

Capítulo 3- Materiais e Métodos

3.1- Introdução

No capítulo que se segue será feita a descrição da metodologia adoptada para a realização das experiências laboratoriais, bem como a descrição dos métodos analíticos e respectivos instrumentos utilizados.

Para este trabalho foram seleccionadas quatro bactérias e foi testada a respectiva capacidade de bioadsorção, quando suportadas em carvão activado granular, tanto em sistema fechado (isotérmicas de adsorção/bioadsorção) como em sistema aberto (curvas de breakthrough). A quantificação de polissacáridos e polímeros totais foi também efectuada para todas as bactérias. A adequada formação de biofilme foi verificada por microscopia electrónica (SEM) e a presença de inúmeros grupos funcionais foi também constatada por FTIR, antes e após contacto das bactérias com cromo. Este procedimento visa a escolha da bactéria que melhor se adapte a um sistema de bioadsorção para remoção de cromo a nível industrial, onde as exigências em termos de tempo de operação e quantidade de efluente a tratar são bastante grandes.

A rentabilidade de um processo de bioadsorção está fortemente condicionada pela possibilidade de reutilização do mesmo bioadsorvente e nas mesmas condições de funcionamento, para o tratamento de grandes quantidades de efluente. A substituição frequente do bioadsorvente poderá levar a que, por vezes, se abandone a possibilidade de escolha dum tratamento biológico.

O esquema seguinte pretende ilustrar a sequência de ensaios realizados e procedimentos adoptados com as quatro diferentes bactérias (Figura 3.1.1).

