

4 Materiais e métodos

4.1. Condições de cultivo do microrganismo e obtenção do bioissorvente

O microrganismo empregado neste trabalho foi uma espécie microbiana obtida da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia ANDRÉ TOSELLO – São Paulo.

A propagação das células foi realizada em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, empregando-se um meio de cultura com a seguinte composição: glicose, 10 g/L; NaCl, 5 g/L; MgSO₄, 0,2 g/L; KH₂PO₄, 1 g/L; (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, com valor de pH 7,0 a temperatura constante de 27 °C por 48 horas em uma incubadora com plataforma de agitação horizontal Nova técnica CT 712, com uma velocidade de agitação de 150 rpm.

Após do crescimento, a cultura foi centrifugada a uma velocidade de 3000 RPM e o material sólido obtido foi submetido à lavagem com água deionizada e suspenso numa solução de 1,0 % de NaCl (Mesquita, 2000) e usados nos ensaios de bioissorção após esterilização a 120°C durante 20 minutos depois de atingir uma pressão de 1 atm.

4.1.1. Coloração de Gram

Esta técnica foi desenvolvida em 1884 pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram (1853-1938) na qual é empregada na visualização e diferenciação de bactérias.

O método de coloração de Gram é baseado na capacidade da parede celular das bactérias Gram-positivas de reterem o corante violeta genciana durante um tratamento com lugol (iodo), enquanto que a parede celular das bactérias Gram-negativas não faz.

Colocou-se sobre uma lâmina de microscópio uma pequena quantidade de microrganismo. Deixou-se o material secar e, em seguida, fixou-se com calor, empregando uma lamparina. Depois foi gotejado corante violeta genciana sobre a lâmina e esperou-se durante um minuto. Imediatamente depois, a lâmina foi enxaguada com água para remover o excesso de corante. Subseqüentemente, aplicou-se lugol, cobrindo toda a amostra por 30 segundos, novamente a lâmina foi submetida a um enxágüe para eliminar o excesso de fixador.

O seguinte passo consistiu em despejar algumas gotas de álcool para remover a violeta genciana das bactérias Gram-negativas, caso sejam Gram negativas. Novamente se enxágüou com água o excesso de solvente e finalmente se aplicou corante fucsina.

Após deste procedimento aplicou-se óleo de imersão na lâmina e observou-se a coloração das bactérias ao microscópio.

4.2. Preparo das soluções de cádmio e zinco

Os sais de cádmio e zinco empregados para o preparo das soluções foram CdSO_4 e ZnSO_4 , fornecido pela Sigma.

As soluções metálicas foram preparadas através da dissolução desses sais em água deionizada, a fim de se obter as diferentes concentrações iniciais empregadas ao longo deste trabalho.

A água deionizada empregada para realizar as diluições dos sais foi testada para se quantificar a concentração de cádmio e zinco existente. A dosagem foi realizada através da técnica de absorção atômica de chama.

4.3. Experimentos de bioabsorção em batelada

Todos os estudos foram feitos por duplicatas tendo em conta o desvio estandar.

4.3.1. Influência do pH no processo de biossorção

Foram realizados ensaios para se determinar a influência do pH no processo de biossorção. Um volume de 100 mL de solução metálica foi mantido em contato com o biossorvente por 12 h a uma velocidade de rotação de 175 rpm em uma plataforma de rotação horizontal (Nova técnica CT 712) e à temperatura de 25 °C. O pH do meio foi medido e ajustado para situar-se na faixa desejada. Este ajuste foi feito empregando-se soluções de NaOH 1M e/ou HCl 0,1N. A solução a ser analisada foi separada por filtração, empregando-se um filtro com membrana Millipore de 0,45 µm de diâmetro de poro (Schleicher & Schuell). As amostras foram acidificadas com uma solução de HCl 0,1N para sua preservação e posterior análise da concentração residual do metal pelo método de espectrofotometria de absorção atômica. Na Tabela 9 são apresentadas as condições experimentais empregadas nos testes.

