

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo são apresentados, os materiais, reagentes e equipamentos utilizados no estudo do processo de bioissorção/flotação para a remoção de metais como, Mercúrio usando a biomassa *Rhodococcus opacus*, bem como a metodologia experimental desenvolvida para o estudo em questão. Inicialmente é descrito o procedimento para preparação da biomassa. Em seguida são descritas a metodologia empregada nas medições eletrocinéticas, a metodologia e as condições operacionais do estudo da influência de algumas variáveis na capacidade de remoção de Mercúrio. São apresentados os procedimentos analíticos para a determinação quantitativa e assim como os procedimentos empregados na caracterização do bioissorvente antes e após a bioissorção. Finalmente é descrita a metodologia experimental desenvolvida.

### **4.1. OBTENÇÃO DO BIOSSORVENTE**

A cepa do microorganismo *Rhodococcus opacus* foi fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello-São Paulo.

#### **4.1.1. CULTIVO E CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO**

A bactéria *Rhodococcus opacus* referenciada como DSM 43250 foi subcultivada no laboratório usando o meio de cultura YMA composto por: glicose conforme podemos observar a tabela 9.

Tabela 9. Composição do meio de cultivo sólido utilizado no cultivo bacteriano

Componente	Composição (g.L <sup>-1</sup> )
Glicose	10
Peptona	5
Extrato de malte	3
Extrato de levedura	3
CaCO <sub>3</sub>	2
Agar	20

O meio de cultura foi ajustado em pH 7,2 e posteriormente esterilizado em autoclave com 1 atm de pressão, durante 20 min.

Na figura 12 abaixo a bactéria foi cultivada durante 48 horas no meio sólido e foram identificadas as colônias características do *Rhodococcus opacus*, posteriormente a bactéria foi subcultivada em placas de preservação para manter um estoque suficiente para realizar os ensaios.

Figura 12. Bactéria *Rhodococcus opacus* após crescimento em meio sólido

Tabela 10. Composição do meio de cultivo líquido utilizado no cultivo bacteriano

Componente	Composição (g.L <sup>-1</sup> )
Glicose	10
Peptona	5
Extrato de malte	3
Extrato de levedura	3

Para realizar os crescimentos e obter as células concentradas de *Rhodococcus opacus*, a bactéria foi cultivada num meio líquido e utilizando a mesma composição do meio sólido descrita anteriormente sem a presença de agar-agar e de  $\text{CaCO}_3$  conforme observamos na tabela 10.

O meio de cultura foi ajustado a um pH 7,2 e posteriormente esterilizado em autoclave à 1atm de pressão, por 20 minutos. A figura 13 mostra a suspensão em agitador tipo rotatório (CIENITEC CT-712) a temperatura de 27°C por 48 horas. Após o crescimento, a suspensão celular centrifugada a velocidade de 4000rpm por 8 minutos. Precipitado da centrifugação, constituído pelas células do *Rhodococcus opacus*, é lavado três vezes com água deionizada, e re-suspensão numa solução de 1mM de NaCl. Posteriormente a suspensão é colocada em autoclave a 1atm de pressão por 20 minutos, obtendo-se o bioissorvente para os ensaios.



Figura 13. Bactéria *Rhodococcus opacus* após crescimento em meio líquido

A densidade óptica das suspensões da bactéria é determinada, por espectrofotômetro (Biospectro SP-220), a comprimento de onda específica para a bactéria ( $\lambda=620$ ). Calibração do peso seco da biomassa contra a densidade óptica das suspensões é realizada nesse comprimento de onda. O peso seco da biomassa é determinado gravimetricamente a diferentes concentrações após um secado a 60°C por 24 horas.

## 4.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE MERCÚRIO

As soluções foram preparadas com água deionizada a partir dos sais de Mercúrio. As soluções teste preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg.L<sup>-1</sup> adicionando os volumes necessários da solução estoque para a obtenção das concentrações iniciais desejadas. O pH foi ajustado para os valores desejados com HCl 0.1M e NaOH 0.1 M.

## 4.3. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL BIOSORVENTE

### 4.3.1. POTENCIAL ZETA

Os valores dos potenciais Zeta do *Rhodococcus opacus* foram feitas sem a interação com os metais e após a interação com o Mercúrio empregando um equipamento denominado Zeta Meter System 3.0 da Zeta-Meter Inc. para os diferentes valores de pH. Este equipamento mede a velocidade eletroforética das partículas, e mediante um programa no qual ele tem inserido a equação de Smoluchowski, faz a transformação direta em potencial Zeta.

Será empregado como eletrólito indiferente 1mM de NaCl para manter a força iônica constante. Inicialmente será condicionado 50mL de *Rhodococcus opacus* antes e depois da interação com os metais com uma agitação mecânica durante 1 minuto, ao final do condicionamento medir o pH da solução, tentando atingir os valores desejados com 0.1M de HCl e 0.1M de NaCl.