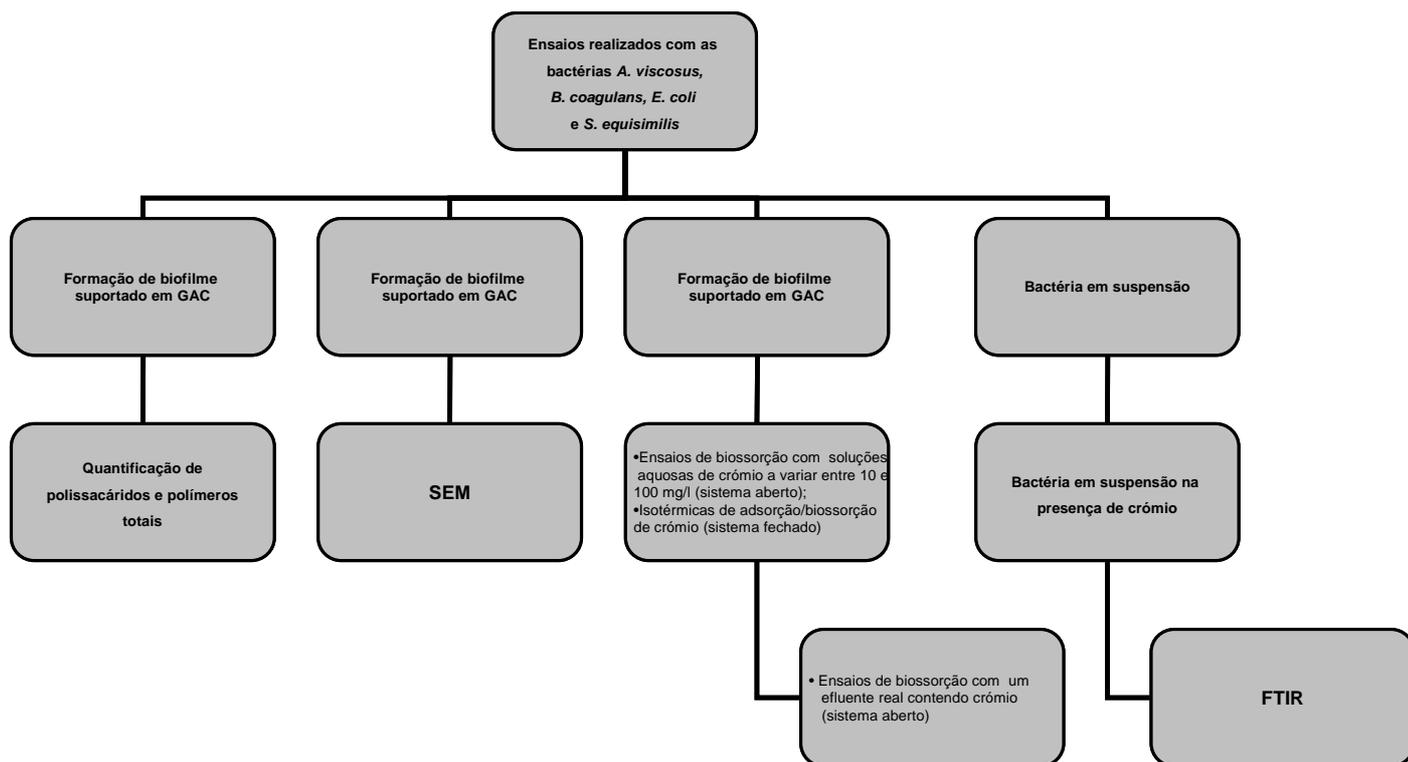


Figura 3.1.1- Sequência de ensaios realizados e procedimentos executados com as quatro diferentes bactérias utilizadas.

Depois de seleccionada a bactéria *Arthrobacter viscosus* para os estudos a efectuar com o reactor piloto, surgiu a necessidade de avaliar o comportamento desta bactéria na presença de compostos normalmente associados a efluentes contendo crómio. Tendo o cumprimento deste objectivo em mente, foram efectuados estudos que visavam a análise da capacidade de bioadsorção dum biofilme de *Arthrobacter viscosus* suportado em carvão activado granular para a remoção de compostos orgânicos (sistema aberto e sistema fechado). A influência que a presença destes tem na remoção de crómio e vice-versa foi também alvo de estudo (sistema aberto). Finalmente foram efectuados os ensaios no reactor piloto, utilizando para tal soluções com concentrações iniciais de crómio de 10 mg/l e 100 mg/l. Após a realização dos ensaios foi também efectuada uma análise de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDXS) para avaliar a presença de crómio na superfície do carvão.

A sequência de ensaios realizados e procedimentos adoptados apenas para a bactéria *Arthrobacter viscosus* encontram-se esquematizados na Figura 3.1.2.

