ (área específica = A_s/V)
- Quimicamente inerte
- Perda de carga no leito mínima
- Leve
- Incolor
- Resistente ao calor podendo tolerar 100 °C
- Número total de anéis no enchimento ≈ 4850

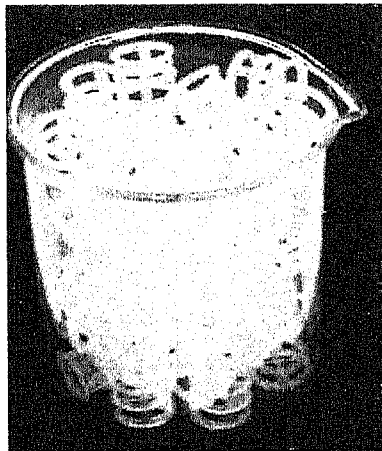


Figura 2.11 - Anéis do tipo 'Raflux Rings'.

A coluna está dividida em três partes fundamentais: a base, o corpo e o topo. Na base da coluna, com uma altura de 26 cm, existe um tubo horizontal em T, através da qual entra lateralmente a corrente gasosa contaminada com tolueno. A fase líquida, que circula através do meio de enchimento no sentido descendente, é recolhida na base da coluna, sendo depois removida para o depósito de nutrientes através de um tubo colocado à sua saída. A quantidade de solução recolhida na base da coluna é mantida a nível constante no decorrer da

operação, de forma a garantir que a corrente gasosa percorra a coluna no sentido ascendente e não escape pela base do leito. No corpo da coluna encontra-se o enchimento em toda a sua extensão, suportado por uma placa de acrílico perfurada. É nesta zona que ocorre o processo biológico propriamente dito, desenvolvendo-se um biofilme em torno dos anéis que irá suportar o crescimento das bactérias e a metabolização do tolueno.

A fase líquida é alimentada no topo da coluna, onde existe um distribuidor que garante a distribuição homogénea em toda a secção. O sistema de distribuição é constituído por três braços semi-cilíndricos (em forma de meia calha), e paralelos entre si, ligados a um tubo central que, por sua vez, está conectado a um tubo que transporta o líquido do depósito de nutrientes para a coluna. A figura 2.12 permite a visualização deste dispositivo.

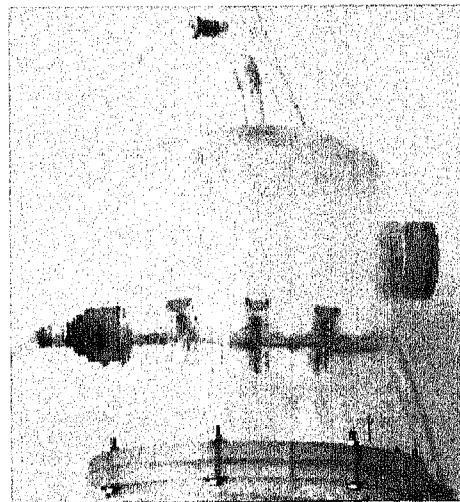


Figura 2.12 - Distribuidor do líquido no topo do leito percolador.

O sistema de aquecimento consiste num enrolamento de tubo de plástico em torno de toda a superfície externa do corpo da coluna, onde circula água aquecida a 28°C. A água provém de um banho termostaticado com um bloco de aquecimento do tipo Jolabo PC/4, sendo a circulação da água garantida pela bomba peristáltica B2 do tipo Multifix-Motnem D53525.

O depósito de nutrientes consiste num bidão de 10 litros, que está imerso no banho termostaticado. Este dispositivo não é nada mais do que uma unidade de mistura, que recolhe no topo, a suspensão bacteriana proveniente do leito percolador (durante a fase de arranque, sendo depois solução de nutrientes), que por sua vez é continuamente recirculada através da sua base para o topo da coluna. O transporte do líquido é conseguido através da bomba peristáltica B1 do tipo Multifix-Motnem D73525. A figura 2.13 apresenta uma fotografia do depósito de nutrientes imerso no banho termostaticado.

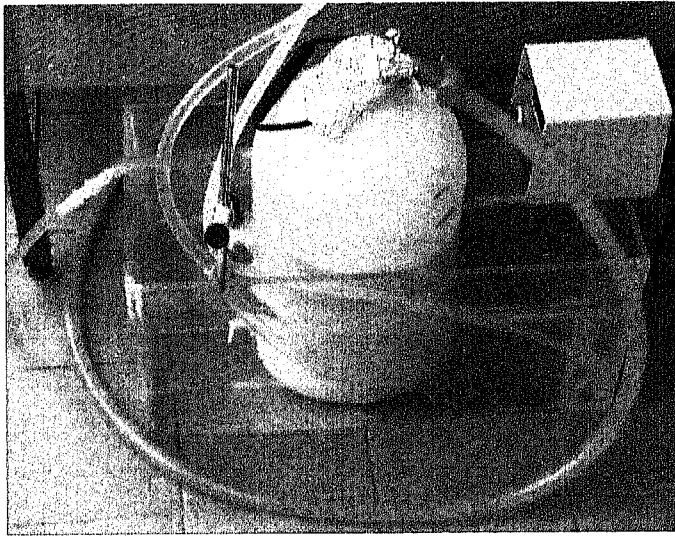


Figura 2.13 - Fotografia do depósito de nutrientes.

Por último, o manómetro é constituído por um tubo em U contendo água corada, cuja função é medir a diferença de pressão entre a entrada e saída da coluna.

2.3.2 Execução experimental

Tal como aconteceu com o reactor *semi-batch*, antes de se proceder ao arranque, toda a instalação foi cuidadosamente lavada. Procedeu-se a uma desinfecção de todas as unidades que contactavam directamente com a suspensão bacteriana, no sentido de evitar quaisquer tipo de contaminações. A esterilização obedeceu aos seguintes passos:

1. Encheu-se toda a coluna com uma solução de hipoclorito e deixou-se em repouso durante dois dias.
2. Ao fim de dois dias removeu-se toda a solução de hipoclorito com várias passagens de água da torneira.
3. Quando a instalação apresentava aspecto ainda sujo, repetiram-se os procedimentos 1 e 2, respectivamente.
4. Posteriormente encheu-se toda a coluna, inclusive todas as unidades que contactam com a suspensão bacteriana, com uma solução de betadine na razão 1:15 e deixou-se actuar durante 13 horas.
5. Ao fim das 13 horas, despejou-se a solução e removeu-se o betadine por várias passagens da coluna com água esterilizada.

Uma vez que toda a instalação estava esterilizada, procedeu-se ao arranque do leite percolador do seguinte modo:

- I. Transferiu-se entre 4 a 7 litros de meio mineral líquido com solução traço, previamente esterilizado para o reactor.
- II. Ligou-se o bloco de aquecimento do banho termostatizado a 28°C.
- III. Ligou-se a bomba peristáltica B2 e deixou-se a circular água a 28°C.
- IV. Ligou-se a bomba peristáltica B1, na posição 2 (caudal de líquido entre 1,5 e 2 l/min).
- V. Abriu-se a válvula de ar comprimido e regulou-se o rotâmetro R1 para o débito de ar pretendido, deixando-se as válvulas V2 e V3 fechadas.

- VI. Deixou-se a instalação a funcionar até estabilizar o nível de líquido na base de coluna, regulando a válvula V5, para introduzir uma dada perda de carga consoante as necessidades.
- VII. Uma vez alcançado o estado estacionário, abriram-se as válvulas V2 e V3, respectivamente, e ligou-se o rotâmetro R2.
- VIII. Retiraram-se amostras gasosas do ponto de amostragem T1, com o auxílio de uma seringa, e determinou-se a concentração de tolueno por cromatografia gasosa.
- IX. Ajustou-se a percentagem do rotâmetro R2 de forma a obter a concentração de tolueno pretendida à entrada do leito percolador.
- X. Uma vez atingidas todas as condições operatórias de arranque, inoculou-se o reactor, em condições estéreis, com 2,5 litros de cultura de *P.putida* previamente adaptada ao tolueno, crescida no reactor *semi-batch* pelo procedimento apresentado no ponto 2.2.2.

Diariamente eram realizadas várias tarefas, nomeadamente:

- a) Controlo do nível de líquido na base da coluna.
- b) Observação do desenvolvimento de biofilme, por visualização da cor e formação de biomassa nos anéis do enchimento.
- c) Periodicamente, retiraram-se amostras gasosas à entrada e saída do leito percolador (em T1 e T2), para determinar a concentração de tolueno por cromatografia gasosa.

- d) Recolha de amostras líquidas do reactor, para avaliar a concentração de biomassa em suspensão e pH da solução.
- e) Colheita de amostras de anéis dos pontos de amostragem P1, P2 e P3, para determinar a quantidade de biomassa aderida aos anéis.
- f) Verificação da perda de carga ao longo do leito, por leitura no manómetro.
- g) Regulação da percentagem do rotâmetro R1 para debitar o ar pretendido.
- h) Ajuste da percentagem do rotâmetro R2, para regular a concentração de tolueno pretendida à entrada do leito percolador.
- i) Verificação do estado de desgaste dos tubos de silicone nas bombas peristálticas e substituição dos mesmos quando necessário.
- j) Cálculo da percentagem de remoção de tolueno do reactor.

Certas tarefas não eram executadas diariamente. Por exemplo, ao fim de cada 2 ou 3 dias de operação, repunham-se os nutrientes necessários para o crescimento das bactérias mediante a adição de solução mineral esterilizada (entre 2 a 4 litros). Entre 1 a 2 vezes por semana procedia-se à purga do líquido condensado nos tubos de saída do gás do leito percolador. Quando se verificava um pH demasiado baixo na suspensão bacteriana, ajustava-se a um valor entre 6 e 7 com uma solução de NaOH concentrada. Foi também determinado o valor de CQO da solução.

2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Determinação do tolueno na fase gasosa por GC

Aparelho utilizado : Cromatógrafo Shimadzu, GC-15A.

Coluna : GP 10 % TCEP on 100/120 chromosorb PAW, SUPELCO, 8' × 1/8'.

Detector: Ionização de Chama

- Gás de arraste: Azoto
- Caudal de N₂ = 30 ml/min
- Caudal de ar = 500 ml/min
- Caudal de H₂ = 36 ml/min
- Gama de sensibilidade = 10⁻³

A recolha das amostras foi efectuada com seringas do tipo Chromopack Hamilton Seringe, 1001RN, 1002RN e 1005RN, com volumes de 1ml, 2,5 ml e 5 ml, respectivamente. A análise do tolueno era efectuada directamente após a sua recolha. Para determinação da concentração de tolueno (em mg/l), foi construída previamente uma curva de calibração pela metodologia apresentada em anexo B.3. A curva obtida apresenta a seguinte equação:

$$\text{Área} = [\text{tolueno}] \times 12421 + 471 \quad (2.3)$$

Determinação de tolueno na fase líquida

A metodologia utilizada para a avaliação da concentração de tolueno dissolvido na fase líquida, consiste numa técnica de *headspace* desenvolvida por Ramalho (1999), que se baseia em determinar a quantidade de tolueno presente na fase gasosa que está em equilíbrio com a fase líquida. O método utilizado segue o seguinte procedimento:

1. Recolhe-se uma amostra líquida de 20 ml directamente para um frasco do tipo *vial*, rolha-se imediatamente com uma rolha de borracha e veda-se com parafilme para evitar quaisquer fugas de gás.
2. Coloca-se numa incubadora orbital Certomac-H, B.Braun, a 28°C e 110 rpm durante 1 hora, para deixar que se estabeleça o equilíbrio entre as concentrações de tolueno na fase gasosa e líquida.
3. Ao fim de uma hora, perfurando a rolha de borracha com uma seringa, recolhe-se uma amostra gasosa para determinar a concentração de tolueno pelo método mencionado no ponto anterior.

A figura 3.15 apresenta uma imagem do processo de recolha da amostra para determinação da concentração de tolueno na fase líquida.



Figura 3.15 - Técnica para a determinação da concentração de tolueno na fase líquida.

A concentração de tolueno na fase líquida é calculada mediante a seguinte expressão:

$$S_g = K_d * S_l \quad (2.4)$$

em que,

S_g - Concentração de tolueno na fase gasosa, ML^{-3}

S_l - Concentração de tolueno na fase líquida, ML^{-3}

K_d - Coeficiente de distribuição do tolueno entre a fase gasosa e líquida

O coeficiente de distribuição varia com a temperatura segundo a seguinte expressão (Ramalho, 1999):

$$\ln K_d = 10,78 - \frac{3694}{T} \quad (2.5)$$

sendo

T - Temperatura, K

Determinação da concentração de biomassa em suspensão

A concentração de biomassa foi determinada pelo método fotométrico directo, através de medições de absorvância a 660 nm. Partindo do pressuposto que a massa seca de células é proporcional à absorvância, construiu-se uma curva de calibração que relaciona a concentração de biomassa (em g/l) com a densidade óptica a 660 nm ($D.O_{660nm}$), pelo procedimento apresentado no anexo B.2. A curva de calibração obtida é:

$$[\text{biomassa}] = 0,382 * D.O_{660nm} \quad (2.6)$$

Determinação da quantidade de biomassa seca e húmida aderida aos anéis do enchimento

A quantidade de biomassa aderida aos anéis do enchimento, foi determinada segundo o seguinte procedimento:

- I. Recolheram-se cuidadosamente, em duplicado, 6 anéis do meio de enchimento para um cadinho devidamente identificado, de cada um dos pontos de amostragem localizados na coluna (P1, P2 e P3).
- II. Pesou-se cada um dos cadinhos.
- III. Colocaram-se os cadinhos a secar na estufa a 104 °C durante aproximadamente 24 horas.
- IV. Após as 24 horas, recolheram-se os cadinhos e colocaram-se a arrefecer num exsiccador.
- V. Quando se verificou que os cadinhos estavam à temperatura ambiente pesaram-se.
- VI. Voltaram-se a colocar os cadinhos na estufa durante algumas horas e repetiram-se os procedimentos 2, 3 e 4, até se verificar que cada um dos cadinhos tinha peso constante.
- VII. Removeu-se a biomassa contida em cada um dos anéis por ultrasons, utilizando um aparelho do tipo Creft, e transferiram-se novamente para os respectivos cadinhos.
- VIII. Colocaram-se novamente na estufa a 104 °C durante 24 horas e repetiram-se os procedimentos 3, 4 e 5.

O peso seco contido em cada grupo de 6 anéis foi determinado pela diferença entre o valor obtido no ponto VIII e no ponto V. O peso de biomassa húmida foi determinada por diferença entre o valor o ponto VIII e II.

Todas as pesagens foram efectuadas com uma balança analítica Mettler AY150.

Determinação do pH

O pH foi medido utilizando um medidor de pH Metrohm 605.

Determinação da porosidade do leito

A porosidade do leito sem biofilme foi calculada, aproximadamente, do seguinte modo:

- I. Encheu-se a coluna na zona de enchimento com água.
- II. Despejou-se a água e mediu-se o respectivo volume.

Este volume recolhido corresponde ao volume de vazios. A porosidade é calculada pela razão entre o volume de vazios e volume total da zona de enchimento (sem anéis).

Determinação do caudal da fase líquida

Uma vez que a solução líquida é uma suspensão bacteriana, apresentando elevada densidade de células, optou-se por não medir o caudal de líquido com um rotâmetro, pois tornava-se bastante difícil calibrá-lo, uma vez que a densidade da suspensão bacteriana é variável. Como tal, calculou-se o caudal medindo o volume de líquido recolhido por unidade de tempo.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 3.1 RESULTADOS DOS ENSAIOS COM BIOMASSA
EM SUSPENSÃO
- 3.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS COM BIOMASSA
FIXA

3.1 RESULTADOS DOS ENSAIOS COM BIOMASSA EM SUSPENSÃO

3.1.1 Condições operatórias

Este capítulo tem como finalidade apresentar os resultados referentes ao crescimento da *Pseudomonas putida* em condições semi-batch. Os ensaios realizados seguiram o procedimento apresentado no capítulo 2.2, tendo partido das seguintes condições iniciais:

- **Volume de solução mineral esterilizada** = 2 litros
- **Volume de suspensão bacteriana previamente adaptada à degradação de fenol** = 1 litro
- **pH** entre 6,8 e 6,5
- **Temperatura** = 28°C
- **Caudal da corrente gasosa** entre 5,6 e 10,5 l/min
- **Concentração de tolueno** entre 0,2 e 4 mg/l

Para cada caudal de ar testado, realizaram-se vários ensaios com diferentes concentrações de tolueno na corrente gasosa de entrada. Ao longo de cada ensaio foram recolhidas amostras periódicas da suspensão bacteriana, com o objectivo de analisar a concentração de biomassa em suspensão, a concentração de tolueno na fase líquida e o pH da solução (metodologias apresentadas no capítulo 2.4 e no anexo B). Simultaneamente, foram recolhidas amostras da corrente gasosa à entrada e saída do reactor, no intuito de quantificar o tolueno alimentado ao reactor e o removido. Estes ensaios tiveram como principal finalidade calcular a velocidade específica de crescimento da *Pseudomonas putida*, bem como a velocidade de consumo de tolueno em função da concentração de tolueno presente na corrente gasosa de entrada. Procurou-se também, determinar a quantidade de tolueno transferida para a fase líquida e a percentagem de remoção em função da concentração afluyente ao reactor.

3.1. 2 Cinética de crescimento da *Pseudomonas putida*

As figuras 3.1 e 3.2 descrevem a variação da concentração de tolueno na fase líquida e na corrente gasosa à saída do reactor, com a concentração na corrente gasosa que alimenta continuamente o reactor, para dois caudais de ar ($Q_{\text{gás}}$) diferentes. Estes dados foram obtidos até ao início da fase de crescimento exponencial das bactérias, período durante o qual praticamente não consomem tolueno.

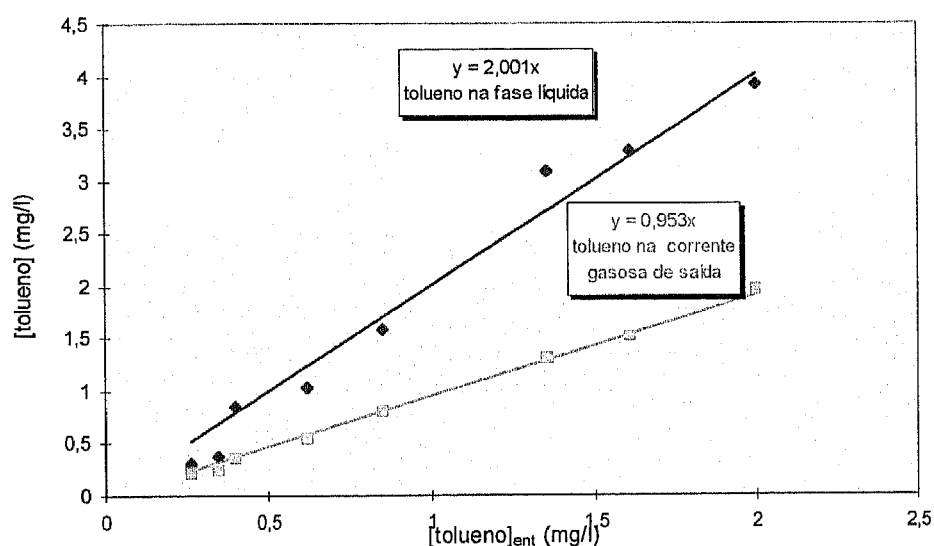


Figura 3.1 - Variação da concentração de tolueno na fase líquida e na corrente gasosa de saída, em função da concentração de tolueno alimentada ao reactor, para $Q_{\text{gás}} = 5,6$ l/min.

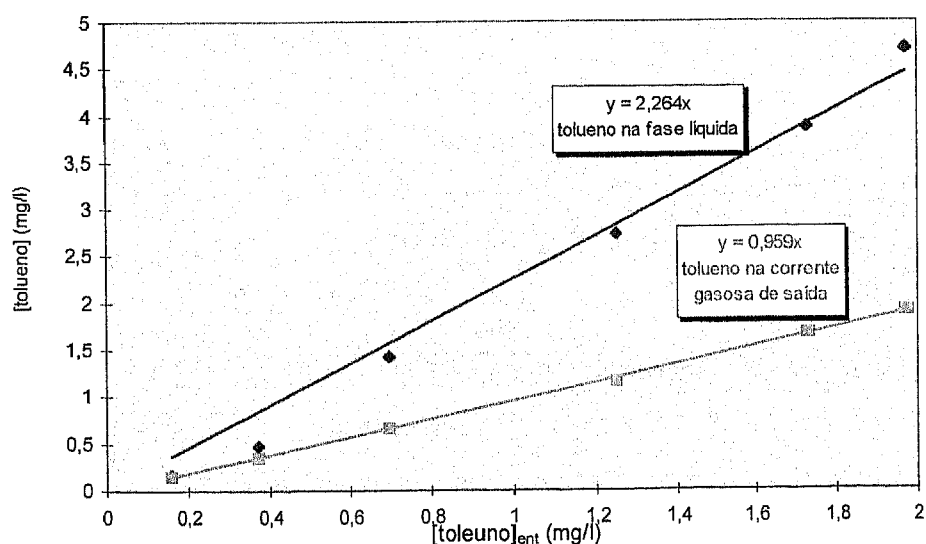


Figura 3.2 - Variação da concentração de tolueno na fase líquida e na corrente gasosa de saída, em função da concentração de tolueno alimentada ao reactor, para $Q_{\text{gás}} = 10,5$ l/min.

Das figuras anteriores pode-se depreender que, existe uma relação linear entre a concentração de tolueno na fase líquida e a concentração de tolueno na corrente de entrada, entre 0,15 e 2 mg/l, e entre a concentração de tolueno na corrente gasosa de saída e a concentração alimentada ao reactor. Verifica-se que, a concentração de tolueno à saída do reactor é praticamente igual à da entrada, sendo esta independente dos caudais da corrente gasosa, para a gama de caudais estudada. Contudo, no que respeita à quantidade de tolueno transferida para a fase líquida, esta é ligeiramente maior para um caudal superior. Definindo um coeficiente de distribuição de tolueno, entre a fase gasosa e fase líquida nas condições observadas, poderá estabelecer-se que para um caudal de 5,6 l/min este toma o valor de $0,499 \text{ mg}_{\text{tolueno(gás)}}/\text{mg}_{\text{tolueno(líq)}}$ e para um caudal de 10,5 l/min toma o valor de $0,442 \text{ mg}_{\text{tolueno(gás)}}/\text{mg}_{\text{tolueno(líq)}}$.

Nas figuras 3.3 a 3.11 é apresentada a evolução da concentração de biomassa em função do tempo, para os ensaios realizados com um caudal da fase gasosa de 5,6 l/min e diferentes valores de concentração de tolueno na corrente de entrada. Nestas figuras, está também representado o logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo, no intuito de determinar, através da equação 1.10, a velocidade específica máxima de crescimento para cada concentração inicial de substrato.

É de salientar que, cada figura refere-se a uma dada concentração de tolueno presente na corrente gasosa de entrada e não à concentração de tolueno na fase líquida. Por outro lado, como se poderá observar na figura 3.1, existe uma relação directa entre a concentração presente nas duas fases.

O tempo de aclimação (t_0) foi obtido por extrapolação, uma vez que em muitos ensaios, não foi possível efectuar as leituras da densidade óptica, no momento em que ocorria o início da fase de crescimento exponencial. Tal como se poderá observar nas figuras 3.3 a 3.11, este valor foi obtido por intercepção da linha que traduz o crescimento exponencial com a recta que traduz a aclimação, correspondendo esta ao valor médio da concentração de biomassa durante esta fase.

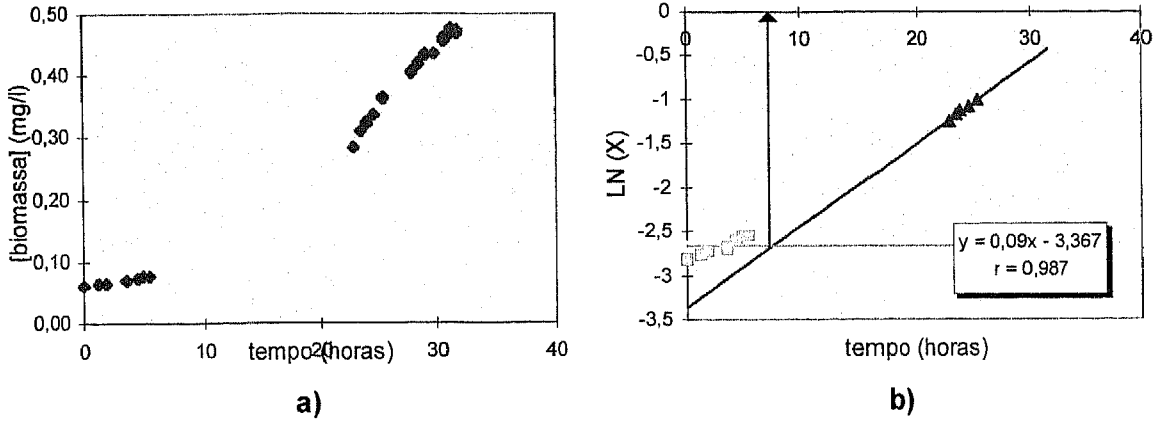


Figura 3.3 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,264 \pm 0,018$ mg/l.

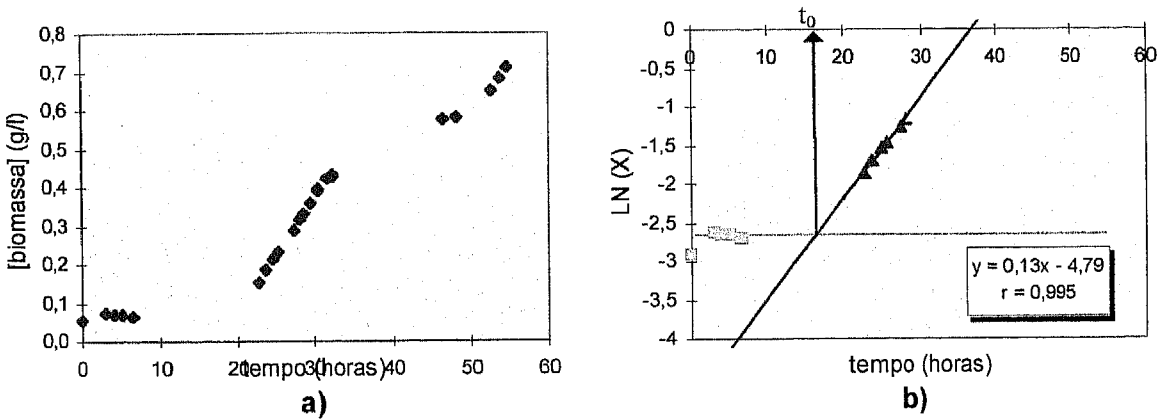


Figura 3.4 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,344 \pm 0,021$ mg/l.

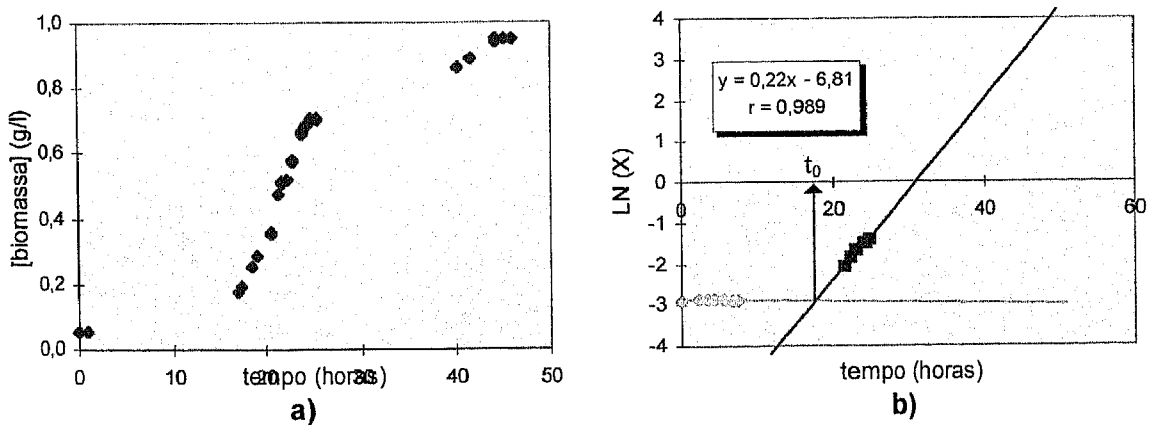


Figura 3.5 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. b) Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $0,398 \pm 0,016$ mg/l.

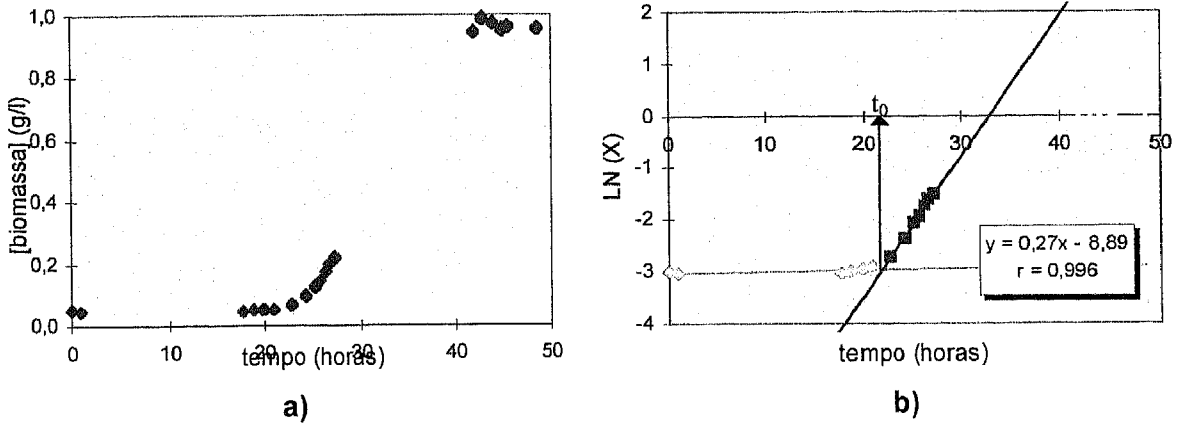


Figura 3.6 - a) Evolução da concentração de biomassa com o tempo. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = 0,616 ± 0,029 mg/l.

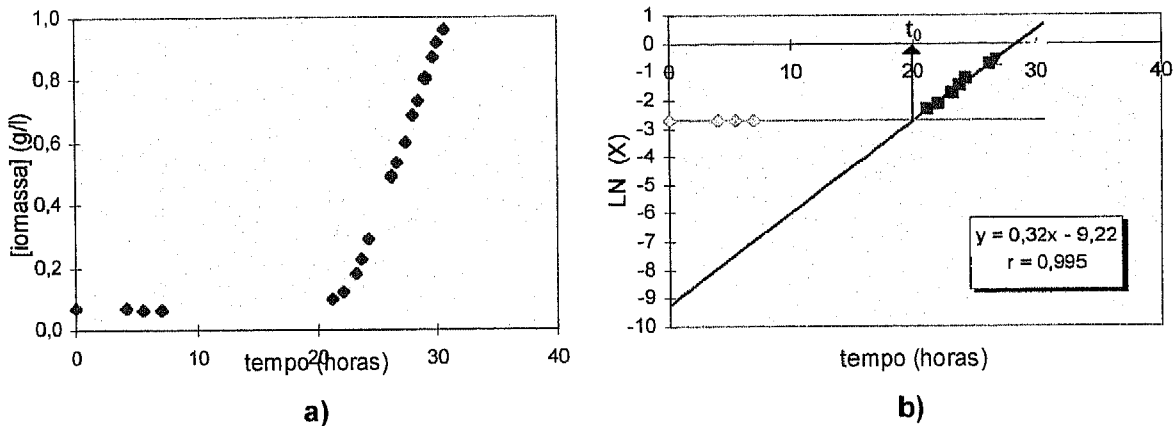


Figura 3.7 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = 0,851 ± 0,021 mg/l.

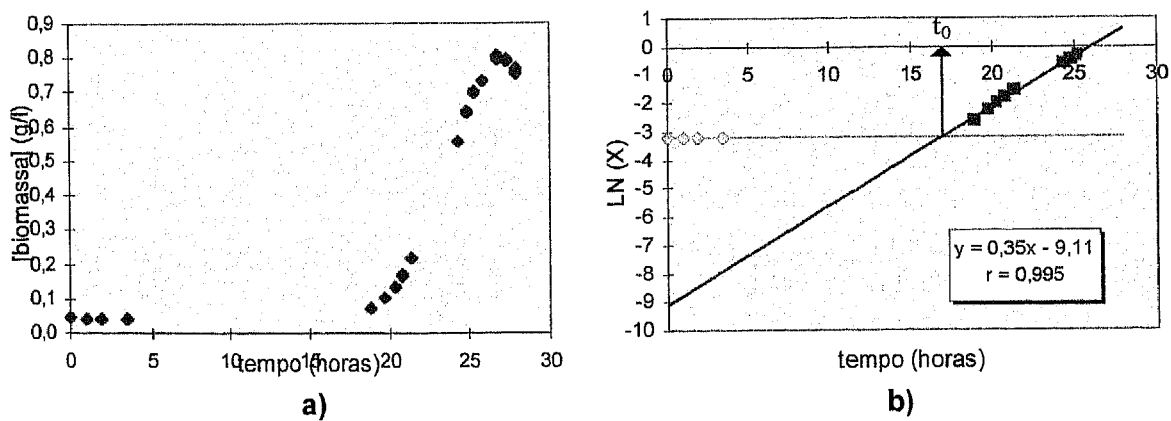


Figura 3.8 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = 1,348 ± 0,048 mg/l.

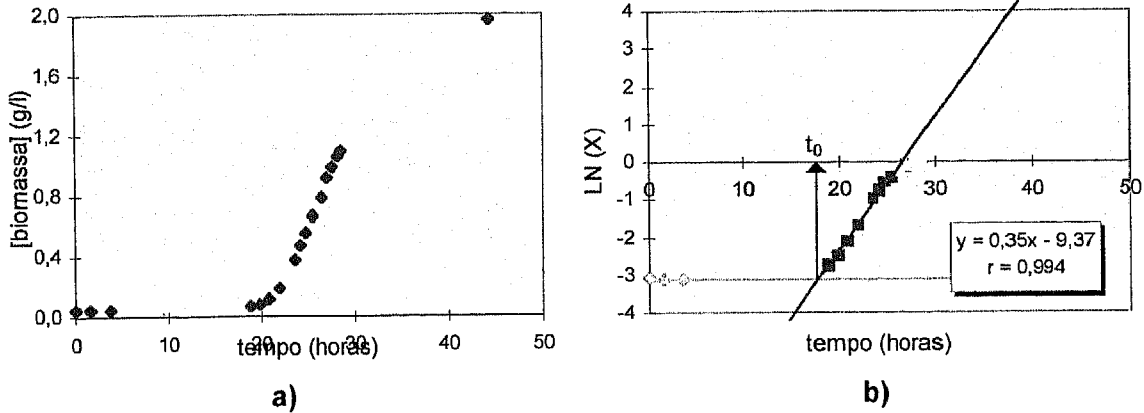


Figura 3.9 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $1,608 \pm 0,056$ mg/l.

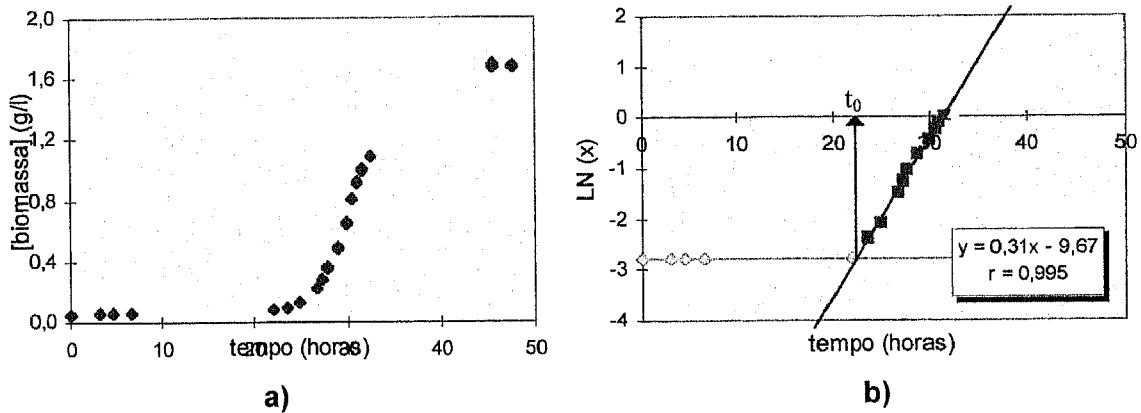


Figura 3.10 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $2,004 \pm 0,047$ mg/l.

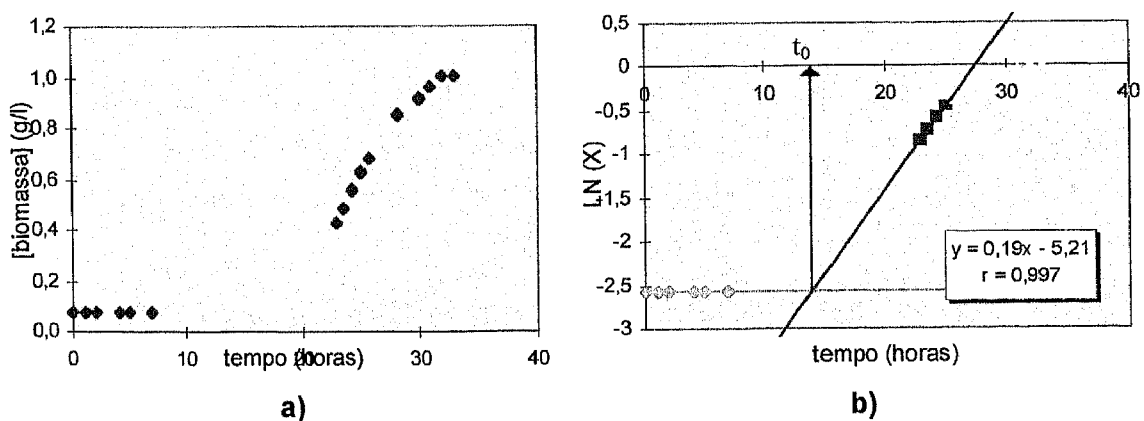


Figura 3.11 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $2,996 \pm 0,206$ mg/l.

Analisando todas as figuras, poderá constatar-se a existência de três fases de crescimento das bactérias. Há uma fase inicial de aclimação na qual a concentração das bactérias permanece praticamente invariável, sendo a duração deste período variável entre 8 e 25 horas. Nas figuras 3.3 e 3.4 verifica-se um ligeiro aumento da concentração de células, durante este período, que se deve ao facto de, quando se inocula o meio com bactérias previamente adaptadas ao fenol, ainda pode existir algum fenol residual na suspensão bacteriana, e deste modo as células continuam a reproduzir-se devido ao consumo do fenol remanescente. Segue-se um período de crescimento exponencial, cujo declive indica a velocidade específica de crescimento. Por último, constata-se um decréscimo gradual da velocidade de crescimento das células, até que a concentração de biomassa tende para um valor constante. Este decréscimo deve-se, provavelmente, ao esgotamento de alguns nutrientes minerais, ou à acumulação de produtos tóxicos ou inibitórios resultantes do metabolismo, e não ao esgotamento da fonte de carbono, uma vez que esta é alimentada continuamente ao reactor ao longo de toda a operação. Além disso, tal como será apresentado posteriormente, constatou-se que durante a fase de crescimento exponencial, o pH decresce até valores na ordem de 5 a 4. Sendo o pH óptimo de crescimento das células situado entre 6 e 8 (capítulo 1.3.1), este facto poderá estar na origem de uma reprodução mais lenta das células.

As figuras 3.12 a 3.14 procuram ilustrar a evolução de parâmetros como a velocidade específica de crescimento (μ) e o tempo de aclimação (t_0), com a concentração média de tolueno na corrente gasosa de entrada, bem como com a concentração de tolueno presente na fase líquida no início do crescimento exponencial dos microrganismos. Os valores dos parâmetros μ e t_0 foram obtidos por tratamento matemático dos resultados apresentados nas figuras 3.3 a 3.11, utilizando a equação 1.10.

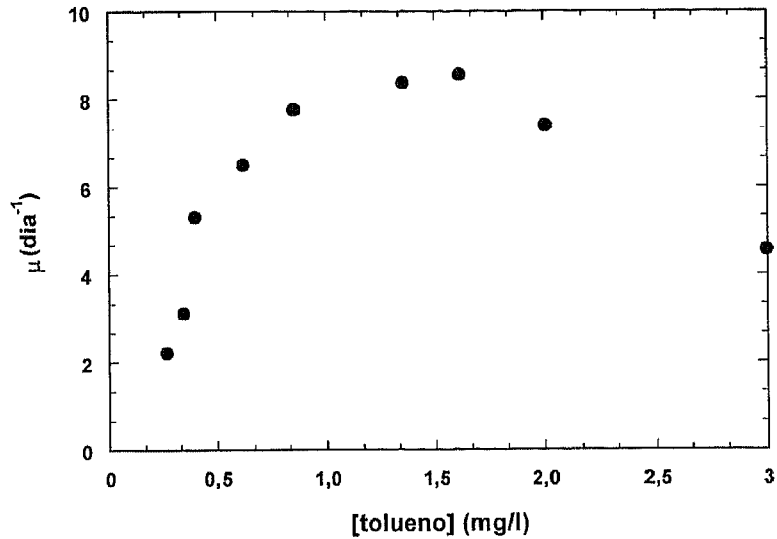


Figura 3.12 - Variação da velocidade específica de crescimento com a concentração de tolueno na corrente de entrada.

Ajustou-se a variação da velocidade específica de crescimento com a concentração de tolueno na fase líquida (S), à equação de Haldane (equação 1.12), de forma a obter os valores dos respectivos parâmetros cinéticos (figura 3.13).

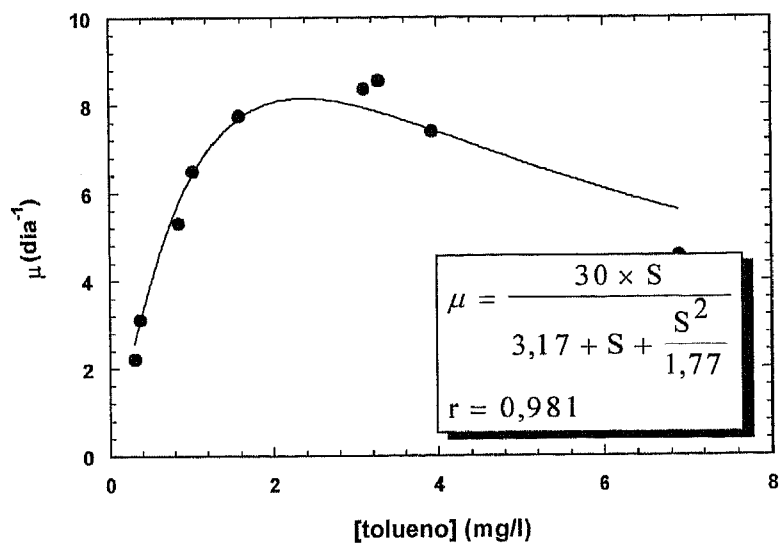


Figura 3.13 - Variação da velocidade específica de crescimento com a concentração de tolueno na suspensão bacteriana.

Verifica-se que, μ aumenta com a concentração de tolueno até um dado valor limite, isto é, para uma concentração de tolueno na fase líquida superior a 2,34 mg/l a velocidade de crescimento das células começa a decrescer. Tal facto, leva a concluir que a partir de determinada concentração de tolueno, este inibe o crescimento das células que, embora continuem a utilizá-lo como fonte de carbono, crescem mais lentamente.

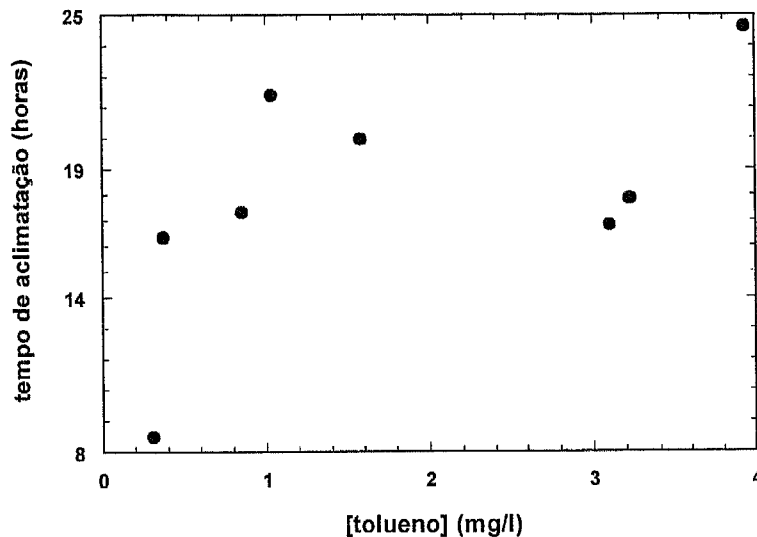


Figura 3.14 - Evolução do tempo de aclimação com a concentração de tolueno na suspensão bacteriana.

Analisando a figura 3.14, conclui-se que para uma gama de concentrações de tolueno na fase líquida entre 0,2 e 4 mg/l, a concentração de tolueno não influencia de forma coerente o tempo de aclimação da células. Contudo, é de salientar que o próprio método de determinação do tempo de aclimação contém um erro associado. De facto, entre a fase de aclimação e a fase de crescimento exponencial pode haver uma fase de crescimento com velocidade inferior à velocidade máxima, que não foi aqui considerado. Deve-se também ter presente, que o tempo de aclimação depende de vários factores tais como: a concentração inicial de bactérias; o pH; a presença ou não de algum fenol residual; o estado fisiológico das bactérias; a diferença de composição entre o meio de cultura anterior e o novo; etc.. Embora se tenha procurado partir sempre das mesmas condições, não foi possível controlá-las com exactidão.

Com o objectivo de verificar se a carga de tolueno alimentada ao reactor afecta ou não a velocidade de crescimento da *Pseudomonas putida*, realizou-se um conjunto de ensaios idênticos aos anteriores, aumentando unicamente o caudal da corrente gasosa para 10,5 l/min.

As figuras 3.15 a 3.22 apresentam a evolução da concentração de biomassa em função do tempo, para os ensaios realizados com um caudal da fase gasosa de 10,5 l/min e concentrações de tolueno na corrente gasosa de entrada entre 0,15 e 4,2 mg/l.

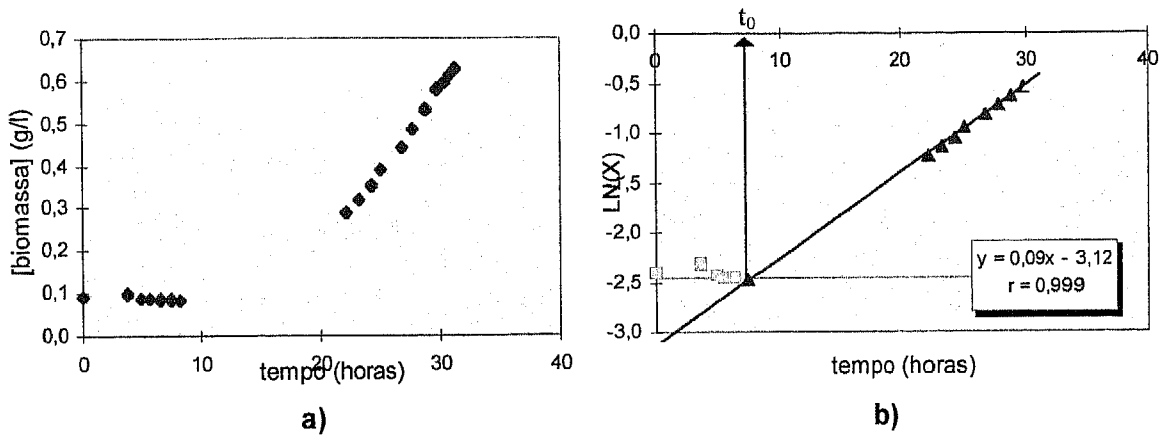


Figura 3.15 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = 0,159 ± 0,013 mg/l.

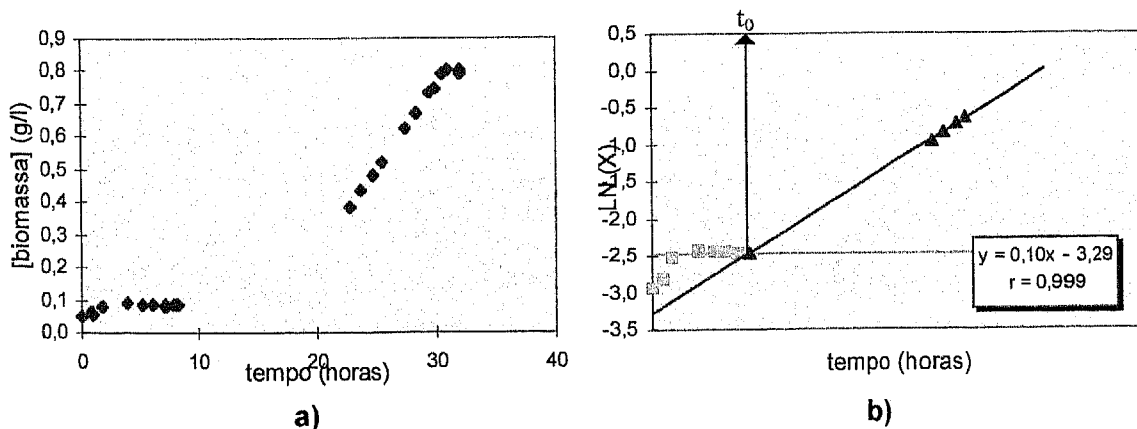


Figura 3.16 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = 0,374 ± 0,014 mg/l.