Tabela 1. Condições empregadas para a determinação da influencia do pH no processo.

Parâmetro	Cd ²⁺	Zn ²⁺
Vol. solução metal (mL)	100	100
Concentração inicial metal (ppm)	20	20
Concentração biomassa (g/L)	2	2
Agitação (rpm)	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2
pH	2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 10	2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 10
Tempo (h)	12	12

4.3.2. Isotermas de adsorção

Os ensaios para a realização das isotermas foram similares aos do item 4.3.1. As concentrações iniciais dos íons metálicos foram variadas entre 15 e 90 ppm para Cd²⁺ e 5 e 70 ppm para Zn²⁺. O valor de pH empregado foi obtido do ensaio anterior.

Na Tabela 10 são apresentados os valores experimentais adotados para cada um dos parâmetros.

Tabela 2. Valores experimentais dos parâmetros

Parâmetro	Cd²⁺	Zn²⁺
Concentração biomassa (g/L)	2	2
Concentração inicial metal (ppm)	15,30,45,60,70 e 90	5,10,15,20,25,30,60 e 70
Vol. Solução metal (mL)	100	100
Agitação (rpm)	175	175
Tempo (h)	12	12
Temperatura (°C)	25	25

4.3.3.

Determinação do tempo de equilíbrio

Foram realizados ensaios para determinar o tempo de contato necessário para atingir o equilíbrio.

Um volume de 100 mL de solução metálica com concentrações de 15 ppm de cádmio e 5 ppm de zinco, concentração de biomassa de 2 g/L, foi mantido a uma velocidade de rotação de 175 rpm em uma plataforma de agitação horizontal (Nova técnica CT 712) e à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O valor de pH empregado para a determinação do tempo de equilíbrio foi obtido do ensaio apresentado na seção 4.3.1. Este foi medido e ajustado empregando soluções de NaOH 1N e 0,1 N e/ou HCl 0,1N.

Para diferentes tempos de contato foram coletadas amostras, verificando se foi atingido o equilíbrio (Ramirez,2005). Na Tabela 11 estão apresentadas as condições experimentais empregadas.

Tabela 3. Condições empregadas na determinação do tempo de equilíbrio

Parâmetro	Cd²⁺	Zn²⁺
Concentração metal (ppm)	15	5
Concentração Biomassa (g/L)	2	2
Vol. Solução metálica (mL)	100	100
Agitação (rpm)	175	175
Temperatura (°C)	25±2	25±2
Tempo (min)	5,10,15,20,30,60,120,180	5,10,15,20,30,60,180

4.4. Experimentos de Bioflotação

Os ensaios de bioflotação foram realizados em uma coluna acrílica de flotação por ar disperso, de diâmetro interno igual a 5,7 cm e comprimento 95 cm; com uma capacidade máxima de 1,3 litros e temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O ar empregado para a flotação foi obtido mediante um compressor. Para a geração das bolhas empregou-se uma placa de vidro sinterizada e porosa (porosidade 4; 10-15 μm). A vazão de ar foi medida através de um rotâmetro.

Foram realizados ensaios para se determinar o tempo no qual se atinge a máxima percentagem de remoção fixando as propriedades aquosas obtidas dos ensaios de biossorção, as condições encontram-se na Tabela 12.

Tabela 4. Condições para avaliar a velocidade de flotação

Parâmetro	Cd^{2+}
Concentração metálica (ppm)	15
Concentração biomassa (g/L)	2
Vol. Solução metal (L)	1,3
Tempo (min)	2,5,10,15, 20 e 30
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	25 ± 2

Posteriormente avaliou-se a vazão de ar em função da percentagem de remoção da espécie metálica.

Tabela.5. Condições para avaliar a influência da vazão de ar na remoção.

Parâmetro	Cd^{2+}
Concentração metálica (ppm)	15
Concentração biomassa (g/L)	2
Vol. Solução metal (L)	1,3
Vazão cm^3/s	2, 5 e 8
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	25
pH	7,0

4.5. Quantificações

As seguintes quantificações foram feitas para avaliar as diferentes características do microrganismo e caracterizar o processo da forma mais adequada.