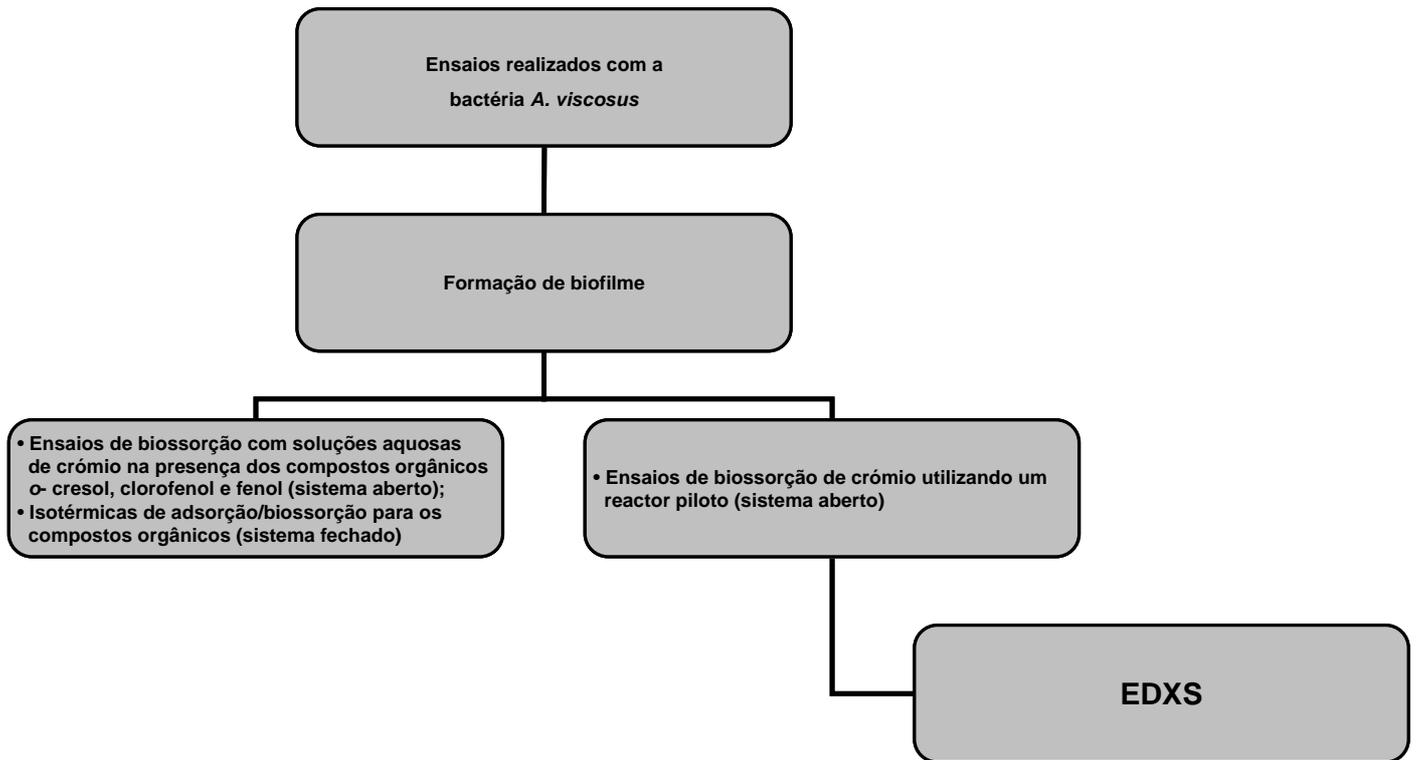


Figura 3.1.2- Sequência de ensaios realizados e procedimentos executados apenas com a bactéria *Arthrobacter viscosus*.

3.2- Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas culturas de bactérias das espécies *Arthrobacter viscosus* (CECT 908), *Bacillus coagulans* (CECT 12), *Streptococcus equisimilis* (CECT 926) e *Escherichia coli* (CECT 515), todas provenientes da Coleção Espanhola de Culturas Tipo da Universidade de Valência (CECT).

3.2.1- Armazenamento dos microrganismos

As espécies provenientes da CECT estavam na forma liofilizada. A reabilitação das espécies foi feita mediante protocolo fornecido pela CECT e consistiu em semear o microrganismo no meio de crescimento apropriado (ver ponto 3.2.2) e incubar à

temperatura ideal de crescimento durante o tempo indicado pelo fornecedor (www.cect.org). Após esse tempo, a cultura foi criopreservada. Para tal, foi misturado meio de cultura com glicerol (solução de glicerol a 98% da Fluka) de modo a obter uma concentração final de glicerol de 15% (v/v) (Kirsop and Snell, 1989), em eppendorfs contendo missangas (material que foi previamente esterilizado a 121 °C durante 20 minutos). Posteriormente, foram utilizadas as missangas para inocular placas de Petri, e após crescimento, as estirpes foram conservadas em tubos inclinados contendo meio de cultivo com 15 g/l de agar, a uma temperatura entre 4 a 7°C.

3.2.2- Meios de cultura

A preparação dos meios de cultura foi efectuada em recipientes apropriados utilizando para o efeito água destilada. O pH dos meios de cultura foi medido e ajustado (pH ORION model 720A) de acordo com as indicações da CECT com uma solução de NaOH 10M (Labsolve). De seguida, procedeu-se à autoclavagem dos mesmos durante 20 minutos à temperatura de 121°C.

A composição dos meios de cultura, temperatura e pH óptimos de crescimento utilizados para as quatro bactérias diferentes encontram-se descritos na Tabela 3.2.2.1.