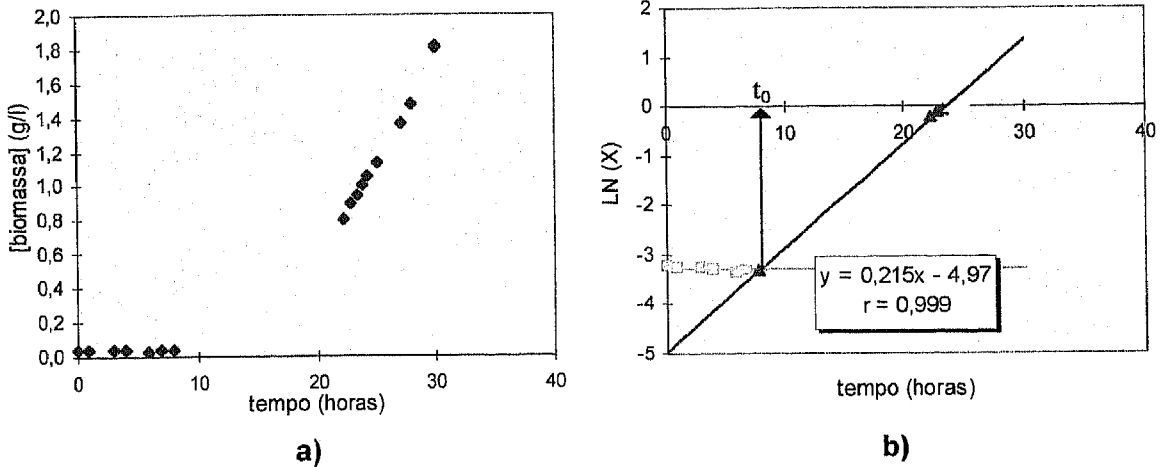


Figura 3.17 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = 0,694 ± 0,025 mg/l.

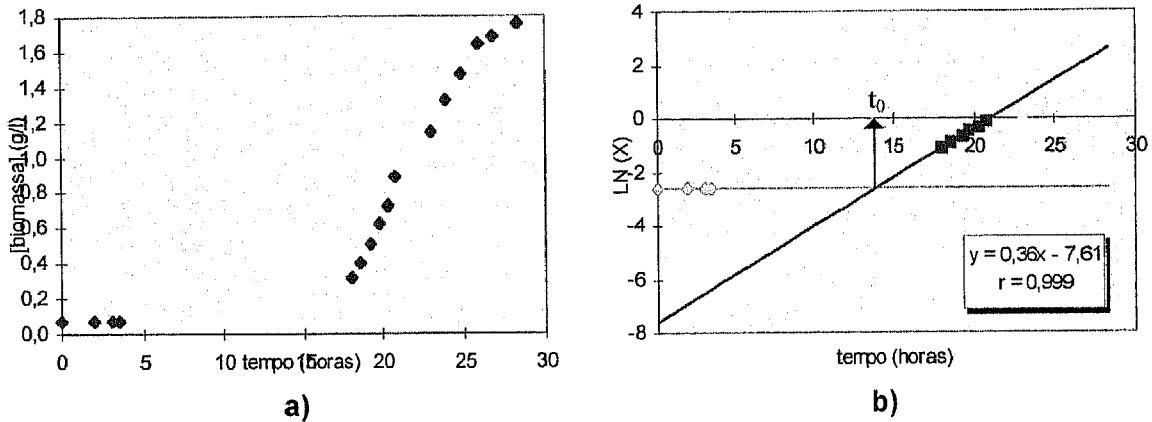


Figura 3.18 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = 1,251 ± 0,072 mg/l.

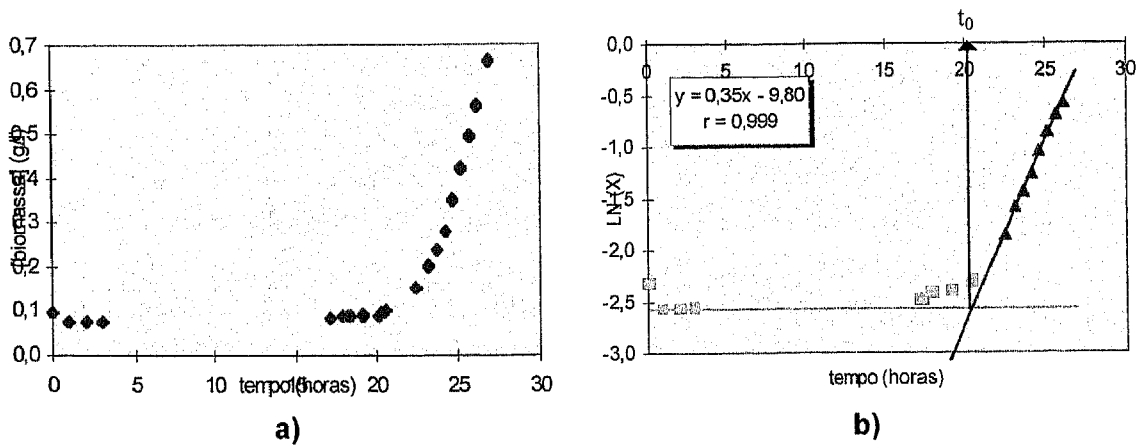


Figura 3.19 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = 1,729 ± 0,060 mg/l.

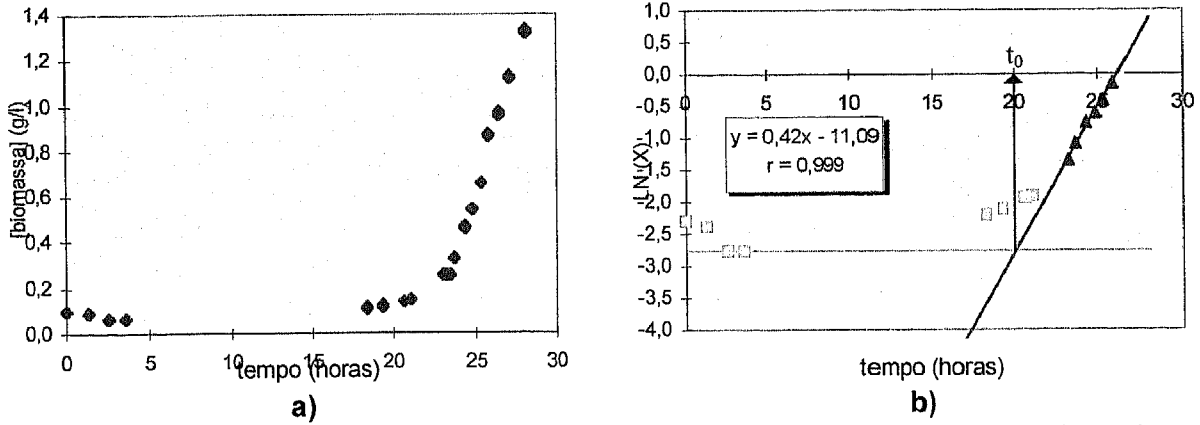


Figura 3.20 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $1,969 \pm 0,079$ mg/l.

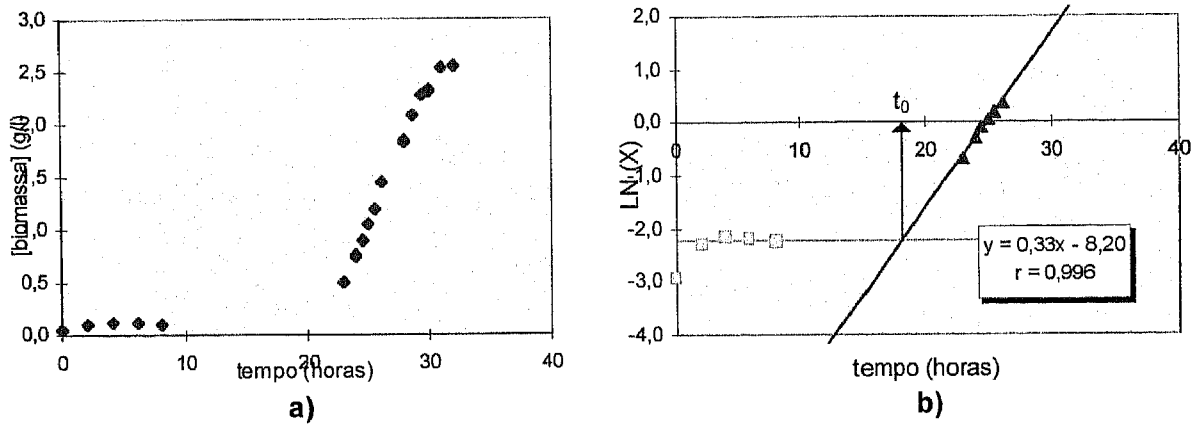


Figura 3.21 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $2,676 \pm 0,177$ mg/l.

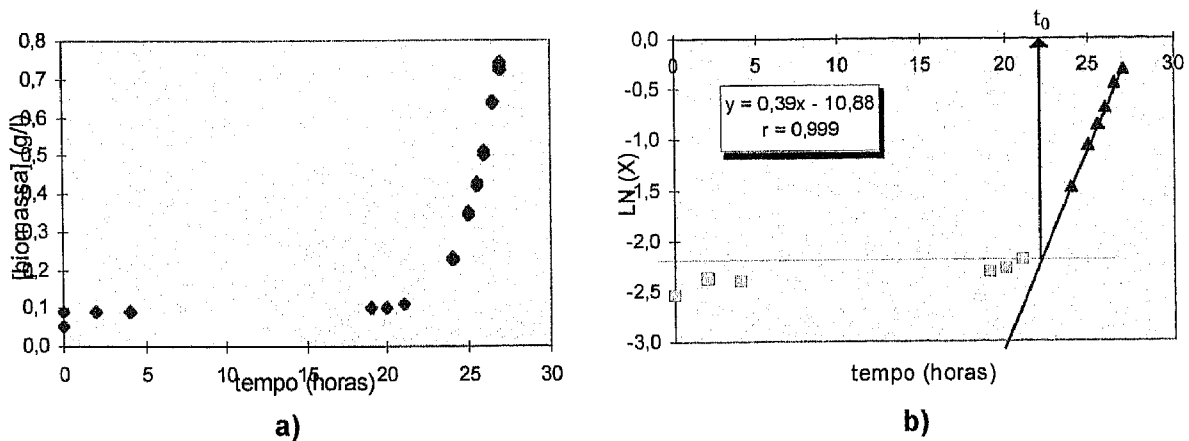


Figura 3.22 - a) Evolução temporal da concentração de biomassa. **b)** Logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo para [tolueno] = $4,178 \pm 0,231$ mg/l.

Nas figuras 3.23, 3.24 e 3.25 é apresentada a variação da velocidade específica de crescimento e do tempo de aclimação com a concentração de tolueno

presente inicialmente na fase líquida, isto é, antes da fase de crescimento exponencial, e na corrente gasosa de entrada.

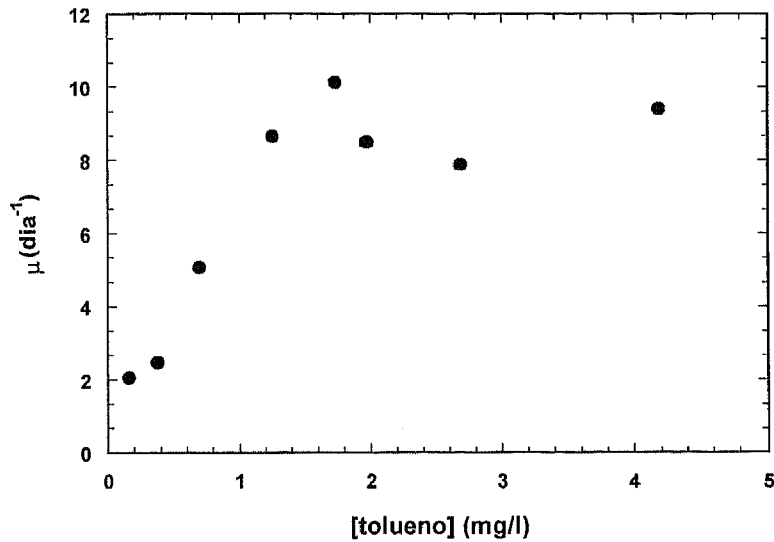


Figura 3.23 - Evolução da velocidade específica de crescimento com a quantidade de tolueno presente na corrente gasosa de entrada.

Similarmente à figura 3.13, na figura 3.24 efectuou-se o ajuste, dos valores obtidos para a velocidade específica de crescimento em função da concentração de tolueno presente na fase líquida à equação de Haldane.

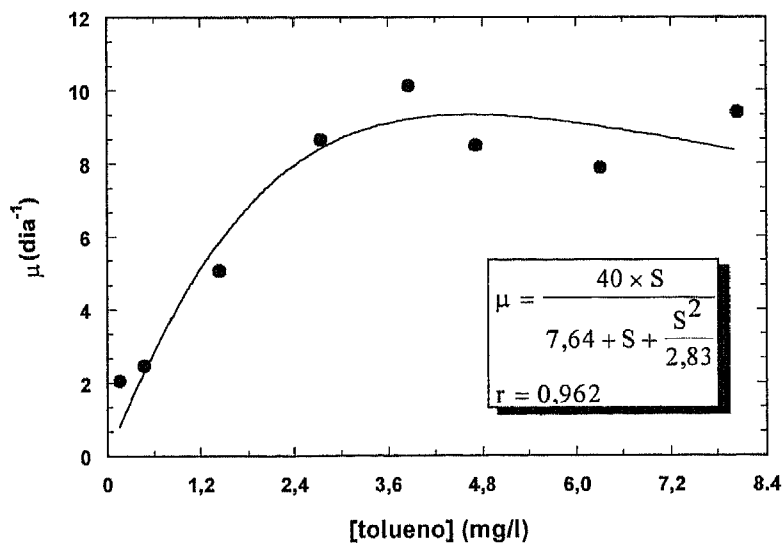


Figura 3.24 - Ajuste da velocidade específica de crescimento *versus* concentração de tolueno presente na suspensão bacteriana ao modelo de Haldane.

Verifica-se que, aplicando a equação apresentada na figura anterior, a velocidade máxima é atingida para uma concentração de tolueno na fase líquida de 4,65 mg/l.

Os valores dos parâmetros do modelo cinético de Haldane, obtidos nos dois conjuntos de ensaios realizados, estão apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Parâmetros do modelo cinético de Haldane.

| $Q_{\text{gás}}$ (l/min) | μ_{max} (dia ⁻¹) | K_s (mg/l) | K_i (mg/l) |
|--------------------------|---|-----------------|-----------------|
| 5,6 | $30 \pm 0,22$ | $3,17 \pm 0,24$ | $1,77 \pm 0,14$ |
| 10,5 | $40 \pm 8,10$ | $7,64 \pm 3,02$ | $2,83 \pm 1,25$ |

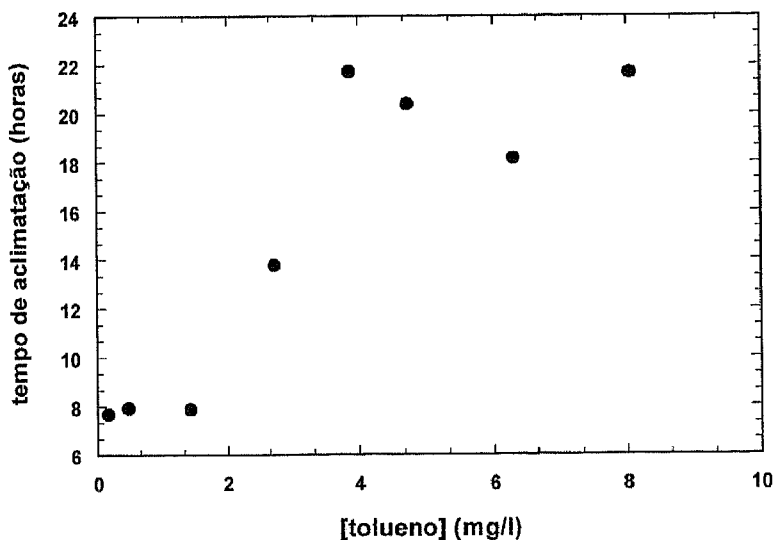


Figura 3.25 - Tempo de aclimação *versus* concentração de tolueno presente na suspensão bacteriana.

Verifica-se que, este conjunto de resultados apresenta um perfil idêntico aos ensaios correspondentes a um caudal da corrente gasosa de 5,6 l/min. Como resultado do ajuste ao modelo de Haldane, constata-se que os ensaios realizados com um caudal de gás superior apresentam valores mais elevados dos

respectivos parâmetros. Na verdade, como se pode verificar na figura 3.2, nestes ensaios a quantidade de tolueno transferida para a fase líquida no início da fase exponencial é ligeiramente superior. Como tal, seria de esperar que as células se multipliquem a uma velocidade mais elevada, e deste modo os valores de μ e K_s sejam superiores, aos verificados nos ensaios conduzidos com um caudal de gás inferior. Além disso, a inibição é menor nos ensaios com caudal superior, caracterizada por um valor de constante de inibição mais elevado, provavelmente devido à adaptação das bactérias a concentrações mais elevadas, tolerando maiores concentrações de tolueno na suspensão bacteriana.

3.1.2 Consumo de tolueno

Nas figuras 3.26 a 3.34 são apresentados os resultados referentes à evolução do consumo de tolueno com o tempo, bem como os valores da percentagem de remoção de tolueno, para os diferentes ensaios realizados com um caudal da corrente gasosa de 5,6 l/min, variando a concentração de tolueno no gás de entrada do reactor entre 0,2 e 3 mg/l.

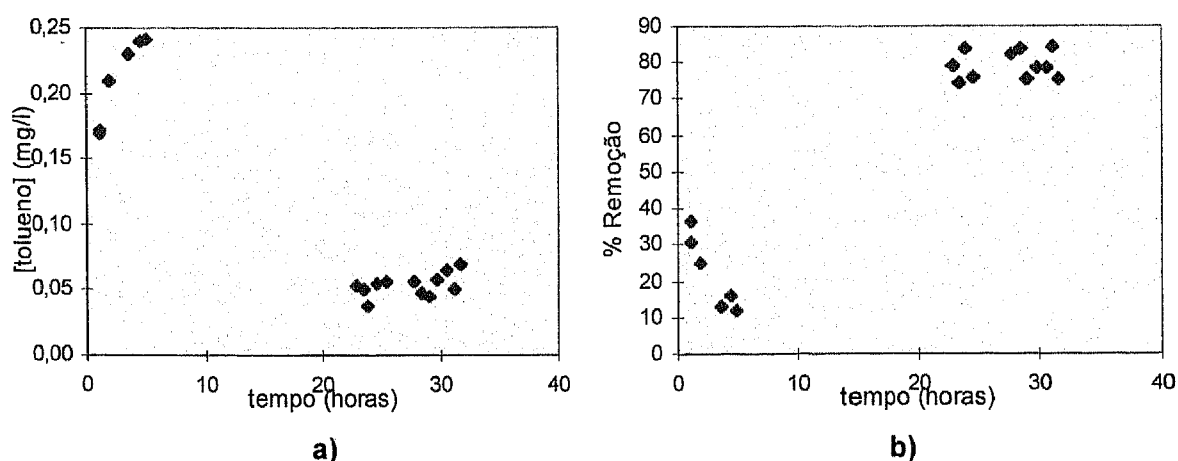


Figura 3.26 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,264 \pm 0,018$ mg/l na corrente de entrada.

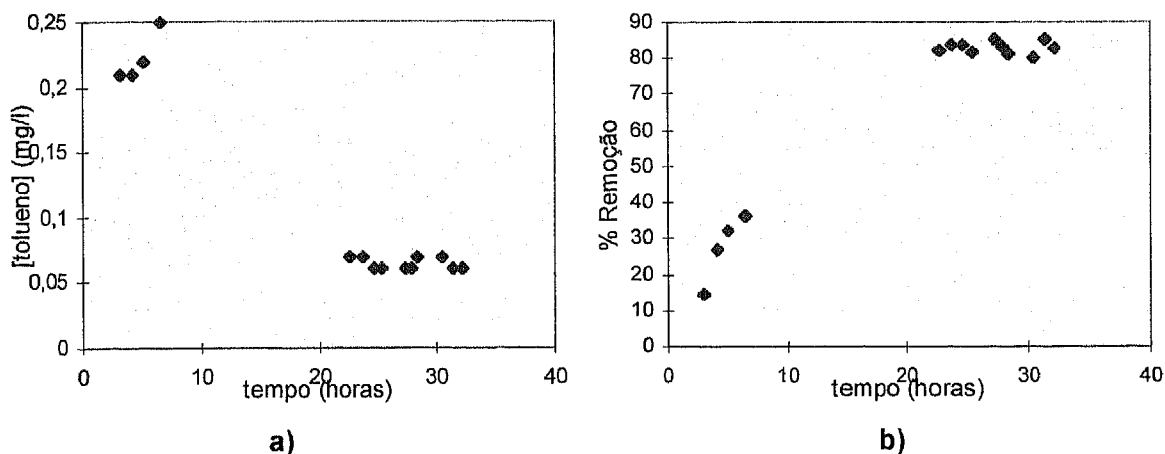


Figura 3.27 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,344 \pm 0,026$ mg/l na corrente de entrada.

Nas figuras 3.28 a 3.33, procurou-se ajustar os dados relativos à evolução da concentração de tolueno na corrente de saída, durante a fase de crescimento exponencial das bactérias, a uma função do tipo exponencial.

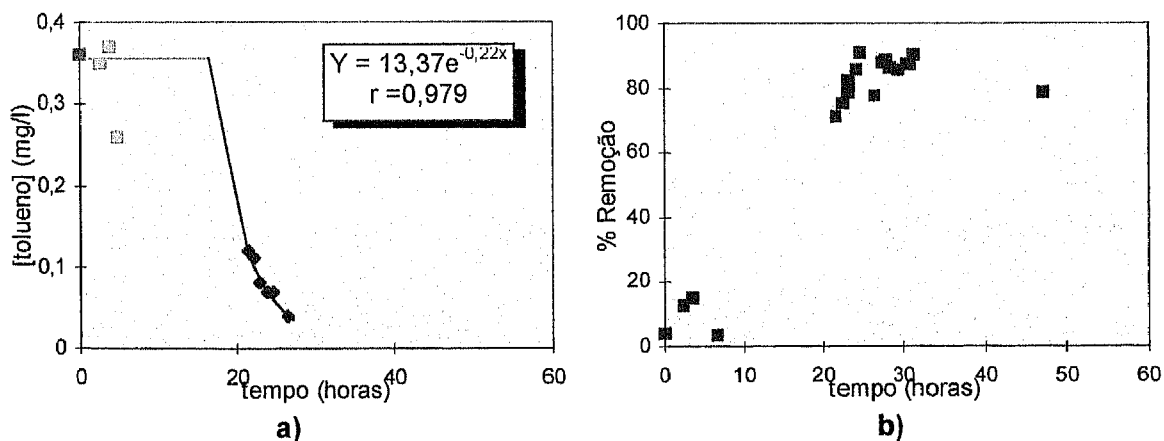


Figura 3.28 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,398 \pm 0,016$ mg/l na corrente de entrada.

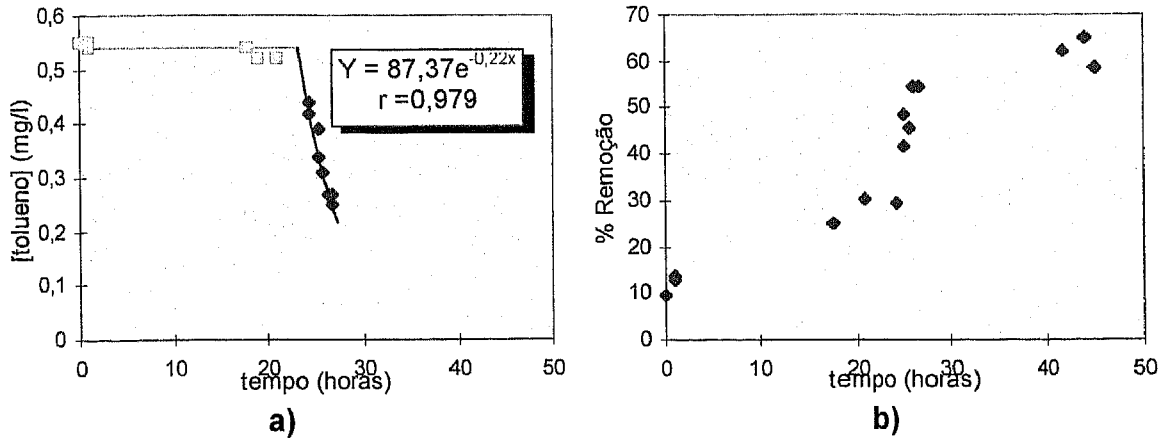


Figura 3.29 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,616 \pm 0,029$ mg/l na corrente de entrada.

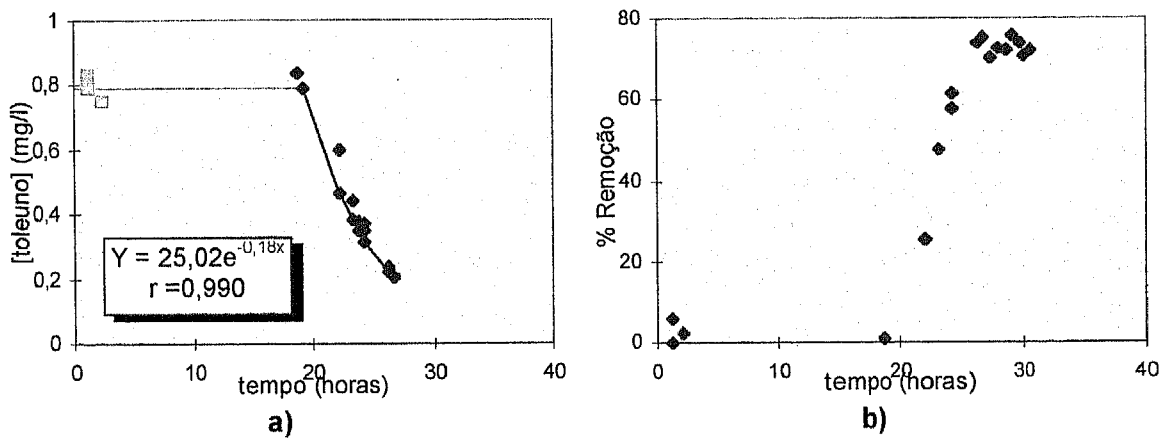


Figura 3.30 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = $0,851 \pm 0,020$ mg/l na corrente de entrada.

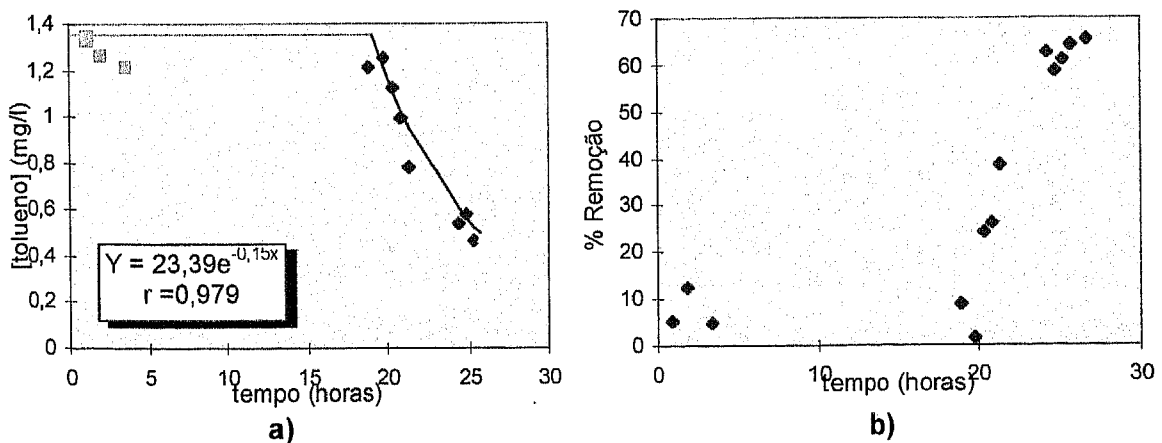


Figura 3.31 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. b) Percentagem de remoção de tolueno para [tolueno] = $1,348 \pm 0,048$ mg/l na corrente de entrada .

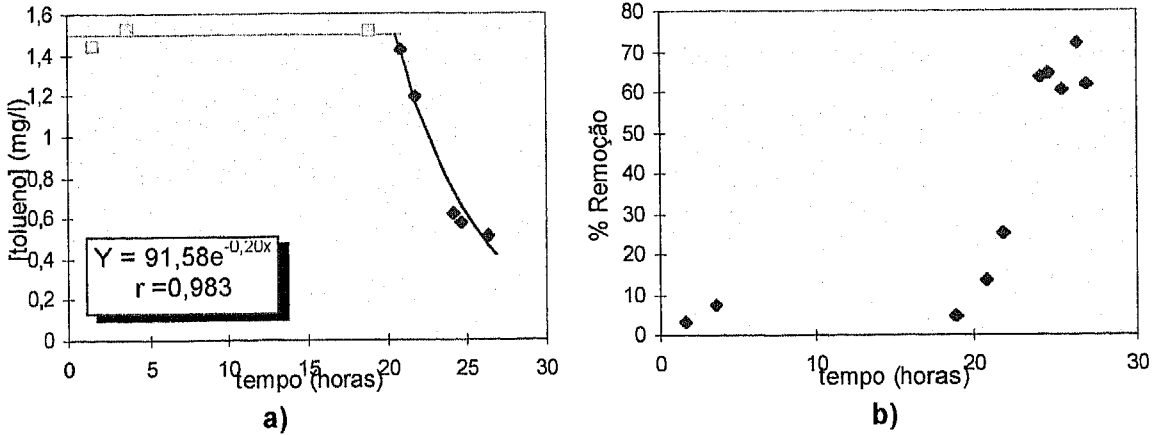


Figura 3.32 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para $[\text{tolueno}] = 1,608 \pm 0,056 \text{ mg/l}$ na corrente de entrada.

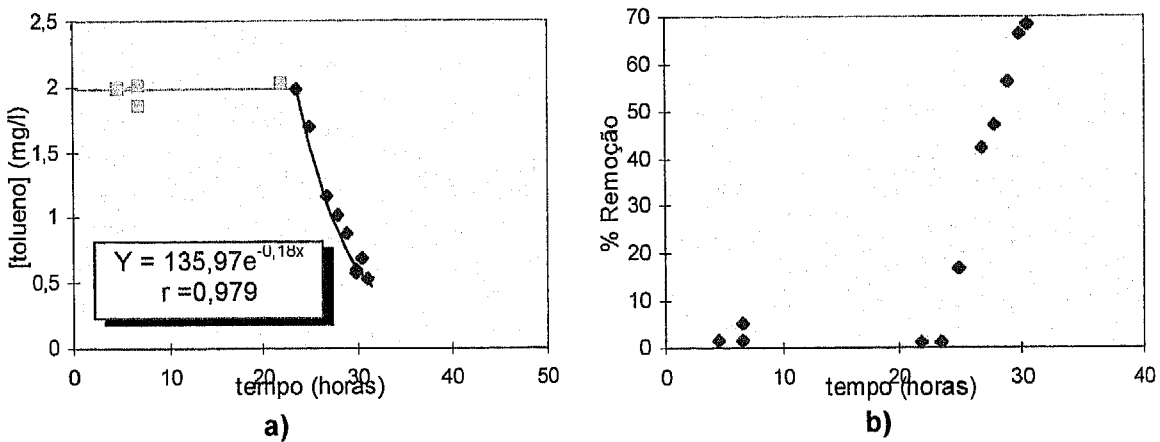


Figura 3.33 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno para $[\text{tolueno}] = 2,004 \pm 0,047 \text{ mg/l}$ na corrente de entrada.

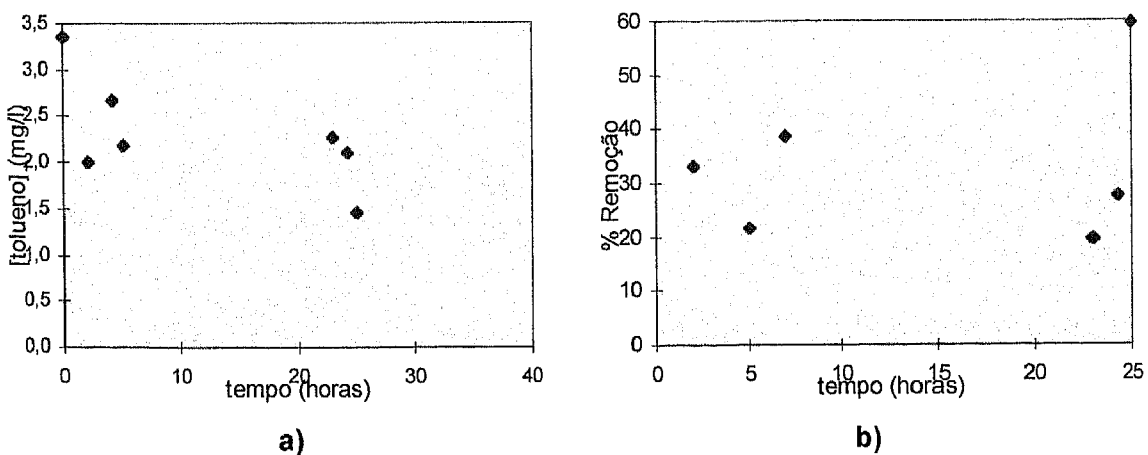


Figura 3.34 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para $[\text{tolueno}] = 2,966 \pm 0,206 \text{ mg/l}$ na corrente de entrada.

Tal como se pode observar nas figuras anteriores, a evolução da concentração do tolueno com o tempo apresenta um perfil concordante com o crescimento da biomassa. Durante o período de aclimação verifica-se que as bactérias praticamente não consomem tolueno. Por sua vez, quando as células se reproduzem a uma taxa constante, a concentração de tolueno decresce de forma praticamente exponencial, sendo este perfil mais evidente nas figuras 3.28 a 3.33. Por último, a concentração de tolueno tende para um valor constante quando a velocidade específica de crescimento das células diminui. Contudo, denota-se uma grande dispersão nos valores obtidos, nomeadamente em certos casos verifica-se um ligeiro aumento da concentração de tolueno durante o período de aclimação, ou mesmo uma diminuição. Supõe-se que esses valores resultam de erros de análise inerentes ao próprio método de medição, que é extremamente sensível.

A eficiência de remoção de tolueno tende a manter-se constante durante a fase de aclimação, aumenta durante a fase de crescimento exponencial, até que atinge um valor máximo que se mantém constante ao fim da fase de crescimento exponencial. O valor máximo de percentagem de remoção atingido foi de aproximadamente 85 % para os ensaios conduzidos com concentração de tolueno na corrente de entrada de 0,264 a 0,398 mg/l. Verifica-se que para concentrações de tolueno mais elevadas a percentagem de remoção decresce significativamente para valores na ordem dos 40 a 50 %.

Admitindo que a concentração de tolueno decresce exponencialmente ao longo do tempo, durante a fase de crescimento exponencial, poderá escrever-se:

$$S_g = S_{g_0} e^{-U(t-t_0)} \quad (3.1)$$

ou linearizando a equação,

$$\ln S_g = -U(t - t_0) + \ln S_{g_0} \quad (3.2)$$

em que,

S_g - concentração de tolueno presente no gás de saída num dado instante, ML^{-3}

S_{g_0} - concentração de tolueno presente no gás de entrada no instante inicial, ML^{-3}

t - tempo, T

t_0 - tempo inicial da fase de crescimento exponencial, T

U - velocidade específica de consumo de substrato, T^{-1}

A figura 3.35 procura ilustrar, como a velocidade específica de consumo de substrato varia com a concentração de tolueno presente na fase líquida. Os valores de U foram obtidos aplicando a equação 3.2, aos dados apresentados nas figura 3.28 a 3.33.

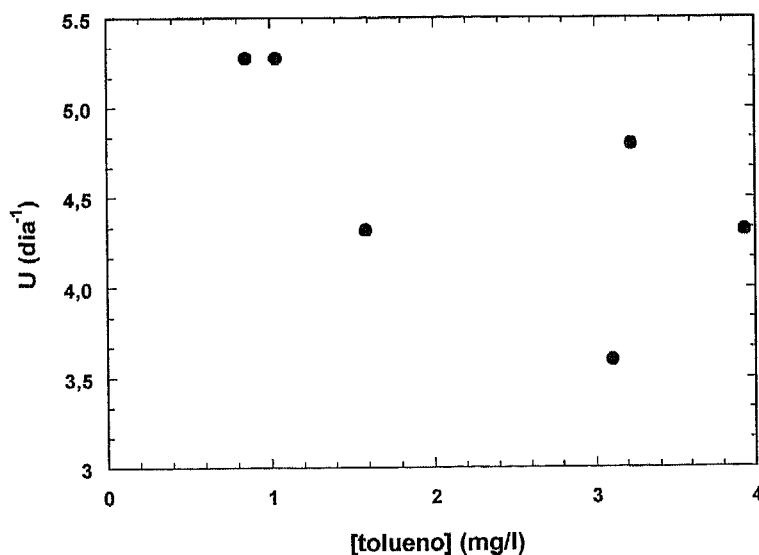


Figura 3.35 - Variação da velocidade de consumo de substrato com a concentração de tolueno na suspensão bacteriana.

Os valores da velocidade específica de consumo de tolueno apresentam uma certa dispersão devido ao grande erro de que estão afectados, uma vez que resultam de cálculos que são efectuados sobre valores pouco exactos.

Uma vez que, o reactor em estudo opera de forma contínua para a fonte de carbono na corrente gasosa e descontínua para a biomassa em suspensão, o rendimento biológico não pode ser determinado através da equação 1.5. Deste modo, definindo um rendimento biológico global (Y_{obs}), como a quantidade de biomassa que é produzida, $\Delta M_{biomassa}$ (M), por unidade de massa de substrato consumido, $\Delta M_{substrato}$ (M), durante a fase de crescimento exponencial, este é calculado mediante a seguinte equação:

$$Y_{obs} = \frac{\Delta M_{biomassa}}{\Delta M_{substrato}} \quad (3.3)$$

em que a biomassa produzida corresponde a,

$$\Delta M_{biomassa} = (X - X_0)V_L \quad (3.4)$$

sendo,

V_L - Volume da solução líquida, L^3

Dado que o consumo de tolueno não é constante durante a fase de crescimento exponencial, isto é, varia com o tempo segundo a equação 3.1, optou-se por determinar o seu consumo durante este período, segundo a seguinte equação:

$$\Delta M_{tolueno} = Q_{gas} \int_0^t (S_{g0} - S_g) dt \quad (3.5)$$

Substituindo a equação 3.1 na equação 3.5, por integração obtém-se:

$$\Delta M_{tolueno} = \frac{QS_{g0}}{U} [(t - t_0)U - 1 + e^{-U(t-t_0)}] \quad (3.6)$$

Substituindo a equação 3.4 e 3.6 na equação 3.3, o rendimento biológico é dado por:

$$Y_{\text{obs}} = \frac{(X - X_0)V_L U}{Q_{\text{gas}} S_{E0} L [(t - t_0)U - 1 + e^{-U(t-t_0)}]} \quad (3.7)$$

Aplicando a equação 3.7 determinou-se o rendimento biológico observado, para os diferentes ensaios em que foi possível obter o valor da velocidade de consumo de substrato.

Sendo assim, a figura 3.36 apresenta os diferentes valores obtidos de Y_{obs} em função da concentração de tolueno na fase líquida.

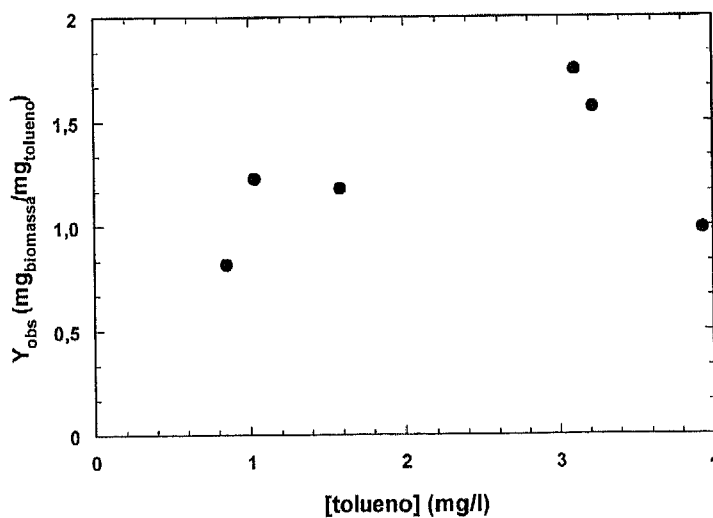


Figura 3.36 - Rendimento biológico em função da concentração de tolueno na suspensão bacteriana.

Verifica-se na figura 3.36, que Y_{obs} evolui de forma idêntica à variação da velocidade específica de crescimento, isto é, tende a aumentar até um dado valor limite, cerca de 1,2 mg_{biomassa}/mg_{tolueno}. Aos valores superiores estarão associados erros experimentais, pelo que se considera que devem ser desprezados.

A figura 3.37 procura ilustrar como os diferentes parâmetros, nomeadamente a concentração de biomassa, a concentração de tolueno e a percentagem de remoção, se comportam nas diferentes fases de crescimento das bactérias. Para tal, seleccionaram-se os valores obtidos nos ensaios com uma concentração de tolueno na corrente de entrada de 0,851 mg/l.

I - Fase de aclimação **II** - Fase de crescimento exponencial **III** - Fase de retardamento

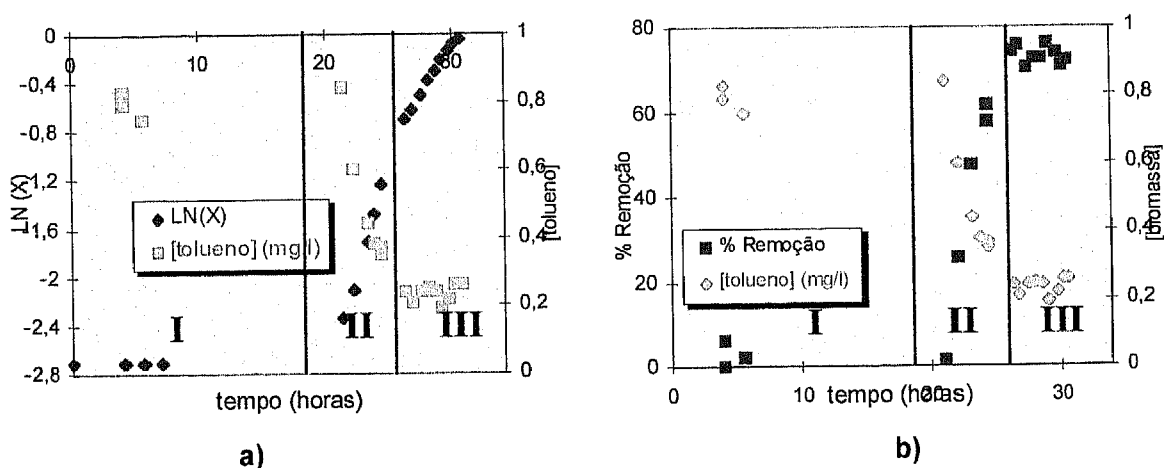


Figura 3.37 - a) Evolução temporal do logaritmo da concentração de biomassa *versus* evolução da concentração de tolueno. **b)** Evolução temporal da percentagem de remoção do tolueno *versus* concentração de tolueno.

A figura 3.37 mostra que, quando o número de células permanece constante na fase de aclimação, a concentração de tolueno mantém-se praticamente invariável, isto é, as células estão a adaptar-se ao novo meio mineral, consumindo muito pouco substrato. Na fase de crescimento exponencial as células consomem a fonte de carbono a uma velocidade constante, contribuindo assim para um aumento da percentagem de remoção do tolueno. Por último, devido ao esgotamento de algum nutriente, ou devido à acumulação no meio de produtos tóxicos ou ácidos que inibem o crescimento das bactérias, a percentagem de remoção do tolueno tende a manter-se constante.

As figuras 3.38 a 3.44 apresentam o consumo de tolueno, bem como a percentagem de remoção ao longo do tempo, nos ensaios que foram realizados com uma caudal da corrente gasosa de 10,5 l/min.

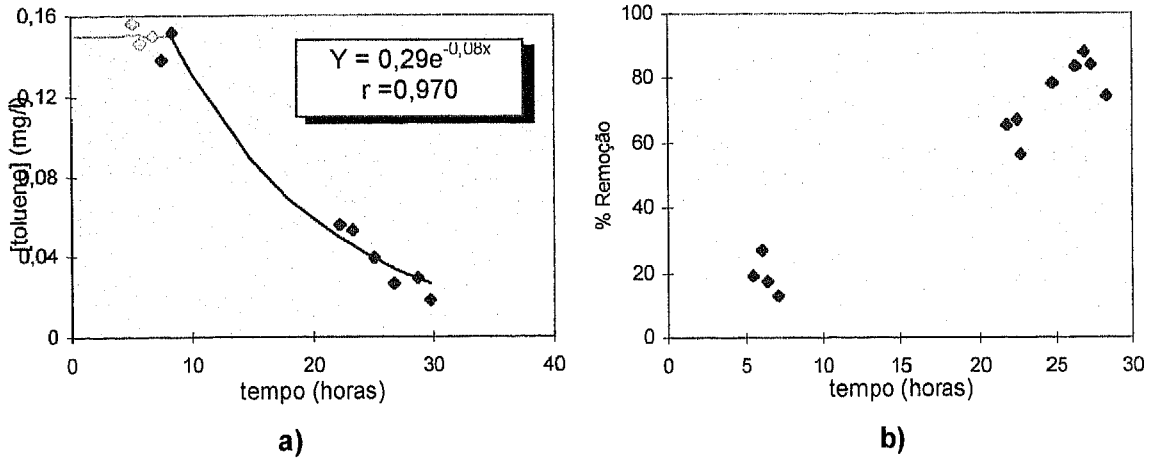


Figura 3.38 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = 0,159 ± 0,013 mg/l na corrente de entrada.

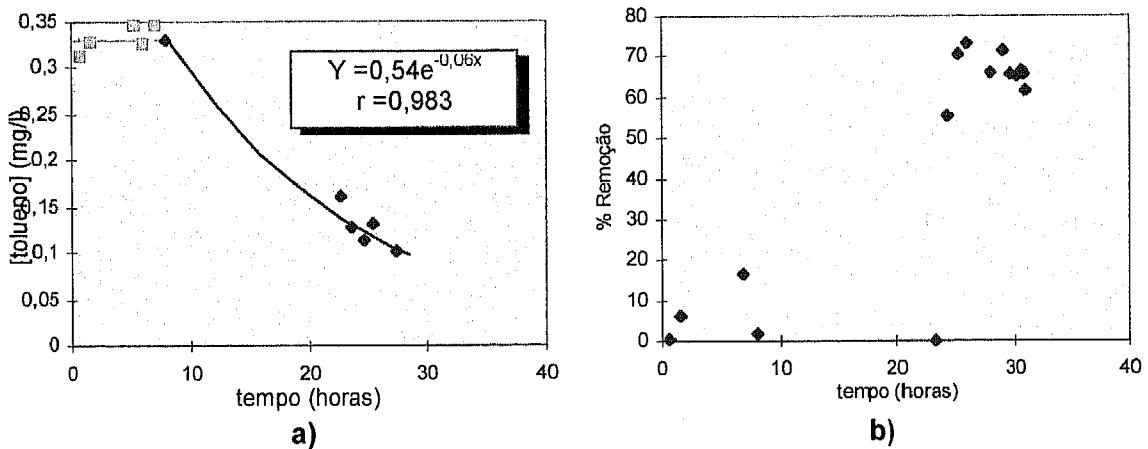


Figura 3.39 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = 0,374 ± 0,014 mg/l na corrente de entrada.