4.5.1. Biomassa

A biomassa foi quantificada através do método de peso seco. Inicialmente foi retirado um volume de 4 mL de suspensão, que foi levado a peso constante numa estufa a temperatura de 50 °C durante 36 horas. A concentração de biomassa (g/L) foi determinada com base no peso obtido.

4.5.2. Avaliação da morfologia das partículas bioSORVENTES

Foi avaliada a morfologia das partículas antes e depois do processo sortivo mediante um microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplada ao EDS antes e depois de carregar o bioSORVENTE com as diferentes espécies metálicas para analisar qualitativamente o fenômeno bioSORTIVO (Huamán, 2005).

Este equipamento gera imagens em branco e preto, com aumento até 2×10^5 vezes da morfologia externa de uma amostra sob condições de vácuo. 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.

Ao MEV pode ser acoplado um sistema EDS (Energy Dispersive System) o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semi-qualitativa das amostras a partir da emissão de raios X característicos, sendo o limite de detecção da ordem de 0,5%.

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

As amostras analisadas foram retiradas no início e no final do processo de sorção, para uma concentração inicial de 90 e 70 ppm de cádmio e zinco, respectivamente, foram empregadas as amostras contendo a maior concentração metálica para facilitar a determinação dos metais, uma vez que a sensibilidade da técnica é baixa. Posteriormente as amostras foram secadas durante 24 h a uma temperatura de 30 °C e finalmente metalizadas. As análises de MEV/EDS foram feitas no microscópio eletrônico Digital Scanning Microscope DSN 960 Zeiss.

4.5.3. Medidas de potencial Zeta

Os valores dos potenciais Zeta da biomassa sem metal e da biomassa carregada foram quantificados usando um equipamento denominado Zeta Meter System 3.0 da Zeta-Meter INC. para os diferentes valores de pH. Este equipamento mede a mobilidade eletroforética das partículas. Os valores do potencial zeta são obtidos mediante a equação de Smoluchowski tendo o valor da atividade eletroforética através de um programa computacional integrado ao aparelho (Mesquita, 2000).

Abaixo é apresentada a equação de Smoluchowski.

$$Z_p = \frac{4\Pi v_t}{D_t} \cdot E_m \quad (11)$$

Onde:

E_m : Mobilidade eletroforética.

v_t : Viscosidade do líquido suspenso (poises) a temperatura ambiente.

D_t : Constante dielétrica

Z_p : Voltagem em unidades eletrostáticas.

$$Z_p = 113000 \cdot \frac{v_t}{D_t} \cdot E_m \quad (12)$$

Nesta determinação se verificou a carga superficial do microrganismo e a influência de cada metal na carga superficial deste depois do processo sortivo.

A cultura de *R. opacus*, foi centrifugado por um período de 15 minutos lavado sucessivamente com uma solução ao 1% de NaCl e suspenso em água. Após, preparou-se soluções com um volume de 100 ml, com uma concentração do microrganismo de 2×10^{-3} gr/L. Ajustou-se o pH numa faixa de 1,5 a 9 , empregando HCl 0,1 N e 1N e NaOH 0,1N e 1N. Posteriormente, foram realizados ensaios para avaliar a influência da interação entre as células de *R. opacus* e as diferentes soluções metálicas.

4.5.4. Cádmio e zinco

As amostras preparadas com sais de cádmio e zinco para trabalhar nesta pesquisa foram dosadas através do método de espectrofotometria de absorção atômica em um equipamento Perkin Elmer.

4.5.5. Captação

A captação foi calculada segundo a equação (6)

$$q = \frac{V \cdot (C_i - C_{eq})}{M}$$

Onde:

- q: Captação do metal (mg metal/g bioissorvente).
- C_i : Concentração inicial de metal (mg/L).
- C_{eq} : Concentração final de metal (ou de equilíbrio mg/L).
- V: Volume da solução do metal (L).
- M: Massa do bioissorvente (g).