

4. Materiais e Métodos

4.1. Preparo da biomassa

A cepa de *Rhodococcus ruber* empregada nos experimentos, como bioissorvente, foi fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Toselo (São Paulo – Brasil). A bactéria foi subcultivada no laboratório usando meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) fabricada pela Himedia®.

Primeiramente, todo material de vidro utilizado foi esterilizado em autoclave a 1 atm. e 121°C durante 20 min. A cepa bacteriana foi cultivada no meio solido com 30 g.L⁻¹ de TSB e 20 g.L⁻¹ de Agar-Agar, em placas de Petri e levada a incubação até que fossem identificadas as colônias da bactéria.

Posteriormente, a partir do meio sólido, a bactéria foi subcultivada em meio de cultura líquido, com 30g/L⁻¹ de TSB. Despejou-se 250 mL deste meio em frascos de erlenmeyers de 500 mL. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm por 20 min e levado a capela de segurança biológica (Filterflux), previamente esterilizada, onde os frascos foram inoculados. Em seguida, os erlenmeyers foram encaminhados a incubação em um *shaker* rotatório (CIEN TEC CT-712) com velocidade de 120 rpm a uma temperatura de 28°C por 12 horas.

Após as 12 horas, a suspensão celular foi centrifugada, a velocidade de 5400 rpm por 8 min. O concentrado da centrifugação, constituído pelas células da bactéria, foi lavado duas vezes com água deionizada e re-suspenso, também, em água deionizada. Finalmente, a suspensão concentrada obtida foi esterilizada na autoclave para inativar as bactérias presentes. Esse concentrado final é a biomassa utilizada para o desenvolvimento do trabalho.

A determinação da concentração celular foi estabelecida pelo método do peso seco. Este método utiliza cadinhos de porcelana, neste caso de 2 ml, os quais são pesados antes e após a adição de biomassa. Os cadinhos preenchidos com biomassa são enviados a uma estufa a temperatura de 50°C até que fiquem secos. Logo após, são encaminhados a um desumidificador para resfriar, não deixando que a elevada temperatura em que foram secos na estufa mude o peso, e depois são pesados novamente. A diferença dos pesos, inicial e final, determina a massa bacteriana presente no cadinho. A partir dos dados de

massa e volume se determina a concentração bacteriana. Este método é realizado em triplicatas, a fim de se garantir a real concentração bacteriana.

4.1.1. Ativação da biomassa com NaOH

A bactéria *R. ruber* foi cultivada como descrita no item 4.1. Após a inativação foi adicionado 10 mL de NaOH em 100 mL de biomassa concentrada. Essa mistura foi submetida à agitação por 2h a 125 rpm. Em seguida a mistura foi centrifugada e lavada por duas vezes com água deionizada. Posteriormente, foi medida a concentração bacteriana, por meio do método do peso seco, conforme descrito no item 4.1. A partir deste ponto, a biomassa ativada com 0,1 M NaOH será denominada bactéria ativada.

4.2. Preparo das soluções estoques dos diferentes íons metálicos

Todos os sais utilizados no preparo das soluções padrão foram pesados em balança analítica Bioprecisa, dissolvidos em água deionizada e estocados em frascos até sua utilização. As soluções para utilização nos ensaios de remoção foram preparadas por diluição da solução padrão em água deionizada no dia da sua utilização.

4.2.1. Solução de Alumínio

Foi preparada uma solução estoque de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de alumínio a partir do reagente cloreto de alumínio $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, puríssimo, fornecidos pela Proquimico (RJ, Brasil). Esta solução foi estocada em um frasco até utilização.

4.2.2. Solução de Cobalto

A solução estoque de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de cobalto foi preparada a partir do reagente cloreto de cobalto, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, marca Proquimico, P.A. Esta solução foi guardada em um frasco até utilização.

4.2.3. Solução de Cromo

Para as análises de Cr (III), foi preparado um padrão de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de cromo, sendo utilizado o cloreto de cromo (III), $\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, puríssimo, da VETEC. A solução foi guardada em frasco até utilização.

4.2.4. Solução de Ferro

Para as análises de Ferro (III) foi utilizado o nitrato de ferro (III), $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$, P.A, da marca VETEC, sendo preparada uma solução padrão de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$. A solução foi guardada até utilização.

4.2.5. Solução de Magnésio

Foi preparada uma solução estoque de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de magnésio a partir do reagente sulfato de magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, com 98% de grau de pureza, fornecido pela VETEC (RJ, Brasil). Esta solução foi guardada em um frasco até utilização.

4.2.6. Solução de Níquel

Foi preparado um padrão de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de níquel a partir de cloreto de níquel $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, P.A, da VETEC. A solução foi guardada até utilização.

4.2.7. Soluções para ajuste de pH

Para o ajuste do pH das soluções foram utilizadas soluções $0,001\text{M}$, $0,01\text{M}$, $0,1\text{M}$ de NaOH e HCl.

4.3. Diagramas de Especiação

A especiação química, que determina a faixa de pH para os ensaios, foi realizada para as soluções aquosas com cada íon metálico, utilizando o software Medusa. As simulações do comportamento das espécies em soluções foram feitas para as concentrações dos íons iguais a 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M e 10^{-6}M .