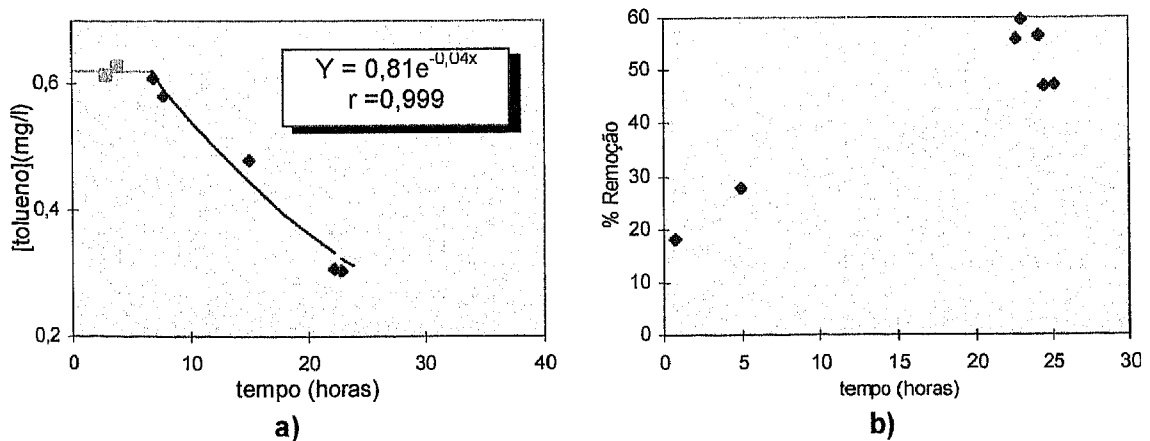
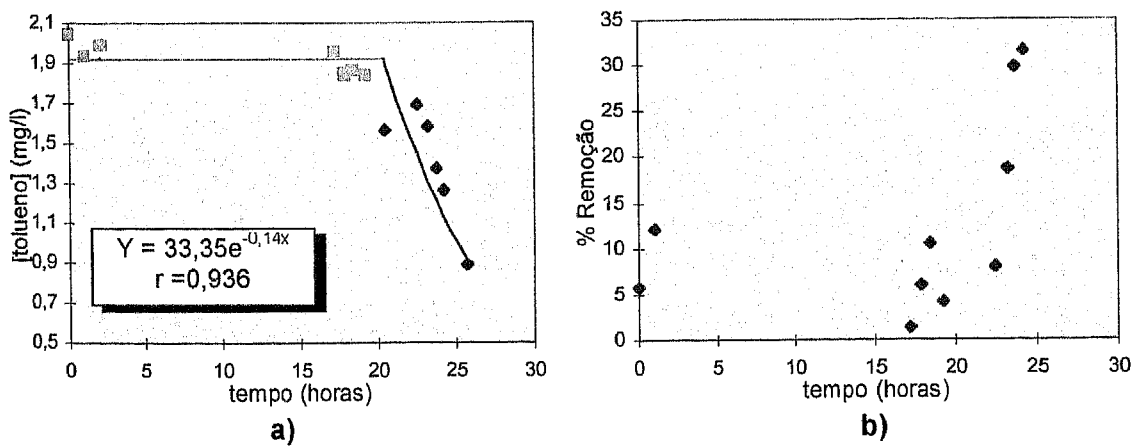
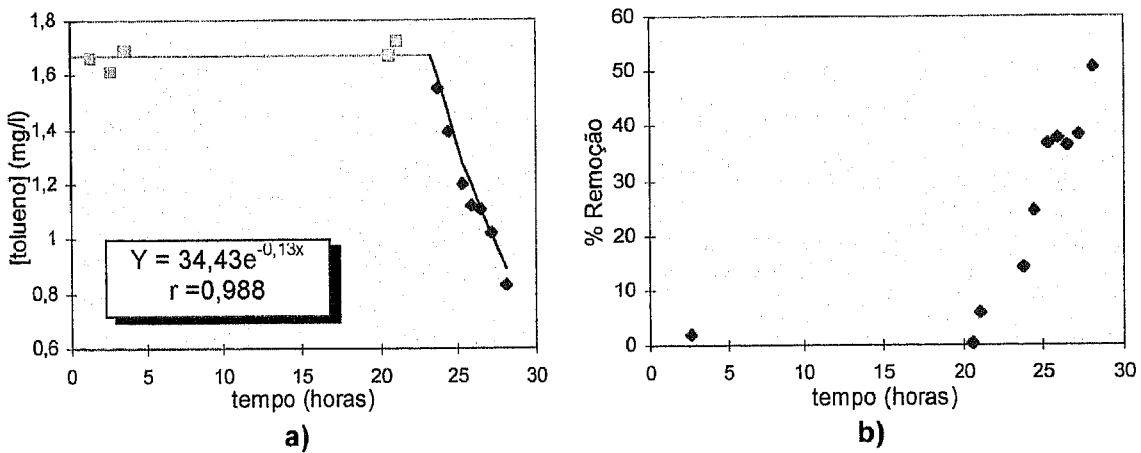
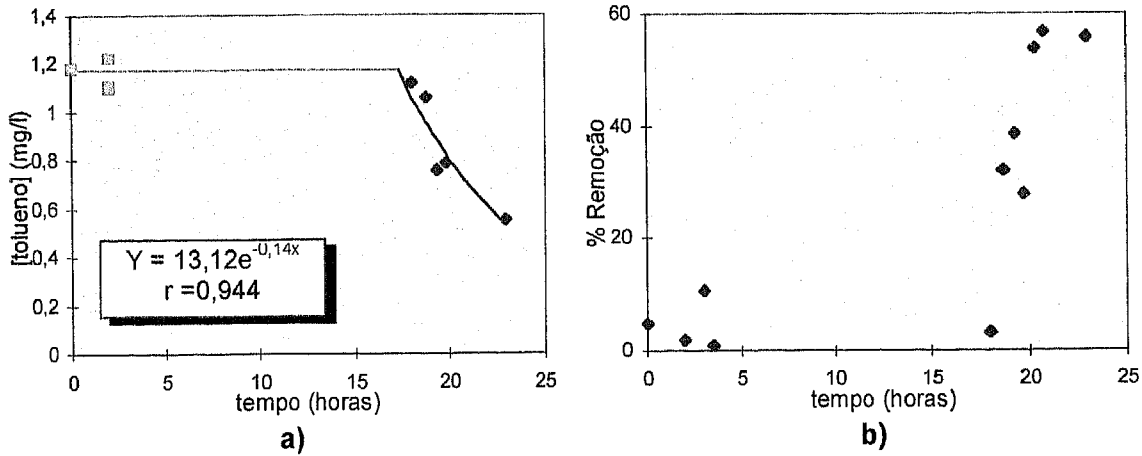


Figura 3.40 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = 0,694 ± 0,014 mg/l na corrente de entrada.



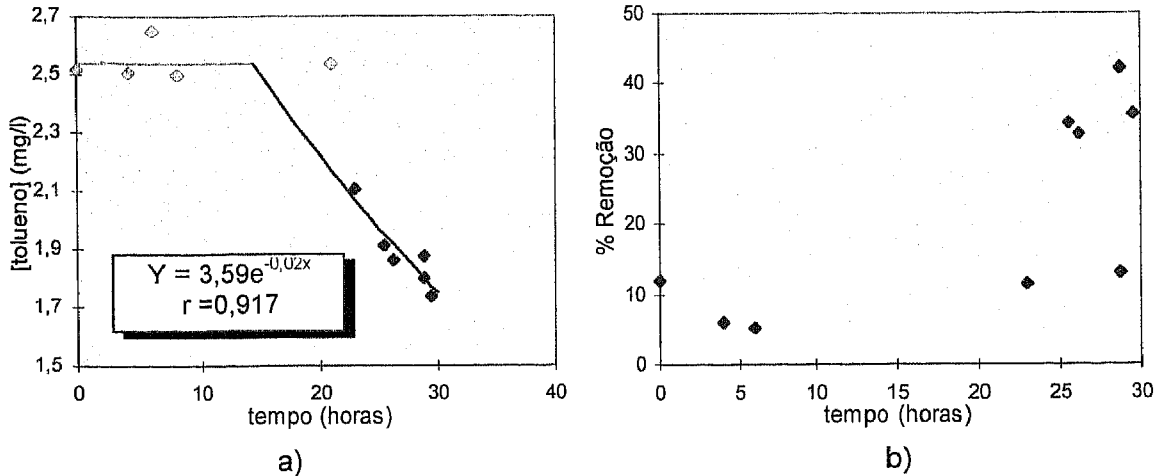


Figura 3.44 - a) Evolução temporal da concentração de tolueno na corrente gasosa à saída do reactor. **b)** Percentagem de remoção de tolueno, para [tolueno] = 2,676 ± 0,177 mg/l na corrente de entrada.

Mais uma vez, observando as figuras anteriores verifica-se que o consumo de tolueno durante a fase de crescimento exponencial segue uma função do tipo exponencial. Durante o período de aclimação a concentração de tolueno mantém-se constante, embora em alguns ensaios se verifique alguma dispersão nos valores obtidos decorrentes de erros de análise. Do mesmo modo que no conjunto de ensaios com $Q_{gás} = 5,6$ l/min, procurou-se calcular a velocidade específica de consumo de substrato, a partir dos resultados apresentados nas figuras anteriores. A figura 3.45 apresenta os valores de U em função da concentração de substrato presente na fase líquida.

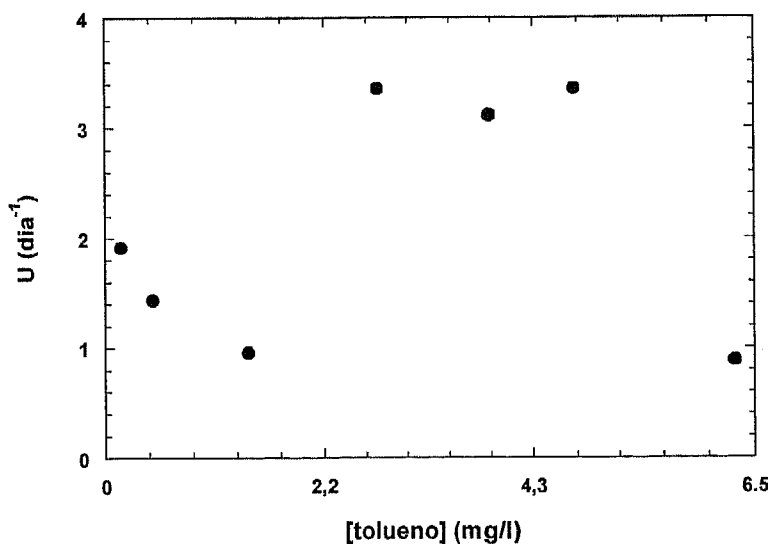


Figura 3.45 - Variação da velocidade específica de consumo de tolueno em função da concentração de tolueno presente na suspensão bacteriana.

A partir dos valores apresentados na figura 3.45 e através da equação 3.7, calculou-se o rendimento biológico observado, (figura 3.46).

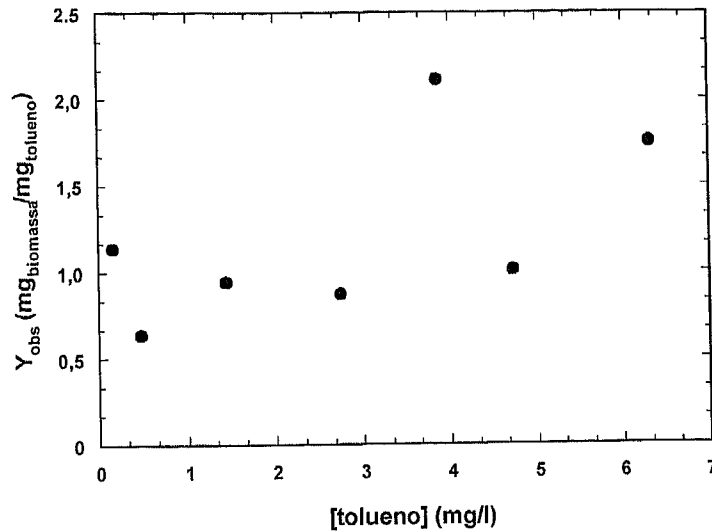


Figura 3.46 - Rendimento biológico em função da concentração de tolueno na suspensão bacteriana.

A figura 3.46 denota que existem dois valores que se encontram bastante afastados relativamente ao perfil esperado, correspondente aos ensaios apresentados nas figuras 3.42 e 3.44, apresentando valores superiores ao rendimento biológico máximo admissível. Da análise da figura 3.45, poder-se-à apurar que U exhibe uma tendência para aumentar com o aumento da concentração de tolueno na suspensão bacteriana, até um dado valor máximo na ordem dos $3,4 \text{ dia}^{-1}$. No que respeita ao rendimento biológico observado, este tende a manter-se em valores próximos do $1 \text{ mg}_{biomassa}/\text{mg}_{tolueno}$. Destes resultados pode-se também depreender que, o tolueno é consumido a uma velocidade mais baixa relativamente aos ensaios conduzidos com uma caudal da corrente gasosa de $5,6 \text{ l/min}$, assim como, o rendimento biológico, de uma forma geral, apresenta valores inferiores.

Para cálculo do rendimento intrínseco (Y), e coeficiente de manutenção (m), partiu-se da equação 1.6. Contudo é de salientar mais uma vez, que o reactor em questão não é um reactor fechado, pelo que é necessário desenvolver uma equação que traduza eficazmente o seu comportamento.

Tendo-se admitido que, durante a fase de crescimento exponencial a acumulação de tolueno na fase líquida é aproximadamente nula, isto é, o tolueno que é transferido para a fase líquida é totalmente consumido pelas bactérias, considerou-se assim, um consumo de tolueno médio por unidade de tempo, durante a fase de crescimento exponencial, dado pela seguinte equação:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{Q_{\text{gas}} \int_0^t (S_{g0} - S_g) dt}{t - t_0} \quad (3.8)$$

Do tolueno consumido, uma parte é utilizado para a produção efectiva de biomassa, outra parte é consumida para fornecer energia necessária à manutenção das células. Substituindo a equação 3.8 na equação 1.6 e admitindo, do mesmo modo, uma média da biomassa produzida durante a fase de crescimento exponencial, obtém-se,

$$\frac{Q_{\text{gas}} \int_0^t (S_{g0} - S_g) dt}{t - t_0} = \frac{1}{Y} \frac{(X - X_0) V_L}{(t - t_0)} + m V_L \frac{\int_0^t X dt}{t - t_0} \quad (3.9)$$

Substituindo a equação 3.7 na equação 3.9, e por integração, obtém-se a equação 1.7, ou seja,

$$\frac{1}{Y_{\text{obs}}} = \frac{m}{\mu} + \frac{1}{Y} \quad (3.11)$$

Representando graficamente o inverso do rendimento observado em função do inverso de μ , por regressão linear é possível extrapolar os valores do coeficiente de manutenção e rendimento intrínseco. As figuras 3.47 e 3.48 apresentam esta variação.

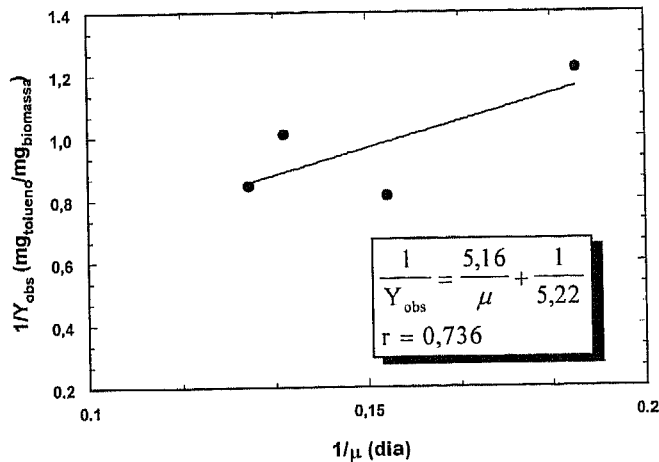


Figura 3.47 - Inverso do rendimento biológico observado *versus* inverso da velocidade específica de crescimento para $Q_{gás} = 5,6$ l/min.

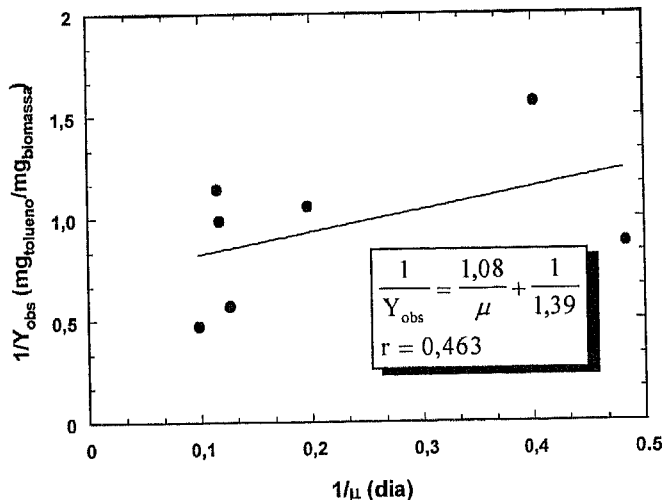


Figura 3.48 - Inverso do rendimento biológico observado *versus* inverso da velocidade específica de crescimento para $Q_{gás} = 10,5$ l/min.

As figuras 3.47 e 3.48 apresentam uma grande dispersão nos resultados obtidos, pelo que por linearização obtém-se coeficientes de correlação muito reduzidos. Na figura 3.48, foi necessário desprezar os valores correspondentes aos ensaios apresentados nas figuras 3.31 e 3.32 para que se obtivesse uma ordenada na origem positiva, contudo o rendimento intrínseco apresenta-se muito superior a $1,7 \text{ mg}_{biomassa}/\text{mg}_{tolueno}$, o que é inadmissível. Na figura 3.48, embora por linearização se obtenha um rendimento intrínseco admissível, o baixo coeficiente de correlação torna pouco credível, qualquer conclusão tirada. Este grande afastamento entre valores obtidos e os valores teoricamente esperados, poderá

estar associado ao facto de, na verdade, durante o período de crescimento exponencial, existir uma variação de concentração de tolueno na fase líquida, e como tal o consumo de tolueno, não corresponder à variação de tolueno na corrente gasosa. Por outro lado esta determinação está afectada de um elevado erro, e como tal seria necessário conduzir mais ensaios que permitam fundamentar melhor as conclusões.

As figuras 3.49 a 3.51 procuram ilustrar a variação do pH com o tempo, em alguns dos ensaios realizados. Na verdade, este parâmetro constitui um indicador indirecto da actividade biológica, isto é, se há um decréscimo no valor do pH, significa que durante o metabolismo as bactérias estão a produzir substâncias ácidas, dióxido de carbono e, eventualmente, intermediários ácidos, como resultado da degradação do tolueno. Em cada uma das figuras, está representada simultaneamente a evolução da quantidade de biomassa com o tempo, para fundamentar melhor as conclusões tiradas.

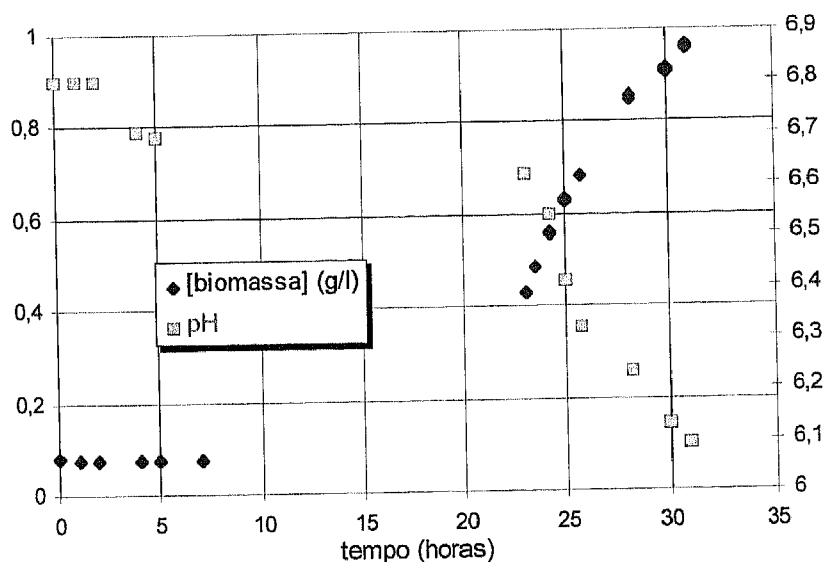


Figura 3.49 - Variação da concentração de biomassa e do pH com o tempo, no ensaio apresentado na figura 3.11.

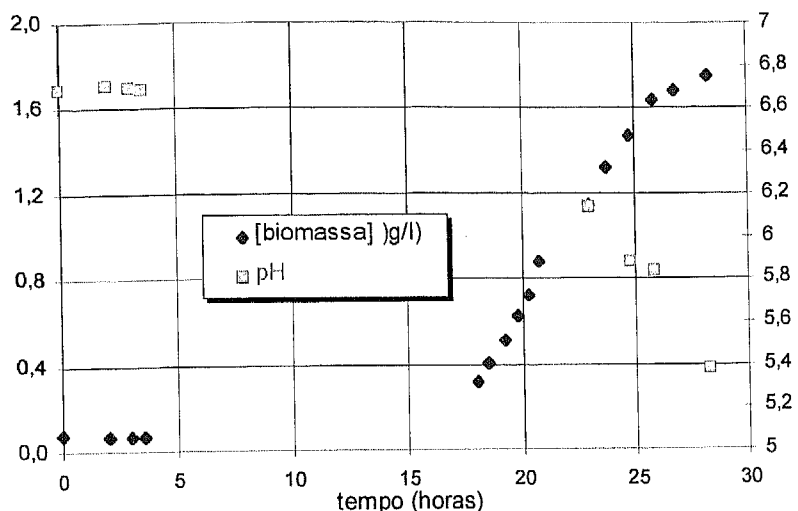


Figura 3.50 - Variação da concentração de biomassa e do pH com o tempo, no ensaio apresentado na figura 3.18.

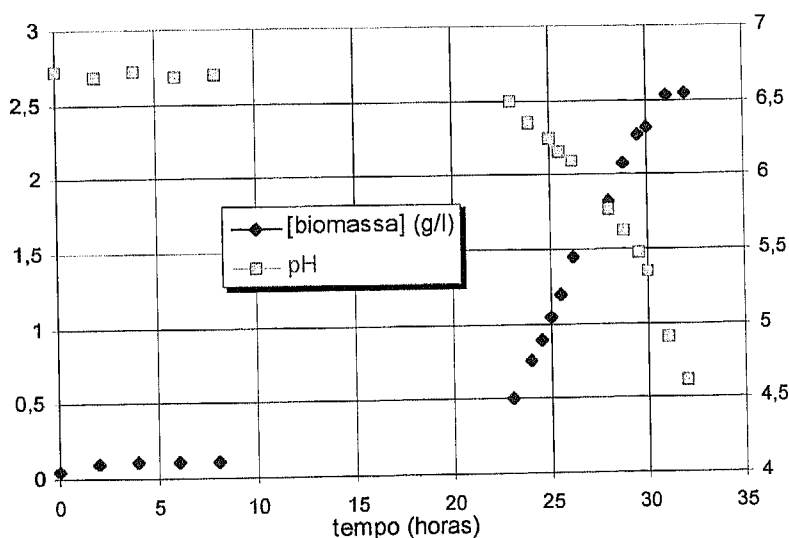


Figura 3.51 - Variação da concentração de biomassa e do pH com o tempo, no ensaio apresentado na figura 3.21.

Verifica-se, pelas figuras anteriores, que de facto existe uma relação inversa entre a variação do pH e variação da concentração de biomassa. Durante o período de aclimação, na qual as bactérias praticamente não consomem tolueno, o pH mantém-se inalterável. Quando as bactérias crescem exponencialmente, o pH decresce também exponencialmente, sendo o decréscimo um indicador indirecto da actividade microbiológica. A análise das figuras anteriores permite também afirmar que o decréscimo de pH é tanto mais acentuado quanto maior é a concentração de tolueno presente na suspensão bacteriana, o que reforça a ideia de que o seu valor está directamente relacionado com a biodegradação do tolueno.

3.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS COM BIOMASSA FIXA

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos ao longo da operação do leito percolador, durante as diferentes fases de arranque que foram levadas a cabo, no sentido de otimizar as condições de operação do reactor.

3.2.1 Condições operatórias

1ª Fase de arranque

Nesta fase, o leito arrancou com as seguintes condições iniciais:

- **Volume de solução mineral esterilizada = 7,5 litros**
- **Volume de suspensão bacteriana de *Pseudomonas putida* previamente adaptadas ao tolueno = 2 litros**
- **Temperatura = 28 °C**
- **pH = 6,63**
- **Concentração de tolueno no gás de entrada = $1,818 \pm 0,129$ mg/l**
- **Carga de tolueno à entrada do reactor = $44,2 \text{ g}/(\text{m}_{\text{leito}})^3 \text{ h}$**
- **Concentração de biomassa em suspensão = 0,25 g/l**
- **Caudal de circulação da fase líquida = 1,6 l/min**
- **Caudal de circulação da fase gasosa = 9,5 l/min**

Durante esta fase, o controlo do reactor resumiu-se ao estudo da adesão das células e monitorização do desenvolvimento do biofilme ao longo do tempo.

É de salientar que, embora se tenha determinado diariamente a concentração de células presentes em suspensão, optou-se por não apresentar os valores obtidos por várias razões. Por um lado, o facto de se adicionar periodicamente solução

mineral fresca para satisfazer as necessidades nutricionais dos microrganismos levava a uma diluição da suspensão microbiana. Por outro lado, tendo-se detectado a constante presença de protozoários e sendo estes bacteriófagos, conduziam a um decréscimo significativo das bactérias presentes. Perante estes resultados, não foi possível tirar qualquer conclusão relativa ao crescimento da biomassa em suspensão.

2ª Fase de arranque

Na segunda fase de arranque procurou partir-se de condições praticamente idênticas às da primeira, nomeadamente o caudal de circulação da corrente gasosa e líquida, o pH da solução, com a única diferença de se ter partido de um inóculo mais concentrado em biomassa e uma concentração de tolueno na corrente de entrada ligeiramente inferior. O arranque do leito percolador decorreu com as seguintes condições iniciais:

- **Volume de solução mineral esterilizada = 4 litros**
- **Volume de suspensão bacteriana de *Pseudomonas putida* previamente adaptadas ao tolueno = 2 litros**
- **Temperatura = 28 °C**
- **pH = 6,2**
- **Concentração de tolueno no gás de entrada = $1,67 \pm 0,101$ mg/l**
- **Carga de tolueno à entrada do reactor = $34,8 \text{ g}/(m_{\text{leito}})^3 \text{ h}$**
- **Concentração de biomassa em suspensão = 0,7 g/l**
- **Caudal de circulação da fase líquida = 1,6 l/min**
- **Caudal de circulação da fase gasosa = 9,5 l/min**

Numa primeira etapa, o controlo do reactor centralizou-se na verificação da adesão das células ao suporte do enchimento e na monitorização periódica do crescimento da biomassa em suspensão por análise da sua concentração, como indicador da viabilidade das células e do seu grau de adaptação às novas

condições de operação. Durante esta primeira etapa, foi também analisada a concentração de tolueno que estava a ser alimentada diariamente ao reactor, que se procurou manter constante e igual à inicial, bem como a concentração de tolueno à saída do reactor, para que se pudesse estabelecer uma base de comparação com os resultados obtidos nos dias posteriores.

Na segunda etapa, tendo-se verificado a adesão das células ao enchimento, quantificou-se a acumulação do biofilme no decorrer do tempo. Ao fim de 15 dias, quando se constatou uma formação significativa de biofilme, procedeu-se a uma avaliação da eficiência de remoção e da capacidade de eliminação do tolueno. Para tal fez-se variar os caudais da corrente gasosa que atravessa o leito entre 9,5 e 36 l/min, fixando-se o caudal de circulação da suspensão bacteriana. Para cada caudal de ar, realizaram-se ensaios em que se variou unicamente a concentração de tolueno alimentada ao reactor, entre aproximadamente 0,5 e 2 mg/l. Em cada ensaio foi medida a concentração de tolueno à entrada e saída do reactor. A queda de pressão no leito foi também monitorizada diariamente, não tendo excedido 7 mmH₂O.

3.2.2 Estudo da acumulação do biofilme

1ª Fase de arranque

A quantidade de biomassa aderida aos anéis do enchimento foi determinada pelo procedimento apresentado no ponto 2.4, tendo-se para tal recolhido amostras periódicas de anéis de três pontos de amostragem, colocados a diferentes alturas da coluna (Base = 11 cm, Meio = 37 cm, Topo = 64 cm). A figura 3.52 apresenta a evolução da biomassa aderida ao longo do tempo de operação.

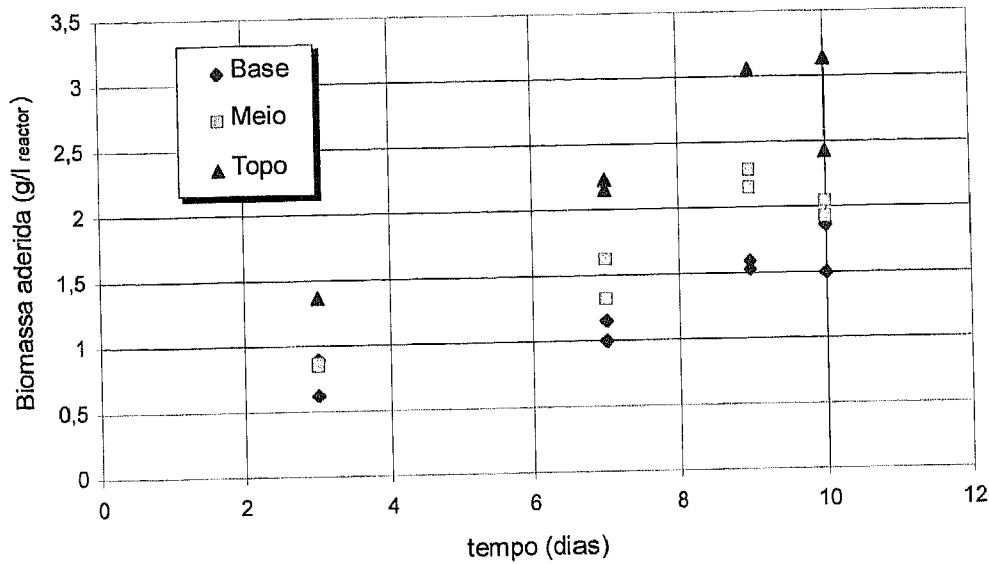


Figura 3.52 - Evolução temporal da concentração de biomassa aderida aos anéis do enchimento no leito percolador, em três posições distintas.

Analisando a figura 3.52, verifica-se que a concentração de biomassa aderida aos anéis aumenta com o tempo de forma quase linear durante a primeira semana de operação. Ao fim de um dia, já é visível a formação de uma camada de biofilme condicionante. Durante esta fase inicial de operação, a massa de células fixas ao suporte é superior no topo da coluna e decresce ao longo da coluna até a base. Tal perfil deve-se ao facto de, durante este período, o crescimento das células aderidas resultar essencialmente do transporte das células em suspensão para a superfície do suporte. Uma vez que a alimentação da fase líquida à coluna se faz pelo topo, haverá uma maior fixação neste local.

Ao fim de uma semana verificou-se a existência de uma contaminação de fungos em larga extensão, que se fixaram nos anéis do enchimento. Como tal parou-se a operação, desmontou-se a coluna e procedeu-se a uma lavagem e desinfecção cuidadosa de toda a instalação com hipoclorito.

2ª Fase de arranque

Neste período de operação, determinou-se também a concentração de biomassa aderida aos anéis do enchimento no decorrer do tempo (figura 3.53).

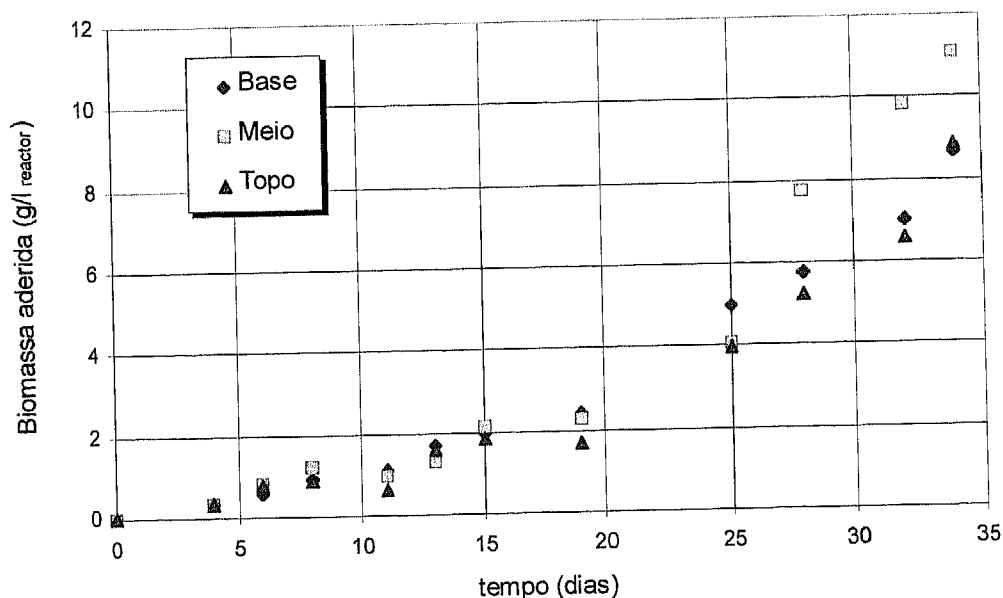


Figura 3.53 - Evolução temporal da concentração de biomassa aderida aos anéis do enchimento no leito percolador, em três posições distintas.

Nesta fase de arranque o aumento da concentração de biomassa aderida aos anéis é mais lento relativamente à primeira fase de arranque, cerca de duas vezes mais lento para obter a mesma massa de células aderidas. A partir do vigésimo dia constata-se uma mais rápida acumulação da biomassa nos anéis do enchimento. Durante os primeiros vinte dias a quantidade de biomassa aderida nos diferentes pontos da coluna é praticamente a mesma, não sendo visível um gradiente, tal como aconteceu na primeira fase de arranque. Crê-se que esta diferença observada nos resultados obtidos, deve-se essencialmente à presença de protozoários que foi detectada por observação ao microscópio, o que impediu o esperado desenvolvimento de biofilme. Por outro lado, o facto de se ter arrancado com uma concentração de tolueno mais reduzida na corrente de entrada poderá ter contribuído para um desenvolvimento de biofilme mais lento.

Ao fim de 10 dias verificou-se novamente o desenvolvimento de fungos, que foram proliferando lentamente ao longo do tempo, tendo estes aderido aos anéis do suporte e contribuído para a acumulação de biomassa no enchimento. Por observação ao microscópio, constatou-se também a existência de protozoários e de leveduras aderidos aos anéis. Contudo verificou-se que, apesar da existência desta heterogeneidade de microrganismos, o reactor continuava a ser eficiente na remoção do tolueno. Sendo assim, optou-se por continuar a operação do reactor e verificar qual a influência destes microrganismos na sua *performance*. Como tal, todos os resultados apresentados posteriormente referem-se à eficiência do reactor na remoção de tolueno, utilizando uma cultura heterogénea de microrganismos, sendo estes maioritariamente bactérias do género *Pseudomonas*.

3.2.3 Características do biofilme

Neste capítulo apresentam-se algumas das características principais do biofilme, nomeadamente percentagem de humidade, espessura (L_f), massa específica do biofilme (ρ_f), concentração de biomassa no biofilme (X_f), porosidade do leito com biofilme (ε_f) e concentração de biomassa no reactor (X_r).

Após o desenvolvimento do filme biológico e atingido o estado pseudo-estacionário, ao fim de 4 semanas de operação procedeu-se a uma caracterização do biofilme. A figura 3.54 apresenta uma imagem pormenorizada de uma fracção do enchimento neste período.



Figura 3.54 - Aspecto da enchimento com biofilme.

A figura 3.55 permite visualizar com pormenor o filme biológico num anel do enchimento, em duas perspectivas.

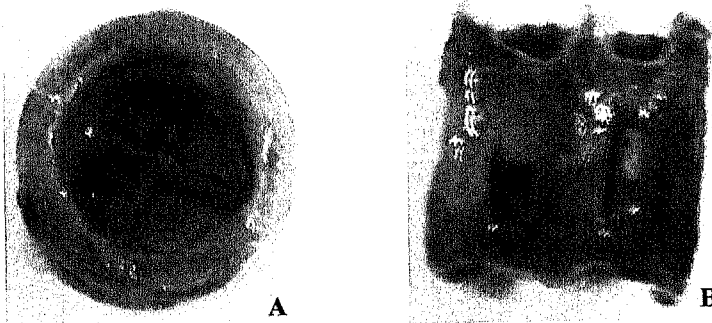


Figura 3.55 - Imagem do anel do enchimento vista da topo (A) e de lado (B).

Humidade

A tabela 3.2 apresenta os valores da biomassa húmida ($M_{\text{húmida}}$) e seca (M_{seca}) e respectiva humidade do biofilme no enchimento.

Tabela 3.2 - Biomassa húmida e seca, e humidade no biofilme de cada anel, em três posições distintas da coluna.

| Tempo (dias) | Local | $M_{\text{húmida}}$ (mg) | M_{seca} (mg) | Humidade (%) |
|--------------|-------|--------------------------|------------------------|--------------|
| 25 | BASE | 475,5 | 38,6 | 91,9 |
| | MEIO | 490,5 | 34,1 | 93,0 |
| | TOPO | 459,0 | 32,8 | 92,9 |
| 27 | BASE | 455,0 | 38,8 | 91,5 |
| | MEIO | 348,8 | 33,4 | 90,4 |
| | TOPO | 582,1 | 47,8 | 91,9 |

Espessura do biofilme

A espessura do biofilme (L_f) foi estimada por dois métodos aproximados.

1º Método

O primeiro método consistiu em sobrepor duas imagens, uma de um anel sem biofilme com dimensões conhecidas, sobre a imagem do mesmo anel com biofilme na mesma escala. Através de uma régua graduada em 0,1 mm, foi possível estimar uma espessura média. A figura 3.56 apresenta as dimensões do anel sem biofilme, lidas através de uma craveira.

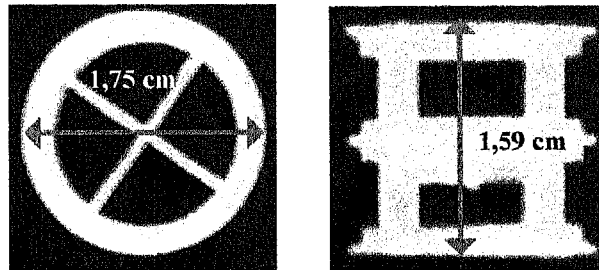


Figura 3.56 - Dimensões do anel sem biofilme.

A figura 3.57 permite visualizar o procedimento utilizado para estimar a espessura do biofilme:

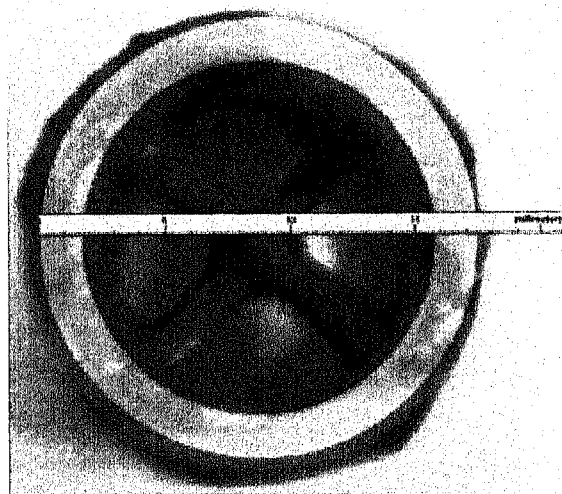


Figura 3.57 - Metodologia para determinação da espessura do biofilme numa partícula do enchimento.

Pode-se assim estimar que, o biofilme apresenta uma espessura média em cada anel de **500 μm** . Tal como se pode verificar na figura 3.55, o biofilme distribui-se de forma heterogénea ao longo de toda a superfície externa do anel, havendo zonas na qual L_f é maior, nomeadamente na zona interna do anel e outras zonas onde praticamente não existe biofilme. Como tal, o valor de L_f é uma média obtida a partir de valores aproximados medidos em dois pontos de cada anel. O procedimento repetiu-se em três anéis recolhidos na base, meio e topo da coluna, tendo-se obtido valores idênticos.

2ª Método

O segundo método para determinar a espessura de biofilme, consistiu em estimar o volume de biofilme (V_f) através do seguinte procedimento:

1. Recolheram-se 15 anéis de cada um dos pontos de amostragem do leito percolador, e mergulharam-se numa proveta contendo um dado volume de água conhecido.
2. Registou-se o volume de água deslocado, que corresponde ao volume total dos anéis com biofilme.
3. Lavou-se cada um dos anéis, secou-se e repetiu-se o procedimento 1. e 2., sendo o volume de água deslocado nestas condições o volume total dos anéis sem biofilme.
4. O volume de biofilme contido em cada anel é calculado pela diferença entre o valor obtido no ponto 2 e 3 a dividir pelo número total de anéis.

Aplicando a equação 3.3 obtém-se um valor aproximado para L_f :

$$V_f = L_f \times A_s \quad (3.3)$$

É de salientar que neste procedimento adoptou-se o pressuposto, de que o biofilme se distribui igualmente por toda a superfície externa do anel, e que, quando o biofilme se desenvolve, os anéis no enchimento deslocam-se de forma a permitir a sua fixação nos pontos de contacto entre os mesmos.

Seguindo esta metodologia, registou-se um volume médio de cada anel com biofilme de 1,591 cm³ e sem biofilme de 0,568 cm³. Sabendo que A_s =17,81 cm²/anel (2.3.1) então:

$$V_f = 1,023 \text{ cm}^3$$

$$L_f = 575 \text{ }\mu\text{m}$$

Dado que, o valor da espessura de biofilme obtido em cada um dos métodos é aproximadamente igual, optou-se por atribuir uma espessura média resultante dos dois métodos para os cálculos posteriores, nomeadamente **540 μm**.

Massa específica e concentração de biomassa no biofilme

Definindo massa específica do biofilme húmido ρ_f , como

$$\rho_f = \frac{M_{\text{humida}}}{V_f} \tag{3.4}$$

e calculando um volume de biofilme médio pela equação 3.3 obtêm-se os seguintes valores:

$$M_{\text{humida(média)}} = 475,0 \text{ mg/anel}$$

$$V_{f(\text{médio})} = 0,962 \text{ cm}^3 \text{ (1)}$$

$$\rho_f = 493,8 \text{ mg/cm}^3 \text{ (1)}$$

$$V_{f(\text{médio})} = 1,023 \text{ cm}^3 \text{ (2)}$$

$$\rho_f = 464,3 \text{ mg/cm}^3 \text{ (2)}$$

(1) Utilizando o valor de espessura média de 540 μm.

(2) Utilizando o valor de volume de biofilme obtido através do 2º método.

Por sua vez, a concentração de biomassa no biofilme, que não é nada mais do que a massa específica seca do biofilme, é calculada pela seguinte expressão:

$$X_f = \frac{M_{\text{seca}}}{V_f} \tag{3.5}$$

pelo que,

$$M_{\text{seca(média)}} = 35,2 \text{ mg/anel}$$

$$X_f = 35,6 \text{ mg/cm}^3 \text{ (1)} \quad X_r = 34,4 \text{ mg/cm}^3 \text{ (2)}$$

Porosidade e concentração de biomassa no reactor

A porosidade do leito com biofilme foi estimada pelo mesmo método que se determinou a porosidade do leito sem biofilme mencionado no ponto 2.4, tendo-se obtido $\varepsilon_f = 0,65$.

A concentração de biomassa no reactor (X_r), é determinada pela equação 1.21, sabendo que a porosidade do leito sem biofilme, $\varepsilon = 0,91$,

$$X_r = 9,3 \text{ mg/cm}^3 \text{ (1)} \quad X_r = 8,9 \text{ mg/cm}^3 \text{ (2)}$$

Verifica-se assim que, seguindo cada um dos métodos, os valores obtidos para os diferentes parâmetros são bastante próximos.

3.2.4 Eficiência de remoção do tolueno

Todos os resultados apresentados neste capítulo referem-se à segunda fase de arranque do leito percolador.

Para cada caudal de corrente gasosa, calculou-se a percentagem de remoção (% Remoção) para as diferentes concentrações de tolueno testadas, tendo-se traçado o gráfico que relaciona % Remoção com a carga de tolueno (C) afluente ao reactor (Anexo E.1). Ajustou-se os valores obtidos a uma função exponencial, apresentada no Anexo E.1. A tabela 3.4 apresenta as equações das curvas de

ajuste, para cada um dos caudais analisados, sendo válidos entre os limites inferiores de aplicabilidade citados na tabela 3.3 e as cargas máximas de tolueno ensaiadas.

Tabela 3.3 - Funções de ajuste às curvas de % Remoção versus C de tolueno.

| $Q_{\text{gás}}$ (l/min) | Função exponencial | Limite de aplicabilidade | Coefficiente de correlação |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 9,5 | % Remoção = $114,9e^{-0,011C}$ | $C \geq 12,6 \text{ g/m}^3\text{h}$ | 0,889 |
| 13,5 | % Remoção = $125,7e^{-0,020C}$ | $C \geq 12,4 \text{ g/m}^3\text{h}$ | 0,921 |
| 19,0 | % Remoção = $109,7e^{-0,011C}$ | $C \geq 8,4 \text{ g/m}^3\text{h}$ | 0,951 |
| 24,8 | % Remoção = $108,7e^{-0,010C}$ | $C \geq 8,4 \text{ g/m}^3\text{h}$ | 0,929 |
| 31,0 | % Remoção = $105,3e^{-0,007C}$ | $C \geq 7,4 \text{ g/m}^3\text{h}$ | 0,911 |
| 36,0 | % Remoção = $113,3e^{-0,007C}$ | $C \geq 17,8 \text{ g/m}^3\text{h}$ | 0,971 |

As figuras 3.58 e 3.59 mostram a variação da percentagem de remoção do tolueno com a carga e concentração de tolueno afluyente ao leito percolador, para cada um dos caudais da corrente de gás testados.

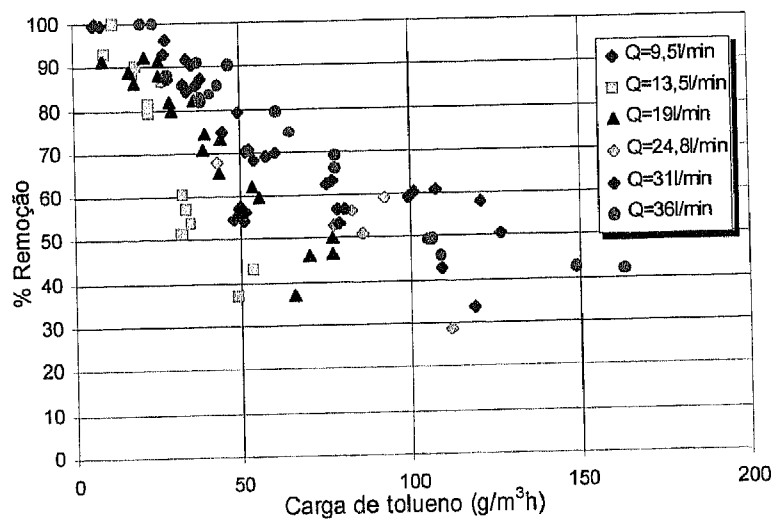


Figura 3.58 - Percentagem de remoção de tolueno versus carga de tolueno à entrada do reactor, para diferentes caudais de gás.

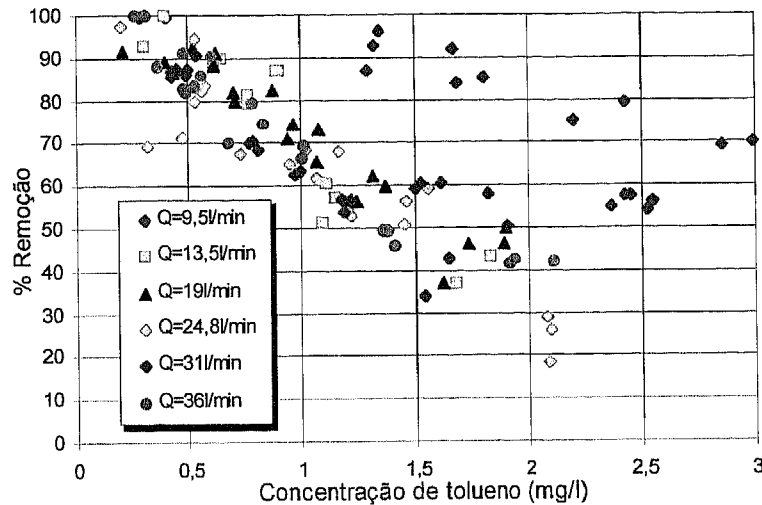


Figura 3.59 - Percentagem de remoção de tolueno *versus* concentração de tolueno à entrada do reator, para diferentes caudais de gás.

A análise das figuras 3.58 e 3.59 revela, claramente, que a percentagem de remoção do tolueno decresce com a carga e concentração de tolueno afluyente ao leito percolador. A figura 3.59 mostra que para uma gama de caudais entre 13,5 a 36,0 l/min a variação da percentagem de remoção de tolueno é praticamente independente do caudal da corrente gasosa.

Estudos realizados por Bibeau *et al*, (1997), em condições similares, revelaram a existência de duas regiões distintas dependentes da concentração de tolueno no gás de entrada. Uma primeira região, para concentrações de tolueno inferiores a 2,2 mg/l, na qual a taxa de conversão é uma função decrescente da concentração de tolueno afluyente ao reator, pelo que no biofilme ocorrem limitações difusionais. Uma segunda região, para concentrações de tolueno superiores a 2,5 mg/l, na qual a taxa de conversão é praticamente independente da concentração de tolueno, pelo que no biofilme domina o regime reactivo. Os resultados experimentais obtidos no presente trabalho mostram-se concordantes com esta teoria, embora não seja tão evidente a 2ª região devendo-se para tal conduzir ensaios com concentrações de tolueno mais elevadas, para fundamentar melhor estas conclusões. Contudo, poderá estabelecer-se que, nas condições operadas, a conversão do tolueno no biofilme é controlada pela velocidade de difusão, isto

é, existem limitações difusionais, pelo que nem toda a espessura do biofilme se encontra activa.

Na figura 3.58 verifica-se uma ligeira sobreposição dos perfis obtidos, embora não tão evidente, com excepção dos resultados para um $Q_{gás} = 13,5$ l/min. A tabela 3.4 revela também, que as curvas de ajuste apresentam equações muito semelhantes, com excepção dos ensaios conduzidos com $Q_{gás} = 13,5$ l/min. Para fundamentar melhor esta teoria, construiu-se a figura 3.60, na qual se estabeleceu um ajuste total de todos os resultados obtidos, independentemente do caudal, com excepção do ensaio realizado com um caudal de 13,5 l/min, pelas razões já mencionadas (figura 3.58).