### 4.3.2. MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Carl Zeiss - DSM 960) foi utilizado para avaliar a morfologia da biomassa antes e após a sorção da espécie metálica (Hg) e assim, analisar qualitativamente o processo de biossorção. O MEV tem uma capacidade única para analisar superfícies. A incidência do feixe de elétrons sobre a superfície da amostra promove a emissão de elétrons secundários retroespalhados e absorvidos assim como de raios X característicos. Estes elétrons são utilizados para a formação da imagem. Os

elétrons têm muito mais curto comprimento de onda que os fótons luminosos, e mais curtos comprimentos de onda são capazes de gerar informação de alta resolução. Realçada resolução permite maiores magnificações sem perda de detalhes. As micrografias do MEV podem manter a aparência tridimensional da textura das superfícies (Gabriel, 1985). A combinação de alta resolução acima de 4nm, extensiva faixa de magnificação (10 a  $2 \times 10^5$  vezes), e alta profundidade de campo (voltagem de 0.2 a 40 Kv) faz que o MEV seja adequado para o estudo da superfície da biomassa microbiana.

As amostras que não são condutoras de corrente elétrica para serem analisadas no MEV devem ser previamente metalizadas. A metalização consiste na precipitação a vácuo de uma película micrométrica de um material condutor (ouro ou prata) sendo utilizado na amostra ouro sobre a superfície da amostra, possibilitando a condução da corrente elétrica.

### **Preparação da Amostra para o MEV**

Placas de vidro foram usadas para montar as amostras.

As amostras analisadas foram retiradas no início e no final do processo de sorção, para uma concentração inicial de 50 ppm de Hg (II), foram empregadas as amostras contendo a concentração metálica para facilitar a determinação dos metais. Posteriormente as amostras foram secadas durante 24h a uma temperatura de 50 °C e finalmente metalizadas.

A metalização foi realizada com Au por deposição a vácuo para fazer um filme delgado condutor antes de serem introduzidas as amostras para análises no MEV.

### **4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

O teor de mercúrio presente na solução para o processo de biossorção, foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica.

A absorção da luz por meio de átomos oferece uma ferramenta analítica para as análises quantitativas e qualitativas. A espectrofotometria de absorção atômica baseia – se no princípio que estabelece que os átomos livres em estado estável podem absorver a luz a um certo comprimento de onda. A espectrofotometria de absorção atômica é um método usado para a análise de traços de metal de amostras biológicas, metalúrgicas, farmacêutica e atmosféricas.

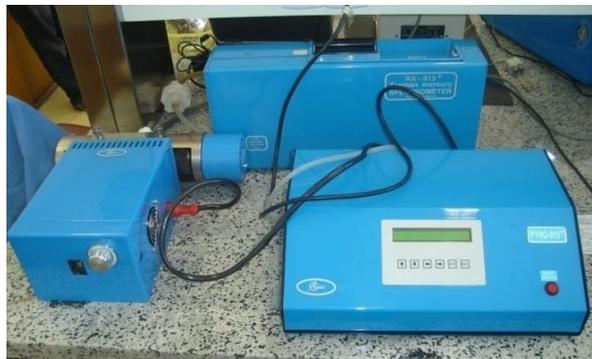


Figura 14. Espectrofotômetro de absorção atômica (CETEM-RJ)



Figura 15. Acessório de geração de calor (CETEM-RJ)

O equipamento utilizado para espectrofotometria de absorção atômica foi Zeeman – Lumex 915+. O comprimento de onda utilizada para as análises foi de 224,5 nm e os padrões utilizados para realizar a curva de calibração foram de 0,50 e 1 mg/L.

## 4.5. ENSAIOS DE BIOSSORÇÃO

### 4.5.1. INFLUÊNCIA DO pH

Foram realizados ensaios para avaliar a influencia do pH no processo de bioadesão e determinar pH ótimo, no qual o biorreagente apresenta a maior capacidade de adesão. O pH do meio não só afeta a solubilidade das espécies presentes, mas também ativa grupos funcionais na parede celular do microrganismo; o efeito desta variável foi avaliado na faixa de 3 – 10, pois segundo literatura observa-se que quando eleva ou abaixa o pH, as variáveis de adsorção são eficientes. Um volume de 50 mL de solução mineral com valores de pH na faixa desejada, mantido em contato com o biorreagente por 3 horas a velocidade de 150 rpm em agitador rotatório horizontal (CIENTEC CT-712) a temperatura de aproximadamente de 25°C. O ajuste do pH feito empregando-se soluções de NaOH 1M ou HCl 0,1M. Após equilíbrio, as amostras submetidas à centrifugação a 4000 rpm durante 8 minutos, para remover o biorreagente carregado. Na tabela 6 abaixo são apresentadas as condições experimentais empregadas nos ensaios.

Tabela 11. Condições a serem empregadas para a determinação da influencia do pH.