Tabela 3.2.2.1- Composição dos meios de cultura, temperatura e pH óptimos de crescimento para as diferentes bactérias utilizadas

Microrganismo	Meios de cultura	Temperatura	pH
<i>Arthrobacter viscosus</i> (meio rico)	Extracto de Malte (Fluka)	3g/l	26 °C
	Extracto de Levedura (Fluka)	3g/l	
	Peptona (Riedel)	5g/l	
	Glucose (Riedel)	10g/l	
<i>Arthrobacter viscosus</i> (meio diluído)	Extracto de Malte (Fluka)	1g/l	7.0
	Extracto de Levedura (Fluka)	1g/l	
	Peptona (Riedel)	0.167g/l	
	Glucose (Riedel)	3.3g/l	
<i>Bacillus coagulans</i>	Extracto de Carne (Himedia)	5g/l	37 °C
	Peptona (Riedel)	10g/l	
	NaCl (Prolabo)	5g/l	
	MnSO ₄ .H ₂ O (Panreac)	10mg/l	
<i>Escherichia coli</i>	Extracto de Carne (Himedia)	5g/l	37 °C
	Peptona (Riedel)	10g/l	
	NaCl (Prolabo)	5g/l	
<i>Streptococcus equisimillis</i>	Brain Heart Infusion CM0225 (Oxoid)	37g/l	37 °C
			7.4

3.3- Preparação do carvão activado granular

O carvão activado granular (GAC) utilizado nos diferentes ensaios foi colocado num matraz ao qual foi adicionada água destilada. Procedeu-se à autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos, com o objectivo de fazer a libertação de ar dos poros do GAC, de forma a minimizar as limitações difusionais internas à transferência de massa.

O GAC (Merck) utilizado foi caracterizado no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, por adsorção de N₂ (77K) com um ASAP Micromeritics 2001 e os valores obtidos são apresentados na tabela 3.3.1.

Tabela 3.3.1- Características do GAC determinadas por adsorção de N₂

Características do GAC	
Diâmetro médio da partícula	2.5 mm
Massa específica	2.34 g/cm ³
Área específica de Langmuir	1270 m ² /g
Diâmetro médio dos poros	20 Å

3.4- Ensaio de bioadsorção

3.4.1- Formação do biofilme

O crescimento do biofilme foi efectuado em colunas de vidro, colunas estas que foram posteriormente utilizadas nos ensaios de bioadsorção em sistema aberto. Estas colunas tinham as características constantes da tabela 3.4.1.1.

Tabela 3.4.1.1- Características das colunas usadas para crescimento do biofilme e ensaios de bioadsorção

Características das Colunas	
Diâmetro interno	2.0 cm
Altura	30 cm
Fracção de enchimento	1/2
Camisa de Isotermicidade	26°C/37°C

Depois de introduzir o GAC (14 g) nas colunas, devidamente preparado segundo o procedimento descrito no ponto 3.3, ajustou-se a camisa de isotermicidade à temperatura óptima de crescimento para o microrganismo em causa.

No caso da estirpe *Arthrobacter viscosus*, foram preparados 500 ml de meio de crescimento (meio rico) num matraz, tendo sido feita a esterilização e posterior inoculação com a bactéria. Esta cultura foi bombeada através das colunas, em circuito fechado, durante um dia, com o objectivo de formar um biofilme suportado em GAC. Posteriormente, e durante dois dias, foi bombeado meio diluído, com a finalidade de alimentar o microrganismo (Quintelas e Tavares, 2002; Quintelas e Tavares 2001). Estudos desenvolvidos por Torres (1996) com o microrganismo *A. viscosus*, permitiram concluir que a utilização de um meio óptimo de crescimento seguido da utilização de um meio mais pobre a nível nutricional, conduzia a uma maior produção de exopolissacáridos e polímeros totais, fundamentais para um bom desempenho em termos de bioadsorção. O fluxo teve sentido ascendente de modo a que a formação do biofilme não interferisse na independência e destacamento das partículas de carvão. O leito permaneceu compactado durante toda a fase de crescimento do biofilme. A passagem dos meios foi efectuada com recirculação total, sendo o caudal de 25 ml/min. O elevado caudal usado permitiu a formação de um biofilme compacto e consequentemente resistente à erosão provocada pelas forças hidrodinâmicas (Vieira e Melo, 1995).