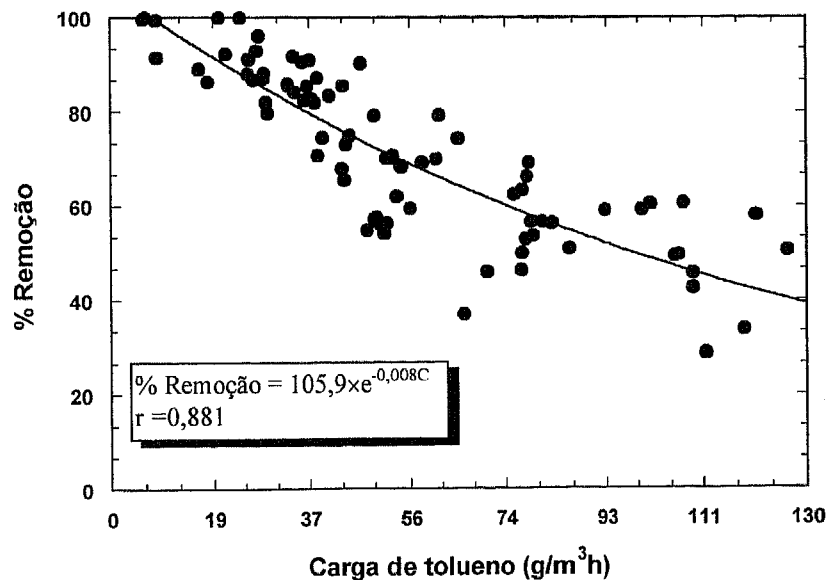


Figura 3.60 - Ajuste da percentagem de remoção de tolueno *versus* carga de tolueno a uma função do tipo exponencial.

Verifica-se na figura 3.60 uma grande dispersão nos valores obtidos, que se deve fundamentalmente a erros de análise e ao facto de se tratar de um ajuste de resultados correspondentes a caudais distintos. A equação apresentada na figura 3.60 é válida para $C \geq 7,2$ g/m^3h e inferior às cargas máximas testadas.

A figura 3.61 procura ilustrar em que medida a concentração de biomassa aderida nos anéis de enchimento, influencia a percentagem de remoção. Para tal construiu-se o gráfico com os dados relativos à fase de arranque com $Q_{\text{gás}} = 9,5$ l/min.

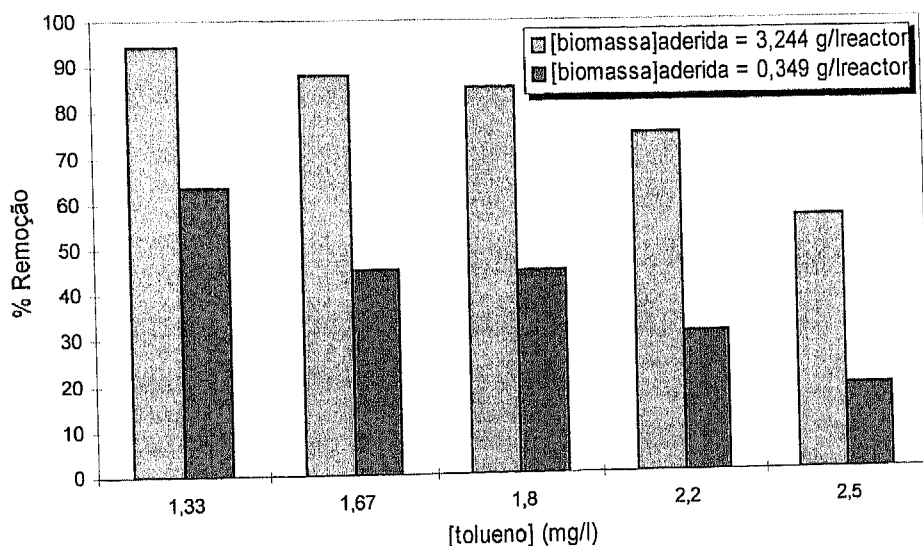


Figura 3.61 - Percentagem de remoção em função da concentração de tolueno alimentada ao reactor antes e depois da acumulação de biomassa.

Confirma-se assim, analisando a figura 3.61, que o aumento da quantidade de biomassa fixada no suporte contribui para uma maior eliminação do tolueno. Verifica-se também, que a conversão de tolueno diminui com o aumento da concentração de tolueno afluente ao reactor.

3.2.4 Capacidade de eliminação do tolueno

Segundo Bibeau *et al* (1991), a capacidade de eliminação (EC) representa um dos parâmetros mais importantes no dimensionamento de um leito percolador, na medida em que este relaciona a carga de tolueno à entrada com a sua eficiência de remoção. A equação 3.6 define a capacidade de eliminação.

$$EC = \frac{Q_{\text{gas}} \times (S_e - S_s)}{V} \quad (3.6)$$

sendo,

EC - Capacidade de eliminação, $\text{ML}^{-3}\text{T}^{-1}$

S_e - Concentração de tolueno afluente ao reactor, ML^{-3}

S_s - Concentração de tolueno à saída do reactor, ML^{-3}

V - Volume total da zona de enchimento, L^3

A variação da capacidade de eliminação com a carga de tolueno afluente ao reactor, foi ajustada à equação E.1, para cada um dos ensaios realizados com diferentes caudais da corrente gasosa (Anexo E.2). A tabela 3.4 apresenta as curvas de ajusta obtidas.

Tabela 3.4 - Funções de ajuste às curvas de EC *versus* C de tolueno.

| $Q_{\text{gás}}$ (l/min) | Função exponencial | Coefficiente de correlação |
|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 9,5 | $EC = 45,8(1 - e^{-0,027C})$ | 0,937 |
| 13,5 | $EC = 22,1(1 - e^{-0,075C})$ | 0,872 |
| 19,0 | $EC = 40,3(1 - e^{-0,031C})$ | 0,972 |
| 24,8 | $EC = 60,2(1 - e^{-0,016C})$ | 0,967 |
| 31,0 | $EC = 91,2(1 - e^{-0,010C})$ | 0,967 |
| 36,0 | $EC = 66,4(1 - e^{-0,018C})$ | 0,971 |

As figuras 3.62 e 3.63 apresentam a variação da capacidade de eliminação em função da carga e da concentração de tolueno afluente ao reactor, para os diferentes caudais da corrente gasosa testados.

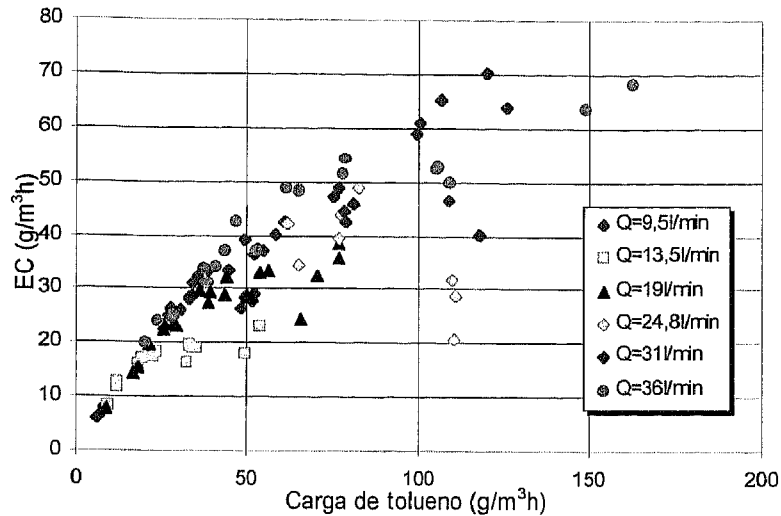


Figura 3.62 - Capacidade de eliminação *versus* carga de tolueno à entrada do reactor, para diferentes caudais de gás.

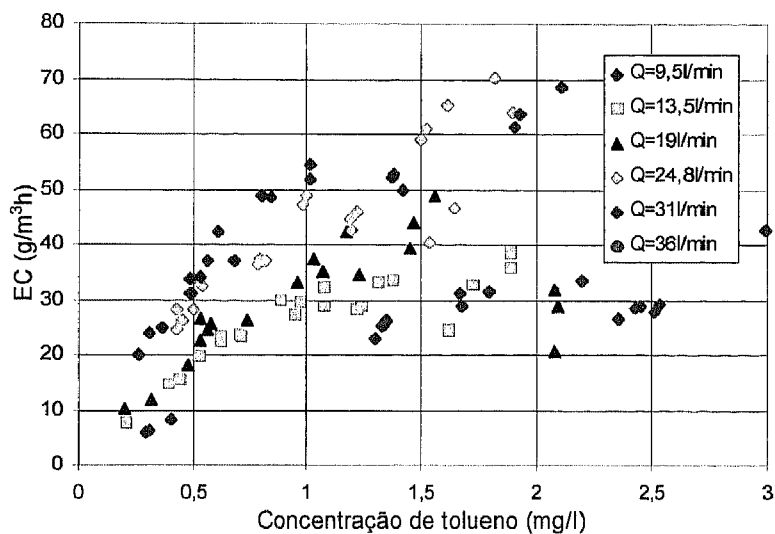


Figura 3.63 - Capacidade de eliminação *versus* concentração de tolueno à entrada do reactor para diferentes caudais de gás.

Analisando as figuras anteriores, constata-se que a capacidade de eliminação varia com a carga de tolueno afluyente ao reactor segundo uma função do tipo exponencial, isto é, aumenta com a carga de tolueno até um dado valor limite. Nas condições de trabalho adoptadas, a capacidade máxima atingida é da ordem dos 60-70 g/m³h para uma carga de tolueno superior a 120 g/m³h (figura 3.62).

Na figura 3.63 verifica-se que, a variação de EC com a concentração de tolueno depende do caudal da corrente gasosa, aumentando ligeiramente com o aumento do caudal. Contudo para uma gama de caudais entre 9,5 e 13,5 l/min esta dependência não é visível.

O mesmo não se verifica na figura 3.62, ilustrando que a evolução da EC em função da carga de tolueno praticamente não depende do caudal de gás, verificando-se mais uma vez que para um caudal de 13,5 l/min apresenta um perfil ligeiramente afastado do esperado. Perante estas observações, à semelhança da figura 3.60, ajustou-se todos os valores obtidos a uma função do tipo exponencial (equação E.1 do Anexo E.2), sendo o resultado apresentado na figura 3.64.

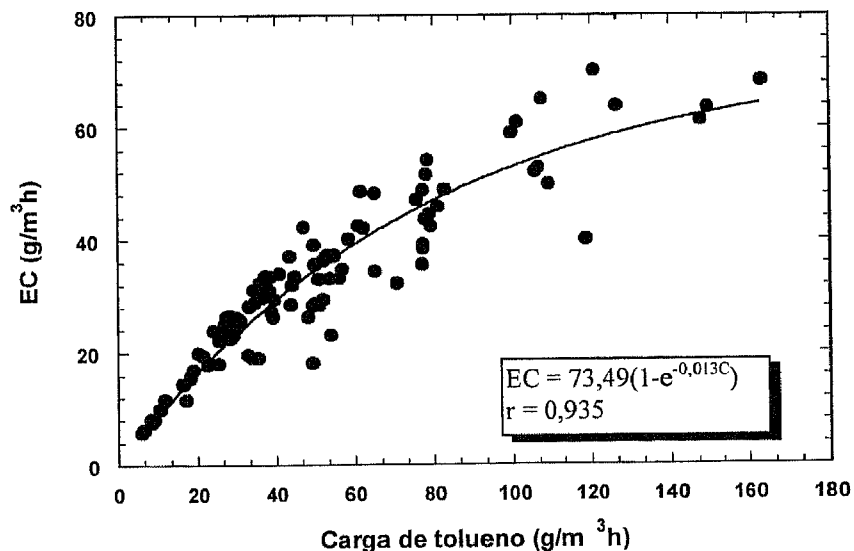


Figura 3.64 - Ajuste da EC em função da carga de tolueno.

Para o ajuste dos pontos, na figura anterior desprezaram-se os últimos três valores relativos ao ensaio conduzido com um caudal de corrente gasosa de 13,5 l/min, pois estes afastavam-se bastante do perfil esperado. A dispersão observada, resulta de erros de análise e do facto de para cargas de tolueno superiores a 40 g/m³h existir uma ligeira dependência de EC do caudal da corrente gasosa. A equação de ajuste obtida mostra que, para a gama de caudais

testados, a capacidade de eliminação aumenta com a carga de tolueno até um dado valor limite.

A degradação biológica do tolueno implica necessariamente a produção de dióxido de carbono (1.5.1), que este constitui um parâmetro fundamental para avaliar a actividade das bactérias. Periodicamente foi medido o pH da solução de nutrientes, verificando-se que este decrescia de 7-6 para 5 ao fim de cada 3 dias de operação, depois de se ter adicionado solução mineral fresca. Este decréscimo no valor de pH resulta da dissolução do dióxido de carbono produzido na solução, e, eventualmente, da mineralização incompleta da fonte de carbono, conduzindo a uma acumulação de ácidos orgânicos. A biomassa em suspensão contribui também para o processo global de oxidação, pois sempre que se adicionava solução mineral fresca, verificava-se ao fim de um dia um rápido aumento da sua concentração, sendo este acompanhado de uma diminuição do pH.

4 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

4.1 CONCLUSÕES

4.2 SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

4.1 CONCLUSÕES

Do trabalho realizado é possível concluir que a *Pseudomonas putida* (DSM 548) degrada biologicamente o tolueno presente numa corrente de ar, sendo, nas condições estudadas a única fonte de carbono e energia, mantendo-se activa mesmo em concentrações de tolueno elevadas.

Do estudo da cinética de crescimento da *P.putida* e de remoção de tolueno em reactor contínuo, com biomassa em suspensão, à temperatura de 28 °C e pH inicial entre 6,8 e 6,3, é possível extrair as seguintes conclusões:

- O crescimento das bactérias segue quatro fases distintas: fase de aclimação, fase de crescimento exponencial, fase estacionária e fase de decaimento.
- A fase de aclimação apresenta um período variável entre 7 e 25 horas.
- Para a gama de concentrações de tolueno estudadas (0,2 a 4,2 mg/l), na corrente gasosa de entrada, a velocidade específica de crescimento das bactérias aumenta com a concentração de tolueno presente na suspensão bacteriana até um dado valor limite, a partir da qual decresce, sendo o modelo cinético que se ajusta a esta evolução o modelo de Haldane. A equação de ajuste ao modelo de Haldane, conduz às seguintes expressões:

$$\mu = \frac{30 \times S}{3,17 + S + \frac{S^2}{1,77}}, \quad \text{para } Q_{\text{gás}} = 5,6 \text{ l/min,}$$

$$\mu = \frac{40 \times S}{7,64 + S + \frac{S^2}{2,83}}, \quad \text{para } Q_{\text{gás}} = 10,5 \text{ l/min.}$$

- A aplicação do modelo de Haldane aos dados experimentais permitiu concluir que:
 - o crescimento das bactérias é inibido pelo tolueno;
 - nos ensaios conduzidos com $Q_{\text{gás}} = 10,5$ l/min, as bactérias atingem uma velocidade específica máxima de crescimento superior relativamente aos ensaios conduzidos com caudal de gás inferior, bem como uma constante de saturação mais elevada;
 - a inibição pelo tolueno é menor para um caudal da corrente gasosa mais elevado;
 - a concentração de tolueno na fase líquida, para a qual μ atinge um valor máximo, é de 2,34 mg/l nos ensaios conduzidos com $Q_{\text{gás}} = 5,6$ l/min e 4,65 mg/l nos ensaios com $Q_{\text{gás}} = 10,5$ l/min.
- A concentração de tolueno no gás de saída segue as três fases de crescimento das bactérias. Mantém-se constante e igual ao valor inicial durante o período de aclimação, decresce exponencialmente durante a fase de crescimento exponencial e estabiliza na fase estacionária, o que demonstra que o tolueno transferido para o meio de cultura, foi efectivamente utilizado pelas bactérias e o restante é rapidamente removido da cultura pela corrente gasosa de saída.
- Durante o período de aclimação, para uma gama de concentrações de tolueno no gás de entrada entre 0,15 e 2 mg/l, existe uma relação directa entre a concentração de tolueno na fase líquida e a concentração de tolueno na corrente gasosa de entrada, pelo que este se distribui pelas duas fases numa razão de $0,499 \text{ mg}_{\text{tolueno(gás)}}/\text{mg}_{\text{tolueno(líq)}}$ para $Q_{\text{gás}} = 5,6$ l/min, e $0,442 \text{ mg}_{\text{tolueno(gás)}}/\text{mg}_{\text{tolueno(líq)}}$ para $Q_{\text{gás}} = 10,5$ l/min.
- Os resultados para o rendimento biológico observado indiciam um aumento com o aumento de concentração inicial de tolueno, até um dado valor limite. Registaram-se valores para o rendimento biológico observado, ligeiramente superiores (da ordem de $1,2 \text{ mg}_{\text{biomassa}}/\text{mg}_{\text{tolueno}}$) para $Q_{\text{gás}} = 5,6$ l/min

comparativamente aos obtidos para $Q_{\text{gás}} = 10,5$ l/min (da ordem de $1 \text{ mg}_{\text{biomassa}}/\text{mg}_{\text{tolueno}}$).

- A eficiência de remoção de tolueno atinge o seu valor máximo de 90 % nos ensaios conduzidos com concentrações de tolueno mais baixas, nomeadamente entre 0,2 a 0,4 mg/l para $Q_{\text{gás}} = 5,6$ l/min, verificando-se que diminui quando o caudal da corrente gasosa aumenta.
- Apesar de se ter tamponado o meio de cultura, a biodegradação do tolueno provoca um decréscimo no valor de pH, tanto maior quanto maior for a concentração inicial de substrato.

Do estudo da remoção de tolueno em reactor de biofilme, tipo leito percolador, ficou provado que este tipo de reactor tem um bom desempenho para a gama de caudais e concentrações de tolueno testadas. O conjunto de resultados experimentais permitiram tirar as seguintes conclusões.

- A *Pseudomonas putida* (DSM 548) é um microrganismo com boas características de adesão em polipropileno, sendo visível a formação de biofilme ao fim de três dias de operação.
- Ao fim de 4 semanas de operação, o biofilme possui uma boa percentagem de humidade (92 %), que oferece condições favoráveis para a actividade microbiana, apresentando, entre outras, características (médias) como:
 - espessura , $L_f = 540 \mu\text{m}$
 - volume médio, $V_{f(\text{médio})} = 0,993 \text{ cm}_{\text{biofilme}}^3/\text{anel}$
 - massa específica húmida, $\rho_f = 480 \text{ mg}/\text{cm}_{\text{biofilme}}^3$
 - massa específica seca, $X_f = 35,0 \text{ mg}/\text{cm}_{\text{biofilme}}^3$
 - porosidade do leito com biofilme, $\varepsilon_f \approx 0,65$
 - concentração de biomassa aderida no reactor, $X_r = 9,1 \text{ mg}/\text{cm}_{\text{leito}}^3$

- O tipo de enchimento utilizado permitiu garantir perdas de carga mínimas ao longo de todo o filtro, não excedendo os 7 mm H₂O, prevenindo deste modo a obstrução do filtro biológico resultante da formação de biomassa em excesso.
- Conseguem-se obter elevadas eficiências de remoção de tolueno, sobretudo para reduzidas concentrações de tolueno no efluente gasoso. Para concentrações de tolueno inferiores a 1mg/l obtém-se percentagens de remoção superiores a 60 %, atingindo o seu valor máximo entre 90 e 100 % para concentrações de tolueno inferiores a 0,5 mg/l.
- Para uma gama de caudais entre 13,5 e 36 l/min, a eficiência de remoção de tolueno decresce com o aumento da concentração de tolueno alimentada ao reactor, independentemente do caudal da corrente gasosa.
- Nas condições de operação a percentagem de remoção de tolueno varia com a carga de tolueno alimentada ao reactor (C), segundo uma função do tipo exponencial, para cargas de tolueno no gás de entrada superiores a 7 g/m³h:

$$\% \text{ Remoção} = 105,9e^{-0,008C}$$

- Na gama de concentrações de tolueno estudadas (inferiores a 2,2 mg/l no gás de entrada), a conversão de tolueno no biofilme é controlada por limitações difusionais.
- A capacidade de eliminação (EC), aumenta com a carga de tolueno até um dado valor limite. A função que traduz esta variação é a seguinte:

$$EC = 73,49(1 - e^{-0,013C})$$

A capacidade máxima de eliminação, na ordem dos 60 a 70 g_{tolueno}/m_{leito}³h, é atingida para cargas superiores a 120 g_{tolueno}/m_{leito}³h.

Resumindo e concluindo, poderá afirmar-se que o tolueno pode ser eliminado biologicamente de um efluente gasoso, utilizando para tal um leito percolador com recirculação total da solução de nutrientes, sendo as condições ótimas garantidas para uma gama de caudais da corrente gasosa entre 9,5 e 36 l/min e concentrações de tolueno no gás de entrada inferiores a 0,5 mg/l. A manutenção das concentrações de saída abaixo dos 55 mg/m³, exigidas pela legislação (capítulo 1.2), é conseguida para concentrações de entrada abaixo de 400 mg/m³, para a gama de caudais estudados.

4.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

São ainda inúmeras as actividades a desenvolver no campo experimental. Sugerem-se os seguintes pontos como possibilidades para se obter mais informação:

- Monitorização da concentração de dióxido de carbono na corrente gasosa de saída e na fase líquida, como medida indirecta da actividade microbiológica.
- Monitorização do consumo de alguns nutrientes como, azoto, fósforo e COT na solução de nutrientes.
- Caracterização química, microbiológica e microscópica do biofilme, numa perspectiva de classificação do tipo de biofilme e respectiva estrutura.
- Determinação da actividade do biofilme em diferentes locais do filtro biológico.
- Estudo da eficiência do reactor na remoção de substrato para caudais de efluente gasoso superiores aos utilizados no presente estudo, visto que como se pode verificar nas conclusões apresentadas, este parâmetro não influenciou significativamente na eficiência do reactor na gama analisada.
- Aplicação de um modelo matemático para descrever a biodegradação de tolueno em reactor contínuo, com biomassa em suspensão e em reactor de biomassa fixa, tipo leito percolador.
- Possibilidade de utilização de outros microrganismos para a remoção de tolueno, por exemplo, uma cultura de fungos.
- Por último, numa fase avançada, um estudo económico que, provavelmente, poderá fundamentar as perspectivas promissoras de utilização deste processo à escala industrial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, C. e Suidan, M. T., "Dynamic Mathematical Model for the Biodegradation of VOCs in a Biofilter: Biomass Accumulation", *Environmental Science & Technology*, **32**, 20, 1998, 3118-3123.

Alonso, C., Suidan, M. T., Sorial, G. A. e Brenner, R. C., "Gas Treatment in Trickle-Bed Biofilters: Biomass, How Much Is Enough?", *Biotechnology and Bioengineering*, **54**, 6, 1996, 583-590.

Barley e Barbour, "Meta Cleavage and Gentisate Pathways", *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds*, **13**, 1984, 256-268.

Bideau, L., Kiared, K., Leraux, A., Brzezinski, R., Viel, G. e Heitz, M., "Biological Purification of Exhaust Air Containing Toluene Vapor in a Filter-bed Reactor", *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **75**, 1997, 921-929.

Boaventura, R. R., Apontamentos da disciplina de Tratamento Biológico de Efluentes Líquidos, Mestrado em Engenharia do Ambiente, FEUP, 1996.

Boaventura, R. R., Desnitrificação biológica em reactores de biomassa fixa, Tese de Doutoramento, FEUP, 1986, 20-50.

Characklis, W. G. e Cooksey, K. E., "Biofilms and microbial fouling", M Laskin (ed.) *Applied Microbiology*, **29**, Academic Press, New York, 1983, 83-138.

Charles e Fewson, "Biodegradation of Aromatics with Industrial Relevance", *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds*, Academic Press, 1981, 146-160.

- Cherry, R. S. e Thompson, D. N., "Shift from Growth to Nutrient-Limited Maintenance Kinetics during Biofilter Acclimation", *Biotechnology and Bioengineering*, **56**, 6, 1997, 331-338.
- Choi, Y. B., Lee, J. Y. e Kim, H. S., "A Novel Bioreactor for the Biodegradation of Inhibitory Aromatic Solvents: Experimental Results and Mathematical Analysis", *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 6, 1992, 1403-1411.
- Christensen, B. E. e Characklis, W.G., "Physical and chemical properties at biofilms", W. G. Characklis and K. C. Marshall (eds.) *Biofilms*, Wiley-Interscience, New York, 1990, 93-130.
- Claus, D. e Walker, N., *J. gen. Microbiol.*, **36**, 1964, 107-122.
- D'Adame, P. D. e Rozich, A. F., "Analysis of Growth Data with Inhibitory Carbon Sources", *Biotechnology Bioengineering*, **26**, 1984, 397-402.
- Dagley, S., "The Bacteria", Academic Press, London and New York, Ornston, L. N. e Sokatch, J. R., (eds), **6**, 1978, 302-388.
- Gibson e Subramanian, "Degradation of Aromatic Hydrocarbons", *Microbial Degradation of Organic Compounds*, **13**, 1984, 182-218.
- Gray, P. H. H., Thorton, *Zentralbl. Bakteriol.*, **2**, 1928, 73-74.
- Hayaishi, O., "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation", Academic Press, New York and London, 1974.
- Houghton, J. E., Shanley, M., "Catabolic Potential of Pseudomonads: A regulatory perspective", *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*, 1^a ed., Chapman & Hall Publ., 1994, 11-20.

Kent, C. A., "Biological Fouling: Basic Science and Models", Fouling Science and Technology, Melo, L. F. *et al* (eds), Kluwer Academic Publ., 1988, 207-222.

Kirchner, K., Gossen, C. A. e Rehm H. J., "Purification of exhaust air containing organic pollutants in a trickle-bed bioreactor", Applied Microbiology Biotechnology, **35**, 1991, 396-400.

Kitagawa, M., J. Biochem., **43**, 1956, 553-563.

Krieg, N. R. e Holt, Y. G., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, **1**, 1984.

Leson, G., Winer, A. e Hadge, " Application of Biofiltration to the control of Air Toxics and other VOC Emissions", Proc. Ann. Meet. Air & Waste Management Associations, 84 th Annual Meeting & Exhibitions, 1991, 1-11.

Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R., Canadian Journal Microbiology, **17**, 1971, 1413-1416.

Mendez, R. e Lema, J. M., "Biofilm Reactors Technology in Wastewater Treatment", Biofilms: Science and Technology, Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville (eds.), Kluwer Academic Publ., 1992.

Mirpuri, R., Jones, W. e Bryers, J. D., "Toluene Degradation Kinetics for Planktonic and Biofilm-Grown Cells of *Pseudomonas putida* 54 G", Biotechnology and Bioengineering, **53**, 6, 1997, 535-546.

Nozaka, J. e Kusunose, M., Agric. Biol. Chem., 1969, **33**, 962-964.

Ottengraf, S. P. P., "Biological systems for waste gas elimination", Tibeck, **5**, 1987, 132-136.

Ottengraf, S. P. P. e Van Den Oever, A. P. P., "Kinetics of Organic Compound Removal from Waste Gases with a Biological Filter", *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 6, 1993, 3089-3102.

Peixoto, J. M., "Remoção de aromáticos numa corrente gasosa usando um filtro percolador", Tese de Mestrado em Tecnologia do Ambiente, U. Minho, Braga, 1995.

Post, F. S., Magdaliniuk, J. C., Block, J. C., "Influence of Type of Culture on the Kinetics of Xenobiotic Biodegradation", Nato Advance Study Institute, Alvor, Portugal, 1992.

Ramalho, E., Comunicação pessoal, 1999.

Roques, H., *Fondements Théoriques du Traitement Biologique des Eaux, Technique et documentation*, 12^a ed., Technique et documentation, 1, 1980.

Sá, C. S. A., "Degradação biológica de fenol num leito percolador com bactérias imobilizadas num suporte de poros largos", Tese de Mestrado em Tecnologia do Ambiente, U. Minho, Braga, 1998.

Schondüre, P., Sára, M. e Friedl, A., "Influence of physiologically relevant parameters on biomass formation in a trickle-bed bioreactor used for waste gas cleaning", *Applied Microbiology Biotechnology*, **45**, 1996, 286-292.

Shareefdeen, Z. e Baltzis, B. C., "Biofiltration of toluene vapor under steady-state and transient conditions: theory and experimental results", *Chemical Engineering Science*, **49**, 24, 1995, 4347-4360.

Shreve, G. S., Olsen, R. H. e Vogel, T. M., "Development of Pure Culture Biofilms of *P. putida* on Solid Supports", *Biotechnology and Bioengineering*, **37**, 1991, 512-518.

Stanier, R. Y. e Ornston, L. N., *Adv. Microb. Physiol.*, **9**, 1973, 89-151.

Stormer, K., *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt.*, **2**, 1913, 37-595.

Veiga, M. C., Amor, L., Fraga, M., Vazquez, A. e Kennes, C., "Procesos Biotecnológicos para tratamiento de efluentes gaseosos", *Ingeniería Química*, 1998, 137-146.

Wagner, R., Z., *Garungsphysiol*, 1914, 4-289.

Weber, F. Y. e Hartmans, S., "Prevention of Clogging in a Biological Trickle-Bed Reactor Removing Toluene from Contaminated Air", *Biotechnology and Bioengineering*, **50**, 1996, 91-97.

Williams, P. A., *Microbial Degradation of Organic Compounds*, **11**, 1981.

Wübker, S. M., Laurenzis, A., Werner, U. e Friedrich, C., "Controlled Biomass Formation and Kinetics of Toluene Degradation in a Bioscrubber and in a Reactor with a Periodically Moved Trickle-Bed", *Biotechnology and Bioengineering*, **55**, 4, 1997, 686-292.

Internet 1, <http://www.csj.com.br/alunos/quimica/solventes.htm>, Setembro, 2000.

Internet 2, <http://www.gtz.de/uvp/publika/Spanish/Vol345.htm#Tolueno>, Agosto, 2000.

Internet 3, http://bigmac.civil.mtu.edu/public_html/classes.html, Setembro, 2000.

Internet 4, http://www.enviroaccess.ca/fiches_2/F2-04-96ba.html, Setembro, 2000.

Internet 5, <http://www.epa.gov/ttnvatw1/hlthef/toluene.html>, Maio, 2000.

Internet 6, http://europa.eu.int/eur-lex/pt/lift/dat/1999/pt_39910013.html, Maio, 2000.

ANEXOS

ANEXO A - ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS

DE *P.putida*

ANEXO B - CURVAS DE CALIBRAÇÃO

ANEXO C - COMPLEMENTOS DO CAPÍTULO 3.1

ANEXO D - COMPLEMENTOS DO CAPÍTULO 3.2

ANEXO E - CURVAS DE AJUSTE À REMOÇÃO DO TOLUENO

ANEXO F - RISCOS DE EXPOSIÇÃO A VAPORES DE TOLUENO

ANEXO G - LEGISLAÇÃO COMUNITÁRIA EM VIGOR

ANEXO A - ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS DE *P.putida*

Preparam-se *stocks* de bactérias da estirpe *Pseudomonas putida* previamente adaptada ao fenol e da estirpe não adaptada. As bactérias foram armazenadas em tubos de agar inclinados a 4°C e preservadas a -80°C em *ependorfs* com glicerol a 30 %. O procedimento seguido para a preparação das culturas *stock* de *Pseudomonas putida* teve em conta os passos apresentados nos pontos seguintes.

A.1 Preparação dos meios de cultura sólidos

1. Transferiu-se 200 ml de solução de macronutrientes e solução tampão (tabela 2.1) para um frasco Schott de 500 ml de tampa roscada e autoclavável.
2. Adicionou-se 4 g de agar, homogeneizou-se a solução e fundiu-se num banho a 100 °C até que a solução apresenta-se um aspecto límpido e transparente.
3. Esterilizou-se a solução por autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos.
4. Deixou-se arrefecer até aproximadamente 50 °C e, em condições estéreis, numa câmara de fluxo laminar, transferiu-se 800 µl de fenol (50 g/l) e 2 ml de solução traço previamente esterilizada.
5. Transferiu-se aproximadamente 20 ml para placas de petri estéreis e 5 ml para tubos de ensaio esterilizados e tapados com algodão cardado.
6. Inclinaram-se os tubos de ensaio e deixaram-se arrefecer juntamente com as placas de petri até que o meio de cultura solidifica-se.

A.2 Isolamento e armazenamento da *Pseudomonas putida*

1. Transferiu-se, em condições estéreis, 5ml de uma suspensão bacteriana de *Pseudomonas putida* previamente adaptadas ao fenol para um matraz de 200 ml contendo 40 ml de solução mineral (tabela 2.1) tapado com algodão cardado e previamente esterilizado por autoclavagem.

2. Colocou-se a crescer numa incubadora orbital a 28 °C e 150 rpm durante 24 horas.
3. Ao fim um dia, após se verificar o crescimento das bactérias, fez-se o espalhamento de uma porção de bactérias em meio sólido numa placa de *petri*, com o auxílio de uma ansa estéril.
4. Colocou-se a crescer numa estufa a 28 °C, em posição invertida.
5. Ao fim de dois a três dias, quando se observou o desenvolvimento de colónias, verificou-se ao microscópio o grau de pureza da cultura.
6. A partir de uma colónia, fez-se uma nova repicagem de cultura em meio sólido e colocou-se a crescer nas mesmas condições, para verificar se a cultura era de facto pura.
7. Uma vez garantido o grau de pureza da cultura, procedeu-se ao seu espalhamento em tubos de agar inclinados, colocaram-se a crescer nas mesmas condições.
8. Uma vez desenvolvidas as colónias, foram armazenadas no frigorífico a 4 °C.

A preparação de *stocks* das bactérias não adaptadas ao fenol seguiu o mesmo procedimento que as estirpes adaptadas, com a única diferença da solução mineral ser composta por *Nutrient Broth* (NB), com uma concentração de 8g/l.

Periodicamente as culturas *stock* armazenadas no frigorífico, foram substituídas por novas culturas para evitar contaminações ou perda de algumas características das bactérias que poderiam resultar do armazenamento em períodos demasiados longos.

Para conservação da bactéria a longo prazo adicionou-se 800 µl de suspensão bacteriana a 200 µl de glicerol a 30 % e congelou-se a -80°C.

ANEXO B - CURVAS DE CALIBRAÇÃO

B.1 Curvas de calibração dos rotômetros

A construção da curva de calibração do rotômetro para medir o caudal de ar obedeceu aos seguintes passos:

1. Para cada posição (%) do rotômetro, fez-se passar através de um bidão completamente cheio de água, a corrente de ar cujo caudal se pretendia medir.
2. Simultaneamente mediu-se o volume de água ($V_{\text{água}(1)}$) que saía do bidão na unidade de tempo, que correspondia ao volume de ar que entra no bidão na unidade de tempo à pressão (p_1), isto é, à pressão que o ar se encontra no interior do bidão.
3. Através de um manómetro contendo mercúrio mediu-se a diferença de pressão entre o ar contido no bidão e a pressão atmosférica (Δp).

O caudal de ar ($Q_{\text{gás}}$) é determinado pela expressão:

$$Q_{\text{gas}} = \frac{V_{\text{ar}}}{t} \quad (\text{B.1})$$

em que o volume de ar (V_{ar}) corresponde ao volume de água ($V_{\text{água}(2)}$), à pressão atmosférica (p_2), sendo este obtido mediante a seguinte equação:

$$V_{\text{água}(2)} \times p_2 = V_{\text{água}(1)} \times p_1 \quad (\text{B.2})$$

sendo,

$$p_1 = p_2 + \Delta p \quad (\text{B.3})$$

por sua vez a diferença de pressão é determinada pela lei fundamental da hidrostática:

$$\Delta p = \rho \times g \times \Delta h \quad (\text{B.4})$$

sendo,

ρ - massa específica da água, ML^{-3}

g – aceleração gravítica, LT^{-2}

Δh – diferença de altura do líquido no manómetro, L

A tabela B.1 apresenta os resultados obtidos para construção da curva de calibração do rotâmetro R1 do reactor semi-*batch*.

Tabela B.1 – Dados para a construção da curva de calibração do rotâmetro R1 da instalação do reactor semi-*batch*.

| % | $V_{\text{água}(1)}$ (l) | tempo (s) | Δh (mmHg) | Δp (Pa) | P_1 (Pa) | $V_{\text{água}(2)}$ (l) | Q_{ar} (l/min) |
|------|-----------------------------|--------------|----------------------|--------------------|---------------|-----------------------------|----------------------------|
| 10% | 2,9 | 28,6 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 2,8 | 5,8 |
| | 3,1 | 30,5 | 0,018 | 2389,5 | 103714,5 | 3,0 | 5,8 |
| | 3,0 | 29,1 | 0,018 | 2389,5 | 103714,5 | 2,9 | 5,9 |
| 20% | 3,4 | 19,6 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 3,2 | 9,9 |
| | 3,2 | 17,4 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 3,0 | 10,5 |
| | 3,2 | 17,3 | 0,015 | 1991,2 | 103316,2 | 3,0 | 10,6 |
| 30% | 3,9 | 14,7 | 0,015 | 1991,2 | 103316,2 | 3,7 | 15,1 |
| | 3,9 | 14,0 | 0,015 | 1991,2 | 103316,2 | 3,7 | 15,9 |
| | 3,4 | 12,2 | 0,014 | 1858,5 | 103183,5 | 3,2 | 15,8 |
| 40% | 3,9 | 11,1 | 0,015 | 1991,2 | 103316,2 | 3,7 | 20,1 |
| | 4,0 | 12,1 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 3,8 | 18,9 |
| | 4,2 | 11,9 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 4,0 | 20,1 |
| 50% | 4,0 | 8,9 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 3,8 | 25,6 |
| | 4,0 | 8,7 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 3,8 | 26,2 |
| | 4,0 | 9,2 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 3,8 | 24,9 |
| 60% | 4,2 | 8,2 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 4,0 | 29,2 |
| | 4,2 | 8,3 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 4,0 | 28,9 |
| | 4,9 | 9,4 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 4,7 | 30,0 |
| 70% | 4,5 | 7,8 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 4,3 | 33,2 |
| | 4,4 | 7,3 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 4,2 | 34,4 |
| | 4,5 | 7,7 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 4,3 | 33,4 |
| 80% | 3,5 | 5,5 | 0,013 | 1725,7 | 103050,7 | 3,3 | 36,4 |
| | 3,5 | 5,5 | 0,015 | 1991,2 | 103316,2 | 3,3 | 36,5 |
| | 3,4 | 5,2 | 0,014 | 1858,5 | 103183,5 | 3,2 | 37,5 |
| 90% | 4,5 | 5,7 | 0,018 | 2389,5 | 103714,5 | 4,3 | 45,0 |
| | 4,7 | 6,2 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 4,5 | 43,6 |
| | 4,5 | 5,8 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 4,3 | 44,6 |
| 100% | 4,3 | 4,9 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 4,1 | 50,4 |
| | 4,4 | 5,0 | 0,017 | 2256,7 | 103581,7 | 4,2 | 50,8 |
| | 4,3 | 4,9 | 0,016 | 2124,0 | 103449,0 | 4,1 | 50,6 |

A figura B.1 apresenta a curva de calibração resultante.

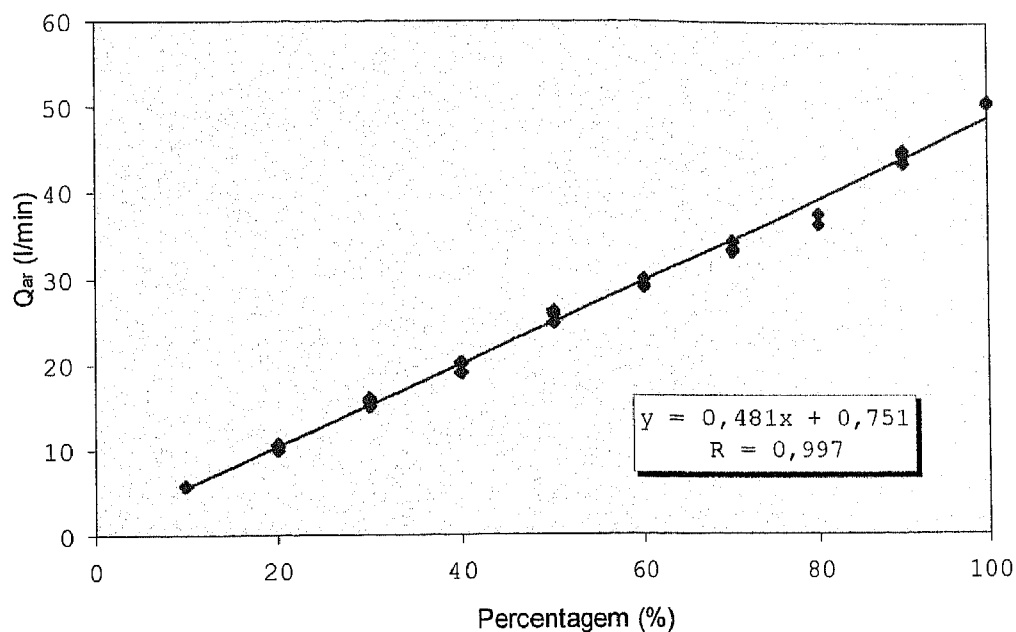


Figura B.1 – Curva de calibração do rotâmetro R1 da instalação do reactor semi-batch.

A curva de calibração obtida para o rotâmetro R.1 (figura B.1.) é:

$$Q_{\text{gás}} = 0,481 \times (\%) + 0,751 \quad (\text{B.5})$$

Do mesmo modo, construiu-se a curva de calibração para o rotâmetro R1 da instalação do leito percolador, sendo os resultados obtidos apresentados na tabela B.2 e figura B.2 respectivamente.

Tabela B.2 – Dados para a construção da curva de calibração do rotâmetro R1 da instalação do leito percolador.

| % | V _{água(1)} (l) | tempo (s) | Δh (mmHg) | Δp (Pa) | p ₁ (Pa) | V _{água(2)} (l) | Q _{ar} (l/min) |
|-----|-----------------------------|--------------|--------------|------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 10% | 2,0 | 38,8 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 1,9 | 3,2 |
| | 1,8 | 36,9 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 1,8 | 3,1 |
| | 2,0 | 40,0 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 2,0 | 3,2 |
| 20% | 2,4 | 25,0 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 2,3 | 5,9 |
| | 2,2 | 24,2 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 2,1 | 5,6 |
| | 2,2 | 23,5 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 2,2 | 5,9 |

| % | V _{água(1)} (l) | tempo (s) | Δh (mmHg) | Δp (Pa) | p ₁ (Pa) | V _{água(2)} (l) | Q _{ar} (l/min) |
|-----|-----------------------------|--------------|--------------|------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 30% | 2,3 | 15,2 | 44 | 5840,9 | 107165,9 | 2,2 | 9,3 |
| | 2,4 | 15,8 | 42 | 5575,5 | 106900,5 | 2,4 | 9,6 |
| | 2,4 | 15,7 | 44 | 5840,9 | 107165,9 | 2,3 | 9,6 |
| 40% | 2,7 | 12,3 | 43 | 5708,2 | 107033,2 | 2,6 | 13,6 |
| | 2,5 | 11,5 | 43 | 5708,2 | 107033,2 | 2,5 | 13,6 |
| | 2,7 | 12,1 | 43 | 5708,2 | 107033,2 | 2,6 | 13,8 |
| 50% | 3,0 | 9,8 | 45 | 5973,7 | 107298,7 | 3,0 | 19,3 |
| | 2,9 | 9,6 | 45 | 5973,7 | 107298,7 | 2,8 | 19,0 |
| | 2,9 | 9,7 | 43 | 5708,2 | 107033,2 | 2,8 | 18,6 |
| 60% | 3,2 | 8,4 | 44 | 5840,9 | 107165,9 | 3,2 | 24,1 |
| | 3,3 | 8,5 | 44 | 5840,9 | 107165,9 | 3,2 | 24,3 |
| | 3,6 | 8,8 | 43 | 5708,2 | 107033,2 | 3,6 | 26,0 |
| 70% | 3,4 | 6,9 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 3,4 | 31,5 |
| | 3,0 | 6,2 | 38 | 5044,5 | 106369,5 | 2,9 | 30,5 |
| | 3,2 | 6,4 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 3,1 | 31,1 |
| 80% | 3,8 | 6,7 | 38 | 5044,5 | 106369,5 | 3,7 | 35,6 |
| | 3,6 | 6,2 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 3,6 | 36,5 |
| | 3,6 | 6,3 | 40 | 5310,0 | 106635,0 | 3,5 | 35,9 |

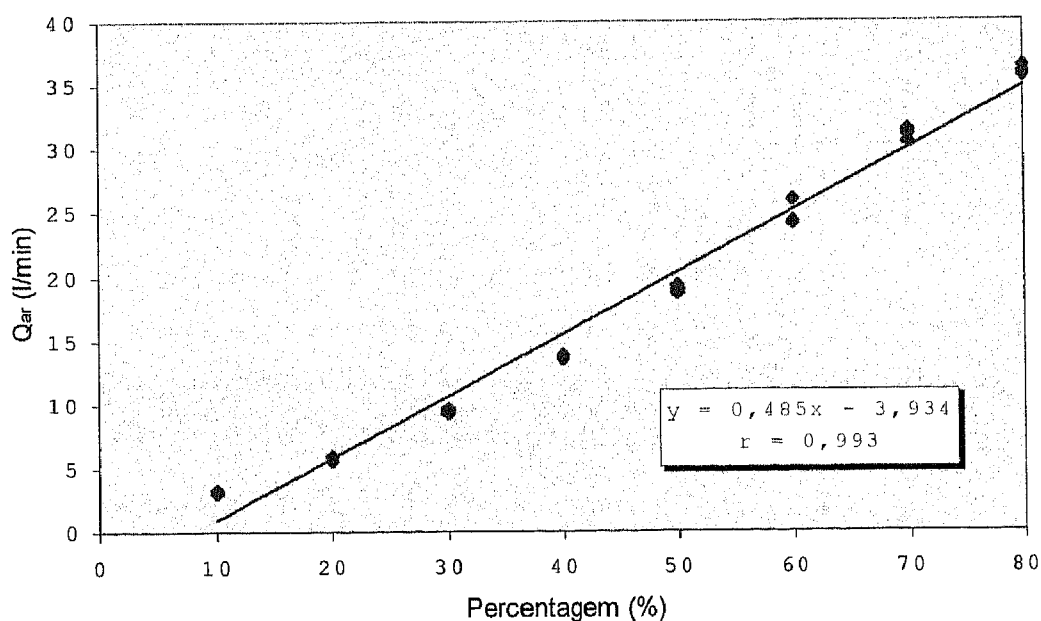


Figura B.2 – Curva de calibração do rotômetro R1 da instalação do leito percolador.

A curva de calibração do rotômetro R1 apresentada na figura B.2 é:

$$Q_{\text{gás}} = 0,485 \times (\%) - 3,934 \quad (\text{B.6})$$

B.2 Curva de calibração da biomassa em suspensão

A curva de calibração para a determinação da concentração de biomassa em suspensão foi obtida através do seguinte procedimento:

1. Inocolou-se com uma cultura de *Pseudomonas putida* previamente adaptadas ao fenol, em condições assépticas, um matraz de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultura.
2. Colocou-se a crescer em *batch*, numa incubadora orbital a 28°C e 150 rpm.
3. Quando se verificou um crescimento significativo de células, resuspendeu-se 15 ml dessa solução bacteriana em 500 ml de meio de cultura fresco, contidos num matraz de 1 litro e colocou-se a crescer nas mesmas condições.
4. Quando se verificou um crescimento significativo das células, concentrou-se as células por centrifugação numa centrífuga, a 2500 rpm durante 15 minutos.
5. Removeu-se o sobrenadante, tendo-se recolhido a fase concentrada suspendendo-a em 800 ml de água destilada.
6. A partir da suspensão bacteriana obtida, preparou-se aproximadamente 500 ml de padrões com densidades ópticas a 660 nm de, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 e 0.026 respectivamente e leram-se as respectivas absorvâncias.
7. Filtraram-se volumes conhecidos de cada um dos padrões em triplicado, através de membranas de 0,45 μm previamente pesadas, tendo sido colocados posteriormente na estufa a 105°C durante 24 horas e pesados.
8. Determinaram-se os respectivos pesos secos das células (M_{seca} do filtro + células) e construiu-se a curva de calibração, concentração de biomassa *versus* densidade óptica.

A concentração de células é determinada pela seguinte equação:

$$[X] = \frac{M_{\text{seca}}}{V} \quad (\text{B.7})$$

em que,

M_{seca} – Peso seco de biomassa, M

V – Volume de suspensão bacteriana, L³

O peso seco das células é determinado pela diferença entre o peso seco do filtro mais biomassa, obtido pelo procedimento apresentado no ponto 8, e o peso seco do filtro.

Os resultados obtidos para a construção da curva de calibração encontram-se apresentados na tabela B.3.