PARAMETRO	Mercúrio
Volume da solução (mL)	50
Concentração inicial do metal (mg.L <sup>-1</sup> )	50
Concentração biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	3
Velocidade de agitação (rpm)	150
Temperatura (°C)	25±2
pH	3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10
Tempo de contato (min)	180

### 4.5.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO BIOSSORVENTE

O efeito da dosagem de bioissorvente na bioissorção do mercúrio da solução aquosa foi avaliado empregando seis diferentes concentrações de bioissorvente, buscando ainda uma melhor variável, que seja positiva na

bioissorção dos metais trabalhados, segundo literaturas esses valores são considerados altos para determinados processos de bioissorção, como, por exemplo, absorção do metal cromo (VI) onde variáveis da concentração do bioissorvente vão de 0,8 (g.L<sup>-1</sup>) a 2,4 (g.L<sup>-1</sup>). Já que é outra variável importante na captação dos metais. O grau de bioissorção é proporcional a área específica. A área específica será definida como a proporção de área total, parede celular, do bioissorvente disponível para a bioissorção. Ensaios serão realizados para avaliar a dosagem do *Rhodococcus opacus* na faixa de 0,5g.L<sup>-1</sup> até 4g.L<sup>-1</sup> de biomassa. O efeito da concentração do bioissorvente será avaliada a um pH 5, segundo onde apresenta uma máxima captação, e uma concentração inicial de 50mg.L<sup>-1</sup> para ambos íons metálicos. Na tabela 12 abaixo são apresentadas às condições experimentais empregadas nos ensaios.

Tabela 12. Condições a serem empregadas para a determinação da influencia da concentração de bioissorvente.

PARAMETRO	Mercúrio
Volume da solução (mL)	50
Concentração inicial do metal (mg.L <sup>-1</sup> )	50
Concentração biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	0,5; 1; 2; 3; 4
Velocidade de agitação (rpm)	150
Temperatura (°C)	25±2
pH	5
Tempo de contato (min)	180

#### 4.5.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DO ÍON METÁLICO

O efeito da concentração de metal na capacidade de captação dos íons por *Rhodococcus opacus* foram avaliadas na faixa de 5 a 150 mg.l<sup>-1</sup> para mercúrio onde são normalmente os níveis de concentração encontrados em empresas que processam esses metais ou que o usam em seus insumos em seu processo . Os experimentos foram realizados com pH de 5.0 para o mercúrio ajustado com HCl ou NaOH, e com a concentração de biomassa previamente determinada. Os resultados obtidos nestes testes vão ser empregados para a construção das isotermas. Na Tabela 13 abaixo são apresentados os valores experimentais adotados para cada um dos parâmetros.

Tabela 13. Condições a serem empregadas para a determinação da influência da concentração inicial do íon metálico.

PARAMETRO	Mercúrio
Volume da solução (mL)	50
Concentração inicial do metal ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	5;10;20;30;40;50
Concentração biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )	3
Velocidade de agitação (rpm)	150
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$25\pm 2$
pH	5
Tempo de contato (min)	180

#### 4.5.4. CINÉTICA DE BIOSSORÇÃO E TEMPO DE EQUILÍBRIO

A distribuição do adsorvato entre o biossorvente e a solução, é influenciada pelo tempo de equilíbrio. A taxa na qual os íons metálicos são removidos da solução pelo adsorvente é uma variável significativa para o emprego em um processo de tratamento de efluentes. Os dados no efeito do tempo de contato são interpretados sob: I o estudo da taxa constante; II o estudo da difusão intrapartícula. Portanto foram realizados ensaios para determinar o efeito do tempo de contato na biossorção do Mercúrio sobre o *Rhodococcus opacus*, para atingir o equilíbrio. Na tabela 14 abaixo estão apresentadas às condições experimentais empregadas.

Tabela 14. Condições a serem empregadas na determinação do tempo de equilíbrio.

PARÂMETRO	Mercúrio
Volume da solução (mL)	50
Concentração inicial do metal ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	50
Concentração biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )	3
Velocidade de agitação (rpm)	150
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$25\pm 2$
pH	5
Tempo de contato (min)	5; 10; 30; 60 120; 180; 240

#### 4.5.5. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

A temperatura possui um efeito pronunciado na biossorção. Os ensaios para a avaliação da temperatura são semelhantes aos da cinética de biossorção. Ao final de cada ensaio a mistura será centrifugada a 4000rpm por 8 minutos para separar o biossorvente carregado com o íon metálico e a concentração remanescente do íon metálico na fase líquida será avaliada mediante a técnica de absorção atômica de chama. Na tabela 15 abaixo são apresentadas as condições experimentais empregadas nos ensaios.

Tabela 15. Condições a serem empregadas para a determinação da influencia da temperatura.

PARAMETRO	Mercúrio
Volume da solução (mL)	50
Concentração inicial do metal ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	50
Concentração biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )	3
Velocidade de agitação (rpm)	150
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	25;35;45 $\pm$ 2
pH	5
Tempo de contato (min)	180