4.4. Medidas de Potencial Zeta

As medidas de potencial zeta para as bactérias antes e após o contato com os íons metálicos foram determinadas em um equipamento de micro eletroforese do tipo Zeta meter system +4.0. O equipamento permite determinar o valor de potencial zeta baseado na velocidade da partícula em suspensão submetida a uma diferença de voltagem entre dois eletrodos.

4.4.1. Curvas Bacterianas

As medidas de potencial zeta das suspensões bacterianas foram realizadas empregando-se como eletrólito indifferente soluções de KCl (cloreto de potássio) nas concentrações 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} M.

Os procedimentos realizados para este teste foram:

- Preparo da solução com a concentração bacteriana desejada (50 ppm);
- Ajuste do pH;
- Repouso de 2 minutos, e verificação do valor do pH ajustado;
- Preenchimento da célula do zeta meter com a suspensão;

Evitar a formação de bolhas de ar dentro da célula

- Conexão dos terminais da célula a fonte de tensão;

A câmara do sistema encarrega-se de medir e transformar a velocidade eletroforética em potencial zeta.

Os resultados de potencial zeta foram obtidos com a média de 20 leituras para cada amostra analisada.

Curvas com diferentes concentrações bacterianas

Os ensaios das medidas de potencial zeta entre as células bacterianas com concentrações de 50, 75 e 100 ppm após a interação com o níquel foram realizadas para avaliar a influência da concentração bacteriana na medida do potencial zeta.

Os procedimentos realizados para este teste foram:

- Preparo da solução com a concentração desejada;

Nesta etapa, fora preparada, em Becker de 50mL, a solução metálica de níquel a 10^{-4} M. Após foi adicionado 50ppm do concentrado bacteriano e ajustado o pH no valor desejado. Esta mistura ficou em contato por 5 min a temperatura de 25°C, sob agitação de 3 rpm. Após verificou-se novamente o pH para confirmar se estava na faixa determinada. O mesmo foi feito para a concentração de 75ppm e 100ppm.

- Preenchimento da célula do zeta meter com a suspensão;

Retirou-se 20 ml da suspensão com auxílio de uma seringa e preencheu a célula. Sempre evitando a formação de bolhas de ar dentro da célula.

- Conexão dos terminais da célula a fonte de tensão;

O valor do potencial zeta registrado representa a média de 20 valores medidos pelo aparelho o qual calcula a mobilidade eletroforética das partículas e converte esta para potencial zeta mediante a equação de Smoluchowski.

O aparelho também fornece o desvio padrão de cada ponto a partir da média de 20 valores medidos.

4.4.2. Curvas da Biomassa com metal

Os ensaios das medidas de potencial zeta entre as células bacterianas e as espécies metálicas com diferentes concentrações 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M foram realizadas para avaliar a influência destas interações.

Os procedimentos realizados para este teste foram:

- Preparo da solução com a concentração desejada;

Nesta etapa foram preparados em Becker de 50mL, soluções metálicas com a concentração desejada. Após foi adicionado 50ppm do concentrado bacteriano e ajustado o pH no valor desejado. Esta mistura ficou em contato por 5 min a temperatura de 25°C, sob agitação de 3 rpm. Após verificou-se novamente o pH para confirmar se estava na faixa determinada.

- Preenchimento da célula do zeta meter com a suspensão;

Retirou-se 20 ml da suspensão com auxílio de uma seringa e preencheu a célula. Sempre evitando a formação de bolhas de ar dentro da célula.

- Conexão dos terminais da célula a fonte de tensão;

O valor do potencial zeta registrado representa a média de 20 valores medidos pelo aparelho o qual calcula a mobilidade eletroforética das partículas e converte esta para potencial zeta mediante a equação de Smoluchowski.

4.5. Espectroscopia de Infravermelho

A espectrometria de Infravermelho foi utilizada para analisar e comparar os grupamentos funcionais presentes nas superfícies bacterianas antes e após o contato com os íons metálicos. Os ensaios foram realizados em um espectrofotômetro modelo Nicolet 7600 FTIR.

4.5.1. Espectroscopia das bactérias

As suspensões bacterianas foram secadas em uma estufa a uma temperatura de 50°C. O material resultante da secagem de cada amostra foi macerado até a forma de pó. Foram então, realizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) contendo 1% de amostra e em seguida analisadas.

4.5.2. Espectroscopia da bactéria com metal

Foram adicionados 50 ppm de bactéria em cada Becker de 50mL, com a solução metálica e pH já ajustado no valor desejado, totalizando 20 bécheres. Esta mistura ficou em contato por 5 min a temperatura de 25°C, sob agitação de 3 rpm. Após verificou-se novamente o pH para confirmar se estava na faixa determinada. Todas as amostras foram centrifugadas após o tempo de contato, com velocidade de 5000 rpm por um período de 6 minutos, os volumes foram ressuspensos em alíquotas de água destilada e postos para secagem em estufa a temperatura de 50°C. O material seco foi macerado até a forma de pó. Foram então, realizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr), contendo 1% de amostra e em seguida analisadas.

Na tabela 5 esta as condições utilizadas para cada metal durante essa análise.

Tabela 5. Concentração e pH utilizados nas análises de infravermelho.

Elemento	Concentração (M)	pH
Níquel	10^{-3}	5
Cobalto	10^{-3}	6
Magnésio	10^{-3}	6
Alumínio	10^{-4}	4
Cromo	10^{-4}	5
Ferro	10^{-4}	3