Tabela B.3 – Resultados obtidos nos ensaios realizados para a construção da curva de calibração de [biomassa] versus D.O_{660nm}.

| Suspensão bacteriana | Ensaio | D.O 660 nm | D.O média | M _{seca} do filtro+ células (g) | M _{seca} do filtro (g) | M _{seca} células (g) | V (ml) | [X] (g/l) | [X] _{médio} (g/l) |
|----------------------|--------|------------|-----------|--|---------------------------------|-------------------------------|--------|-----------|----------------------------|
| A | 1 | 0,704 | | 0,240 | 0,225 | 0,014 | 50 | 0,286 | 0,276 |
| | 2 | 0,703 | 0,703 | 0,265 | 0,253 | 0,013 | 50 | 0,254 | |
| | 3 | 0,703 | | 0,269 | 0,255 | 0,014 | 50 | 0,288 | |
| B | 1 | 0,602 | | 0,296 | 0,284 | 0,012 | 50 | 0,244 | 0,236 |
| | 2 | 0,600 | 0,601 | 0,254 | 0,242 | 0,012 | 50 | 0,244 | |
| | 3 | 0,601 | | 0,259 | 0,248 | 0,011 | 50 | 0,220 | |
| C | 1 | 0,508 | | 0,237 | 0,227 | 0,010 | 70 | 0,139 | 0,185 |
| | 2 | 0,507 | 0,508 | 0,285 | 0,274 | 0,011 | 100 | 0,112 | |
| | 3 | 0,508 | | 0,324 | 0,305 | 0,019 | 100 | 0,185 | |
| D | 1 | 0,405 | | 0,326 | 0,311 | 0,015 | 100 | 0,145 | 0,150 |
| | 2 | 0,405 | 0,405 | 0,297 | 0,281 | 0,015 | 100 | 0,153 | |
| | 3 | 0,404 | | 0,336 | 0,321 | 0,015 | 100 | 0,153 | |
| E | 1 | 0,307 | | 0,258 | 0,248 | 0,011 | 100 | 0,105 | 0,110 |
| | 2 | 0,307 | 0,307 | 0,256 | 0,245 | 0,011 | 100 | 0,108 | |
| | 3 | 0,306 | | 0,268 | 0,256 | 0,012 | 100 | 0,117 | |
| F | 1 | 0,197 | | 0,252 | 0,244 | 0,008 | 100 | 0,077 | 0,077 |
| | 2 | 0,197 | 0,197 | 0,249 | 0,241 | 0,008 | 100 | 0,079 | |
| | 3 | 0,197 | | 0,261 | 0,253 | 0,007 | 100 | 0,075 | |
| G | 1 | 0,109 | | 0,234 | 0,228 | 0,006 | 150 | 0,037 | 0,037 |
| | 2 | 0,109 | 0,109 | 0,231 | 0,228 | 0,004 | 100 | 0,035 | |
| | 3 | 0,109 | | 0,249 | 0,243 | 0,006 | 150 | 0,038 | |

| Suspensão bacteriana | Ensaio | D.O 660 nm | D.O média | M _{seca} do filtro+ células (g) | M _{seca} do filtro (g) | M _{seca} células (g) | V (ml) | [X] (g/l) | [X] _{médio} (g/l) |
|----------------------|--------|------------|-----------|--|---------------------------------|-------------------------------|--------|-----------|----------------------------|
| H | 1 | 0,053 | | 0,258 | 0,256 | 0,003 | 150 | 0,017 | |
| | 2 | 0,053 | 0,053 | 0,253 | 0,251 | 0,003 | 150 | 0,017 | 0,018 |
| | 3 | 0,053 | | 0,248 | 0,246 | 0,003 | 150 | 0,018 | |
| G | 1 | 0,026 | | 0,252 | 0,252 | 0,001 | 150 | 0,005 | |
| | 2 | 0,026 | 0,026 | 0,233 | 0,231 | 0,002 | 200 | 0,009 | 0,009 |
| | 3 | 0,026 | | 0,247 | 0,246 | 0,001 | 150 | 0,005 | |

A figura B.3 apresenta o gráfico que relaciona a [biomassa] *versus* densidade óptica a 660 nm (D.O_{660nm}).

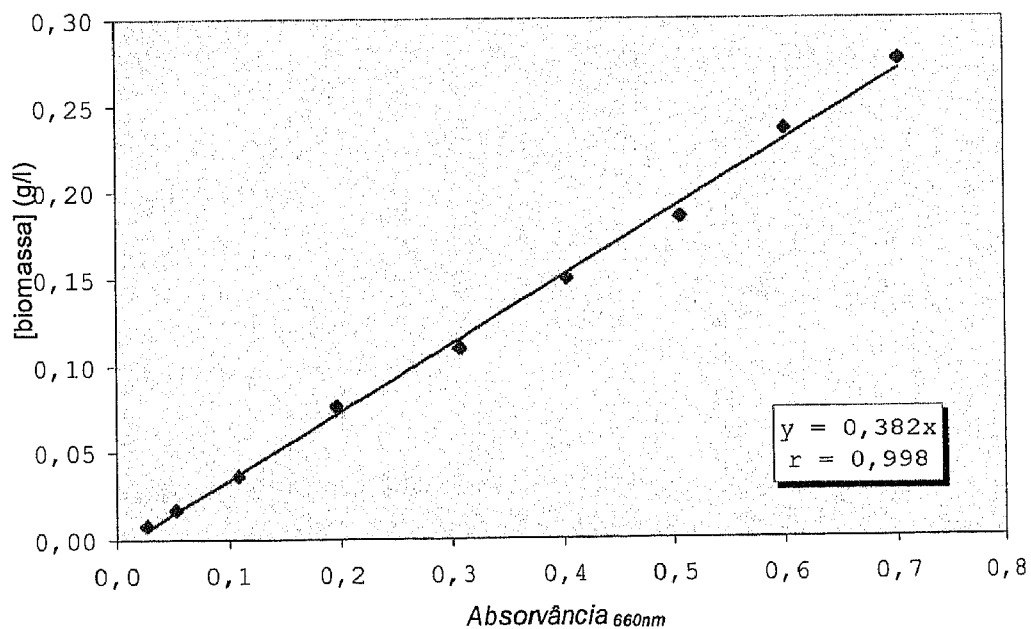


Figura B.3 – Curva de calibração da [biomassa] *versus* D.O_{660nm}.

A curva de calibração apresenta a seguinte equação:

$$[X] \text{ (g/l)} = 0,382 * D.O_{660nm} \quad (\text{B.8})$$

B.3 Curva de calibração para o tolueno

A construção da curva de calibração de [tolueno] *versus* área foi obtida seguindo os seguintes passos:

1. Numa ampola de 756 ml completamente vedada, adicionou-se volumes conhecidos de tolueno puro no estado líquido ($V_{\text{adicionado}}$), através de uma seringa para líquidos de 1, 5 e 10 μl da SGE P/N 000852, P/N 000553 e Hamilton P.O Box 26 CH-7402 Bonaduz, de forma a obter na ampola uma [tolueno] entre 0,02 e 12 mg/l.
2. Deixou-se a ampola em repouso durante aproximadamente 1 hora, para que se garantisse uma homogeneização total do tolueno evaporado na ampola.
3. Retirou-se através de uma seringa para gases de 1 e 2,5 ml, uma amostra de volume conhecido da ampola ($V_{\text{injectado}}$) e injectou-se no cromatógrafo.
4. Através de um processador de dados acoplado ao cromatógrafo, do tipo Chromatopac C-R3A da Shimadzu, registou-se o valor da área do pico correspondente (Área).
5. Construiu-se o gráfico que relaciona a [tolueno] com a área do pico correspondente, apresentado na figura B.4.

A [tolueno] é determinada pela seguinte expressão:

$$[\text{tolueno}] = \frac{M_{\text{total}}}{V_{\text{ampola}}} \quad (\text{B.9})$$

sendo a massa de tolueno contida na ampola (M_{total}) calculada do seguinte modo:

$$M_{\text{total}} = \rho \times V_{\text{adicionado}} \quad (\text{B.10})$$

em que, ρ representa a massa volúmica de do tolueno ($86,6 \text{ Kg/m}^3$).

A tabela B.4 apresenta os valores obtidos para construção da curva de calibração do tolueno.

Tabela B.4 – Resultados para a construção da curva de calibração de [tolueno] versus área.

| V _{adicionado} (μ l) | V _{injectado} (ml) | M _{total} (mg) | [tolueno] (mg/l) | Área 1 | Área 2 | Área 3 | Área _{médica} $\times 10^{-2}$ |
|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|--|
| 10,00 | 0,1 | 8660 | 11,46 | 14017 | 14294 | 15082 | 145 |
| 9,00 | 0,1 | 7794 | 10,31 | 12043 | 13499 | - | 128 |
| 8,00 | 0,1 | 6928 | 9,16 | 11711 | 11592 | 11525 | 116 |
| 7,00 | 0,1 | 6062 | 8,02 | 9915 | 9340 | 10377 | 96 |
| 5,00 | 0,2 | 4330 | 5,73 | 14268 | 14359 | 14504 | 72 |
| 3,00 | 0,5 | 2598 | 3,44 | 22733 | 22005 | 19987 | 43 |
| 2,50 | 0,5 | 2165 | 2,86 | 18821 | 17988 | 17265 | 36 |
| 1,60 | 1 | 1386 | 1,83 | 22546 | 22270 | 25176 | 23 |
| 1,20 | 1 | 1039 | 1,37 | 16552 | 18402 | 17558 | 18 |
| 1,00 | 1 | 866 | 1,15 | 15264 | 15305 | 14716 | 15 |
| 0,80 | 1 | 693 | 0,92 | 11946 | 11905 | 11614 | 12 |
| 0,04 | 2,5 | 35 | 0,05 | 6099 | - | - | 1 |
| 0,02 | 2,5 | 17 | 0,02 | 3842 | 4129 | 2542 | 1 |

A figura B.4 apresenta a curva de calibração para a determinação da [tolueno].

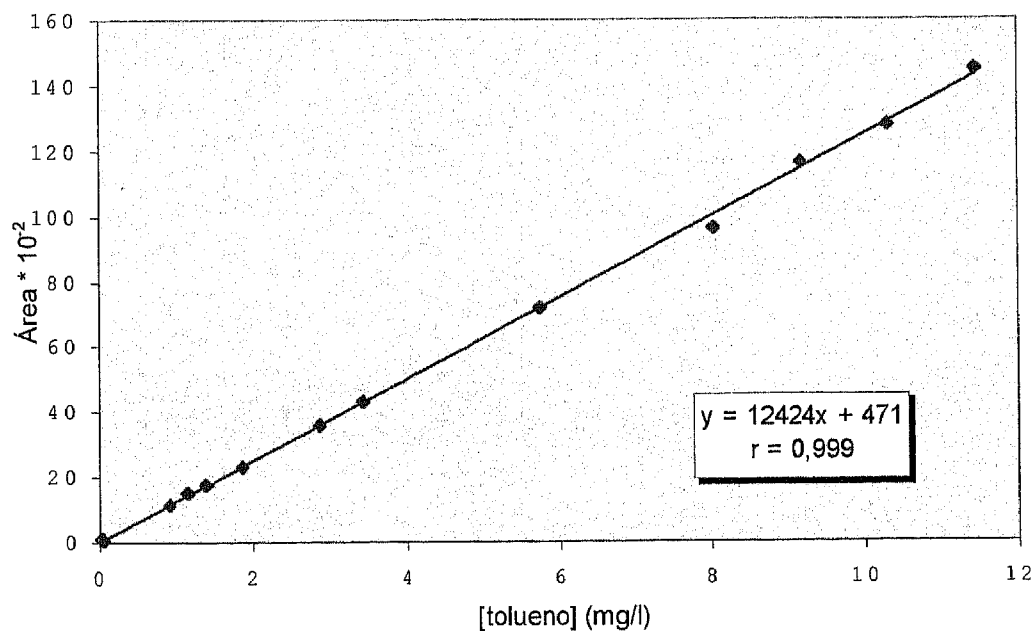


Figura B.4 – Curva de calibração de [tolueno] versus área.

A curva toma a seguinte forma:

$$\text{Área} = [\text{tolueno}] (\text{mg/l}) \times 12421 + 471 \quad (\text{B.11})$$

ANEXO C - COMPLEMENTOS DO CAPÍTULO 3.1

C.1 Resultados experimentais de cinética de crescimento da *P.putida*Resultados dos ensaios com $Q_{ar} = 5,6$ l/minTabela C.1- Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $0,264 \pm 0,0183$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância a 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|----------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,159 | 1,00 | 0,061 | -2,797 |
| 0,00 | 0,159 | 1,00 | 0,061 | -2,797 |
| 0,00 | 0,160 | 1,00 | 0,061 | -2,797 |
| 1,17 | 0,166 | 1,00 | 0,063 | -2,765 |
| 1,17 | 0,166 | 1,00 | 0,063 | -2,765 |
| 1,17 | 0,167 | 1,00 | 0,064 | -2,749 |
| 1,84 | 0,170 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 1,84 | 0,170 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 1,84 | 0,171 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 3,59 | 0,182 | 1,00 | 0,07 | -2,659 |
| 3,59 | 0,18 | 1,00 | 0,069 | -2,674 |
| 3,59 | 0,18 | 1,00 | 0,069 | -2,674 |
| 4,42 | 0,194 | 1,00 | 0,074 | -2,604 |
| 4,42 | 0,194 | 1,00 | 0,074 | -2,604 |
| 4,42 | 0,194 | 1,00 | 0,074 | -2,604 |
| 4,95 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,564 |
| 4,95 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,564 |
| 4,95 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,564 |
| 5,45 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,564 |
| 5,45 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,564 |
| 5,45 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,564 |
| 22,87 | 0,74 | 1,00 | 0,283 | -1,262 |
| 22,87 | 0,745 | 1,00 | 0,285 | -1,255 |
| 22,87 | 0,746 | 1,00 | 0,285 | -1,255 |
| 23,45 | 0,405 | 0,50 | 0,309 | -1,174 |
| 23,45 | 0,404 | 0,50 | 0,309 | -1,174 |
| 23,45 | 0,405 | 0,50 | 0,309 | -1,174 |
| 23,87 | 0,424 | 0,50 | 0,324 | -1,127 |
| 23,87 | 0,422 | 0,50 | 0,322 | -1,133 |
| 23,87 | 0,422 | 0,50 | 0,322 | -1,133 |
| 24,62 | 0,442 | 0,50 | 0,338 | -1,085 |
| 24,62 | 0,442 | 0,50 | 0,338 | -1,085 |
| 24,62 | 0,442 | 0,50 | 0,338 | -1,085 |
| 25,37 | 0,475 | 0,50 | 0,363 | -1,013 |
| 25,37 | 0,478 | 0,50 | 0,365 | -1,008 |
| 25,37 | 0,473 | 0,50 | 0,361 | -1,019 |
| 27,79 | 0,531 | 0,50 | 0,406 | -0,901 |
| 27,79 | 0,531 | 0,50 | 0,406 | -0,901 |
| 27,79 | 0,529 | 0,50 | 0,404 | -0,906 |
| 28,46 | 0,552 | 0,50 | 0,422 | -0,863 |
| 28,46 | 0,551 | 0,50 | 0,421 | -0,865 |
| 28,46 | 0,549 | 0,50 | 0,419 | -0,870 |

| Tempo (horas) | Absorvância a 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|----------------------|--------------------|-----------|--------|
| 29,04 | 0,572 | 0,50 | 0,437 | -0,828 |
| 29,04 | 0,566 | 0,50 | 0,432 | -0,839 |
| 29,79 | 0,569 | 0,50 | 0,435 | -0,832 |
| 29,79 | 0,569 | 0,50 | 0,435 | -0,832 |
| 29,79 | 0,569 | 0,50 | 0,435 | -0,832 |
| 30,62 | 0,603 | 0,50 | 0,461 | -0,774 |
| 30,62 | 0,598 | 0,50 | 0,457 | -0,783 |
| 30,62 | 0,597 | 0,50 | 0,456 | -0,785 |
| 31,12 | 0,624 | 0,50 | 0,477 | -0,740 |
| 31,12 | 0,621 | 0,50 | 0,474 | -0,747 |
| 31,12 | 0,613 | 0,50 | 0,468 | -0,759 |
| 31,62 | 0,620 | 0,50 | 0,474 | -0,747 |
| 31,62 | 0,617 | 0,50 | 0,471 | -0,753 |
| 31,62 | 0,613 | 0,50 | 0,468 | -0,759 |

Tabela C.2 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $0,344 \pm 0,0206$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,144 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 0,00 | 0,145 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 0,00 | 0,145 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 3,08 | 0,191 | 1,00 | 0,073 | -2,617 |
| 3,08 | 0,190 | 1,00 | 0,073 | -2,617 |
| 3,08 | 0,190 | 1,00 | 0,073 | -2,617 |
| 4,08 | 0,187 | 1,00 | 0,071 | -2,645 |
| 4,08 | 0,187 | 1,00 | 0,071 | -2,645 |
| 4,08 | 0,187 | 1,00 | 0,071 | -2,645 |
| 5,08 | 0,184 | 1,00 | 0,070 | -2,659 |
| 5,08 | 0,182 | 1,00 | 0,070 | -2,659 |
| 5,08 | 0,183 | 1,00 | 0,070 | -2,659 |
| 6,50 | 0,176 | 1,00 | 0,067 | -2,703 |
| 6,50 | 0,176 | 1,00 | 0,067 | -2,703 |
| 6,50 | 0,176 | 1,00 | 0,067 | -2,703 |
| 22,67 | 0,403 | 1,00 | 0,154 | -1,871 |
| 22,67 | 0,402 | 1,00 | 0,154 | -1,871 |
| 22,67 | 0,403 | 1,00 | 0,154 | -1,871 |
| 23,67 | 0,484 | 1,00 | 0,185 | -1,687 |
| 23,67 | 0,484 | 1,00 | 0,185 | -1,687 |
| 23,67 | 0,484 | 1,00 | 0,185 | -1,687 |
| 24,67 | 0,557 | 1,00 | 0,213 | -1,546 |
| 24,67 | 0,558 | 1,00 | 0,213 | -1,546 |
| 24,67 | 0,557 | 1,00 | 0,213 | -1,546 |
| 25,34 | 0,608 | 1,00 | 0,232 | -1,461 |
| 25,34 | 0,609 | 1,00 | 0,233 | -1,457 |
| 25,34 | 0,609 | 1,00 | 0,233 | -1,457 |
| 27,34 | 0,754 | 1,00 | 0,288 | -1,245 |
| 27,34 | 0,754 | 1,00 | 0,288 | -1,245 |
| 27,34 | 0,754 | 1,00 | 0,288 | -1,245 |
| 27,92 | 0,413 | 0,50 | 0,316 | -1,152 |
| 27,92 | 0,411 | 0,50 | 0,314 | -1,158 |
| 27,92 | 0,411 | 0,50 | 0,314 | -1,158 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 28,42 | 0,431 | 0,50 | 0,329 | -1,112 |
| 28,42 | 0,431 | 0,50 | 0,329 | -1,112 |
| 28,42 | 0,431 | 0,50 | 0,329 | -1,112 |
| 29,42 | 0,470 | 0,50 | 0,359 | -1,024 |
| 29,42 | 0,470 | 0,50 | 0,359 | -1,024 |
| 29,42 | 0,470 | 0,50 | 0,359 | -1,024 |
| 30,42 | 0,515 | 0,50 | 0,393 | -0,934 |
| 30,42 | 0,514 | 0,50 | 0,393 | -0,934 |
| 30,42 | 0,514 | 0,50 | 0,393 | -0,934 |
| 31,42 | 0,557 | 0,50 | 0,426 | -0,853 |
| 31,42 | 0,556 | 0,50 | 0,425 | -0,856 |
| 31,42 | 0,554 | 0,50 | 0,423 | -0,860 |
| 32,17 | 0,565 | 0,50 | 0,432 | -0,839 |
| 32,17 | 0,565 | 0,50 | 0,432 | -0,839 |
| 32,17 | 0,563 | 0,50 | 0,430 | -0,844 |
| 46,67 | 0,376 | 0,25 | 0,575 | -0,553 |
| 46,67 | 0,378 | 0,25 | 0,578 | -0,548 |
| 46,67 | 0,378 | 0,25 | 0,578 | -0,548 |
| 48,17 | 0,380 | 0,25 | 0,581 | -0,543 |
| 48,17 | 0,381 | 0,25 | 0,582 | -0,541 |
| 48,17 | 0,381 | 0,25 | 0,582 | -0,541 |
| 52,59 | 0,425 | 0,25 | 0,649 | -0,432 |
| 52,59 | 0,426 | 0,25 | 0,651 | -0,429 |
| 52,59 | 0,425 | 0,25 | 0,649 | -0,432 |
| 53,69 | 0,448 | 0,25 | 0,685 | -0,378 |
| 53,69 | 0,446 | 0,25 | 0,681 | -0,384 |
| 53,69 | 0,446 | 0,25 | 0,681 | -0,384 |
| 54,69 | 0,467 | 0,25 | 0,714 | -0,337 |
| 54,69 | 0,467 | 0,25 | 0,714 | -0,337 |
| 54,69 | 0,466 | 0,25 | 0,712 | -0,340 |

Tabela C.3 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $0,398 \pm 0,0156$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,147 | 1,00 | 0,056 | -2,882 |
| 0,00 | 0,147 | 1,00 | 0,056 | -2,882 |
| 0,00 | 0,147 | 1,00 | 0,056 | -2,882 |
| 2,42 | 0,151 | 1,00 | 0,058 | -2,847 |
| 2,42 | 0,150 | 1,00 | 0,057 | -2,865 |
| 2,42 | 0,151 | 1,00 | 0,058 | -2,847 |
| 3,50 | 0,150 | 1,00 | 0,057 | -2,865 |
| 3,50 | 0,149 | 1,00 | 0,057 | -2,865 |
| 3,50 | 0,149 | 1,00 | 0,057 | -2,865 |
| 4,50 | 0,147 | 1,00 | 0,056 | -2,882 |
| 4,50 | 0,148 | 1,00 | 0,057 | -2,865 |
| 4,50 | 0,147 | 1,00 | 0,056 | -2,882 |
| 5,67 | 0,147 | 1,00 | 0,056 | -2,882 |
| 5,67 | 0,149 | 1,00 | 0,057 | -2,865 |
| 5,67 | 0,150 | 1,00 | 0,057 | -2,865 |
| 6,67 | 0,145 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 6,67 | 0,144 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 6,67 | 0,144 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 7,50 | 0,146 | 1,00 | 0,056 | -2,882 |
| 7,50 | 0,145 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 7,50 | 0,147 | 1,00 | 0,056 | -2,882 |
| 21,50 | 0,324 | 1,00 | 0,124 | -2,087 |
| 21,50 | 0,326 | 1,00 | 0,125 | -2,079 |
| 21,50 | 0,326 | 1,00 | 0,125 | -2,079 |
| 22,25 | 0,409 | 1,00 | 0,156 | -1,858 |
| 22,25 | 0,411 | 1,00 | 0,157 | -1,852 |
| 22,25 | 0,414 | 1,00 | 0,158 | -1,845 |
| 22,92 | 0,489 | 1,00 | 0,187 | -1,677 |
| 22,92 | 0,487 | 1,00 | 0,186 | -1,682 |
| 22,92 | 0,493 | 1,00 | 0,188 | -1,671 |
| 23,92 | 0,587 | 1,00 | 0,224 | -1,496 |
| 23,92 | 0,589 | 1,00 | 0,225 | -1,492 |
| 23,92 | 0,591 | 1,00 | 0,226 | -1,487 |
| 24,50 | 0,640 | 1,00 | 0,244 | -1,411 |
| 24,50 | 0,636 | 1,00 | 0,243 | -1,415 |
| 24,50 | 0,636 | 1,00 | 0,243 | -1,415 |
| 26,42 | 0,398 | 0,50 | 0,304 | -1,191 |
| 26,42 | 0,398 | 0,50 | 0,304 | -1,191 |
| 26,42 | 0,398 | 0,50 | 0,304 | -1,191 |
| 27,17 | 0,427 | 0,50 | 0,326 | -1,121 |
| 27,17 | 0,428 | 0,50 | 0,327 | -1,118 |
| 27,17 | 0,428 | 0,50 | 0,327 | -1,118 |
| 27,75 | 0,465 | 0,50 | 0,355 | -1,036 |
| 27,75 | 0,465 | 0,50 | 0,355 | -1,036 |
| 27,75 | 0,465 | 0,50 | 0,355 | -1,036 |
| 28,25 | 0,490 | 0,50 | 0,374 | -0,983 |
| 28,25 | 0,490 | 0,50 | 0,374 | -0,983 |
| 28,25 | 0,490 | 0,50 | 0,374 | -0,983 |
| 29,25 | 0,533 | 0,50 | 0,407 | -0,899 |
| 29,25 | 0,535 | 0,50 | 0,409 | -0,894 |
| 29,25 | 0,535 | 0,50 | 0,409 | -0,894 |
| 30,25 | 0,578 | 0,50 | 0,442 | -0,816 |
| 30,25 | 0,581 | 0,50 | 0,444 | -0,812 |
| 30,25 | 0,581 | 0,50 | 0,444 | -0,812 |
| 30,75 | 0,597 | 0,50 | 0,456 | -0,785 |
| 30,75 | 0,598 | 0,50 | 0,457 | -0,783 |
| 30,75 | 0,598 | 0,50 | 0,457 | -0,783 |
| 31,25 | 0,610 | 0,50 | 0,466 | -0,764 |
| 31,25 | 0,610 | 0,50 | 0,466 | -0,764 |
| 31,25 | 0,610 | 0,50 | 0,466 | -0,764 |
| 45,75 | 0,818 | 0,50 | 0,625 | -0,470 |
| 45,75 | 0,818 | 0,50 | 0,625 | -0,470 |
| 45,75 | 0,818 | 0,50 | 0,625 | -0,470 |
| 47,25 | 0,839 | 0,50 | 0,641 | -0,445 |
| 47,25 | 0,839 | 0,50 | 0,641 | -0,445 |
| 47,25 | 0,839 | 0,50 | 0,641 | -0,445 |
| 48,33 | 0,868 | 0,50 | 0,663 | -0,411 |
| 48,33 | 0,868 | 0,50 | 0,663 | -0,411 |
| 48,33 | 0,868 | 0,50 | 0,663 | -0,411 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 49,33 | 0,883 | 0,50 | 0,675 | -0,393 |
| 49,33 | 0,883 | 0,50 | 0,675 | -0,393 |
| 49,33 | 0,883 | 0,50 | 0,675 | -0,393 |
| 49,83 | 0,888 | 0,50 | 0,678 | -0,389 |
| 49,83 | 0,889 | 0,50 | 0,679 | -0,387 |
| 49,83 | 0,887 | 0,50 | 0,678 | -0,389 |
| 50,83 | 0,885 | 0,50 | 0,676 | -0,392 |
| 50,83 | 0,886 | 0,50 | 0,677 | -0,390 |
| 50,83 | 0,886 | 0,50 | 0,677 | -0,390 |

Tabela C.4 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $0,616 \pm 0,029$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,131 | 1,00 | 0,050 | -2,996 |
| 0,00 | 0,132 | 1,00 | 0,050 | -2,996 |
| 0,00 | 0,131 | 1,00 | 0,050 | -2,996 |
| 1,00 | 0,126 | 1,00 | 0,048 | -3,037 |
| 1,00 | 0,127 | 1,00 | 0,049 | -3,016 |
| 1,00 | 0,127 | 1,00 | 0,049 | -3,016 |
| 17,75 | 0,126 | 1,00 | 0,048 | -3,037 |
| 17,75 | 0,127 | 1,00 | 0,049 | -3,016 |
| 17,75 | 0,128 | 1,00 | 0,049 | -3,016 |
| 18,83 | 0,130 | 1,00 | 0,050 | -2,996 |
| 18,83 | 0,130 | 1,00 | 0,050 | -2,996 |
| 18,83 | 0,130 | 1,00 | 0,050 | -2,996 |
| 19,83 | 0,135 | 1,00 | 0,052 | -2,957 |
| 19,86 | 0,135 | 1,00 | 0,052 | -2,957 |
| 19,83 | 0,135 | 1,00 | 0,052 | -2,957 |
| 20,83 | 0,144 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 20,83 | 0,143 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 20,83 | 0,144 | 1,00 | 0,055 | -2,900 |
| 22,66 | 0,173 | 1,00 | 0,066 | -2,718 |
| 22,66 | 0,175 | 1,00 | 0,067 | -2,703 |
| 22,66 | 0,176 | 1,00 | 0,067 | -2,703 |
| 24,33 | 0,248 | 1,00 | 0,095 | -2,354 |
| 24,33 | 0,248 | 1,00 | 0,095 | -2,354 |
| 24,33 | 0,250 | 1,00 | 0,096 | -2,343 |
| 25,25 | 0,329 | 1,00 | 0,126 | -2,071 |
| 25,25 | 0,330 | 1,00 | 0,126 | -2,071 |
| 25,25 | 0,328 | 1,00 | 0,125 | -2,079 |
| 25,75 | 0,388 | 1,00 | 0,148 | -1,911 |
| 25,75 | 0,388 | 1,00 | 0,148 | -1,911 |
| 25,75 | 0,388 | 1,00 | 0,148 | -1,911 |
| 26,25 | 0,459 | 1,00 | 0,175 | -1,743 |
| 26,25 | 0,463 | 1,00 | 0,177 | -1,732 |
| 26,25 | 0,462 | 1,00 | 0,176 | -1,737 |
| 26,75 | 0,521 | 1,00 | 0,199 | -1,614 |
| 26,75 | 0,524 | 1,00 | 0,200 | -1,609 |
| 26,75 | 0,524 | 1,00 | 0,200 | -1,609 |
| 27,25 | 0,571 | 1,00 | 0,218 | -1,523 |
| 27,25 | 0,575 | 1,00 | 0,220 | -1,514 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 27,25 | 0,577 | 1,00 | 0,220 | -1,514 |
| 41,83 | 0,619 | 0,25 | 0,946 | -0,056 |
| 41,83 | 0,618 | 0,25 | 0,944 | -0,058 |
| 41,83 | 0,618 | 0,25 | 0,944 | -0,058 |
| 42,91 | 0,650 | 0,25 | 0,993 | -0,007 |
| 42,91 | 0,647 | 0,25 | 0,989 | -0,011 |
| 42,91 | 0,644 | 0,25 | 0,984 | -0,016 |
| 43,99 | 0,641 | 0,25 | 0,979 | -0,021 |
| 43,99 | 0,638 | 0,25 | 0,975 | -0,025 |
| 43,99 | 0,635 | 0,25 | 0,970 | -0,030 |
| 44,99 | 0,622 | 0,25 | 0,950 | -0,051 |
| 44,99 | 0,627 | 0,25 | 0,958 | -0,043 |
| 44,99 | 0,627 | 0,25 | 0,958 | -0,043 |
| 45,49 | 0,631 | 0,25 | 0,964 | -0,037 |
| 45,49 | 0,628 | 0,25 | 0,960 | -0,041 |
| 45,49 | 0,629 | 0,25 | 0,961 | -0,040 |
| 48,49 | 0,623 | 0,25 | 0,952 | -0,049 |
| 48,49 | 0,625 | 0,25 | 0,955 | -0,046 |
| 48,49 | 0,627 | 0,25 | 0,958 | -0,043 |

Tabela C.5 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = 0,851 ± 0,02 mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,182 | 1,00 | 0,070 | -2,659 |
| 0,00 | 0,181 | 1,00 | 0,069 | -2,674 |
| 0,00 | 0,181 | 1,00 | 0,069 | -2,674 |
| 4,00 | 0,179 | 1,00 | 0,068 | -2,688 |
| 4,00 | 0,179 | 1,00 | 0,068 | -2,688 |
| 4,00 | 0,178 | 1,00 | 0,068 | -2,688 |
| 5,50 | 0,171 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 5,50 | 0,171 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 5,50 | 0,170 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 7,00 | 0,171 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 7,00 | 0,171 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 7,00 | 0,171 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 21,25 | 0,252 | 1,00 | 0,096 | -2,343 |
| 21,25 | 0,252 | 1,00 | 0,096 | -2,343 |
| 21,25 | 0,254 | 1,00 | 0,097 | -2,333 |
| 22,17 | 0,318 | 1,00 | 0,121 | -2,112 |
| 22,17 | 0,317 | 1,00 | 0,121 | -2,112 |
| 22,17 | 0,320 | 1,00 | 0,122 | -2,104 |
| 23,25 | 0,466 | 1,00 | 0,178 | -1,726 |
| 23,25 | 0,471 | 1,00 | 0,180 | -1,715 |
| 23,25 | 0,468 | 1,00 | 0,179 | -1,720 |
| 23,75 | 0,593 | 1,00 | 0,227 | -1,483 |
| 23,75 | 0,594 | 1,00 | 0,227 | -1,483 |
| 23,75 | 0,595 | 1,00 | 0,227 | -1,483 |
| 24,33 | 0,764 | 1,00 | 0,292 | -1,231 |
| 24,33 | 0,764 | 1,00 | 0,292 | -1,231 |
| 24,33 | 0,763 | 1,00 | 0,291 | -1,234 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 26,25 | 0,643 | 0,50 | 0,491 | -0,711 |
| 26,25 | 0,644 | 0,50 | 0,492 | -0,709 |
| 26,25 | 0,644 | 0,50 | 0,492 | -0,709 |
| 26,75 | 0,700 | 0,50 | 0,535 | -0,625 |
| 26,75 | 0,700 | 0,50 | 0,535 | -0,625 |
| 26,75 | 0,700 | 0,50 | 0,535 | -0,625 |
| 27,42 | 0,786 | 0,50 | 0,601 | -0,509 |
| 27,42 | 0,786 | 0,50 | 0,601 | -0,509 |
| 27,42 | 0,784 | 0,50 | 0,599 | -0,512 |
| 28,09 | 0,448 | 0,25 | 0,685 | -0,378 |
| 28,09 | 0,448 | 0,25 | 0,685 | -0,378 |
| 28,09 | 0,448 | 0,25 | 0,685 | -0,378 |
| 28,59 | 0,385 | 0,20 | 0,735 | -0,308 |
| 28,59 | 0,383 | 0,20 | 0,732 | -0,312 |
| 28,59 | 0,383 | 0,20 | 0,732 | -0,312 |
| 29,09 | 0,530 | 0,25 | 0,810 | -0,211 |
| 29,09 | 0,530 | 0,25 | 0,810 | -0,211 |
| 29,09 | 0,525 | 0,25 | 0,802 | -0,221 |
| 29,67 | 0,571 | 0,25 | 0,872 | -0,137 |
| 29,67 | 0,571 | 0,25 | 0,872 | -0,137 |
| 29,67 | 0,569 | 0,25 | 0,869 | -0,140 |
| 30,09 | 0,603 | 0,25 | 0,921 | -0,082 |
| 30,09 | 0,602 | 0,25 | 0,920 | -0,083 |
| 30,09 | 0,600 | 0,25 | 0,917 | -0,087 |
| 30,59 | 0,627 | 0,25 | 0,958 | -0,043 |
| 30,59 | 0,627 | 0,25 | 0,958 | -0,043 |
| 30,59 | 0,627 | 0,25 | 0,958 | -0,043 |

Tabela C.6 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $1,348 \pm 0,048$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,117 | 1,00 | 0,045 | -3,101 |
| 0,00 | 0,117 | 1,00 | 0,045 | -3,101 |
| 0,00 | 0,117 | 1,00 | 0,045 | -3,101 |
| 1,00 | 0,113 | 1,00 | 0,043 | -3,147 |
| 1,00 | 0,113 | 1,00 | 0,043 | -3,147 |
| 1,00 | 0,113 | 1,00 | 0,043 | -3,147 |
| 1,92 | 0,106 | 1,00 | 0,040 | -3,219 |
| 1,92 | 0,106 | 1,00 | 0,040 | -3,219 |
| 1,92 | 0,106 | 1,00 | 0,040 | -3,219 |
| 3,50 | 0,106 | 1,00 | 0,040 | -3,219 |
| 3,50 | 0,106 | 1,00 | 0,040 | -3,219 |
| 3,50 | 0,106 | 1,00 | 0,040 | -3,219 |
| 18,83 | 0,190 | 1,00 | 0,073 | -2,617 |
| 18,83 | 0,188 | 1,00 | 0,072 | -2,631 |
| 18,83 | 0,190 | 1,00 | 0,073 | -2,617 |
| 19,75 | 0,268 | 1,00 | 0,102 | -2,283 |
| 19,75 | 0,269 | 1,00 | 0,103 | -2,273 |
| 19,75 | 0,273 | 1,00 | 0,104 | -2,263 |
| 20,33 | 0,349 | 1,00 | 0,133 | -2,017 |
| 20,33 | 0,350 | 1,00 | 0,134 | -2,010 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 20,33 | 0,352 | 1,00 | 0,134 | -2,010 |
| 20,83 | 0,440 | 1,00 | 0,168 | -1,784 |
| 20,83 | 0,446 | 1,00 | 0,170 | -1,772 |
| 20,83 | 0,448 | 1,00 | 0,171 | -1,766 |
| 21,33 | 0,571 | 1,00 | 0,218 | -1,523 |
| 21,33 | 0,576 | 1,00 | 0,220 | -1,514 |
| 21,33 | 0,571 | 1,00 | 0,218 | -1,523 |
| 24,33 | 0,728 | 0,50 | 0,556 | -0,587 |
| 24,33 | 0,729 | 0,50 | 0,557 | -0,585 |
| 24,33 | 0,732 | 0,50 | 0,559 | -0,582 |
| 24,83 | 0,422 | 0,25 | 0,645 | -0,439 |
| 24,83 | 0,420 | 0,25 | 0,642 | -0,443 |
| 24,83 | 0,420 | 0,25 | 0,642 | -0,443 |
| 25,33 | 0,459 | 0,25 | 0,701 | -0,355 |
| 25,33 | 0,455 | 0,25 | 0,695 | -0,364 |
| 25,33 | 0,456 | 0,25 | 0,697 | -0,361 |
| 25,83 | 0,481 | 0,25 | 0,735 | -0,308 |
| 25,83 | 0,481 | 0,25 | 0,735 | -0,308 |
| 25,83 | 0,479 | 0,25 | 0,732 | -0,312 |
| 26,75 | 0,527 | 0,25 | 0,805 | -0,217 |
| 26,75 | 0,520 | 0,25 | 0,795 | -0,229 |
| 26,75 | 0,520 | 0,25 | 0,795 | -0,229 |
| 27,33 | 0,522 | 0,25 | 0,798 | -0,226 |
| 27,33 | 0,518 | 0,25 | 0,792 | -0,233 |
| 27,33 | 0,518 | 0,25 | 0,792 | -0,233 |
| 27,83 | 0,503 | 0,25 | 0,769 | -0,263 |
| 27,83 | 0,494 | 0,25 | 0,755 | -0,281 |
| 27,83 | 0,498 | 0,25 | 0,761 | -0,273 |

Tabela C.7 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $1,608 \pm 0,056$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,122 | 1,00 | 0,047 | -3,058 |
| 0,00 | 0,121 | 1,00 | 0,046 | -3,079 |
| 0,00 | 0,120 | 1,00 | 0,046 | -3,079 |
| 1,58 | 0,120 | 1,00 | 0,046 | -3,079 |
| 1,58 | 0,119 | 1,00 | 0,045 | -3,101 |
| 1,58 | 0,120 | 1,00 | 0,046 | -3,079 |
| 3,58 | 0,118 | 1,00 | 0,045 | -3,101 |
| 3,58 | 0,117 | 1,00 | 0,045 | -3,101 |
| 3,58 | 0,118 | 1,00 | 0,045 | -3,101 |
| 18,83 | 0,170 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 18,83 | 0,170 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 18,83 | 0,171 | 1,00 | 0,065 | -2,733 |
| 19,83 | 0,220 | 1,00 | 0,084 | -2,477 |
| 19,83 | 0,218 | 1,00 | 0,083 | -2,489 |
| 19,83 | 0,218 | 1,00 | 0,083 | -2,489 |
| 20,83 | 0,312 | 1,00 | 0,119 | -2,129 |
| 20,83 | 0,313 | 1,00 | 0,120 | -2,120 |
| 20,83 | 0,313 | 1,00 | 0,120 | -2,120 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 21,83 | 0,486 | 1,00 | 0,186 | -1,682 |
| 21,83 | 0,486 | 1,00 | 0,186 | -1,682 |
| 21,83 | 0,486 | 1,00 | 0,186 | -1,682 |
| 23,66 | 0,496 | 0,50 | 0,379 | -0,970 |
| 23,66 | 0,496 | 0,50 | 0,379 | -0,970 |
| 23,66 | 0,498 | 0,50 | 0,380 | -0,968 |
| 24,16 | 0,620 | 0,50 | 0,474 | -0,747 |
| 24,16 | 0,622 | 0,50 | 0,475 | -0,744 |
| 24,16 | 0,621 | 0,50 | 0,474 | -0,747 |
| 24,66 | 0,729 | 0,50 | 0,557 | -0,585 |
| 24,66 | 0,729 | 0,50 | 0,557 | -0,585 |
| 24,66 | 0,726 | 0,50 | 0,555 | -0,589 |
| 25,41 | 0,435 | 0,25 | 0,665 | -0,408 |
| 25,41 | 0,436 | 0,25 | 0,666 | -0,406 |
| 25,41 | 0,436 | 0,25 | 0,666 | -0,406 |
| 26,41 | 0,621 | 0,30 | 0,791 | -0,234 |
| 26,41 | 0,619 | 0,30 | 0,788 | -0,238 |
| 26,41 | 0,618 | 0,30 | 0,787 | -0,240 |
| 26,99 | 0,602 | 0,25 | 0,920 | -0,083 |
| 26,99 | 0,604 | 0,25 | 0,923 | -0,080 |
| 26,99 | 0,597 | 0,25 | 0,912 | -0,092 |
| 27,57 | 0,648 | 0,25 | 0,990 | -0,010 |
| 27,57 | 0,646 | 0,25 | 0,987 | -0,013 |
| 27,57 | 0,646 | 0,25 | 0,987 | -0,013 |
| 28,07 | 0,695 | 0,25 | 1,062 | 0,060 |
| 28,07 | 0,692 | 0,25 | 1,057 | 0,055 |
| 28,07 | 0,690 | 0,25 | 1,054 | 0,053 |
| 28,49 | 0,719 | 0,25 | 1,099 | 0,094 |
| 28,49 | 0,719 | 0,25 | 1,099 | 0,094 |
| 28,49 | 0,719 | 0,25 | 1,099 | 0,094 |
| 44,41 | 0,514 | 0,10 | 1,963 | 0,674 |
| 44,41 | 0,514 | 0,10 | 1,963 | 0,674 |
| 44,41 | 0,514 | 0,10 | 1,963 | 0,674 |

Tabela C.8 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $2,004 \pm 0,047$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,134 | 1,000 | 0,051 | -2,976 |
| 0,00 | 0,135 | 1,000 | 0,052 | -2,957 |
| 0,00 | 0,135 | 1,000 | 0,052 | -2,957 |
| 3,00 | 0,166 | 1,000 | 0,063 | -2,765 |
| 3,00 | 0,164 | 1,000 | 0,063 | -2,765 |
| 3,00 | 0,165 | 1,000 | 0,063 | -2,765 |
| 4,50 | 0,163 | 1,000 | 0,062 | -2,781 |
| 4,50 | 0,163 | 1,000 | 0,062 | -2,781 |
| 4,50 | 0,163 | 1,000 | 0,062 | -2,781 |
| 6,67 | 0,161 | 1,000 | 0,062 | -2,781 |
| 6,67 | 0,161 | 1,000 | 0,062 | -2,781 |
| 6,67 | 0,162 | 1,000 | 0,062 | -2,781 |
| 21,92 | 0,200 | 1,000 | 0,076 | -2,577 |
| 21,92 | 0,200 | 1,000 | 0,076 | -2,577 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 21,92 | 0,200 | 1,000 | 0,076 | -2,577 |
| 23,50 | 0,251 | 1,000 | 0,096 | -2,343 |
| 23,50 | 0,249 | 1,000 | 0,095 | -2,354 |
| 23,50 | 0,249 | 1,000 | 0,095 | -2,354 |
| 24,83 | 0,330 | 1,000 | 0,126 | -2,071 |
| 24,83 | 0,330 | 1,000 | 0,126 | -2,071 |
| 24,83 | 0,328 | 1,000 | 0,125 | -2,079 |
| 26,75 | 0,596 | 1,000 | 0,228 | -1,478 |
| 26,75 | 0,594 | 1,000 | 0,227 | -1,483 |
| 26,75 | 0,597 | 1,000 | 0,228 | -1,478 |
| 27,33 | 0,742 | 1,000 | 0,283 | -1,262 |
| 27,33 | 0,750 | 1,000 | 0,287 | -1,248 |
| 27,33 | 0,749 | 1,000 | 0,286 | -1,252 |
| 27,83 | 0,475 | 0,500 | 0,363 | -1,013 |
| 27,83 | 0,475 | 0,500 | 0,363 | -1,013 |
| 27,83 | 0,465 | 0,500 | 0,355 | -1,036 |
| 28,91 | 0,642 | 0,500 | 0,490 | -0,713 |
| 28,91 | 0,636 | 0,500 | 0,486 | -0,722 |
| 28,91 | 0,630 | 0,500 | 0,481 | -0,732 |
| 29,91 | 0,839 | 0,500 | 0,641 | -0,445 |
| 29,91 | 0,849 | 0,500 | 0,649 | -0,432 |
| 29,91 | 0,857 | 0,500 | 0,655 | -0,423 |
| 30,49 | 0,528 | 0,250 | 0,807 | -0,214 |
| 30,49 | 0,525 | 0,250 | 0,802 | -0,221 |
| 30,49 | 0,525 | 0,250 | 0,802 | -0,221 |
| 30,99 | 0,603 | 0,250 | 0,921 | -0,082 |
| 30,99 | 0,603 | 0,250 | 0,921 | -0,082 |
| 30,99 | 0,595 | 0,250 | 0,909 | -0,095 |
| 31,49 | 0,652 | 0,250 | 0,996 | -0,004 |
| 31,49 | 0,649 | 0,250 | 0,992 | -0,008 |
| 31,49 | 0,659 | 0,250 | 1,007 | 0,007 |
| 32,49 | 0,711 | 0,250 | 1,086 | 0,083 |
| 32,49 | 0,709 | 0,250 | 1,083 | 0,080 |
| 32,49 | 0,709 | 0,250 | 1,083 | 0,080 |
| 45,49 | 0,555 | 0,125 | 1,696 | 0,528 |
| 45,49 | 0,548 | 0,125 | 1,675 | 0,516 |
| 45,49 | 0,546 | 0,125 | 1,669 | 0,512 |
| 47,49 | 0,550 | 0,125 | 1,681 | 0,519 |
| 47,49 | 0,549 | 0,125 | 1,678 | 0,518 |
| 47,49 | 0,549 | 0,125 | 1,678 | 0,518 |

Tabela C.9 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $2,966 \pm 0,206$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,205 | 1,00 | 0,078 | -2,547 |
| 0,00 | 0,206 | 1,00 | 0,079 | -2,542 |
| 0,00 | 0,205 | 1,00 | 0,078 | -2,547 |
| 1,00 | 0,202 | 1,00 | 0,077 | -2,562 |
| 1,00 | 0,204 | 1,00 | 0,078 | -2,552 |
| 1,00 | 0,204 | 1,00 | 0,078 | -2,552 |

| Tempo horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|--------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 2,00 | 0,204 | 1,00 | 0,078 | -2,552 |
| 2,00 | 0,204 | 1,00 | 0,078 | -2,552 |
| 2,00 | 0,204 | 1,00 | 0,078 | -2,552 |
| 4,00 | 0,199 | 1,00 | 0,076 | -2,577 |
| 4,00 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,567 |
| 4,00 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,567 |
| 5,00 | 0,198 | 1,00 | 0,076 | -2,582 |
| 5,00 | 0,199 | 1,00 | 0,076 | -2,577 |
| 5,00 | 0,198 | 1,00 | 0,076 | -2,582 |
| 7,00 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,567 |
| 7,00 | 0,198 | 1,00 | 0,076 | -2,582 |
| 7,00 | 0,198 | 1,00 | 0,076 | -2,582 |
| 23,00 | 0,450 | 0,40 | 0,430 | -0,845 |
| 23,00 | 0,449 | 0,40 | 0,429 | -0,847 |
| 23,00 | 0,450 | 0,40 | 0,430 | -0,845 |
| 23,50 | 0,507 | 0,40 | 0,484 | -0,725 |
| 23,50 | 0,506 | 0,40 | 0,483 | -0,727 |
| 23,50 | 0,507 | 0,40 | 0,484 | -0,725 |
| 24,25 | 0,588 | 0,40 | 0,562 | -0,577 |
| 24,25 | 0,584 | 0,40 | 0,558 | -0,584 |
| 24,25 | 0,584 | 0,40 | 0,558 | -0,584 |
| 25,00 | 0,662 | 0,40 | 0,632 | -0,459 |
| 25,00 | 0,657 | 0,40 | 0,627 | -0,466 |
| 25,00 | 0,660 | 0,40 | 0,630 | -0,462 |
| 25,75 | 0,714 | 0,40 | 0,682 | -0,383 |
| 25,75 | 0,714 | 0,40 | 0,682 | -0,383 |
| 25,75 | 0,715 | 0,40 | 0,683 | -0,382 |
| 28,25 | 0,449 | 0,20 | 0,858 | -0,154 |
| 28,25 | 0,445 | 0,20 | 0,850 | -0,163 |
| 28,25 | 0,443 | 0,20 | 0,846 | -0,167 |
| 30,00 | 0,480 | 0,20 | 0,917 | -0,087 |
| 30,00 | 0,477 | 0,20 | 0,911 | -0,093 |
| 30,00 | 0,476 | 0,20 | 0,909 | -0,095 |
| 31,00 | 0,505 | 0,20 | 0,965 | -0,036 |
| 31,00 | 0,502 | 0,20 | 0,959 | -0,042 |
| 31,00 | 0,504 | 0,20 | 0,963 | -0,038 |
| 32,00 | 0,527 | 0,20 | 1,007 | 0,007 |
| 32,00 | 0,527 | 0,20 | 1,007 | 0,007 |
| 32,00 | 0,526 | 0,20 | 1,005 | 0,005 |
| 33,00 | 0,525 | 0,20 | 1,003 | 0,003 |
| 33,00 | 0,527 | 0,20 | 1,007 | 0,007 |
| 33,00 | 0,527 | 0,20 | 1,007 | 0,007 |

Tabela C.10 - Resultados dos parâmetros de crescimento da *P. putida*.

| [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{liq} (mg/l) | μ (dia ⁻¹) | t _{aclimação} (horas) |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 0,264 ± 0,018 | 0,30 | 2,229 | 8,60 |
| 0,344 ± 0,206 | 0,37 | 3,125 | 16,35 |
| 0,398 ± 0,015 | 0,85 | 5,323 | 17,73 |
| 0,616 ± 0,029 | 1,03 | 6,511 | 21,89 |
| 0,851 ± 0,020 | 1,58 | 7,770 | 20,17 |
| 1,348 ± 0,048 | 3,10 | 8,381 | 16,83 |
| 1,608 ± 0,560 | - | 8,568 | 17,87 |
| 2,004 ± 0,047 | 3,93 | 7,409 | 24,56 |
| 2,966 ± 0,206 | 6,57 | 4,569 | 13,93 |

Resultados dos ensaios com Q_{ar} = 10,5 l/min**Tabela C.11** - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = 0,159 ± 0,013 mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,239 | 1,00 | 0,091 | -2,394 |
| 0,00 | 0,239 | 1,00 | 0,091 | -2,394 |
| 0,00 | 0,239 | 1,00 | 0,091 | -2,394 |
| 3,67 | 0,256 | 1,00 | 0,098 | -2,325 |
| 3,67 | 0,259 | 1,00 | 0,099 | -2,313 |
| 3,67 | 0,259 | 1,00 | 0,099 | -2,313 |
| 4,92 | 0,229 | 1,00 | 0,087 | -2,436 |
| 4,92 | 0,229 | 1,00 | 0,087 | -2,436 |
| 4,92 | 0,229 | 1,00 | 0,087 | -2,436 |
| 5,59 | 0,224 | 1,00 | 0,086 | -2,458 |
| 5,59 | 0,224 | 1,00 | 0,086 | -2,458 |
| 5,59 | 0,224 | 1,00 | 0,086 | -2,458 |
| 6,59 | 0,222 | 1,00 | 0,085 | -2,467 |
| 6,59 | 0,224 | 1,00 | 0,086 | -2,458 |
| 6,59 | 0,225 | 1,00 | 0,086 | -2,454 |
| 7,42 | 0,22 | 1,00 | 0,084 | -2,476 |
| 7,42 | 0,224 | 1,00 | 0,086 | -2,458 |
| 7,42 | 0,222 | 1,00 | 0,085 | -2,467 |
| 22,17 | 0,304 | 0,40 | 0,290 | -1,237 |
| 22,17 | 0,304 | 0,40 | 0,290 | -1,237 |
| 22,17 | 0,304 | 0,40 | 0,290 | -1,237 |
| 23,17 | 0,334 | 0,40 | 0,319 | -1,143 |
| 23,17 | 0,334 | 0,40 | 0,319 | -1,143 |
| 23,17 | 0,333 | 0,40 | 0,318 | -1,146 |
| 24,17 | 0,369 | 0,40 | 0,352 | -1,043 |
| 24,17 | 0,368 | 0,40 | 0,351 | -1,046 |
| 24,17 | 0,367 | 0,40 | 0,350 | -1,048 |
| 25,00 | 0,407 | 0,40 | 0,389 | -0,945 |
| 25,00 | 0,406 | 0,40 | 0,388 | -0,947 |
| 25,00 | 0,406 | 0,40 | 0,388 | -0,947 |
| 26,75 | 0,463 | 0,40 | 0,442 | -0,816 |
| 26,75 | 0,463 | 0,40 | 0,442 | -0,816 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 26,75 | 0,463 | 0,40 | 0,442 | -0,816 |
| 27,75 | 0,509 | 0,40 | 0,486 | -0,721 |
| 27,75 | 0,508 | 0,40 | 0,485 | -0,723 |
| 27,75 | 0,508 | 0,40 | 0,485 | -0,723 |
| 28,75 | 0,558 | 0,40 | 0,533 | -0,629 |
| 28,75 | 0,557 | 0,40 | 0,532 | -0,631 |
| 28,75 | 0,556 | 0,40 | 0,531 | -0,633 |
| 29,75 | 0,607 | 0,40 | 0,580 | -0,545 |
| 29,75 | 0,609 | 0,40 | 0,582 | -0,542 |
| 29,75 | 0,606 | 0,40 | 0,579 | -0,547 |
| 30,25 | 0,622 | 0,40 | 0,594 | -0,521 |
| 30,25 | 0,621 | 0,40 | 0,593 | -0,522 |
| 30,25 | 0,621 | 0,40 | 0,593 | -0,522 |
| 30,75 | 0,643 | 0,40 | 0,614 | -0,488 |
| 30,75 | 0,643 | 0,40 | 0,614 | -0,488 |
| 30,75 | 0,643 | 0,40 | 0,614 | -0,488 |
| 31,25 | 0,657 | 0,40 | 0,627 | -0,466 |
| 31,25 | 0,656 | 0,40 | 0,626 | -0,468 |
| 31,25 | 0,658 | 0,40 | 0,628 | -0,465 |

Tabela C.12 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $0,374 \pm 0,014$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,138 | 1,00 | 0,053 | -2,943 |
| 0,00 | 0,138 | 1,00 | 0,053 | -2,943 |
| 0,00 | 0,138 | 1,00 | 0,053 | -2,943 |
| 0,83 | 0,156 | 1,00 | 0,060 | -2,820 |
| 0,83 | 0,159 | 1,00 | 0,061 | -2,801 |
| 0,83 | 0,158 | 1,00 | 0,060 | -2,807 |
| 1,66 | 0,210 | 1,00 | 0,080 | -2,523 |
| 1,66 | 0,211 | 1,00 | 0,081 | -2,518 |
| 1,66 | 0,210 | 1,00 | 0,080 | -2,523 |
| 3,74 | 0,233 | 1,00 | 0,089 | -2,419 |
| 3,74 | 0,233 | 1,00 | 0,089 | -2,419 |
| 3,74 | 0,233 | 1,00 | 0,089 | -2,419 |
| 5,16 | 0,226 | 1,00 | 0,086 | -2,450 |
| 5,16 | 0,226 | 1,00 | 0,086 | -2,450 |
| 5,16 | 0,226 | 1,00 | 0,086 | -2,450 |
| 5,99 | 0,227 | 1,00 | 0,087 | -2,445 |
| 5,99 | 0,227 | 1,00 | 0,087 | -2,445 |
| 5,99 | 0,227 | 1,00 | 0,087 | -2,445 |
| 7,07 | 0,217 | 1,00 | 0,083 | -2,490 |
| 7,07 | 0,221 | 1,00 | 0,084 | -2,472 |
| 7,07 | 0,218 | 1,00 | 0,083 | -2,486 |
| 7,90 | 0,222 | 1,00 | 0,085 | -2,467 |
| 7,90 | 0,222 | 1,00 | 0,085 | -2,467 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 7,90 | 0,222 | 1,00 | 0,085 | -2,467 |
| 22,73 | 0,403 | 0,40 | 0,385 | -0,955 |
| 22,73 | 0,405 | 0,40 | 0,387 | -0,950 |
| 22,73 | 0,403 | 0,40 | 0,385 | -0,955 |
| 23,65 | 0,456 | 0,40 | 0,435 | -0,831 |
| 23,65 | 0,457 | 0,40 | 0,436 | -0,829 |
| 23,65 | 0,455 | 0,40 | 0,435 | -0,834 |
| 24,65 | 0,505 | 0,40 | 0,482 | -0,729 |
| 24,65 | 0,505 | 0,40 | 0,482 | -0,729 |
| 24,65 | 0,505 | 0,40 | 0,482 | -0,729 |
| 25,40 | 0,548 | 0,40 | 0,523 | -0,648 |
| 25,40 | 0,548 | 0,40 | 0,523 | -0,648 |
| 25,40 | 0,548 | 0,40 | 0,523 | -0,648 |
| 27,40 | 0,654 | 0,40 | 0,625 | -0,471 |
| 27,40 | 0,654 | 0,40 | 0,625 | -0,471 |
| 27,40 | 0,653 | 0,40 | 0,624 | -0,472 |
| 28,40 | 0,701 | 0,40 | 0,669 | -0,401 |
| 28,40 | 0,700 | 0,40 | 0,669 | -0,403 |
| 28,40 | 0,702 | 0,40 | 0,670 | -0,400 |
| 29,40 | 0,770 | 0,40 | 0,735 | -0,307 |
| 29,40 | 0,771 | 0,40 | 0,736 | -0,306 |
| 29,40 | 0,771 | 0,40 | 0,736 | -0,306 |
| 29,90 | 0,391 | 0,20 | 0,747 | -0,292 |
| 29,90 | 0,391 | 0,20 | 0,747 | -0,292 |
| 29,90 | 0,389 | 0,20 | 0,743 | -0,297 |
| 30,40 | 0,415 | 0,20 | 0,793 | -0,232 |
| 30,40 | 0,415 | 0,20 | 0,793 | -0,232 |
| 30,40 | 0,414 | 0,20 | 0,791 | -0,235 |
| 30,90 | 0,420 | 0,20 | 0,802 | -0,220 |
| 30,90 | 0,420 | 0,20 | 0,802 | -0,220 |
| 30,90 | 0,420 | 0,20 | 0,802 | -0,220 |
| 31,90 | 0,417 | 0,20 | 0,796 | -0,228 |
| 31,90 | 0,419 | 0,20 | 0,800 | -0,223 |
| 31,90 | 0,415 | 0,20 | 0,793 | -0,232 |

Tabela C.13 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $0,694 \pm 0,025$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,107 | 1,00 | 0,041 | -3,197 |
| 0,00 | 0,107 | 1,00 | 0,041 | -3,197 |
| 0,00 | 0,106 | 1,00 | 0,040 | -3,207 |
| 0,83 | 0,105 | 1,00 | 0,040 | -3,216 |
| 0,83 | 0,102 | 1,00 | 0,039 | -3,245 |
| 0,83 | 0,102 | 1,00 | 0,039 | -3,245 |
| 2,83 | 0,102 | 1,00 | 0,039 | -3,245 |
| 2,83 | 0,102 | 1,00 | 0,039 | -3,245 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 2,83 | 0,102 | 1,00 | 0,039 | -3,245 |
| 3,83 | 0,098 | 1,00 | 0,037 | -3,285 |
| 3,83 | 0,097 | 1,00 | 0,037 | -3,295 |
| 3,83 | 0,097 | 1,00 | 0,037 | -3,295 |
| 5,83 | 0,091 | 1,00 | 0,035 | -3,359 |
| 5,83 | 0,092 | 1,00 | 0,035 | -3,348 |
| 5,83 | 0,092 | 1,00 | 0,035 | -3,348 |
| 6,83 | 0,096 | 1,00 | 0,037 | -3,306 |
| 6,83 | 0,096 | 1,00 | 0,037 | -3,306 |
| 6,83 | 0,096 | 1,00 | 0,037 | -3,306 |
| 7,83 | 0,094 | 1,00 | 0,036 | -3,327 |
| 7,83 | 0,094 | 1,00 | 0,036 | -3,327 |
| 7,83 | 0,094 | 1,00 | 0,036 | -3,327 |
| 22,25 | 0,844 | 0,40 | 0,806 | -0,216 |
| 22,25 | 0,846 | 0,40 | 0,808 | -0,213 |
| 22,25 | 0,846 | 0,40 | 0,808 | -0,213 |
| 22,83 | 0,468 | 0,20 | 0,894 | -0,112 |
| 22,83 | 0,467 | 0,20 | 0,892 | -0,114 |
| 22,83 | 0,468 | 0,20 | 0,894 | -0,112 |
| 23,33 | 0,495 | 0,20 | 0,945 | -0,056 |
| 23,33 | 0,494 | 0,20 | 0,944 | -0,058 |
| 23,33 | 0,492 | 0,20 | 0,940 | -0,062 |
| 23,83 | 0,524 | 0,20 | 1,001 | 0,001 |
| 23,83 | 0,524 | 0,20 | 1,001 | 0,001 |
| 23,83 | 0,524 | 0,20 | 1,001 | 0,001 |
| 24,33 | 0,553 | 0,20 | 1,056 | 0,055 |
| 24,33 | 0,553 | 0,20 | 1,056 | 0,055 |
| 24,33 | 0,55 | 0,20 | 1,051 | 0,049 |
| 25,08 | 0,597 | 0,20 | 1,140 | 0,131 |
| 25,08 | 0,593 | 0,20 | 1,133 | 0,125 |
| 25,08 | 0,593 | 0,20 | 1,133 | 0,125 |
| 27,08 | 0,717 | 0,20 | 1,369 | 0,314 |
| 27,08 | 0,715 | 0,20 | 1,366 | 0,312 |
| 27,08 | 0,715 | 0,20 | 1,366 | 0,312 |
| 28,08 | 0,775 | 0,20 | 1,480 | 0,392 |
| 28,08 | 0,773 | 0,20 | 1,476 | 0,390 |
| 28,08 | 0,775 | 0,20 | 1,480 | 0,392 |
| 30,08 | 0,474 | 0,10 | 1,811 | 0,594 |
| 30,08 | 0,476 | 0,10 | 1,818 | 0,598 |
| 30,08 | 0,475 | 0,10 | 1,815 | 0,596 |

Tabela C.14 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $1,251 \pm 0,072$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,200 | 1,000 | 0,076 | -2,572 |
| 0,00 | 0,200 | 1,000 | 0,076 | -2,572 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,200 | 1,000 | 0,076 | -2,572 |
| 2,00 | 0,187 | 1,000 | 0,071 | -2,639 |
| 2,00 | 0,187 | 1,000 | 0,071 | -2,639 |
| 2,00 | 0,187 | 1,000 | 0,071 | -2,639 |
| 3,00 | 0,189 | 1,000 | 0,072 | -2,628 |
| 3,00 | 0,189 | 1,000 | 0,072 | -2,628 |
| 3,00 | 0,190 | 1,000 | 0,073 | -2,623 |
| 3,50 | 0,184 | 1,000 | 0,070 | -2,655 |
| 3,50 | 0,185 | 1,000 | 0,071 | -2,650 |
| 3,50 | 0,185 | 1,000 | 0,071 | -2,650 |
| 18,00 | 0,336 | 0,400 | 0,321 | -1,137 |
| 18,00 | 0,336 | 0,400 | 0,321 | -1,137 |
| 18,00 | 0,336 | 0,400 | 0,321 | -1,137 |
| 18,50 | 0,420 | 0,400 | 0,401 | -0,914 |
| 18,50 | 0,422 | 0,400 | 0,403 | -0,909 |
| 18,50 | 0,422 | 0,400 | 0,403 | -0,909 |
| 19,25 | 0,532 | 0,400 | 0,508 | -0,677 |
| 19,25 | 0,532 | 0,400 | 0,508 | -0,677 |
| 19,25 | 0,532 | 0,400 | 0,508 | -0,677 |
| 19,75 | 0,657 | 0,400 | 0,627 | -0,466 |
| 19,75 | 0,655 | 0,400 | 0,626 | -0,469 |
| 19,75 | 0,655 | 0,400 | 0,626 | -0,469 |
| 20,25 | 0,756 | 0,400 | 0,722 | -0,326 |
| 20,25 | 0,760 | 0,400 | 0,726 | -0,320 |
| 20,25 | 0,760 | 0,400 | 0,726 | -0,320 |
| 20,75 | 0,463 | 0,200 | 0,884 | -0,123 |
| 20,75 | 0,463 | 0,200 | 0,884 | -0,123 |
| 20,75 | 0,463 | 0,200 | 0,884 | -0,123 |
| 22,92 | 0,601 | 0,200 | 1,148 | 0,138 |
| 22,92 | 0,601 | 0,200 | 1,148 | 0,138 |
| 22,92 | 0,600 | 0,200 | 1,146 | 0,136 |
| 23,75 | 0,694 | 0,200 | 1,326 | 0,282 |
| 23,75 | 0,692 | 0,200 | 1,322 | 0,279 |
| 23,75 | 0,693 | 0,200 | 1,324 | 0,280 |
| 24,75 | 0,771 | 0,200 | 1,473 | 0,387 |
| 24,75 | 0,770 | 0,200 | 1,471 | 0,386 |
| 24,75 | 0,769 | 0,200 | 1,469 | 0,384 |
| 25,83 | 0,859 | 0,200 | 1,641 | 0,495 |
| 25,83 | 0,859 | 0,200 | 1,641 | 0,495 |
| 25,83 | 0,859 | 0,200 | 1,641 | 0,495 |
| 26,75 | 0,441 | 0,100 | 1,685 | 0,522 |
| 26,75 | 0,441 | 0,100 | 1,685 | 0,522 |
| 26,75 | 0,441 | 0,100 | 1,685 | 0,522 |
| 28,25 | 0,459 | 0,100 | 1,753 | 0,562 |
| 28,25 | 0,459 | 0,100 | 1,753 | 0,562 |
| 28,25 | 0,459 | 0,100 | 1,753 | 0,562 |

Tabela C.15 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $1,729 \pm 0,06$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,257 | 1,00 | 0,098 | -2,321 |
| 0,00 | 0,255 | 1,00 | 0,097 | -2,329 |
| 0,00 | 0,255 | 1,00 | 0,097 | -2,329 |
| 1,00 | 0,199 | 1,00 | 0,076 | -2,577 |
| 1,00 | 0,202 | 1,00 | 0,077 | -2,562 |
| 1,00 | 0,198 | 1,00 | 0,076 | -2,582 |
| 2,00 | 0,202 | 1,00 | 0,077 | -2,562 |
| 2,00 | 0,199 | 1,00 | 0,076 | -2,577 |
| 2,00 | 0,201 | 1,00 | 0,077 | -2,567 |
| 3,00 | 0,202 | 1,00 | 0,077 | -2,562 |
| 3,00 | 0,202 | 1,00 | 0,077 | -2,562 |
| 3,00 | 0,202 | 1,00 | 0,077 | -2,562 |
| 17,17 | 0,217 | 1,00 | 0,083 | -2,490 |
| 17,17 | 0,218 | 1,00 | 0,083 | -2,486 |
| 17,17 | 0,219 | 1,00 | 0,084 | -2,481 |
| 18,17 | 0,233 | 1,00 | 0,089 | -2,419 |
| 18,17 | 0,233 | 1,00 | 0,089 | -2,419 |
| 18,17 | 0,235 | 1,00 | 0,090 | -2,411 |
| 19,17 | 0,237 | 1,00 | 0,091 | -2,402 |
| 19,17 | 0,239 | 1,00 | 0,091 | -2,394 |
| 19,17 | 0,237 | 1,00 | 0,091 | -2,402 |
| 20,17 | 0,26 | 1,00 | 0,099 | -2,309 |
| 20,17 | 0,259 | 1,00 | 0,099 | -2,313 |
| 20,17 | 0,261 | 1,00 | 0,100 | -2,306 |
| 22,42 | 0,402 | 1,00 | 0,154 | -1,874 |
| 22,42 | 0,405 | 1,00 | 0,155 | -1,866 |
| 22,42 | 0,402 | 1,00 | 0,154 | -1,874 |
| 23,17 | 0,527 | 1,00 | 0,201 | -1,603 |
| 23,17 | 0,53 | 1,00 | 0,202 | -1,597 |
| 23,17 | 0,53 | 1,00 | 0,202 | -1,597 |
| 23,67 | 0,618 | 1,00 | 0,236 | -1,444 |
| 23,67 | 0,62 | 1,00 | 0,237 | -1,440 |
| 23,67 | 0,621 | 1,00 | 0,237 | -1,439 |
| 24,17 | 0,734 | 1,00 | 0,280 | -1,272 |
| 24,17 | 0,733 | 1,00 | 0,280 | -1,273 |
| 24,17 | 0,737 | 1,00 | 0,282 | -1,268 |
| 24,67 | 0,369 | 0,40 | 0,352 | -1,043 |
| 24,67 | 0,365 | 0,40 | 0,349 | -1,054 |
| 24,67 | 0,365 | 0,40 | 0,349 | -1,054 |
| 25,17 | 0,444 | 0,40 | 0,424 | -0,858 |
| 25,17 | 0,443 | 0,40 | 0,423 | -0,860 |
| 25,17 | 0,439 | 0,40 | 0,419 | -0,869 |
| 25,67 | 0,517 | 0,40 | 0,494 | -0,706 |
| 25,67 | 0,521 | 0,40 | 0,498 | -0,698 |
| 25,67 | 0,518 | 0,40 | 0,495 | -0,704 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 26,17 | 0,589 | 0,40 | 0,562 | -0,575 |
| 26,17 | 0,591 | 0,40 | 0,564 | -0,572 |
| 26,17 | 0,585 | 0,40 | 0,559 | -0,582 |
| 26,92 | 0,699 | 0,40 | 0,668 | -0,404 |
| 26,92 | 0,691 | 0,40 | 0,660 | -0,416 |
| 26,92 | 0,693 | 0,40 | 0,662 | -0,413 |

Tabela C.16 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $1,968 \pm 0,079$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,262 | 1,00 | 0,100 | -2,302 |
| 0,00 | 0,261 | 1,00 | 0,100 | -2,306 |
| 0,00 | 0,265 | 1,00 | 0,101 | -2,290 |
| 1,33 | 0,244 | 1,00 | 0,093 | -2,373 |
| 1,33 | 0,243 | 1,00 | 0,093 | -2,377 |
| 1,33 | 0,245 | 1,00 | 0,094 | -2,369 |
| 2,58 | 0,169 | 1,00 | 0,065 | -2,740 |
| 2,58 | 0,166 | 1,00 | 0,063 | -2,758 |
| 2,58 | 0,166 | 1,00 | 0,063 | -2,758 |
| 3,58 | 0,166 | 1,00 | 0,063 | -2,758 |
| 3,58 | 0,166 | 1,00 | 0,063 | -2,758 |
| 3,58 | 0,166 | 1,00 | 0,063 | -2,758 |
| 18,33 | 0,291 | 1,00 | 0,111 | -2,197 |
| 18,33 | 0,293 | 1,00 | 0,112 | -2,190 |
| 18,33 | 0,293 | 1,00 | 0,112 | -2,190 |
| 19,33 | 0,312 | 1,00 | 0,119 | -2,127 |
| 19,33 | 0,316 | 1,00 | 0,121 | -2,114 |
| 19,33 | 0,316 | 1,00 | 0,121 | -2,114 |
| 20,58 | 0,373 | 1,00 | 0,142 | -1,949 |
| 20,58 | 0,373 | 1,00 | 0,142 | -1,949 |
| 20,58 | 0,373 | 1,00 | 0,142 | -1,949 |
| 21,08 | 0,39 | 1,00 | 0,149 | -1,904 |
| 21,08 | 0,392 | 1,00 | 0,150 | -1,899 |
| 21,08 | 0,394 | 1,00 | 0,151 | -1,894 |
| 23,00 | 0,668 | 1,00 | 0,255 | -1,366 |
| 23,00 | 0,67 | 1,00 | 0,256 | -1,363 |
| 23,00 | 0,674 | 1,00 | 0,257 | -1,357 |
| 23,67 | 0,87 | 1,00 | 0,332 | -1,102 |
| 23,67 | 0,873 | 1,00 | 0,333 | -1,098 |
| 23,67 | 0,873 | 1,00 | 0,333 | -1,098 |
| 24,34 | 0,487 | 0,40 | 0,465 | -0,766 |
| 24,34 | 0,489 | 0,40 | 0,467 | -0,761 |
| 24,34 | 0,487 | 0,40 | 0,465 | -0,766 |
| 24,84 | 0,566 | 0,40 | 0,541 | -0,615 |
| 24,84 | 0,57 | 0,40 | 0,544 | -0,608 |
| 24,84 | 0,567 | 0,40 | 0,541 | -0,613 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 25,34 | 0,692 | 0,40 | 0,661 | -0,414 |
| 25,34 | 0,694 | 0,40 | 0,663 | -0,411 |
| 25,34 | 0,692 | 0,40 | 0,661 | -0,414 |
| 25,84 | 0,458 | 0,20 | 0,875 | -0,134 |
| 25,84 | 0,455 | 0,20 | 0,869 | -0,140 |
| 25,84 | 0,454 | 0,20 | 0,867 | -0,143 |
| 26,42 | 0,507 | 0,20 | 0,968 | -0,032 |
| 26,42 | 0,506 | 0,20 | 0,966 | -0,034 |
| 26,42 | 0,502 | 0,20 | 0,959 | -0,042 |
| 27,09 | 0,589 | 0,20 | 1,125 | 0,118 |
| 27,09 | 0,591 | 0,20 | 1,129 | 0,121 |
| 27,09 | 0,585 | 0,20 | 1,117 | 0,111 |
| 28,09 | 0,697 | 0,20 | 1,331 | 0,286 |
| 28,09 | 0,694 | 0,20 | 1,326 | 0,282 |
| 28,09 | 0,692 | 0,20 | 1,322 | 0,279 |

Tabela C.17 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $2,676 \pm 0,177$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,143 | 1,00 | 0,055 | -2,907 |
| 0,00 | 0,143 | 1,00 | 0,055 | -2,907 |
| 0,00 | 0,143 | 1,00 | 0,055 | -2,907 |
| 2,00 | 0,261 | 1,00 | 0,100 | -2,306 |
| 2,00 | 0,261 | 1,00 | 0,100 | -2,306 |
| 2,00 | 0,268 | 1,00 | 0,102 | -2,279 |
| 4,00 | 0,303 | 1,00 | 0,116 | -2,156 |
| 4,00 | 0,301 | 1,00 | 0,115 | -2,163 |
| 4,00 | 0,301 | 1,00 | 0,115 | -2,163 |
| 6,00 | 0,295 | 1,00 | 0,113 | -2,183 |
| 6,00 | 0,294 | 1,00 | 0,112 | -2,187 |
| 6,00 | 0,294 | 1,00 | 0,112 | -2,187 |
| 8,00 | 0,282 | 1,00 | 0,108 | -2,228 |
| 8,00 | 0,281 | 1,00 | 0,107 | -2,232 |
| 8,00 | 0,281 | 1,00 | 0,107 | -2,232 |
| 23,00 | 0,668 | 0,50 | 0,510 | -0,673 |
| 23,00 | 0,662 | 0,50 | 0,506 | -0,682 |
| 23,00 | 0,66 | 0,50 | 0,504 | -0,685 |
| 24,00 | 0,783 | 0,40 | 0,748 | -0,291 |
| 24,00 | 0,787 | 0,40 | 0,752 | -0,286 |
| 24,00 | 0,787 | 0,40 | 0,752 | -0,286 |
| 24,50 | 0,47 | 0,20 | 0,898 | -0,108 |
| 24,50 | 0,471 | 0,20 | 0,900 | -0,106 |
| 24,50 | 0,47 | 0,20 | 0,898 | -0,108 |
| 25,00 | 0,55 | 0,20 | 1,051 | 0,049 |
| 25,00 | 0,55 | 0,20 | 1,051 | 0,049 |
| 25,00 | 0,551 | 0,20 | 1,052 | 0,051 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 25,50 | 0,623 | 0,20 | 1,190 | 0,174 |
| 25,50 | 0,627 | 0,20 | 1,198 | 0,180 |
| 25,50 | 0,623 | 0,20 | 1,190 | 0,174 |
| 26,17 | 0,378 | 0,10 | 1,444 | 0,367 |
| 26,17 | 0,379 | 0,10 | 1,448 | 0,370 |
| 26,17 | 0,38 | 0,10 | 1,452 | 0,373 |
| 28,00 | 0,482 | 0,10 | 1,841 | 0,610 |
| 28,00 | 0,479 | 0,10 | 1,830 | 0,604 |
| 28,00 | 0,479 | 0,10 | 1,830 | 0,604 |
| 28,75 | 0,546 | 0,10 | 2,086 | 0,735 |
| 28,75 | 0,546 | 0,10 | 2,086 | 0,735 |
| 28,75 | 0,546 | 0,10 | 2,086 | 0,735 |
| 29,50 | 0,597 | 0,10 | 2,281 | 0,824 |
| 29,50 | 0,594 | 0,10 | 2,269 | 0,819 |
| 29,50 | 0,594 | 0,10 | 2,269 | 0,819 |
| 30,00 | 0,61 | 0,10 | 2,330 | 0,846 |
| 30,00 | 0,609 | 0,10 | 2,326 | 0,844 |
| 30,00 | 0,605 | 0,10 | 2,311 | 0,838 |
| 31,00 | 0,663 | 0,10 | 2,533 | 0,929 |
| 31,00 | 0,663 | 0,10 | 2,533 | 0,929 |
| 31,00 | 0,663 | 0,10 | 2,533 | 0,929 |
| 32,00 | 0,668 | 0,10 | 2,552 | 0,937 |
| 32,00 | 0,668 | 0,10 | 2,552 | 0,937 |
| 32,00 | 0,668 | 0,10 | 2,552 | 0,937 |

Tabela C.18 - Resultados experimentais da cinética de crescimento da *Pseudomonas putida* para [tolueno] = $4,178 \pm 0,231$ mg/l.

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 0,00 | 0,240 | 1,0 | 0,092 | -2,389 |
| 0,00 | 0,138 | 1,0 | 0,053 | -2,943 |
| 0,00 | 0,238 | 1,0 | 0,091 | -2,398 |
| 2,00 | 0,244 | 1,0 | 0,093 | -2,373 |
| 2,00 | 0,246 | 1,0 | 0,094 | -2,365 |
| 2,00 | 0,244 | 1,0 | 0,093 | -2,373 |
| 4,00 | 0,237 | 1,0 | 0,091 | -2,402 |
| 4,00 | 0,238 | 1,0 | 0,091 | -2,398 |
| 4,00 | 0,238 | 1,0 | 0,091 | -2,398 |
| 19,00 | 0,259 | 1,0 | 0,099 | -2,313 |
| 19,00 | 0,260 | 1,0 | 0,099 | -2,309 |
| 19,00 | 0,260 | 1,0 | 0,099 | -2,309 |
| 20,00 | 0,268 | 1,0 | 0,102 | -2,279 |
| 20,00 | 0,270 | 1,0 | 0,103 | -2,272 |
| 20,00 | 0,270 | 1,0 | 0,103 | -2,272 |
| 21,00 | 0,289 | 1,0 | 0,110 | -2,204 |
| 21,00 | 0,290 | 1,0 | 0,111 | -2,200 |
| 21,00 | 0,290 | 1,0 | 0,111 | -2,200 |

| Tempo (horas) | Absorvância 660 nm | Factor de diluição | [X] (g/l) | LN (X) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|
| 24,00 | 0,599 | 1,0 | 0,229 | -1,475 |
| 24,00 | 0,603 | 1,0 | 0,230 | -1,468 |
| 24,00 | 0,603 | 1,0 | 0,230 | -1,468 |
| 25,00 | 0,366 | 0,4 | 0,350 | -1,051 |
| 25,00 | 0,359 | 0,4 | 0,343 | -1,070 |
| 25,00 | 0,359 | 0,4 | 0,343 | -1,070 |
| 25,50 | 0,449 | 0,4 | 0,429 | -0,847 |
| 25,50 | 0,437 | 0,4 | 0,417 | -0,874 |
| 25,50 | 0,437 | 0,4 | 0,417 | -0,874 |
| 26,00 | 0,533 | 0,4 | 0,509 | -0,675 |
| 26,00 | 0,533 | 0,4 | 0,509 | -0,675 |
| 26,00 | 0,527 | 0,4 | 0,503 | -0,687 |
| 26,50 | 0,664 | 0,4 | 0,634 | -0,456 |
| 26,50 | 0,671 | 0,4 | 0,641 | -0,445 |
| 26,50 | 0,673 | 0,4 | 0,643 | -0,442 |
| 27,00 | 0,776 | 0,4 | 0,741 | -0,300 |
| 27,00 | 0,768 | 0,4 | 0,733 | -0,310 |
| 27,00 | 0,755 | 0,4 | 0,721 | -0,327 |
| 25,34 | 0,692 | 0,4 | 0,661 | -0,414 |
| 25,34 | 0,694 | 0,4 | 0,663 | -0,411 |
| 25,34 | 0,692 | 0,4 | 0,661 | -0,414 |
| 25,84 | 0,458 | 0,2 | 0,875 | -0,134 |
| 25,84 | 0,455 | 0,2 | 0,869 | -0,140 |
| 25,84 | 0,454 | 0,2 | 0,867 | -0,143 |
| 26,42 | 0,507 | 0,2 | 0,968 | -0,032 |
| 26,42 | 0,506 | 0,2 | 0,966 | -0,034 |
| 26,42 | 0,502 | 0,2 | 0,959 | -0,042 |
| 27,09 | 0,589 | 0,2 | 1,125 | 0,118 |
| 27,09 | 0,591 | 0,2 | 1,129 | 0,121 |
| 27,09 | 0,585 | 0,2 | 1,117 | 0,111 |
| 28,09 | 0,697 | 0,2 | 1,331 | 0,286 |
| 28,09 | 0,694 | 0,2 | 1,326 | 0,282 |
| 28,09 | 0,692 | 0,2 | 1,322 | 0,279 |

Tabela C.19 - Resultados dos parâmetros de crescimento da *P. putida*.

| [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{liq} (mg/l) | μ (dia ⁻¹) | $t_{\text{aclimatação}}$ (horas) |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| 0,159 ± 0,013 | 0,16 | 2,07 | 7,70 |
| 0,374 ± 0,014 | 0,47 | 2,49 | 7,95 |
| 0,694 ± 0,025 | 1,43 | 5,08 | 7,90 |
| 1,251 ± 0,072 | 2,73 | 8,65 | 13,80 |
| 1,729 ± 0,060 | 3,86 | 10,14 | 21,74 |
| 1,969 ± 0,079 | 4,71 | 8,51 | 20,40 |
| 2,676 ± 0,177 | 6,30 | 7,89 | 18,18 |
| 4,178 ± 0,231 | 8,04 | 9,42 | 21,70 |

C.2 Resultados experimentais de consumo de tolueno

Resultados dos ensaios com $Q_{ar} = 5,6$ l/min

Tabela C.20 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = $0,264 \pm 0,018$ mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saida} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{said} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 1,17 | 3,0 | 10495 | 7725 | 0,244 | 0,169 | 30,5 |
| 1,17 | 4,0 | 15284 | 10434 | 0,270 | 0,172 | 36,2 |
| 1,84 | 4,0 | 15784 | 12326 | 0,280 | 0,210 | 24,9 |
| 3,59 | 4,0 | 14993 | 13320 | 0,264 | 0,230 | 12,8 |
| 4,42 | 4,0 | 16091 | 13801 | 0,286 | 0,240 | 16,1 |
| 4,95 | 4,0 | 15432 | 13838 | 0,273 | 0,241 | 11,8 |
| 22,87 | 4,0 | 14686 | 4585 | 0,258 | 0,054 | 78,9 |
| 23,45 | 4,0 | 11482 | 4350 | 0,193 | 0,050 | 74,3 |
| 23,87 | 4,0 | 13105 | 3716 | 0,226 | 0,037 | 83,7 |
| 24,62 | 4,0 | 13227 | 4623,2 | 0,228 | 0,055 | 75,9 |
| 25,37 | 4,0 | - | 4679,2 | - | 0,056 | - |
| 27,79 | 4,0 | 17407 | 4679,2 | 0,312 | 0,056 | 82,0 |
| 28,46 | 4,0 | 16682 | 4260,8 | 0,298 | 0,048 | 84,0 |
| 29,04 | 4,0 | 10920 | 4117 | 0,182 | 0,045 | 75,3 |
| 29,79 | 4,0 | 15367 | 4788,8 | 0,271 | 0,058 | 78,5 |
| 30,62 | 4,0 | 17126 | 5124,8 | 0,307 | 0,065 | 78,8 |
| 31,12 | 4,0 | 17680 | 4400 | 0,318 | 0,051 | 84,1 |
| 31,62 | 4,0 | 15860 | 5360 | 0,281 | 0,070 | 75,2 |

Tabela C.21 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = $0,344 \pm 0,021$ mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saida} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{said} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 1,0 | 5076 | 4889 | 0,370 | 0,356 | 4,1 |
| 2,42 | 1,0 | 5454 | 4829 | 0,400 | 0,351 | 12,5 |
| 3,50 | 1,0 | 5853 | 5042 | 0,430 | 0,370 | 14,6 |
| 4,50 | 1,0 | 4072 | 3706 | 0,290 | 0,260 | 10,2 |
| 5,67 | 2,0 | 11800 | - | 0,440 | - | - |
| 7,50 | 2,0 | 9955 | 9655 | 0,360 | - | - |
| 21,50 | 2,0 | 11355 | 3966 | 0,420 | 0,122 | 71,0 |
| 22,25 | 2,0 | 11515 | 3597 | 0,430 | 0,107 | 74,9 |
| 22,92 | 2,0 | 10335 | 2929 | 0,380 | 0,080 | 78,9 |
| 23,92 | 2,0 | 11145 | 2782 | 0,410 | 0,074 | 82,0 |
| 24,50 | 2,0 | 12032 | 2567 | 0,450 | 0,065 | 85,4 |
| 26,42 | 2,0 | 12251 | 2000 | 0,460 | 0,043 | 90,7 |
| 27,17 | 2,0 | 10073 | 3022 | 0,370 | 0,080 | 78,2 |
| 27,75 | 2,0 | 11524 | 2211 | 0,430 | 0,051 | 88,0 |
| 28,25 | 2,0 | 10483 | 2055 | 0,380 | 0,045 | 88,4 |
| 29,25 | 2,0 | 10340 | 2055 | 0,380 | 0,045 | 88,2 |
| 30,25 | 2,0 | 10384 | 2313 | 0,380 | 0,055 | 85,5 |
| 30,75 | 2,0 | 11404 | 2269 | 0,420 | 0,053 | 87,3 |
| 31,25 | 2,0 | 11646 | 1983 | 0,430 | 0,042 | 90,3 |
| 45,75 | 2,0 | 10919 | 3057 | 0,400 | 0,085 | 78,8 |
| 47,25 | 2,0 | 10454 | 2845 | 0,380 | 0,077 | 80,0 |
| 48,33 | 2,0 | 10003 | 3196 | 0,360 | 0,090 | 75,3 |

Tabela C.22 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
 $[\text{tolueno}] = 0,398 \pm 0,016 \text{ mg/l.}$

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ML) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 3,0 | 22643 | - | 0,570 | - | - |
| 3,08 | 4,0 | 14168 | 12404 | 0,250 | 0,210 | 14,4 |
| 4,08 | 4,0 | 16046 | 12196 | 0,280 | 0,210 | 27,2 |
| 5,08 | 4,0 | 18321 | 13034 | 0,330 | 0,220 | 32,2 |
| 6,50 | 4,0 | 21220 | 14223 | 0,390 | 0,250 | 36,2 |
| 22,67 | 4,0 | 20374 | 5141 | 0,370 | 0,070 | 82,4 |
| 23,67 | 4,0 | 21978 | 5182 | 0,400 | 0,070 | 83,6 |
| 24,67 | 4,0 | 20677 | 4955 | 0,380 | 0,060 | 83,7 |
| 25,34 | 4,0 | 17447 | 4706 | 0,310 | 0,060 | 81,9 |
| 27,34 | 4,0 | 21414 | 4774 | 0,390 | 0,060 | 85,2 |
| 27,92 | 4,0 | 18646 | 4726 | 0,340 | 0,060 | 83,1 |
| 28,42 | 4,0 | 19111 | 5162 | 0,350 | 0,070 | 81,0 |
| 29,42 | 4,0 | 18042 | - | 0,330 | - | - |
| 30,42 | 4,0 | 20343 | 5545 | 0,370 | 0,070 | 80,2 |
| 31,42 | 4,0 | 19669 | - | 0,360 | - | - |
| 31,42 | 4,0 | 22785 | 4984 | 0,420 | 0,060 | 85,2 |
| 32,17 | 4,0 | 19982 | 5001 | 0,360 | 0,060 | 82,8 |

Tabela C.23 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
 $[\text{tolueno}] = 0,616 \pm 0,029 \text{ mg/l.}$

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 1,0 | 8081 | 7353 | 0,610 | 0,554 | 9,6 |
| 1,00 | 1,0 | 8191 | 7127 | 0,620 | 0,536 | 13,8 |
| 1,00 | 1,0 | 8367 | 7333 | 0,640 | 0,552 | 13,1 |
| 17,75 | 1,0 | 9370 | 7143 | 0,720 | 0,537 | 25,0 |
| 18,83 | 1,0 | 7102 | 6869 | 0,530 | 0,515 | - |
| 20,83 | 1,0 | 9678 | 6868 | 0,740 | 0,515 | 30,5 |
| 24,33 | 1,0 | - | 5904 | - | 0,437 | - |
| 24,33 | 1,0 | 7901 | 5715 | 0,600 | 0,422 | 29,4 |
| 25,25 | 1,0 | 8776 | 5302 | 0,670 | 0,389 | 41,8 |
| 25,25 | 1,0 | 8773 | 4746 | 0,670 | 0,344 | 48,5 |
| 25,75 | 1,0 | 7586 | 4339 | 0,570 | 0,311 | 45,6 |
| 26,25 | 1,0 | 7997 | 3877 | 0,610 | 0,274 | 54,8 |
| 26,75 | 1,0 | 7741 | 3782 | 0,590 | 0,266 | 54,5 |
| 26,75 | 1,0 | - | 3523 | - | 0,246 | - |
| 41,83 | 1,0 | 7330 | 3048 | 0,550 | 0,207 | 62,4 |
| 43,99 | 1,0 | 8701 | 3344 | 0,660 | 0,231 | 65,1 |
| 44,99 | 1,0 | 7352 | 3326 | 0,550 | 0,230 | 58,5 |

Tabela C.24 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
 $[\text{tolueno}] = 0,851 \pm 0,020 \text{ mg/l.}$

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 4,00 | 1,0 | 10851 | 10830 | 0,84 | 0,83 | 0,2 |
| 4,00 | 1,0 | 10942 | 10318 | 0,84 | 0,79 | 5,9 |
| 5,50 | 1,0 | 10030 | 9816 | 0,77 | 0,75 | 2,2 |
| 7,00 | 1,0 | 10884 | - | 0,84 | - | - |
| 21,25 | 1,0 | 11033 | 10913 | 0,85 | 0,84 | 1,1 |
| 22,17 | 1,0 | 10471 | 7924 | 0,81 | 0,6 | 25,5 |
| 22,17 | 1,0 | 10588 | - | 0,81 | - | - |

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saida} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 23,25 | 1,0 | 10938 | 5972 | 0,84 | 0,44 | 47,5 |
| 23,75 | 1,0 | - | 5231 | - | 0,38 | - |
| 24,33 | 1,0 | 11457 | 5113 | 0,88 | 0,37 | 57,6 |
| 24,33 | 1,0 | 11729 | 4824 | 0,91 | 0,35 | 61,3 |
| 26,25 | 1,0 | 11902 | 3422 | 0,92 | 0,24 | 74,2 |
| 26,75 | 1,0 | 11396 | 3138 | 0,88 | 0,21 | 75,6 |
| 27,42 | 1,0 | 10665 | 3508 | 0,82 | 0,24 | 70,2 |
| 28,09 | 1,0 | 11726 | 3566 | 0,91 | 0,25 | 72,5 |
| 28,59 | 1,0 | 11140 | 3421 | 0,86 | 0,24 | 72,4 |
| 29,09 | 1,0 | 10042 | 2784 | 0,77 | 0,19 | 75,8 |
| 29,67 | 1,0 | 10966 | 3220 | 0,84 | 0,22 | 73,8 |
| 30,09 | 1,0 | 11616 | 3723 | 0,9 | 0,26 | 70,8 |
| 30,59 | 1,0 | 11864 | 3645 | 0,92 | 0,26 | 72,2 |

Tabela C.25 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 1,248 ± 0,048 mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saida} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 1,00 | 1,0 | 15910 | - | 1,240 | - | - |
| 1,00 | 1,0 | 18023 | 17110 | 1,410 | 1,340 | 5,2 |
| 1,00 | 1,0 | - | 16941 | - | 1,326 | - |
| 1,92 | 1,0 | 18415 | 16143 | 1,440 | 1,262 | 12,7 |
| 3,50 | 1,0 | 16195 | 15455 | 1,270 | 1,206 | 4,7 |
| 3,50 | 1,0 | 18246 | - | 1,430 | -0,038 | - |
| 18,83 | 1,0 | 16956 | 15520 | 1,330 | 1,211 | 8,7 |
| 19,75 | 1,0 | 16256 | 16029 | 1,270 | 1,252 | 1,4 |
| 20,33 | 1,0 | 18907 | 14436 | 1,480 | 1,124 | 24,3 |
| 20,83 | 1,0 | 17165 | 12820 | 1,340 | 0,994 | 26,0 |
| 21,33 | 1,0 | 16313 | 10222 | 1,280 | 0,785 | 38,5 |
| 24,33 | 1,0 | 18355 | 7146 | 1,440 | 0,537 | 62,7 |
| 24,83 | 1,0 | 17856 | 7626 | 1,400 | 0,576 | 58,9 |
| 25,33 | 1,0 | 15276 | 6244 | 1,190 | 0,465 | 61,0 |
| 25,83 | 1,0 | 17181 | 6446 | 1,350 | 0,481 | 64,3 |
| 26,75 | 1,0 | 18708 | 6716 | 1,470 | 0,503 | 65,8 |
| 27,33 | 1,0 | - | 5318 | - | 0,390 | - |

Tabela C.26 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 1,608 ± 0,056mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saida} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 1,58 | 0,8 | 15226 | 14726 | 1,490 | 1,444 | 3,4 |
| 3,58 | 0,8 | 16723 | 15539 | 1,640 | 1,526 | 7,2 |
| 18,83 | 0,8 | 16195 | 15455 | 1,590 | 1,517 | 4,7 |
| 20,83 | 0,8 | 16636 | 14474 | 1,640 | 1,419 | 13,3 |
| 21,83 | 0,8 | 16087 | 12156 | 1,580 | 1,185 | 25,0 |
| 24,16 | 0,8 | 17141 | 6492 | 1,690 | 0,615 | 63,5 |
| 24,66 | 0,8 | 16376 | 6024 | 1,610 | 0,568 | 64,7 |
| 25,41 | 0,8 | 16147 | 6581 | 1,590 | 0,624 | 60,7 |
| 26,41 | 0,8 | 15361 | - | 1,510 | - | - |
| 26,41 | 0,8 | 18539 | 5474 | 1,830 | 0,513 | 71,9 |
| 26,41 | 0,8 | 15623 | - | 1,530 | -- | -- |
| 26,99 | 0,8 | 16189 | 6382 | 1,590 | 0,604 | 62,0 |

Tabela C.27 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 2.004 ± 0,029mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 3,00 | 1,0 | 23320 | - | 1,840 | - | - |
| 3,00 | 1,0 | 23874 | - | 1,880 | - | - |
| 4,50 | 1,0 | 25142 | - | 1,990 | - | - |
| 4,50 | 1,0 | - | 25275 | - | - | - |
| 4,50 | 1,0 | 25523 | 25080 | 2,020 | 1,981 | 1,8 |
| 6,67 | 0,8 | 20643 | 20339 | 2,039 | 2,009 | 1,5 |
| 6,67 | 0,8 | 20776 | - | 2,050 | -0,038 | - |
| 6,67 | 0,8 | 19869 | 18866 | 1,960 | 1,861 | 5,1 |
| 21,92 | 0,8 | 20837 | 20567 | 2,060 | 2,032 | 1,3 |
| 23,50 | 0,8 | 20248 | 20032 | 2,000 | 1,980 | 1,1 |
| 24,83 | 0,8 | 20621 | 17190 | 2,040 | 1,690 | 16,9 |
| 26,75 | 0,8 | 20290 | 11902 | 2,000 | 1,160 | 42,1 |
| 27,83 | 0,8 | 19574 | 10536 | 1,930 | 1,020 | 47,1 |
| 28,91 | 0,8 | 20225 | 9018 | 2,000 | 0,870 | 56,5 |
| 29,91 | 0,8 | 18002 | 6315 | 1,770 | 0,600 | 66,3 |
| 30,49 | 0,8 | 22201 | 7274 | 2,200 | 0,690 | 68,4 |
| 30,99 | 1,0 | - | 7054 | - | 0,530 | - |
| 31,49 | 1,0 | - | 8718 | - | 0,664 | - |

Tabela C.28- Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 2.996 ± 0,206mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 0,8 | 27239 | 33703 | 2,703 | 3,354 | - |
| 1,00 | 0,8 | 32374 | - | 3,220 | - | - |
| 2,00 | 0,8 | 30307 | 20359 | 3,012 | 2,011 | 33,2 |
| 4,00 | 0,8 | 27023 | 26937 | 2,681 | 2,673 | - |
| 5,00 | 0,8 | 27985 | 22059 | 2,778 | 2,182 | 21,5 |
| 7,00 | 0,8 | 31696 | 19536 | 3,152 | 1,928 | 38,8 |
| 23,00 | 0,8 | 28293 | 22840 | 2,809 | 2,261 | 19,5 |
| 23,50 | 0,8 | 28154 | - | 2,795 | - | - |
| 24,25 | 0,8 | 29291 | 21287 | 2,910 | 2,104 | 27,7 |
| 25,00 | 0,8 | 36169 | 14777 | 3,602 | 1,449 | 59,8 |

Tabela C.29 - Valores dos parâmetros de consumo de tolueno.

| [tolueno] _{ent} (mg/l) | U (dia-1) | Y _{obs} (mg _{biomassa} /mg _{tolueno}) |
|---------------------------------|-----------|---|
| 0,398 ± 0,015 | 5,28 | 0,82 |
| 0,616 ± 0,029 | 5,28 | 1,23 |
| 0,851 ± 0,020 | 4,32 | 1,18 |
| 1,348 ± 0,048 | 3,60 | 1,75 |
| 1,608 ± 0,560 | 4,80 | 1,57 |
| 2,004 ± 0,047 | 4,32 | 0,99 |

Resultados dos ensaios com Q_{ar} = 10,5 l/min

Tabela C.30 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 0,159 ± 0,013 mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 3,67 | 2,5 | 5040 | - | 0,124 | - | - |
| 4,92 | 2,5 | 7191 | 6041 | 0,194 | 0,157 | 19,1 |

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 5,59 | 2,5 | 7393 | 5712 | 0,200 | 0,146 | 27,1 |
| 6,59 | 2,5 | 6808 | 5829 | 0,181 | 0,150 | 17,4 |
| 7,42 | 2,5 | - | 5476 | - | 0,138 | - |
| 7,52 | 2,5 | 6609 | 5901 | 0,175 | 0,152 | 13,0 |
| 22,17 | 2,5 | 6189 | 2903 | 0,161 | 0,055 | 65,6 |
| 23,17 | 2,5 | 4969 | 2377 | 0,122 | 0,053 | 56,7 |
| 24,17 | 2,5 | 5756 | 2793 | 0,147 | 0,040 | 67,2 |
| 25,00 | 2,5 | 4876 | 2392 | 0,119 | 0,039 | 78,6 |
| 25,10 | 2,5 | 6237 | - | 0,163 | - | - |
| 26,75 | 2,5 | 5064 | 2665 | 0,125 | 0,027 | 83,7 |
| 26,75 | 5,0 | 9845 | 4022 | 0,121 | - | - |
| 27,75 | 5,0 | 14038 | 5126 | 0,188 | - | - |
| 28,75 | 5,0 | 13674 | 4202 | 0,182 | 0,030 | 83,7, |
| 29,75 | 5,0 | 11853 | 3479 | 0,153 | 0,018 | 88,2 |
| 30,25 | 5,0 | 12270 | 3918 | 0,160 | 0,025 | 84,3 |
| 30,75 | 5,0 | - | 5743 | - | 0,050 | - |
| 31,25 | 2,5 | 7152 | 2715 | 0,192 | 0,049 | 74,3 |
| 31,25 | 2,5 | 6028 | - | 0,160 | - | - |

Tabela C.31 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 0,374 ± 0,014 mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 2,5 | 12423 | - | 0,362 | - | - |
| 0,83 | 2,5 | 11921 | 10890 | 0,346 | 0,313 | 0,3 |
| 1,66 | 2,5 | 12047 | 11365 | 0,350 | 0,328 | 6,3 |
| 5,16 | 2,5 | - | 11948 | - | 0,347 | - |
| 5,99 | 2,5 | 13385 | 11340 | 0,393 | 0,327 | 16,8 |
| 7,07 | 2,5 | 12107 | 11935 | 0,352 | 0,346 | 1,6 |
| 7,90 | 2,5 | 12457 | 6200 | 0,363 | 0,330 | 0,9 |
| 22,73 | 2,5 | 14635 | 5162 | 0,433 | 0,162 | 55,5 |
| 23,65 | 2,5 | 14505 | 4735 | 0,429 | 0,128 | 70,4 |
| 23,65 | 2,5 | 12169 | - | 0,354 | - | - |
| 24,65 | 2,5 | 13392 | 5297 | 0,393 | 0,114 | 73,3 |
| 25,40 | 2,5 | 12390 | 4356 | 0,361 | 0,133 | 66,3 |
| 27,40 | 2,5 | 12259 | 5002 | 0,357 | 0,102 | 71,7 |
| 28,40 | 2,5 | 12342 | 5051 | 0,359 | - | 65,5 |
| 29,40 | 2,5 | 13693 | 5350 | 0,403 | - | 65,3 |
| 29,90 | 2,5 | 13736 | 5489 | 0,404 | - | 66,7 |
| 30,40 | 2,5 | 12488 | 5489 | 0,364 | - | 65,7 |
| 30,90 | 2,5 | 11708 | 5152 | 0,339 | - | 61,9 |

Tabela C.32 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 0,694 ± 0,025 mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 1,0 | 9011 | - | 0,687 | - | - |
| 0,83 | 1,0 | 8278 | 6848 | 0,628 | 0,513 | 18,3 |
| 2,83 | 2,0 | 17711 | 16230 | 0,675 | 0,615 | 8,8 |

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 3,83 | 2,5 | 23557 | 21894 | 0,721 | 0,667 | 7,4 |
| 5,83 | 2,0 | 19635 | 19900 | 0,752 | 0,763 | 0,0 |
| 6,83 | 2,0 | 20411 | 15010 | 0,784 | 0,566 | 27,7 |
| 6,83 | 2,0 | 18255 | 17858 | 0,697 | 0,681 | 2,3 |
| 7,83 | 2,0 | - | 15319 | - | 0,579 | - |
| 22,25 | 2,0 | 18173 | 8569 | 0,694 | 0,307 | 55,7 |
| 22,83 | 2,0 | 19622 | 8477 | 0,752 | 0,303 | 59,7 |
| 23,33 | 2,0 | - | 6832 | - | 0,237 | - |
| 23,33 | 2,0 | 17655 | 8193 | 0,673 | 0,292 | 56,6 |
| 23,83 | 2,0 | 17898 | 9929 | 0,682 | 0,362 | 47,0 |
| 24,33 | 2,0 | 17222 | 9516 | 0,655 | 0,345 | 47,3 |
| 25,08 | 2,0 | 17043 | - | 0,648 | - | - |
| 27,08 | 2,0 | 17714 | - | 0,675 | - | - |

Tabela C.33 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
 $[\text{tolueno}] = 1,251 \pm 0,072 \text{ mg/l.}$

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 1,0 | - | - | 1,240 | 1,180 | 4,8 |
| 2,00 | 1,0 | 15917 | 15102 | 1,200 | 1,178 | 1,8 |
| 3,00 | 1,0 | 14783 | 14237 | 1,240 | 1,108 | 10,6 |
| 3,50 | 1,0 | 15906 | 15583 | 1,230 | 1,217 | 1,1 |
| 18,00 | 1,0 | 15695 | 14393 | 1,160 | 1,121 | 3,4 |
| 18,00 | 1,0 | 14908 | 13579 | - | 1,055 | - |
| 18,50 | 1,0 | 19830 | 9944 | 1,558 | 1,060 | 32,0 |
| 19,25 | 1,0 | 15839 | 10312 | 1,237 | 0,760 | 38,6 |
| 19,75 | 1,0 | 14099 | 6644 | 1,097 | 0,790 | 28,0 |
| 20,25 | 1,0 | 15294 | 7306 | 1,193 | 0,550 | 53,9 |
| 20,75 | 1,0 | 18647 | 8312 | 1,463 | 0,631 | 56,9 |
| 20,75 | 1,0 | 16962 | - | 1,328 | - | - |
| 22,92 | 1,0 | 15944 | 7289 | 1,246 | 0,550 | 55,8 |
| 23,75 | 1,0 | 15028 | - | 1,172 | - | - |

Tabela C.34 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
 $[\text{tolueno}] = 1,729 \pm 0,060 \text{ mg/l.}$

| Tempo (horas) | V _{injectado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 1,33 | 1,0 | 20189 | 21122 | 1,59 | 1,66 | 0,0 |
| 2,58 | 1,0 | 20838 | 20421 | 1,64 | 1,61 | 2,0 |
| 2,58 | 1,0 | 20578 | - | 1,62 | - | - |
| 3,58 | 1,0 | 20377 | 21453 | 1,60 | 1,69 | 0,0 |
| 19,33 | 1,0 | 23115 | - | 1,82 | - | - |
| 20,58 | 1,0 | 21281 | 21198 | 1,68 | 1,67 | 0,4 |
| 21,08 | 1,0 | 23251 | 21882 | 1,83 | 1,72 | 6,0 |
| 23,67 | 1,0 | 22935 | 19721 | 1,81 | 1,55 | 14,3 |
| 24,34 | 1,0 | 23428 | 17762 | 1,85 | 1,39 | 24,7 |
| 25,34 | 1,0 | 24089 | 15387 | 1,90 | 1,20 | 36,8 |
| 25,84 | 1,0 | 22807 | 14361 | 1,80 | 1,12 | 37,8 |
| 26,42 | 1,0 | 22127 | 14241 | 1,74 | 1,11 | 36,4 |

| Tempo (horas) | V _{injetado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 27,09 | 1,0 | 21030 | 13157 | 1,66 | 1,02 | 38,3 |
| 28,09 | 1,0 | 21338 | 10760 | 1,68 | 0,83 | 50,7 |

Tabela C.35 - Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 1,969 ± 0,079mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injetado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 1,0 | 27416 | 25851 | 2,169 | 2,043 | 5,8 |
| 1,00 | 1,0 | 27918 | 24570 | 2,210 | 1,940 | 12,2 |
| 2,00 | 1,0 | 23935 | 25227 | 1,889 | 1,993 | 0,0 |
| 17,17 | 1,0 | 25079 | 24750 | 1,981 | 1,955 | 1,3 |
| 17,84 | 1,0 | 24800 | 23348 | 1,959 | 1,842 | 5,9 |
| 18,42 | 1,0 | 26343 | 23629 | 2,083 | 1,864 | 10,5 |
| 19,17 | 1,0 | 266326 | - | 21,404 | - | - |
| 19,17 | 1,0 | 24269 | 23287 | 1,916 | 1,837 | 4,12 |
| 21,42 | 1,0 | 23352 | 19916 | 1,842 | 1,565 | 15,0 |
| 22,42 | 1,0 | 23230 | 21429 | 1,832 | 1,687 | 7,9 |
| 23,17 | 1,0 | 24659 | 20148 | 1,947 | 1,584 | 18,7 |
| 23,67 | 1,0 | 24823 | 17573 | 1,960 | 1,377 | 29,8 |
| 24,17 | 1,0 | 23427 | 16166 | 1,848 | 1,264 | 31,6 |

Tabela C.36- Resultados experimentais de consumo de tolueno para
[tolueno] = 2,676 ± 0,177mg/l.

| Tempo (horas) | V _{injetado} (ml) | A _{entrada} | A _{saída} | [tolueno] _{ent} (mg/l) | [tolueno] _{saíd} (mg/l) | %Remoção |
|---------------|----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0,00 | 1,0 | 35975 | 31745 | 2,858 | 2,518 | 11,9 |
| 0,00 | 0,8 | 26639 | - | 2,643 | - | - |
| 2,00 | 0,8 | 25905 | - | 2,569 | - | - |
| 4,00 | 0,9 | 30232 | 28450 | 2,666 | 2,507 | 5,9 |
| 6,00 | 0,9 | 31663 | 29996 | 2,794 | 2,645 | 5,3 |
| 8,00 | 1,0 | 44063 | 31531 | - | 2,501 | - |
| 23,00 | 0,9 | 26999 | 23961 | 2,377 | 2,105 | 11,4 |
| 24,00 | 0,9 | 24462 | 17199 | 2,150 | 1,501 | 30,2 |
| 25,00 | 0,9 | 27698 | 13830 | 2,440 | 1,199 | 50,8 |
| 25,50 | 1,0 | 36643 | 24228 | 2,912 | 1,913 | 34,3 |
| 26,17 | 0,9 | 31407 | 21258 | 2,771 | 1,864 | 32,8 |
| 28,00 | 0,9 | 29266 | 24146 | 2,580 | 2,122 | 17,8 |
| 28,75 | 0,9 | 24534 | 21396 | 2,157 | 1,876 | 13,0 |
| 28,75 | 0,9 | 35139 | 20521 | 3,105 | 1,798 | 42,1 |
| 29,50 | 0,9 | 30612 | 19830 | 2,700 | 1,736 | 35,7 |
| 30,00 | 0,9 | 29362 | 21308 | 2,589 | 1,868 | 27,8 |

Tabela C.37 - Valores dos parâmetros de consumo de tolueno.

| [tolueno] _{ent} (mg/l) | U (dia ⁻¹) | Y _{obs} (mg _{biomassa} /mg _{tolueno}) |
|---------------------------------|------------------------|---|
| 0,159 ± 0,013 | 1,92 | 1,14 |
| 0,374 ± 0,014 | 1,44 | 0,64 |
| 0,694 ± 0,025 | 0,96 | 0,95 |
| 1,251 ± 0,072 | 3,36 | 0,88 |
| 1,729 ± 0,060 | 3,12 | 2,11 |
| 1,969 ± 0,079 | 3,36 | 1,01 |
| 2,676 ± 0,177 | 0,89 | 1,75 |

ANEXO D - COMPLEMENTOS DO CAPÍTULO 3.2

D.1 Resultados de crescimento do biofilme

As tabelas D.1 e D.2 apresentam os valores obtidos para estudo do desenvolvimento do biofilme.

Tabela D.1 - Resultados de acumulação de biofilme no enchimento na 1ª fase de arranque.

| tempo (dias) | Local na coluna | M _{seca} de 6 anéis com biofilme (g) | M _{seca} de 6 anéis sem biofilme (g) | M _{seca} (g/anel) | [X] _{aderidas} (g/l _{reactor}) |
|--------------|-----------------|---|---|----------------------------|---|
| 3 | Base | 26,076 | 26,044 | 5,2 | 0,897 |
| | | 23,049 | 23,028 | 3,6 | 0,618 |
| | Meio | 26,491 | 26,462 | 4,9 | 0,844 |
| | | 29,828 | 29,798 | 5,0 | 0,870 |
| | Topo | 26,934 | 26,887 | 7,8 | 1,356 |
| | | 26,934 | 26,887 | 7,8 | 1,356 |
| 7 | Base | 26,087 | 26,053 | 5,8 | 0,999 |
| | | 23,057 | 23,017 | 6,6 | 1,148 |
| | Meio | 26,511 | 26,465 | 7,6 | 1,320 |
| | | 29,862 | 29,806 | 9,3 | 1,616 |
| | Topo | 26,965 | 26,888 | 12,9 | 2,234 |
| | | 30,583 | 30,509 | 12,4 | 2,148 |
| 9 | Base | 28,667 | 28,614 | 8,8 | 1,528 |
| | | 32,289 | 32,233 | 9,2 | 1,597 |
| | Meio | 23,418 | 23,339 | 13,2 | 2,286 |
| | | 33,920 | 33,846 | 12,4 | 2,144 |
| | Topo | 33,291 | 33,186 | 17,6 | 3,043 |
| | | 32,619 | 32,513 | 17,7 | 3,057 |
| 10 | Base | 26,116 | 26,064 | 8,7 | 1,504 |
| | | 23,081 | 23,016 | 10,7 | 1,859 |
| | Meio | 26,553 | 26,482 | 11,8 | 2,039 |
| | | 29,855 | 29,788 | 11,1 | 1,926 |
| | Topo | 26,983 | 26,874 | 18,1 | 3,132 |
| | | 30,599 | 30,515 | 14,0 | 2,428 |

Tabela D.2 - Resultados de acumulação de biofilme no enchimento na 2ª fase de arranque.

| tempo (dias) | Local na coluna | M _{seca} de 6 anéis com biofilme (g) | M _{seca} de 6 anéis sem biofilme (g) | M _{seca} (g/anel) | [X] _{aderidas} (g/l _{reactor}) |
|--------------|-----------------|---|---|----------------------------|---|
| 4 | Base | 26,062 | 26,049 | 2,2 | 0,381 |
| | | 26,333 | 26,323 | 1,8 | 0,312 |
| | Meio | 26,466 | 26,453 | 2,2 | 0,381 |
| | | 29,812 | 29,800 | 1,9 | 0,329 |
| | Topo | 26,889 | 26,876 | 2,1 | 0,364 |
| | | 30,516 | 30,504 | 1,9 | 0,329 |
| 6 | Base | 28,637 | 28,614 | 3,8 | 0,658 |
| | | 32,268 | 32,250 | 2,9 | 0,502 |
| | Meio | 23,357 | 23,331 | 4,3 | 0,745 |
| | | 33,858 | 33,826 | 5,3 | 0,918 |
| | Topo | 33,202 | 33,176 | 4,3 | 0,745 |
| | | 32,540 | 32,513 | 4,5 | 0,779 |
| 8 | Base | 26,094 | 26,059 | 6,0 | 1,039 |
| | | 26,339 | 26,310 | 4,8 | 0,831 |
| | Meio | 26,507 | 26,471 | 6,0 | 1,039 |
| | | 29,840 | 29,793 | 7,7 | 1,334 |
| | Topo | 26,899 | 26,875 | 4,0 | 0,693 |
| | | 30,548 | 30,513 | 5,8 | 1,005 |
| 11 | Base | 28,660 | 28,621 | 6,5 | 1,126 |
| | | 32,292 | 32,255 | 6,2 | 1,074 |
| | Meio | 23,364 | 23,331 | 5,5 | 0,953 |
| | | 33,861 | 33,827 | 5,7 | 0,987 |
| | Topo | 33,196 | 33,176 | 3,3 | 0,572 |
| | | 32,530 | 32,507 | 3,8 | 0,658 |
| 8 | Base | 26,106 | 26,045 | 10,1 | 1,752 |
| | | 26,357 | 26,302 | 9,2 | 1,596 |
| | Meio | 26,512 | 26,476 | 6,1 | 1,057 |
| | | 29,849 | 29,794 | 9,1 | 1,582 |
| | Topo | 26,919 | 26,861 | 9,6 | 1,666 |
| | | 30,552 | 30,499 | 8,7 | 1,513 |
| 15 | Base | 28,699 | 28,613 | 14,3 | 2,471 |
| | | 32,295 | 32,243 | 8,7 | 1,513 |
| | Meio | 23,397 | 23,327 | 11,6 | 2,018 |
| | | 33,911 | 33,832 | 13,1 | 2,269 |
| | Topo | 33,248 | 33,182 | 11,0 | 1,902 |
| | | 32,572 | 32,511 | 10,2 | 1,767 |
| 19 | Base | 26,146 | 26,061 | 14,1 | 2,448 |
| | | 26,386 | 26,302 | 14,0 | 2,431 |
| | Meio | 26,540 | 26,461 | 13,2 | 2,284 |
| | | 29,874 | 29,797 | 12,9 | 2,232 |
| | Topo | 26,934 | 26,867 | 11,2 | 1,934 |
| | | 30,559 | 30,508 | 8,5 | 1,478 |
| | Base | 28,712 | 28,619 | 15,5 | 2,693 |
| | | - | - | - | - |

| tempo (dias) | Local na coluna | M_{seca} de 6 anéis com biofilme (g) | M_{seca} de 6 anéis sem biofilme (g) | M_{seca} (g/anel) | $[X]_{aderidas}$ (g/l _{reactor}) |
|--------------|-----------------|--|--|---------------------|--|
| 25 | Meio | 23,413 | 23,331 | 13,7 | 2,367 |
| | | 33,881 | 33,832 | 8,2 | 1,415 |
| | Topo | 33,264 | 33,185 | 13,2 | 2,286 |
| | | 32,599 | 32,510 | 14,9 | 2,584 |
| 28 | Base | 26,248 | 26,047 | 33,6 | 5,814 |
| | | 26,457 | 26,313 | 24,0 | 4,154 |
| | Meio | 26,585 | 26,461 | 20,7 | 3,583 |
| | | 29,944 | 29,785 | 26,5 | 4,593 |
| Topo | 27,027 | 26,875 | 25,4 | 4,405 | |
| | 30,630 | 30,506 | 20,6 | 3,577 | |
| 32 | Base | 28,813 | 28,613 | 33,3 | 5,774 |
| | | 24,139 | 23,939 | 33,3 | 5,777 |
| | Meio | 23,603 | 23,334 | 45,0 | 7,786 |
| | | 34,088 | 33,822 | 44,4 | 7,691 |
| Topo | 33,358 | 33,186 | 28,7 | 4,965 | |
| | 32,703 | 32,512 | 31,8 | 5,514 | |
| 34 | Base | 28,865 | 28,629 | 39,2 | 6,790 |
| | | 24,197 | 23,945 | 41,9 | 7,263 |
| | Meio | 23,640 | 23,232 | 68,0 | 11,779 |
| | | 34,103 | 33,830 | 45,5 | 7,881 |
| Topo | 33,415 | 33,174 | 40,2 | 6,963 | |
| | 32,739 | 32,523 | 36,1 | 6,244 | |

D.2 Resultados do consumo de tolueno

As tabelas D.3 a D.8 apresentam os resultados da remoção do tolueno para diferentes caudais da corrente gasosa.

Tabela D.3 - Resultados do consumo de tolueno para $Q_{\text{gás}}=9,5$ l/min.

| $V_{\text{injectado}}$ (ml) | Área entrada | Área saída | [tolueno] _e (mg/l) | [tolueno] _s (mg/l) | Carga (g/m ³ h) | %Remoção | EC (g/m ³ h) |
|--------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
| 0,3 | 13830 | 9557 | 3,673 | 2,527 | 74,8 | 31,2 | 23,3 |
| 0,5 | 28401 | 19701 | 4,535 | 3,134 | 92,3 | 30,9 | 28,5 |
| 0,4 | 19108 | 15402 | 3,808 | 3,062 | 77,5 | 19,6 | 15,2 |
| 0,5 | 23456 | 20189 | 3,739 | 3,213 | 76,1 | 14,1 | 10,7 |
| 1,0 | 21341 | 3768 | 1,680 | 0,265 | 34,2 | 84,2 | 28,8 |
| 1,0 | 16565 | 2591 | 1,296 | 0,171 | 26,4 | 86,8 | 22,9 |
| 1,0 | 17200 | 1110 | 1,347 | 0,051 | 27,4 | 96,2 | 26,4 |
| 1,0 | 21211 | 2170 | 1,670 | 0,137 | 34,0 | 91,8 | 31,2 |
| 1,0 | 16967 | 1631 | 1,328 | 0,093 | 27,0 | 93,0 | 25,1 |
| 1,0 | 30682 | 6746 | 2,432 | 0,505 | 49,5 | 79,2 | 39,2 |
| 1,0 | 27770 | 7292 | 2,198 | 0,549 | 44,7 | 75,0 | 33,6 |
| 1,0 | 37592 | 11601 | 2,988 | 0,896 | 60,8 | 70,0 | 42,6 |
| 1,0 | 30914 | 13362 | 2,451 | 1,038 | 49,9 | 57,7 | 28,8 |
| 1,0 | 35994 | 11392 | 2,860 | 0,879 | 58,2 | 69,3 | 40,3 |
| 1,0 | 32072 | 14243 | 2,544 | 1,109 | 51,8 | 56,4 | 29,5 |
| 1,0 | 30640 | 13335 | 2,429 | 1,036 | 49,4 | 57,4 | 28,4 |
| 1,0 | 29800 | 13688 | 2,361 | 1,064 | 48,1 | 54,9 | 26,4 |
| 2,5 | 10158 | 1208 | 0,289 | 0,001 | 5,9 | 99,7 | 5,9 |
| 2,5 | 13705 | 1249 | 0,403 | 0,002 | 8,2 | 99,5 | 8,2 |
| 2,5 | 10726 | 958 | 0,307 | 0,000 | 6,3 | 100,0 | 6,3 |

Tabela D.4 - Resultados do consumo de tolueno para $Q_{\text{gás}}=13,5$ l/min.

| $V_{\text{injectado}}$ (ml) | Área entrada | Área saída | [tolueno] _e (mg/l) | [tolueno] _s (mg/l) | Carga (g/m ³ h) | %Remoção | EC (g/m ³ h) |
|--------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
| 1,0 | 21273 | 13580 | 1,675 | 1,055 | 49,2 | 37,0 | 18,2 |
| 1,0 | 23189 | 13383 | 1,829 | 1,039 | 53,7 | 43,2 | 23,2 |
| 1,0 | 15424 | 7344 | 1,204 | 0,553 | 35,3 | 54,0 | 19,1 |
| 1,0 | 14725 | 6599 | 1,147 | 0,493 | 33,7 | 57,0 | 19,2 |
| 1,0 | 14297 | 5950 | 1,113 | 0,441 | 32,7 | 60,4 | 19,7 |
| 2,5 | 25081 | 5579 | 0,770 | 0,142 | 22,6 | 81,6 | 18,4 |
| 2,5 | 25010 | 6120 | 0,767 | 0,159 | 22,5 | 79,3 | 17,9 |
| 2,5 | 29300 | 4817 | 0,906 | 0,117 | 26,6 | 87,1 | 23,1 |
| 2,5 | 29054 | 4855 | 0,898 | 0,118 | 26,4 | 86,8 | 22,9 |
| 2,5 | 13487 | 1044 | 0,396 | < 0,05 | 11,6 | 100,0 | 11,8 |
| 2,5 | 10616 | 1846 | 0,304 | 0,021 | 8,9 | 92,9 | 8,3 |
| 2,5 | 21116 | 3180 | 0,642 | 0,064 | 18,8 | 90,0 | 17,0 |
| 2,5 | 20363 | 3483 | 0,618 | 0,074 | 18,1 | 88,0 | 16,0 |

Tabela D.5 - Resultados do consumo de tolueno para $Q_{gás}=19$ l/min.

| $V_{injetado}$ (ml) | Área entrada | Área saída | [tolueno] _e (mg/l) | [tolueno] _s (mg/l) | Carga (g/m ³ h) | %Remoção | EC (g/m ³ h) |
|------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
| 1,0 | 21943 | 12056 | 1,729 | 0,933 | 70,4 | 46,0 | 32,4 |
| 1,0 | 23996 | 12225 | 1,894 | 0,946 | 77,1 | 50,0 | 38,6 |
| 1,0 | 23946 | 13048 | 1,890 | 1,012 | 76,9 | 46,4 | 35,7 |
| 1,0 | 15635 | 7004 | 1,221 | 0,526 | 49,7 | 56,9 | 35,7 |
| 1,0 | 16801 | 6660 | 1,315 | 0,498 | 53,5 | 62,1 | 33,2 |
| 1,0 | 15934 | 7246 | 1,245 | 0,545 | 50,7 | 56,2 | 28,5 |
| 2,0 | 35102 | 14764 | 1,375 | 0,556 | 56,0 | 59,5 | 33,3 |
| 1,0 | 13798 | 5060 | 1,073 | 0,369 | 43,7 | 65,6 | 28,6 |
| 2,0 | 27764 | 8150 | 1,080 | 0,290 | 44,0 | 73,1 | 32,1 |
| 2,0 | 25054 | 7076 | 0,971 | 0,247 | 39,5 | 74,6 | 29,5 |
| 2,0 | 24499 | 7822 | 0,948 | 0,277 | 38,6 | 70,8 | 27,3 |
| 2,0 | 22922 | 4788 | 0,885 | 0,155 | 36,0 | 82,5 | 29,7 |
| 2,0 | 18652 | 4513 | 0,713 | 0,144 | 29,0 | 79,8 | 23,2 |
| 2,5 | 23111 | 5125 | 0,706 | 0,127 | 28,8 | 82,0 | 23,6 |
| 2,5 | 7584 | 1724 | 0,206 | 0,018 | 8,4 | 91,5 | 7,7 |
| 2,5 | 14835 | 3039 | 0,440 | 0,060 | 17,9 | 86,4 | 15,5 |
| 2,5 | 17370 | 2428 | 0,521 | 0,040 | 21,2 | 92,3 | 19,6 |
| 2,5 | 20521 | 3478 | 0,623 | 0,074 | 25,4 | 88,1 | 22,3 |
| 2,5 | 13562 | 2533 | 0,399 | 0,044 | 16,2 | 89,1 | 14,5 |
| 2,5 | 20646 | 2891 | 0,627 | 0,055 | 25,5 | 91,2 | 23,3 |

Tabela D.6 - Resultados do consumo de tolueno para $Q_{gás}=24,8$ l/min.

| $V_{injetado}$ (ml) | Área entrada | Área saída | [tolueno] _e (mg/l) | [tolueno] _s (mg/l) | Carga (g/m ³ h) | %Remoção | EC (g/m ³ h) |
|------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
| 1,0 | 26526 | 19787 | 2,098 | 1,555 | 111,5 | 25,9 | 22,1 |
| 1,0 | 26359 | 21546 | 2,084 | 1,697 | 110,8 | 18,6 | 15,8 |
| 1,0 | 26285 | 18855 | 2,078 | 1,480 | 110,4 | 28,8 | 24,4 |
| 1,0 | 19822 | 8380 | 1,558 | 0,637 | 82,8 | 59,1 | 49,0 |
| 1,0 | 18487 | 9294 | 1,450 | 0,710 | 77,1 | 51,0 | 39,3 |
| 1,0 | 18630 | 8386 | 1,462 | 0,637 | 77,7 | 56,4 | 43,8 |
| 2,0 | 31341 | 15229 | 1,224 | 0,575 | 65,0 | 53,0 | 34,5 |
| 2,0 | 29984 | 10247 | 1,169 | 0,374 | 62,1 | 68,0 | 42,2 |
| 2,5 | 24043 | 8623 | 0,736 | 0,240 | 39,1 | 67,4 | 26,4 |
| 2,5 | 33065 | 11216 | 1,027 | 0,323 | 54,6 | 68,5 | 37,4 |
| 2,5 | 34328 | 13913 | 1,067 | 0,410 | 56,7 | 61,6 | 34,9 |
| 2,5 | 30808 | 11472 | 0,954 | 0,331 | 50,7 | 65,3 | 33,1 |
| 2,5 | 16029 | 5450 | 0,478 | 0,138 | 25,4 | 71,2 | 18,1 |
| 2,5 | 11074 | 4219 | 0,319 | 0,098 | 16,9 | 69,3 | 11,7 |
| 2,5 | 17696 | 4490 | 0,532 | 0,107 | 28,3 | 80,0 | 22,6 |
| 2,5 | 18580 | 4270 | 0,560 | 0,100 | 29,8 | 82,2 | 24,5 |
| 2,5 | 19140 | 4109 | 0,578 | 0,094 | 30,7 | 83,7 | 25,7 |
| 2,5 | 17656 | 2098 | 0,531 | 0,030 | 28,2 | 94,4 | 26,6 |
| 2,5 | 7238 | 1343 | 0,195 | 0,005 | 10,4 | 97,3 | 10,1 |

Tabela D.7 - Resultados do consumo de tolueno para $Q_{\text{gás}} = 31$ l/min.

| $V_{\text{injectado}}$ (ml) | Área entrada | Área saída | [tolueno] _e (mg/l) | [tolueno] _s (mg/l) | Carga (g/m ³ h) | %Remoção | EC (g/m ³ h) |
|--------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
| 2,5 | 17887 | 2746 | 0,538 | 0,050 | 35,7 | 90,6 | 32,4 |
| 2,5 | 15221 | 2963 | 0,452 | 0,057 | 30,0 | 87,3 | 26,2 |
| 2,5 | 14391 | 2890 | 0,425 | 0,055 | 28,3 | 87,1 | 24,6 |
| 2,5 | 25395 | 8394 | 0,780 | 0,232 | 51,8 | 70,2 | 36,4 |
| 2,5 | 26609 | 9223 | 0,819 | 0,259 | 54,4 | 68,4 | 37,2 |
| 2,5 | 25878 | 8394 | 0,795 | 0,232 | 52,8 | 70,8 | 37,4 |
| 1,0 | 15278 | 7333 | 1,192 | 0,552 | 79,2 | 53,7 | 42,5 |
| 1,0 | 15621 | 7028 | 1,220 | 0,528 | 81,0 | 56,7 | 46,0 |
| 1,0 | 15200 | 6846 | 1,186 | 0,513 | 78,8 | 56,7 | 44,7 |
| 1,0 | 19089 | 8046 | 1,499 | 0,610 | 99,6 | 59,3 | 59,1 |
| 1,0 | 20528 | 8354 | 1,615 | 0,635 | 107,3 | 60,7 | 65,1 |
| 1,0 | 19361 | 7946 | 1,521 | 0,602 | 101,0 | 60,4 | 61,0 |
| 1,0 | 23038 | 9921 | 1,817 | 0,761 | 120,7 | 58,1 | 70,2 |
| 1,0 | 24099 | 12146 | 1,902 | 0,940 | 126,4 | 50,6 | 63,9 |
| 2,5 | 16569 | 3340 | 0,496 | 0,070 | 32,9 | 86,0 | 28,3 |
| 2,5 | 14490 | 3105 | 0,429 | 0,062 | 33,1 | 85,5 | 28,3 |
| 2,5 | 16682 | 3153 | 0,499 | 0,064 | 38,5 | 87,3 | 33,6 |
| 2,5 | 31572 | 12574 | 0,979 | 0,367 | 75,5 | 62,5 | 47,2 |
| 2,5 | 32219 | 12537 | 1,000 | 0,366 | 77,1 | 63,4 | 48,9 |
| 1,0 | 19559 | 13091 | 1,537 | 1,016 | 118,5 | 33,9 | 40,2 |

Tabela D.8 - Resultados do consumo de tolueno para $Q_{\text{gás}} = 36$ l/min.

| $V_{\text{injectado}}$ (ml) | Área entrada | Área saída | [tolueno] _e (mg/l) | [tolueno] _s (mg/l) | Carga (g/m ³ h) | %Remoção | EC (g/m ³ h) |
|--------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
| 2,5 | 16285 | 3786 | 0,486 | 0,084 | 37,5 | 82,7 | 31,1 |
| 2,5 | 20063 | 2994 | 0,608 | 0,058 | 46,9 | 90,4 | 42,4 |
| 2,5 | 16101 | 2518 | 0,481 | 0,043 | 37,1 | 91,0 | 33,7 |
| 2,5 | 12592 | 2520 | 0,368 | 0,043 | 28,4 | 88,3 | 25,0 |
| 2,5 | 9225 | 763 | 0,259 | 0,000 | 20,0 | 100,0 | 20,0 |
| 5,0 | 21647 | 1573 | 0,311 | 0,000 | 24,0 | 100,0 | 24,0 |
| 2,5 | 18660 | 3703 | 0,563 | 0,081 | 43,4 | 85,6 | 37,2 |
| 2,5 | 17607 | 3888 | 0,529 | 0,087 | 40,8 | 83,5 | 34,1 |
| 2,5 | 16498 | 3935 | 0,493 | 0,089 | 38,1 | 82,0 | 31,2 |
| 2,5 | 32567 | 11767 | 1,011 | 0,341 | 78,0 | 66,3 | 51,7 |
| 2,0 | 26187 | 8707 | 1,016 | 0,313 | 78,4 | 69,2 | 54,3 |
| 2,5 | 27351 | 7880 | 0,843 | 0,216 | 65,0 | 74,4 | 48,4 |
| 2,5 | 25898 | 6286 | 0,796 | 0,164 | 61,4 | 79,3 | 48,7 |
| 2,5 | 22361 | 7464 | 0,682 | 0,202 | 52,6 | 70,3 | 37,0 |
| 1,0 | 17465 | 9059 | 1,368 | 0,691 | 105,5 | 49,5 | 52,2 |
| 1,0 | 17597 | 9079 | 1,379 | 0,693 | 106,4 | 49,7 | 52,9 |
| 1,0 | 18041 | 9996 | 1,414 | 0,767 | 109,1 | 45,8 | 50,0 |
| 1,0 | 24482 | 14247 | 1,933 | 1,109 | 149,1 | 42,6 | 63,6 |
| 1,0 | 26727 | 15711 | 2,114 | 1,227 | 163,1 | 42,0 | 68,4 |
| 1,0 | 24203 | 14313 | 1,911 | 1,114 | 147,4 | 41,7 | 61,4 |

ANEXO E - CURVAS DE AJUSTE À REMOÇÃO DE TOLUENO

E.1 - Percentagem de remoção de tolueno *versus* carga de tolueno

Nas figuras E.1 a E.6 são apresentados os ajustes da variação da percentagem de remoção de tolueno com a carga afluyente ao leito percolador, a uma função do tipo exponencial.

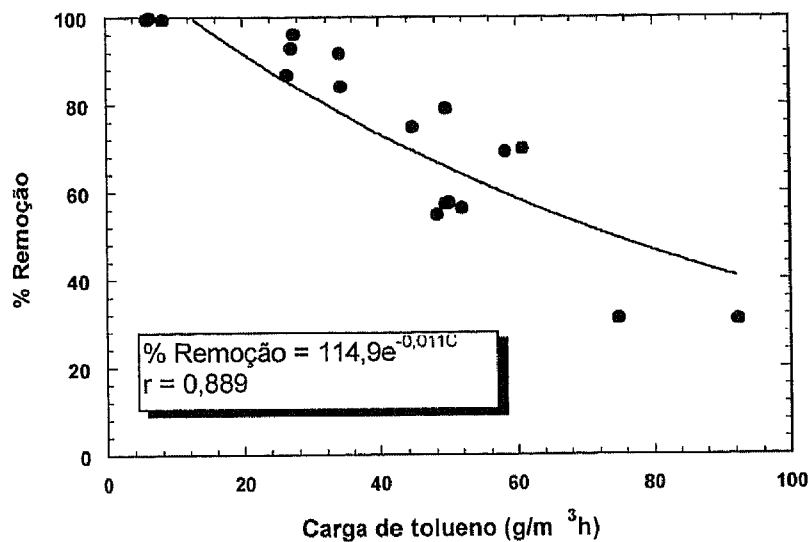


Figura E.1 - Variação da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{\text{gás}} = 9,5 \text{ l/min}$ e $[\text{biomassa}]_{\text{aderida}} = 2,062 \text{ g/l}_{\text{reactor}}$.

Para o ajuste dos valores obtidos nas condições apresentadas na figura E.1, a uma função do tipo exponencial, desprezaram-se os resultados obtidos para uma carga de tolueno de 76 e 77 g/m³h.

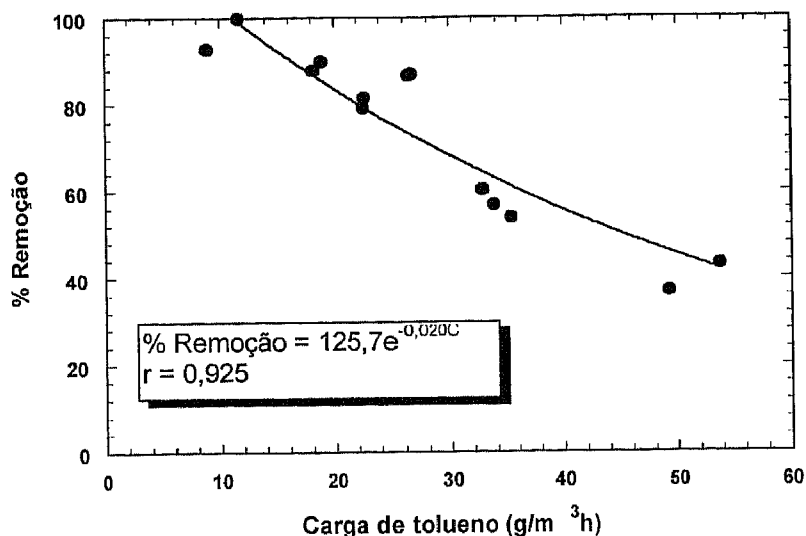


Figura E.2 - Variação da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{\text{gás}} = 13,5$ l/min e $[\text{biomassa}]_{\text{aderida}} = 5,303$ g/l_{reactor}.

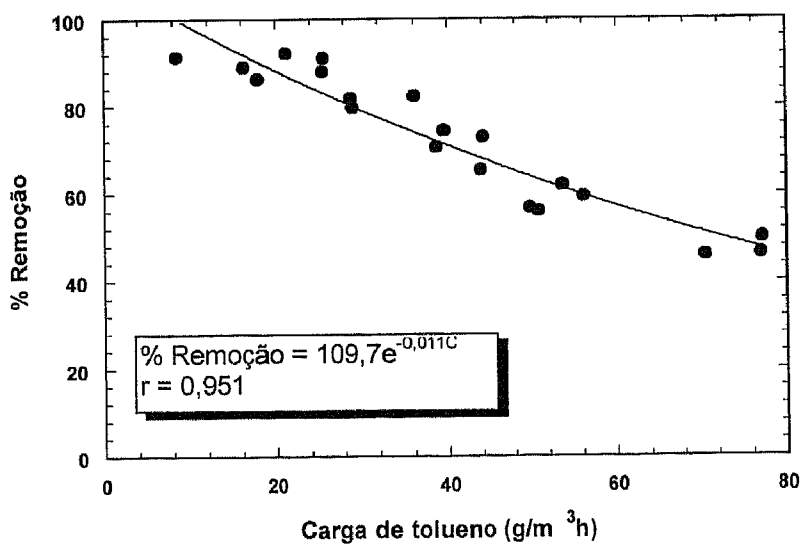


Figura E.3 - Variação da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{\text{gás}} = 19,0$ l/min e $[\text{biomassa}]_{\text{aderida}} = 7,820$ g/l_{reactor}.

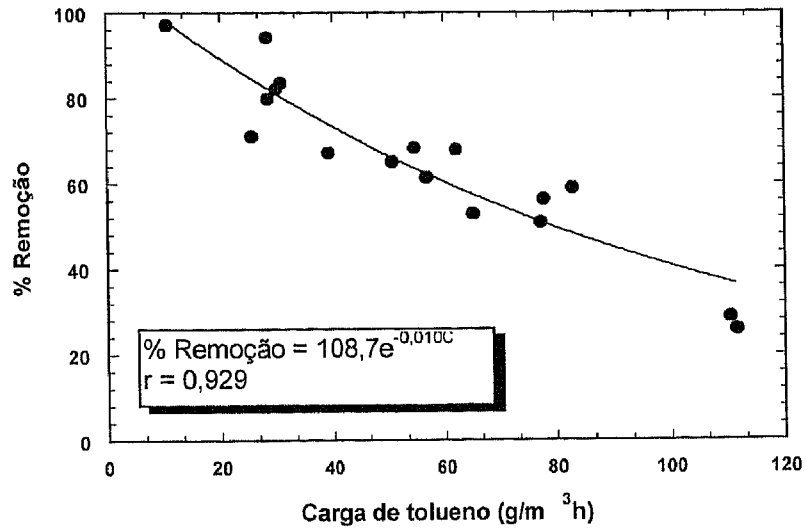


Figura E.4 - Variação da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{\text{gás}} = 24,8 \text{ l/min}$ e $[\text{biomassa}]_{\text{aderida}} = 8,681 \text{ g/l}_{\text{reactor}}$.

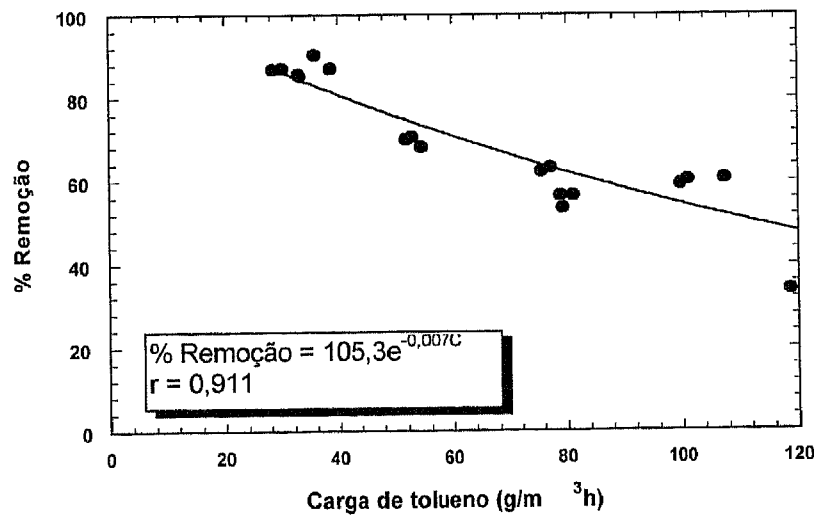


Figura E.5 - Variação da percentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reactor, para um $Q_{\text{gás}} = 31,0 \text{ l/min}$.

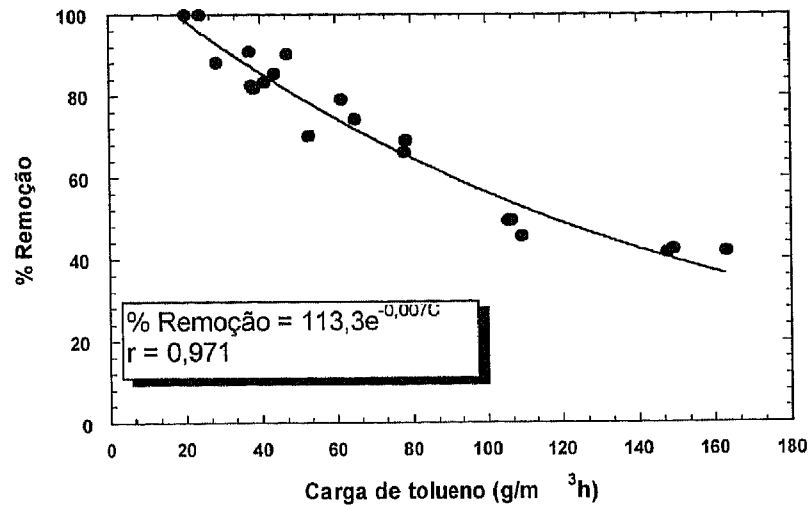


Figura E.6 - Variação da porcentagem de remoção de tolueno com a carga de tolueno à entrada do reator, para um $Q_{\text{gás}} = 36,0$ l/min.

E.2 - Capacidade de eliminação *versus* carga de tolueno

As figuras E.7 a E.12 apresentam o ajuste da variação de EC *versus* carga de tolueno (C) a uma função do tipo exponencial (E1), para cada um dos caudais testados.

$$EC = EC_{\text{max}} (1 - e^{-kC}) \quad (\text{E.1})$$

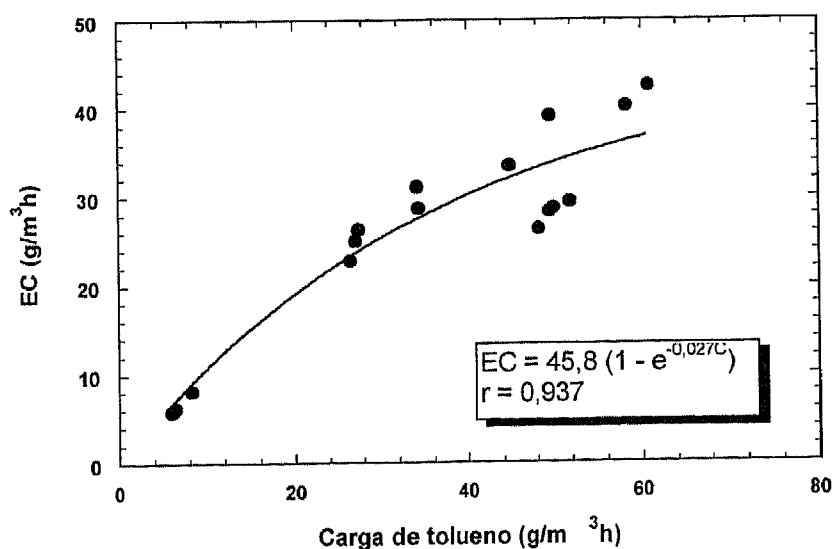


Figura E.7 - Capacidade de eliminação *versus* carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 9,5 l/min.

Para o ajuste da dos pontos apresentados na figura anterior a uma função do tipo exponencial, desprezaram-se os últimos valores correspondentes a uma carga de tolueno de 75, 77 e 92 g/m³h.

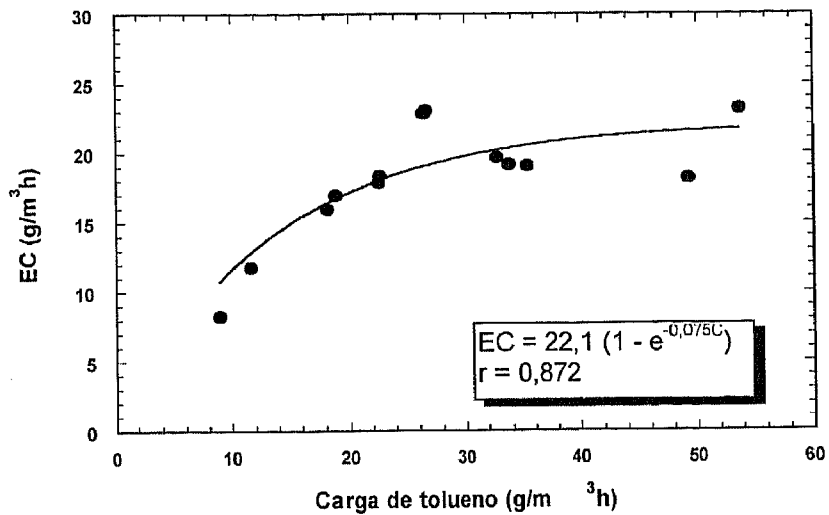


Figura E.8 - Capacidade de eliminação versus carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 13,5 l/min.

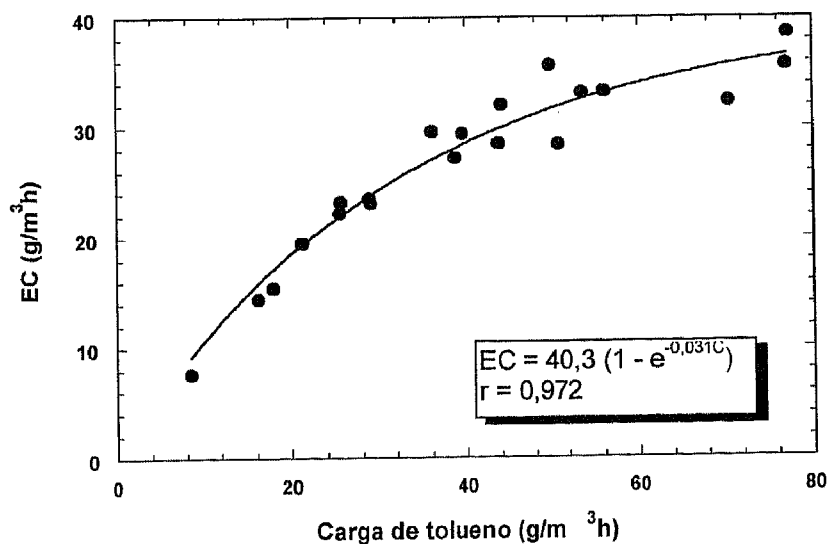


Figura E.9 - Capacidade de eliminação versus carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 19 l/min.

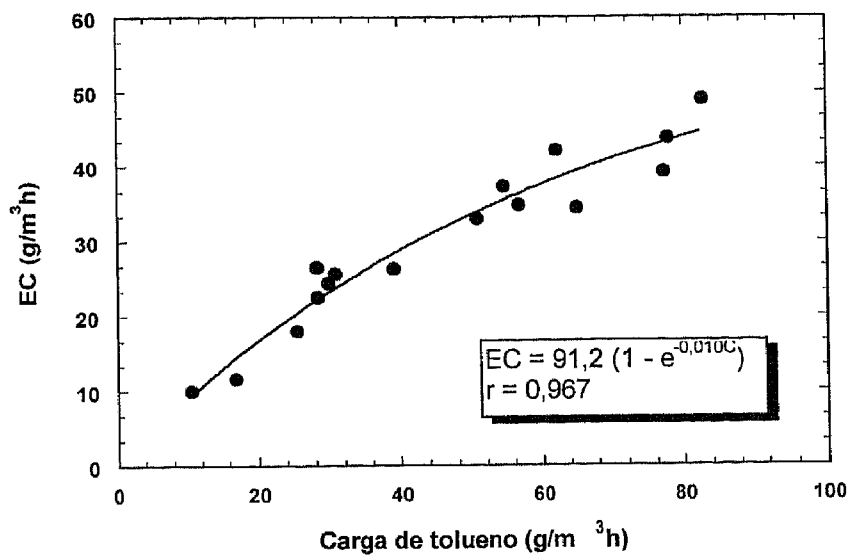


Figura E.10 - Capacidade de eliminação *versus* carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 24,8 l/min

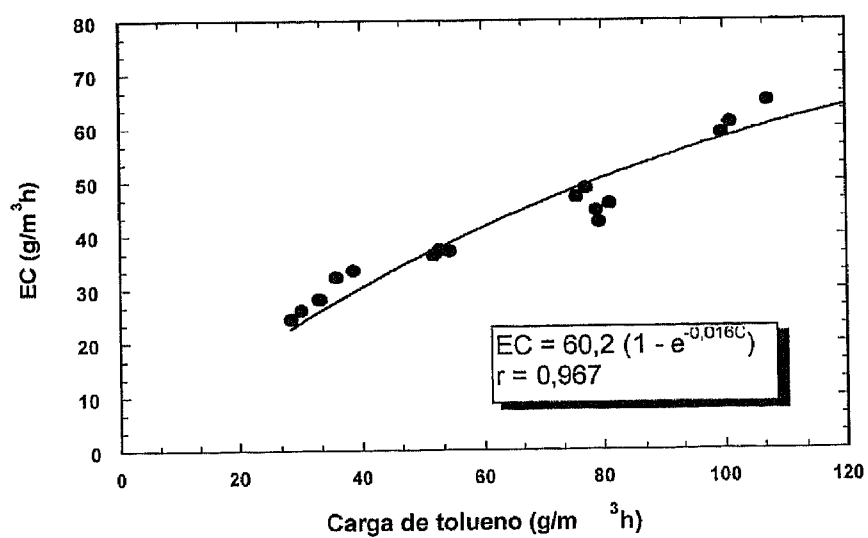


Figura E.11 - Capacidade de eliminação *versus* carga afluyente de tolueno, para um caudal de gás de 31 l/min.

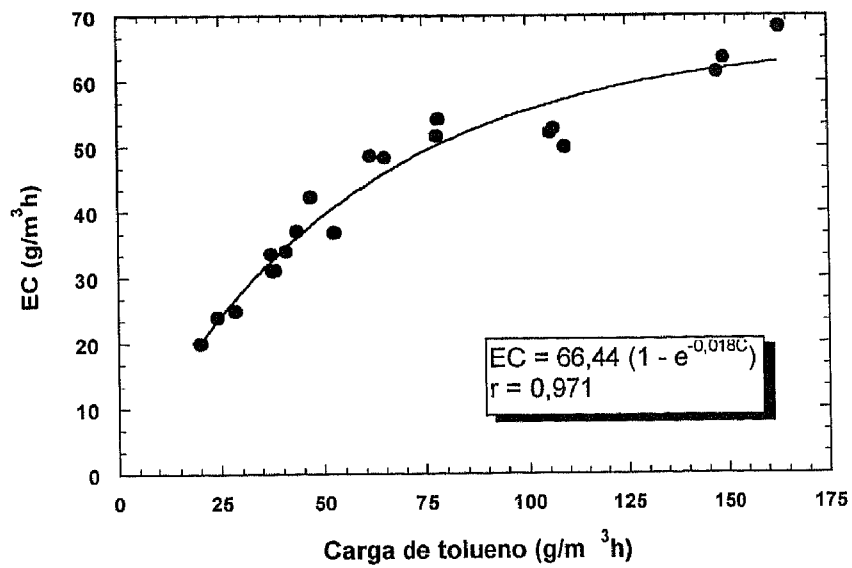


Figura E.12 - Capacidade de eliminação *versus* carga afluente de tolueno, para um caudal de gás de 36 l/min.

ANEXO F - RISCOS DE EXPOSIÇÃO A VAPORES DE TOLUENO

Informação obtida via internet, EPA, Dezembro de 1994, (Internet 5, 2000).

Hazard Summary

- The central nervous system (CNS) is the primary target organ for toluene toxicity in both humans and animals for acute (short-term) and chronic (long-term) exposures. **CNS dysfunction** (which is often reversible) and **narcosis** have been frequently observed in humans acutely exposed to low or moderate levels of toluene by inhalation; symptoms include fatigue, sleepiness, headaches, and nausea. Cardiac arrhythmia has also been reported in humans acutely exposed to toluene.
- **CNS depression** has been reported to occur in chronic abusers exposed to high levels of toluene. Symptoms include ataxia, tremors, cerebral atrophy, nystagmus (involuntary eye movements), and impaired speech, hearing, and vision. Chronic inhalation exposure of humans to toluene also causes irritation of the upper respiratory tract, eye irritation, sore throats, nausea, skin conditions, dizziness, headaches, and difficulty with sleep.
- The Reference Concentration (RfC) for toluene is 0.4 mg/m³.^a The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) estimates that inhalation of this concentration or less, over a lifetime, would not likely result in the occurrence of chronic, noncancer effects.^b
- The Reference Dose (RfD) for toluene is 0.2 mg/kg/d.^c EPA estimates that consumption of this dose or less, over a lifetime, would not result in the occurrence of chronic, noncancer effects.
- Human studies have reported developmental effects, such as CNS dysfunction, attention deficits, and minor craniofacial and limb anomalies, in the children of pregnant women exposed to toluene or mixed solvents by inhalation. Reproductive effects, including an association between paternal exposure to toluene and an increased odds ratio for spontaneous abortions but not birth defects, have also been noted. However, these studies are not conclusive due to many confounding variables. Animal studies have shown toluene to have developmental, but not reproductive, effects from inhalation exposure.
- None of the data suggest that toluene is carcinogenic. Two epidemiological studies did not detect a statistically significant increased risk of cancer due to inhalation exposure to toluene. However, these studies had many confounding factors. Animal studies have been negative for carcinogenicity. EPA has classified toluene as a Group D, **not classifiable as to human carcinogenicity**.

^a Milligrams per cubic meter is the unit of measurement for chemicals in air.

^b The RfC is not a direct estimator of risk but rather a reference point to gauge the potential effects. Exceedance of the RfC does not imply that an adverse health effect would necessarily occur. As the amount and frequency of exposures exceeding the RfC increase, the probability of adverse health effects also increases.

^c Milligrams per kilogram per day is one way to measure the amount of the contaminant that is consumed in food.

Please Note: The main sources of information for this fact sheet are EPA's Integrated Risk Information System (IRIS), which contains information on inhalation chronic toxicity of toluene and the RfC, oral chronic toxicity and the RfD, and the carcinogenic effects of

toluene, and the Agency for Toxic Substances and Disease Registry's (ATSDR's) *Toxicological Profile for Toluene*. Other secondary sources include the Hazardous Substances Data Bank (HSDB), a database of summaries of peer-reviewed literature, and the Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), a database of toxic effects that are not peer reviewed.

Environmental/Occupational Exposure

- The highest concentrations of toluene usually occur in indoor air from the use of common household products (paints, paint thinners, and adhesives) and cigarette smoke. The deliberate inhalation of paint or glue may produce high levels of exposure to toluene, as well as to other chemicals, in solvent abusers. (1)
- Toluene exposure may also occur in the workplace, especially in occupations such as printing or painting, where toluene is frequently used as a solvent. (1)
- Automobile emissions are the principal source of toluene to the ambient air. Toluene may also be released to the ambient air during the production, use, and disposal of industrial and consumer products that contain toluene. (1)

Assessing Personal Exposure

- Toluene and its breakdown products can be detected in the blood or urine to determine whether or not exposure has occurred. Metabolites measured in the urine are not specific to toluene, and testing must occur within 12 hours of exposure. (1)

Health Hazard Information

Acute Effects:

- The central nervous system is the primary target organ for toluene toxicity in both humans and animals for acute (short-term) and chronic (long-term) exposures. CNS dysfunction (which is often reversible) and narcosis have been frequently observed in humans acutely exposed to low or moderate levels of toluene by inhalation; symptoms include fatigue, sleepiness, headaches, and nausea. CNS depression and death have occurred at higher levels of exposure. (1)
- Cardiac arrhythmia has also been reported in humans acutely exposed to toluene. (1)
- Following the ingestion of toluene a person died from a severe depression of the central nervous system. Constriction and necrosis of myocardial fibers, swollen liver, congestion and hemorrhage of the lungs, and tubular kidney necrosis were also reported. (1)
- Acute exposure of animals to toluene has been reported to affect the central nervous system as well as to decrease resistance to respiratory infection. (1)
- Acute animal tests, such as the LC₅₀ and LD₅₀ tests in rats and mice, have demonstrated toluene to have low acute toxicity by inhalation or oral exposure. (1)

Chronic Effects (Noncancer):

- CNS depression has been reported to occur in chronic (long-term) abusers exposed to high levels of toluene. Symptoms include ataxia, tremors, cerebral atrophy, nystagmus (involuntary eye movements), and impaired speech, hearing, and vision. (1,2)
- Effects on the central nervous system have also been observed in studies of animals chronically exposed by inhalation. (1,2)
- Chronic inhalation exposure of humans to toluene causes irritation of the upper respiratory tract, eye irritation, sore throats, nausea, skin conditions, dizziness, headaches, and difficulty with sleep. (1,2)
- Inflammation and degeneration of the nasal and respiratory epithelium and pulmonary lesions have been observed in rats and mice chronically exposed to high levels of toluene by inhalation. (1)
- Mild effects on the kidneys and liver have been reported in solvent abusers chronically exposed to toluene vapor. However, these studies are confounded by probable exposure to multiple solvents. (1,2)
- Slight adverse effects on the liver, kidneys, and lung have been reported in some chronic inhalation studies of rodents. (1)
- The RfC for toluene is 0.4 mg/m³ based on neurological effects in humans. (2)
- EPA has medium confidence in the study on which the RfC was based because it indicates adverse neurological effects of toluene in a small worker population; medium confidence in the database because even though many chronic laboratory animal studies are available, long-term data in humans are not available for either the neurotoxicity or irritation endpoint; and, consequently, medium confidence in the RfC. (2)
- The RfD for toluene is 0.2 mg/kg/d based on changes in liver and kidney weights in rats. (2)
- EPA has high confidence in the study on which the RfD was based because a sufficient number of animals/sex were tested in each of six dose groups and many parameters were studied; medium confidence in the database because it is supported by a 6-month oral study; and, consequently, medium confidence in the RfD. (2)
- EPA's Office of Air Quality Planning and Standards, for a hazard ranking under Section 112(g) of the Clean Air Act Amendments, has evaluated toluene for chronic toxicity and has given it a composite score of 7 (scores range from 1 to 100, with 100 being the most toxic). These scores are nonlinear and are the product of two ratings: a rating based on the minimal-effect-dose and a rating based on the type of effect. (3)

Reproductive/Developmental Effects:

- CNS dysfunction, attention deficits, minor craniofacial and limb anomalies, and developmental delay were observed in the children of pregnant women exposed to toluene or to mixed solvents by inhalation. Growth retardation and dysmorphism were reported in infants of another study. However, these studies were confounded by exposure to multiple chemicals. (1,2)
- Children born to toluene abusers have exhibited temporary renal tubular acidosis. (1)
- Paternal exposure (in which the mothers had no occupational exposure to toluene but the fathers did) increased the odds ratio for spontaneous abortions but not congenital malformations. However, these observations cannot be clearly

ascribed to toluene because of the small number of cases evaluated and the large number of confounding variables. (1)

- Several inhalation studies have shown toluene to be a developmental toxicant, but not a reproductive toxicant, in rodents. (1)

Cancer Risk:

- Two epidemiological studies did not detect a statistically significant increased risk of cancer due to inhalation exposure to toluene. However, these studies were limited due to the size of the study population and lack of historical monitoring data. (1)
- Inhalation exposure of rats did not produce an increased incidence of treatment-related neoplastic lesions. (1,2)
- EPA has classified toluene as a Group D, not classifiable as to human carcinogenicity. (2)

Physical Properties

- The chemical formula for toluene is $C_6H_5CH_3$, and its molecular weight is 92.15 g/mol. (1,4)
- Toluene occurs as a colorless, flammable, refractive liquid, that is slightly soluble in water. (1,5)
- Toluene has a sweet, pungent odor, with an odor threshold of 2.9 ppm. (1,6)
- The vapor pressure for toluene is 22 mm Hg at 20 C, and its log octanol/water partition coefficient ($\log K_{ow}$) is 2.79. (1)

Uses

- The major use of toluene is as a mixture added to gasoline to improve octane ratings. Toluene is also used to produce benzene and as a solvent in paints, coatings, adhesives, inks, and cleaning agents. (1)
- Toluene is also used in the production of polymers used to make nylon, plastic soda bottles, and polyurethanes and for pharmaceuticals, dyes, cosmetic nail products, and the synthesis of organic chemicals. (1)

Conversion Factors:

To convert from ppm to mg/m^3 : $mg/m^3 = (ppm) \times (\text{molecular weight of the compound}) / (24.45)$. For toluene: $1 \text{ ppm} = 3.77 \text{ mg/m}^3$.

Tabela F.1 - Health Data from Inhalation Exposure

| Concentration (mg/m^3) | Health numbers ^a | Regulatory, advisory numbers ^b | Reference |
|----------------------------|--|---|-----------|
| 10,000.0 | LC ₅₀ (rats) (33,176 mg/m^3) LC ₅₀ (mice) (20,056 mg/m^3) | - | 1 1 |
| 100.0 | LOAEL (humans) (332 mg/m^3) | ACGIH TLV, NIOSH REL, OSHA PEL, MSHA (75 mg/m^3) | 2 7 |

| Concentration (mg/m ³) | Health numbers ^a | Regulatory, advisory numbers ^b | Reference |
|------------------------------------|------------------------------|---|-----------|
| 0.1 | RfC (0.4 mg/m ³) | | 2 |

ACGIH TLV--American Conference of Governmental and Industrial Hygienists' threshold limit value expressed as a time-weighted average; the concentration of a substance to which most workers can be exposed without adverse effects.

LC₅₀ (Lethal Concentration₅₀) - A calculated concentration of a chemical in air to which exposure for a specific length of time is expected to cause death in 50% of a defined experimental animal population/**LOAEL**--Lowest-observed-adverse-effect level.

MSHA--Mine Safety and Health Administration.

NIOSH REL--National Institute of Occupational Safety and Health's recommended exposure limit; NIOSH-recommended exposure limit for an 8- or 10-h time-weighted-average exposure and/or ceiling.

OSHA PEL--Occupational Safety and Health Administration's permissible exposure limit expressed as a time-weighted average; the concentration of a substance to which most workers can be exposed without adverse effect averaged over a normal 8-h workday or a 40-h workweek.

RfC--Reference concentration.

^a Health numbers are toxicological numbers from animal testing or risk assessment values developed by EPA.

^b Regulatory numbers are values that have been incorporated in Government regulations, while advisory numbers are nonregulatory values provided by the Government or other groups as advice.

LEGISLAÇÃO COMUNITÁRIA EM VIGOR

Extractos da Directiva 1999/13/CE do Conselho de 11 de Março de 1999 relativa à limitação das emissões de compostos orgânicos voláteis resultantes da utilização de solventes orgânicos em certas actividades e instalações

Jornal oficial no. L 085 de 29/03/1999 P. 0001 - 0022

O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º Objectivo e âmbito de aplicação

O objectivo da presente directiva consiste em reduzir os efeitos directos e indirectos das emissões de compostos orgânicos voláteis para o ambiente, principalmente para a atmosfera, bem como os riscos potenciais para a saúde humana, através de medidas e procedimentos aplicáveis às actividades definidas no anexo I que operem acima dos limiares de consumo de solventes indicados no anexo II A.

Artigo 3.º Obrigações aplicáveis às novas instalações

Os Estados-membros adoptarão as medidas necessárias para assegurar que:

1. Todas as novas instalações obedeçam aos requisitos constantes dos artigos 5.º, 8.º e 9.º;
2. Todas as novas instalações não abrangidas pela Directiva 96/61/CE fiquem sujeitas a registo ou autorização antes de entrarem em funcionamento.

Artigo 4.º Obrigações aplicáveis às instalações existentes

Sem prejuízo do disposto na Directiva 96/61/CE, os Estados-membros adoptarão as medidas necessárias para assegurar que:

1. As instalações existentes obedeçam aos requisitos constantes dos artigos 5.º, 8.º e 9.º, até 31 de Outubro de 2007, o mais tardar;
2. Todas as instalações existentes estejam registadas ou autorizadas até 31 de Outubro de 2007, o mais tardar;
3. As instalações a autorizar ou registar que utilizem o plano de redução referido no anexo II B tenham notificado tal utilização às autoridades competentes até 31 de Outubro de 2005, o mais tardar;
4. Caso uma instalação:
 - sofra alterações substanciais ou
 - seja incluída pela primeira vez no âmbito de aplicação da presente directiva na sequência de alterações substanciais,a parte da instalação que sofrer alterações substanciais será considerada como nova instalação ou como instalação existente, desde que as emissões totais de toda a instalação não excedam o nível que teria sido atingido se a parte substancialmente alterada tivesse sido considerada como nova instalação.

Artigo 5.º Requisitos

1. Os Estados-membros adoptarão as medidas adequadas para assegurar a observância dos nos 2 a 12, quer mediante indicação nas condições de autorização quer mediante a aplicação de normas gerais vinculativas.
2. Todas as instalações devem satisfazer:
 - a) Os valores-limite de emissão de gases residuais e os valores das emissões evasivas, ou os valores-limite totais de emissão, e outros requisitos estabelecidos no anexo II A;ou
 - b) Os requisitos do plano de redução constante do anexo II B.
3. a) No que se refere às emissões evasivas, os Estados-membros aplicarão às instalações os valores de emissões evasivas como valores-limite de emissão. No entanto, caso seja comprovado, a contento das autoridades competentes, que, quanto a determinada instalação, o cumprimento

desses valores não será técnica nem economicamente viável, a autoridade competente pode abrir uma excepção em relação a essa instalação, desde que não se prevejam riscos significativos para a saúde humana ou para o ambiente. Para cada derrogação, o operador deve comprovar, a contento das autoridades competentes, que estão a ser utilizadas as melhores técnicas disponíveis;

b) As actividades que não possam ser realizadas em condições de confinamento podem ser objecto de uma derrogação em relação aos controlos previstos no anexo II A, caso essa possibilidade esteja explicitamente mencionada no referido anexo. Nesse caso, deverá aplicar-se o plano de redução do anexo II B, a menos que seja comprovado, a contento das autoridades competentes, que essa opção não será técnica nem economicamente viável. Nesse caso, o operador deve comprovar, a contento das autoridades competentes, que estão a ser utilizadas as melhores técnicas disponíveis.

Os Estados-membros deverão informar a Comissão da derrogação prevista nas alíneas a) e b), de acordo com o disposto no artigo 11.º

4. Quanto às instalações que não utilizem o plano de redução, qualquer equipamento de redução instalado após a data de entrada em vigor da presente directiva deverá satisfazer os requisitos do anexo II A.

5. As instalações em que sejam executadas duas ou mais actividades, excedendo cada uma delas os limiares estabelecidos no anexo II A, devem:

a) No que respeita às substâncias abrangidas pelos n.os 6, 7 e 8, obedecer, em relação a cada actividade, aos requisitos constantes dos mesmos números;

b) No que respeita às restantes substâncias:

i) em relação a cada actividade, obedecer aos requisitos expressos no n.º 2 ou

ii) não ter emissões totais que excedam as resultantes da aplicação do disposto em i).

6. As substâncias e preparações às quais, devido ao teor de COV classificados como cancerígenos, mutagénicos ou tóxicos para a reprodução pela Directiva 67/548/CEE (10), sejam atribuídas ou devam ser acompanhadas das frases de risco R45, R46, R49, R60 e R61, serão substituídas, na medida do possível e tendo em consideração as directrizes a que se refere o n.º 1 do artigo 7.º, por substâncias ou preparações menos nocivas, no mais curto prazo.

7. Em caso de descargas de COV do tipo referido no n.º 6, em que o débito mássico da soma dos compostos conducentes à rotulagem referida no n.º 6 seja igual ou superior a 10 g/h, deve ser respeitado o valor-limite de emissão de 2 mg/Nm³. O valor-limite de emissão é relativo à soma das massas dos diversos compostos.

8. Em caso de descargas de COV halogenados às quais seja atribuída a frase de risco R40, em que o débito mássico da soma dos compostos conducentes à rotulagem R40 seja igual ou superior a 100 g/h, deve ser respeitado o valor-limite de emissão de 20 mg/Nm³. O valor-limite de emissão refere-se à soma das massas dos diversos compostos.

As descargas dos COV referidos nos n.os 6 e 8 deverão ser controladas como emissões provenientes de uma instalação em condições de confinamento, tanto quanto tal seja técnica e economicamente viável para salvaguardar a saúde pública e o ambiente.

9. As descargas dos compostos orgânicos voláteis aos quais, após a entrada em vigor da presente directiva, seja atribuída ou devam ser acompanhados de uma das frases de risco mencionadas nos n.os 6 e 8 terão de obedecer aos valores-limite de emissão referidos respectivamente nos n.os 7 e 8, no mais curto prazo.

10. Devem ser tomadas as devidas precauções no sentido de minimizar as emissões durante as fases de arranque e de paragem.

11. As instalações existentes que já possuam equipamento de redução e respeitem os seguintes valores-limite de emissão:

- 50 mg C/Nm³, no caso da incineração,

- 150/mg C/Nm³, no caso de qualquer outro equipamento de redução,

são isentas da obrigação dos valores-limite de emissão de gases residuais previstos no anexo II A, por um período de doze anos a contar da data prevista no artigo 15.º, na condição de as emissões totais de toda a instalação não excederem os níveis que resultariam se tivessem sido cumpridos todos os requisitos desse anexo.

12. Nem o plano de redução das emissões, nem a aplicação do disposto no n.º 11 ou no artigo 6.º isentam as instalações que emitem substâncias referidas nos n.os 6 a 8 de satisfazerem os requisitos deles constantes.

13. Nos casos em que seja efectuada uma avaliação nos termos do Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho (11) e do Regulamento (CEE) n.º 1488/94 da Comissão (12) ou da Directiva 67/548/CEE do Conselho e da Directiva 93/67/CEE da Comissão (13), dos riscos associados a uma substância controlada ao abrigo da presente directiva e em cuja rotulagem se utilizem as frases

R40, R60 ou R61, a Comissão deve tomar em conta as conclusões da referida avaliação, tomando as medidas necessárias, quando adequado.

Artigo 6.º Planos nacionais

1. Sem prejuízo da Directiva 96/61/CE, os Estados-membros podem elaborar e aplicar planos nacionais de redução das emissões resultantes das actividades e instalações industriais abrangidas pelo artigo 1.º, excluindo as actividades 4 e 11 do anexo II A. Nenhuma das outras actividades pode ser excluída do âmbito da presente directiva através de um plano nacional. Tais planos devem originar uma redução das emissões anuais de COV provenientes das instalações existentes abrangidas pela presente directiva, e no mesmo limite de tempo, pelo menos igual à que resultaria da aplicação dos limites de emissão previstos nos n.os 2 e 3 do artigo 5.º e no anexo II, durante o período de validade do plano nacional. O plano nacional, actualizado se necessário, será reapresentado à Comissão de três em três anos.

Os Estados-membros que elaborem e apliquem planos nacionais podem isentar as instalações existentes da aplicação dos valores-limite de emissão estabelecidos nos n.os 2 e 3 do artigo 5.º e no anexo II. Um plano nacional não pode, em caso algum, isentar uma instalação do disposto na Directiva 96/61/CE.

2. Um plano nacional deve incluir uma lista das medidas adoptadas ou a adoptar para atingir os objectivos referidos no n.º 1, incluindo pormenores sobre o mecanismo proposto para o controlo da aplicação do plano. O plano deve também incluir objectivos provisórios vinculativos de redução, que constituam uma referência para a avaliação dos progressos realizados em direcção ao objectivo final. Deve ser compatível com a legislação comunitária pertinente, nomeadamente com as disposições relevantes da presente directiva, e deve incluir:

- uma identificação da ou das actividades a que o plano se aplica,
- a redução das emissões a realizar por essas actividades, correspondente à que deveria ter sido realizada mediante aplicação dos limites de emissão, tal como especificado no n.º 1,
- o número de instalações afectadas pelo plano e respectivas emissões totais, e as emissões totais de cada uma das actividades.

O plano deve ainda incluir uma descrição completa do leque de instrumentos de realização dos requisitos do plano, provas de que esses instrumentos serão aplicáveis e pormenores sobre os meios através dos quais se demonstrará que o plano foi respeitado.

3. Os Estados-membros devem fornecer à Comissão um exemplar do plano. O plano deve ser acompanhado de documentos que comprovem suficientemente a possibilidade de atingir o objectivo referido no n.º 1, bem como de quaisquer documentos especificamente solicitados pela Comissão. As instalações existentes em fase de alterações substanciais mantêm-se dentro do âmbito do plano nacional, desde que já fizessem parte desse plano antes de serem sujeitas a essas alterações substanciais.

4. Os Estados-membros devem designar uma entidade nacional responsável pela recolha e avaliação das informações referidas no n.º 3, bem como pela aplicação do plano nacional.

5. a) A Comissão informará o comité referido no artigo 13.º sobre os critérios para a avaliação dos planos nacionais, o mais tardar um ano após a entrada em vigor da presente directiva.

b) Se, após a análise do plano inicial e do plano reapresentado ou dos relatórios submetidos por um Estado-membro nos termos do artigo 11.º, a Comissão não considerar que os objectivos do plano podem ser atingidos no prazo estabelecido, deve informar o Estado-membro em causa e o comité referido no artigo 13.º do seu parecer, bem como da respectiva fundamentação, nos seis meses subsequentes à recepção do plano ou do relatório. O Estado-membro deve então notificar a Comissão e informar o comité, no prazo de três meses, das medidas de correcção que tenciona adoptar para assegurar que os objectivos serão atingidos.

6. Se, no prazo de seis meses subsequente à notificação das medidas de correcção, a Comissão entender que essas medidas são insuficientes para atingir os objectivos no prazo estabelecido, o Estado-membro é obrigado a cumprir com os requisitos previstos nos n.os 2 e 3 do artigo 5.º, bem como no anexo III, no prazo estabelecido pela presente directiva para as instalações existentes. A Comissão informará da sua decisão o comité referido no artigo 13.º

Artigo 7.º Substituição

1. A Comissão deve garantir que se efectua o intercâmbio de informações entre os Estados-membros e as diversas actividades sobre a utilização de compostos orgânicos e seus potenciais substitutos. Analisará:

- a adequação à utilização,
 - o impacto potencial sobre a saúde humana em geral e a exposição profissional em especial,
 - o impacto potencial sobre o ambiente, e
 - as consequências económicas e, mais particularmente, os custos e benefícios das opções disponíveis,
- tendo em vista a elaboração de directrizes aplicáveis à utilização de substâncias e técnicas que apresentem menos riscos potenciais para a atmosfera, a água, os solos, os ecossistemas e a saúde humana. A Comissão publicará directrizes para cada actividade após o intercâmbio de informações.
2. Os Estados-membros devem garantir que as directrizes referidas no n.º 1 serão tidas em conta na autorização e na formulação de regras gerais de cumprimento obrigatório.

Artigo 8.º Monitorização

1. Os Estados-membros imporão aos operadores das instalações abrangidas pela presente directiva a obrigação de fornecerem à autoridade competente, uma vez por ano ou sempre que lhes seja solicitado dados que lhe permitam verificar a observância da presente directiva.
2. Os Estados-membros devem garantir que os canais a que se encontra ligado o equipamento de redução de emissões, e que no ponto final de descarga emitam em média mais de 10 kg/h de carbono orgânico total, sejam sujeitos a uma monitorização permanente.
3. Nos outros casos, os Estados-membros devem garantir que sejam efectuadas medições contínuas ou periódicas. Em caso de medições periódicas, devem efectuar-se pelo menos três leituras em cada exercício de medição.
4. Não são exigidas medições no caso de não ser necessário um equipamento de redução final para dar cumprimento à presente directiva.
5. A Comissão organizará um intercâmbio de informações sobre a aplicação dos planos de gestão de solventes nos Estados-membros, com base nos dados relativos à aplicação da presente directiva, nos três anos seguintes à data prevista no artigo 15.º

Artigo 9.º Cumprimento dos valores-limite de emissão

1. O cumprimento dos seguintes parâmetros será comprovado a contento da autoridade competente:
 - valores-limite das emissões de gases residuais, valores das emissões evasivas e valores-limite totais de emissão,
 - requisitos do plano de redução das emissões ao abrigo do anexo II B,
 - disposições do n.º 3 do artigo 5.º

Constam do anexo III orientações sobre os planos de gestão de solventes, destinadas a demonstrar o cumprimento dos referidos parâmetros.

Ao gás residual, podem ser acrescentados volumes de gás para efeitos de arrefecimento ou de diluição, sempre que se justifique do ponto de vista técnico, mas estes não serão tidos em conta na determinação da concentração em massa do poluente no gás residual.
2. Se se verificarem alterações substanciais, deve voltar a verificar-se o cumprimento destes parâmetros.
3. Se se proceder a medições contínuas, considerar-se-á que os valores-limite de emissão foram cumpridos se:
 - a) Nenhuma das médias durante 24 horas de funcionamento normal exceder os valores-limite de emissão, e
 - b) Nenhuma das médias horárias exceder os valores-limite de emissão em mais de um factor de 1,5.
4. Se se proceder a medições periódicas, considerar-se-á que os valores-limite de emissão foram cumpridos se, num exercício de monitorização:
 - a) A média de todas as leituras não exceder os valores-limite de emissão, e
 - b) Nenhuma das médias horárias exceder o valor-limite de emissão em mais de um factor de 1,5.
5. O cumprimento do disposto nos n.os 7 e 8 do artigo 5.º será verificado com base no total de concentrações em massa de cada um dos componentes orgânicos voláteis em questão. Em todos os outros casos, o cumprimento será verificado com base na massa total de carbono orgânico emitido, salvo especificação em contrário no anexo II A.

Artigo 10.º Incumprimento

Em caso de incumprimento dos requisitos constantes da presente directiva, os Estados-membros devem adoptar as medidas necessárias para assegurar que:

- a) O operador informe a autoridade competente e adopte medidas destinadas a restabelecer o cumprimento, num prazo tão breve quanto possível;
- b) Seja suspensa a actividade nos casos de incumprimento conducentes a perigo iminente para a saúde humana e enquanto o cumprimento não puder ser restabelecido nas condições da alínea a).

Artigo 14.º Sanções

Os Estados-membros determinarão as sanções aplicáveis em caso de violação das disposições nacionais adoptadas em aplicação da presente directiva e adoptarão as medidas necessárias à sua execução. As sanções adoptadas devem ser eficazes, proporcionadas e dissuasivas. Os Estados-membros notificarão à Comissão as disposições em causa, o mais tardar na data referida no artigo 15.º, notificando qualquer alteração posterior no mais breve prazo.

Artigo 15.º Transposição

1. Os Estados-membros adoptarão as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva o mais tardar em . . . de Abril de 2001. Desse facto informarão imediatamente a Comissão.
Quando os Estados-membros adoptarem essas disposições, estas deverão conter uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência na publicação oficial. As modalidades dessa referência serão adoptadas pelos Estados-membros.
2. Os Estados-membros comunicarão à Comissão as disposições de direito interno que adoptarem no domínio regido pela presente directiva.

Artigo 16.º Entrada em vigor

A presente directiva entra em vigor na data da sua publicação no Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

Artigo 17.º Destinatários

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 11 de Março de 1999.
Pelo Conselho
O Presidente
J. TRITTIN

ANEXO I

ÂMBITO

No presente anexo discriminam-se as categorias de actividade a que se refere o artigo 1.º Sempre que funcionem acima dos limiares estabelecidos no anexo II-A, as actividades referidas neste anexo entram no âmbito da presente directiva. Em todos os casos, a actividade compreende a limpeza dos equipamentos, mas não a dos produtos, salvo especificação em contrário.

Revestimentos adesivos

- Qualquer actividade pela qual se aplique um adesivo a uma superfície, com excepção das actividades de revestimento e laminagem com adesivos associadas às actividades de impressão.

Actividade de revestimento

- Qualquer actividade pela qual se aplique uma única ou várias películas contínuas de revestimento em:

- veículos dos tipos a seguir discriminados:
- veículos novos da categoria M1 da Directiva 70/156/CEE (1), ou da categoria N1, se o

- veículos dos tipos a seguir discriminados:
- veículos novos da categoria M1 da Directiva 70/156/CEE (1), ou da categoria N1, se o revestimento for efectuado nas mesmas instalações dos veículos M1,
- cabinas de camiões, entendidas como o habitáculo do motorista e os compartimentos integrados para equipamento técnico, dos veículos abrangidos pelas categorias N2 e N3 da Directiva 70/156/CEE,
- carrinhas e camiões, entendidos como os veículos abrangidos pelas categorias N1, N2 e N3 da Directiva 70/156/CEE, excluindo as cabinas de camiões,
- autocarros, entendidos como os veículos abrangidos pelas categorias M2 e M3 da Directiva 70/156/CEE,
- reboques definidos nas categorias O1, O2, O3 e O4 da Directiva 70/156/CEE,
- superfícies metálicas e plásticas de aviões, barcos, comboios, etc.,
- superfícies de madeira,
- têxteis, tecidos, películas e superfícies de papel,
- curtumes. Não se inclui o revestimento de substratos com metais por técnicas electroforéticas e pulverização química. Caso a actividade de revestimento inclua uma fase em que o produto seja objecto de impressão por qualquer tipo de técnica, essa fase é considerada parte integrante da actividade de revestimento. Não se incluem, contudo, as actividades de impressão autónomas; estas poderão, porém, ficar abrangidas pela presente directiva se a actividade de impressão se integrar no seu âmbito de aplicação.

Revestimento de bobinas

- Todas as actividades contínuas de revestimento de bobinas de aço, aço inoxidável, aço revestido, ligas de cobre e bandas de alumínio que incluam a formação de uma película ou um revestimento laminado num processo contínuo.

Limpeza a seco

- Todas as actividades industriais ou comerciais que utilizem COV numa instalação com o objectivo de limpar vestuário, móveis e bens de consumo semelhantes, com excepção da remoção manual de manchas e nódoas na indústria têxtil e do vestuário.

Fabrico de calçado

- Quaisquer actividades de produção total ou parcial de calçado.

Produção de revestimentos, vernizes, tintas de impressão e adesivos

- Fabrico dos produtos acabados atrás referidos, bem como de produtos intermédios se efectuado na mesma instalação, mediante a mistura de pigmentos, resinas e materiais adesivos com solventes orgânicos ou outros veículos, incluindo as actividades de dispersão ou pré-dispersão, ajustamentos de viscosidade e tonalidade, bem como a colocação dos produtos acabados na respectiva embalagem.

Fabrico de produtos farmacêuticos

- Síntese química, fermentação, extracção, formulação e acabamento de produtos farmacêuticos e, quando efectuado na mesma instalação, o fabrico de produtos intermédios.

Impressão

- Actividades de reprodução de texto e/ou imagens em que, através de um cliché, se procede à transferência de tinta para qualquer tipo de superfície. Inclui as técnicas de envernizamento, revestimento e laminagem associadas aos referidos processos. Contudo, só os seguintes subprocessos são abrangidos pela directiva:
 - flexografia - actividade de impressão que utiliza um cliché de borracha ou de um fotopolímero elástico em que a área a imprimir se situa num plano superior e tintas líquidas que secam por evaporação.
 - impressão rotativa *offset* com secagem a quente - actividade de impressão rotativa *offset* que utiliza um cliché em que a área a imprimir e a área em branco se situam no mesmo plano. A denominação da técnica provém do facto de o material a imprimir ser introduzido na máquina na forma de bobina e não de folhas separadas. A área em branco é tratada de modo a tornar-se hidrófila, repelindo a tinta. A área a imprimir é tratada de modo a receber tinta e transmiti-la à superfície a imprimir. A evaporação ocorre numa estufa, por aquecimento com ar quente do material impresso.

- laminagem associada a actividades de impressão - colagem de dois ou mais materiais flexíveis, de modo a produzir laminados.
- rotogravura para publicação - rotogravura utilizada na impressão de revistas, brochuras, catálogos e produtos similares, que recorre a tintas à base de tolueno.
- rotogravura - actividade de impressão que utiliza um cliché cilíndrico em que a área a imprimir se situa num plano inferior à área em branco e tintas líquidas que secam por evaporação. Os recessos são enchidos com tinta, sendo o excesso da mesma removido da área em branco antes de a superfície a imprimir tocar o cilindro e retirar a tinta dos recessos.
- serigrafia rotativa - actividade de impressão rotativa em que uma tinta líquida, que seca apenas por evaporação, é vertida na superfície a imprimir após passagem por um cliché poroso, sendo a área a imprimir aberta e a área em branco vedada. A denominação da técnica provém do facto de o material a imprimir ser introduzido na máquina na forma de bobina, e não de folhas separadas.
- Envernizamento - actividade pela qual se aplica num material flexível um verniz ou revestimento adesivo, tendo por objectivo a vedação posterior do material de embalagem.

Processamento de borracha

- Todas as actividades de mistura, trituração, dosagem, calandragem, extrusão e vulcanização de borracha natural e sintética ou quaisquer operações afins tendo por objectivo a conversão da borracha natural ou sintética em produtos acabados.

Limpeza de superfícies

- Todas as actividades, à excepção da limpeza a seco, que utilizem solventes orgânicos com o objectivo de remover sujidade de materiais, nomeadamente processos de desengorduramento. As actividades de limpeza constituídas por várias fases anteriores ou posteriores a qualquer outra actividade devem considerar-se como uma só actividade de limpeza de superfícies. Esta actividade não engloba a limpeza dos equipamentos, mas apenas a limpeza da superfície dos produtos.

Extracção de óleos vegetais e gorduras animais e refinação de óleos vegetais

- Todas as actividades destinadas a extrair óleos vegetais de sementes e outras matérias vegetais, processamento de resíduos secos tendo em vista a produção de alimentos para animais, purificação de gorduras e óleos vegetais provenientes de sementes, matérias vegetais e/ou matérias animais.

Retoque de veículos

- Todas as actividades industriais ou comerciais de revestimento e actividades de desengorduramento associadas que executem:
 - o revestimento de veículos rodoviários definidos pela Directiva 70/156/CEE, ou partes dos mesmos, efectuadas no contexto da reparação, conservação ou decoração de veículos fora das instalações de produção,
 - ou
 - o revestimento inicial de veículos definidos na Directiva 70/156/CEE, ou partes dos mesmos, com materiais de acabamento, caso não seja executado na linha de produção,
 - ou
 - o revestimento de reboques (incluindo semi-reboques) (categoria O).

Revestimento de fios metálicos para bobinas

- Todas as actividades de revestimento de condutores metálicos para utilização em bobinas de transformadores e motores, etc.

Impregnação de madeira

- Todas as actividades que envolvam a aplicação de conservantes na madeira.

Fabrico de laminados de madeira e plástico

- Todas as actividades de colagem de madeira e/ou plástico para a produção de laminados.

(1) JO L 42 de 23.2.1970, p. 1. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 97/27/CE (JO L 233 de 25.8.1997, p. 1).

ANEXO II A

I. LIMIARES E VALORES DE REFERÊNCIA APLICÁVEIS ÀS EMISSÕES

II. INDÚSTRIA DE REVESTIMENTO DE VEÍCULOS

Os valores-limite totais de emissão são expressos em gramas de solvente emitido por unidade de superfície do produto em metros quadrados e em quilogramas de solvente emitido por carroçaria.

A superfície total de qualquer produto referido no quadro infra é definida do seguinte modo:

- superfície calculada com base na superfície total revestida por electroforese e na superfície de quaisquer componentes adicionados nas diversas fases do processo e revestidos com o mesmo material que o produto em causa, ou superfície total do produto revestido na instalação.

A superfície revestida por electroforese é calculada por recurso à fórmula:

>NUM>2 × massa total de produto

>DEN>espessura média da chapa metálica × densidade da chapa metálica

O método é também aplicável aos restantes componentes revestidos constituídos por chapa.

Para o cálculo da superfície dos restantes componentes ou da superfície total revestida na instalação devem utilizar-se métodos CAD (concepção assistida por computador) ou equivalentes.

O valor-limite de emissão que se apresenta no quadro infra refere-se a todas as fases do processo executadas na mesma instalação, por electroforese ou por qualquer outro processo de revestimento, incluindo o enceramento e o polimento final, bem como aos solventes utilizados na limpeza dos equipamentos, incluindo câmaras de pulverização e outros equipamentos fixos, durante e fora do tempo de produção. O valor-limite total de emissão é expresso como a soma das massas dos compostos orgânicos por m² da área total da superfície do produto revestido e a soma das massas dos compostos orgânicos por carroçaria.

>POSIÇÃO NUMA TABELA>

As instalações de revestimento de veículos que apresentem valores inferiores aos limiares de consumo de solventes fornecidos no quadro supra devem cumprir as exigências relativas ao sector de retoque de veículos que se apresentam no anexo II A.

ANEXO II B

PLANO DE REDUÇÃO DAS EMISSÕES

1. Princípios

É objectivo do plano de redução das emissões permitir ao operador, por outros meios, uma redução das emissões equivalente à que resultaria da aplicação de valores-limite de emissão. Para o efeito, o operador pode utilizar qualquer plano de redução especialmente concebido para a sua instalação, desde que no final se obtenha uma redução de emissões equivalente. Os Estados-membros apresentarão à Comissão, nos termos do artigo 11.º da directiva, relatórios sobre os progressos alcançados no tocante à redução das emissões, incluindo a experiência resultante da aplicação do plano de redução.

2. Aplicação

Caso se apliquem revestimentos, vernizes, adesivos ou tintas, poderá utilizar-se o plano que se segue. Se o método que se segue for inadequado, a autoridade competente pode autorizar o operador a utilizar um plano alternativo que considere cumprir os princípios traçados no presente diploma. Na sua concepção, o plano deverá atender aos seguintes factos:

- i) Caso se encontrem ainda em fase de desenvolvimento substituintes isentos de solventes ou com um teor reduzido dos mesmos, deve conceder-se ao operador uma prorrogação do prazo que lhe permita aplicar os seus planos de redução das emissões;
- ii) O valor de referência para a redução das emissões deve corresponder, na medida do possível, ao volume das emissões que resultariam caso não tivessem sido empreendidas quaisquer acções de redução.

O plano que se segue é aplicável a instalações relativamente às quais se possa considerar que processam quantidades constantes de produtos sólidos, que serão utilizadas para a definição do valor de referência para a redução das emissões.

- i) O operador deve aplicar um plano de redução das emissões que inclua, nomeadamente, a redução do teor médio de solvente utilizado e/ou uma maior eficiência na utilização de produtos sólidos, de modo a reduzir as emissões totais provenientes da instalação a uma determinada

adesivo consumida num ano. Consideram-se sólidos todos os materiais dos revestimentos, tintas vernizes e adesivos que solidificam quando a água ou os compostos orgânicos voláteis se evaporam.

b) Calculam-se as emissões anuais de referência mediante a multiplicação da massa determinada em (a) pelo factor específico que se apresenta no quadro infra. As autoridades competentes podem ajustar os factores em causa de modo a adaptá-los aos progressos em matéria de utilização eficiente de sólidos documentados na literatura.

c) O objectivo de emissão é calculado multiplicando a emissão anual de referência por uma determinada percentagem igual a:

- (valor relativo às emissões evasivas + 15), no caso das instalações abrangidas pelo ponto 6 e o limiar inferior dos pontos 8 e 10 do anexo II A,

- (valor relativo às emissões evasivas + 5), no caso das restantes instalações.

d) A conformidade verifica-se nos casos em que a emissão real de solventes, determinada com base no plano de gestão de solventes, é inferior ou igual ao objectivo de emissão.

ANEXO III

PLANO DE GESTÃO DE SOLVENTES

1. Introdução

O presente anexo dá directrizes para a elaboração de um plano de gestão de solventes, identificando os princípios a aplicar (ponto 2) e fornecendo tópicos para a determinação do balanço de massas (ponto 3), bem como uma indicação das exigências em matéria de verificação do cumprimento (ponto 4).

2. Princípios

O plano de gestão de solventes tem os seguintes objectivos:

- i) verificar o cumprimento, de acordo com o n.º 1 do artigo 9.º;
- ii) identificar as futuras opções em matéria de redução de emissões;
- iii) assegurar o fornecimento de informações ao público sobre o consumo de solventes, as emissões de solventes e o cumprimento da directiva.

3. Definições

As seguintes definições constituem a base para a determinação do balanço de massas.

Entradas de solventes orgânicos (E):

E1 As quantidades de solventes orgânicos utilizados em processos no período de cálculo do balanço de massas, incluindo os solventes contidos em preparações.

E2 As quantidades de solventes orgânicos recuperados e reutilizados como solventes num processo, incluindo os solventes contidos em preparações (os solventes reciclados são tomados em conta sempre que utilizados para uma actividade).

Saídas de solventes orgânicos (S):

S1 Emissões em gases residuais.

S2 Solventes orgânicos dispersos em água, incluindo, eventualmente, as águas residuais (S5).

S3 Solventes orgânicos presentes, na forma de contaminantes ou resíduos, nos produtos resultantes do processo.

S4 Emissão não confinada de solventes orgânicos para a atmosfera, nomeadamente através de janelas, portas, ventiladores e aberturas afins.

S5 Solventes orgânicos e/ou compostos orgânicos dispersos em resultado de processos químicos ou físicos (nomeadamente, os solventes orgânicos e/ou compostos orgânicos destruídos por incineração ou de cujo tratamento resultem gases ou águas residuais, bem como solventes orgânicos e/ou compostos orgânicos captados, nomeadamente por adsorção, não contabilizados no âmbito de S6, S7 e S8).

S6 Solventes orgânicos contidos em resíduos recolhidos.

S7 Solventes orgânicos, incluindo os solventes contidos em preparações, que são vendidos ou se destinam a ser vendidos como produtos com valor comercial.

S8 Solventes orgânicos contidos em preparações recuperados para reutilização mas não como solventes, não contabilizados no âmbito de S7.

S9 Solventes orgânicos libertados por outra forma.

4. Directrizes para a verificação do cumprimento por intermédio dos planos de gestão de solventes

O tipo de utilização do plano de gestão de solventes será determinado pela exigência específica a respeitar, nomeadamente:

i) Verificação da conformidade com a opção de redução do anexo II B, com um valor-limite total expresso em termos de emissões de solvente por unidade do produto, ou por outra forma consagrada no anexo II A.

a) No que respeita a todas as actividades abrangidas pelo anexo II B, o plano de gestão de solventes deve ser elaborado anualmente, de modo a determinar o consumo (C). Este último pode ser calculado por recurso à seguinte fórmula:

$$C = E1 - S8$$

Deve proceder-se de modo idêntico para a determinação do teor de sólidos utilizados num processo de revestimento, de modo a estabelecer anualmente o valor de referência das emissões anuais e o objectivo de emissão.

b) No que respeita à determinação da conformidade com um valor-limite total expresso em termos de emissão de solventes por unidade do produto ou por outra forma consagrada no anexo II A, o plano de gestão de solventes deve ser elaborado anualmente, de modo a determinar o volume de emissões (E). Este último pode ser calculado por recurso à seguinte fórmula:

$$E = F + S1$$

em que F representa as emissões evasivas definidas no ponto ii)a. O valor obtido deve dividir-se pelo parâmetro específico relativo ao produto.

c) No que respeita à avaliação do cumprimento das exigências expressas no n.º 5, alínea b), subalínea ii), do artigo 5.º, o plano de gestão de solventes deve ser elaborado anualmente, de modo a determinar o total das emissões decorrentes de todas as actividades em causa, que deverá ser comparado com o valor que resultaria caso as exigências do anexo II tivessem sido aplicadas separadamente às diversas actividades.

ii) Determinação das emissões evasivas para comparação com os valores das emissões evasivas que se apresentam no anexo II A:

a) Metodologia

As emissões evasivas podem ser calculadas por recurso à seguinte fórmula:

$$F = E1 - S1 - S5 - S6 - S7 - S8$$

ou

$$F = S2 + S3 + S4 + S9$$

As quantidades podem ser determinadas por medição directa. O cálculo pode ser efectuado de outro modo, nomeadamente com base na eficiência de confinamento do processo.

O valor relativo às emissões evasivas é expresso em percentagem das entradas, calculável do seguinte modo:

$$E = E1 + E2$$

b) Frequência

A determinação do volume de emissões evasivas pode ser efectuada através de um conjunto de medições breve mas completo, não tendo de ser repetida antes de se proceder a alterações do equipamento.