No caso de cada uma das bactérias *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli* e *Streptococcus equisimillis*, foram preparados 500 ml de meio de cultura num matraz, tendo sido feita a esterilização e posterior inoculação com a bactéria. Esta cultura foi bombeada através das colunas, em fluxo ascendente e em circuito fechado durante três dias, tendo-se substituído diariamente o meio de 500 ml por outro igual de modo a garantir a presença dos nutrientes necessários ao bom desenvolvimento do biofilme. Ao fim do primeiro dia de passagem da solução inoculada, uma parte significativa das bactérias encontrava-se já aderida ao carvão activado, necessitando apenas de crescer e multiplicar-se. No entanto, as bactérias que entretanto se destacaram ou aquelas que se encontravam na solução que preenchia o reactor, retornaram à nova solução, funcionando assim como um novo inóculo. O caudal foi de 25 ml/min.

Para promover o fluxo, utilizaram-se bombas peristálticas do tipo Reglo-Ismatec, de seis rolamentos para os ensaios em micro-colunas e bombas peristálticas Masterflex (modelo 7019-05) para ensaios com o reactor piloto.

3.4.2- Sistema fechado

A formação de biofilme foi efectuada de acordo com a secção anterior (ver 3.4.1). Os ensaios em sistema fechado tinham como objectivo a determinação de isotérmicas de adsorção. As experiências foram realizadas em erlenmeyers de 250 ml contendo 150 ml de solução de crómio e 1.5 g de GAC revestido com biofilme. As concentrações iniciais de crómio variaram entre 5 mg/l e 1000 mg/l. Os erlenmeyers foram colocados numa incubadora à temperatura óptima de crescimento de cada microrganismo e a uma agitação de 150 rpm (Incubadora orbital Certomat/S da B. Braun Biotech Internacional). Estudos prévios determinaram o tempo necessário para se atingir os diferentes equilíbrios. Após se atingir o equilíbrio foram tiradas amostras que foram centrifugadas (Centrífuga angular Nohita model 2690) a 5000 rpm durante 30 min e cujo sobrenadante foi analisado por espectrofotometria de absorção atómica, no caso do crómio, ou pelo método da 4 amino-antipirina (Clesceri *et al.*, 1989), no caso dos compostos orgânicos.



Figura 3.4.2.1- Bateria de erlenmeyers para determinação de equilíbrios de biossorção.

3.4.3- Sistema aberto

3.4.3.1- Ensaio com a bactéria *Arthrobacter viscosus*

3.4.3.1.1- Ensaio em minicolunas

Após a formação do biofilme (de acordo com o descrito no ponto 3.4.1) promoveu-se o fluxo de solução metálica e/ou solução orgânica através das colunas, no sentido ascendente, retirando-se amostras à saída do sistema, ao longo do tempo. As amostras recolhidas foram posteriormente analisadas. O caudal de solução foi de 5 ml/min.

As soluções a tratar consistiam em soluções aquosas de dicromato de potássio ($H_2Cr_2O_7$, Riedel), com concentrações de Cr (VI) entre 10 e 100 mg/l e um efluente real com uma concentração de Cr (VI) de 4.2 mg/l. Este efluente provinha duma estação de tratamento de águas residuais da zona de Felgueiras, zona de grande concentração de indústrias ligadas aos curtumes e por isso com teores elevados de crómio e alguns compostos orgânicos associados.

Como na maioria das vezes a presença de crómio se encontra associada à presença de outros compostos, nomeadamente compostos orgânicos, foram também realizados ensaios com soluções aquosas de dicromato de potássio na presença de compostos orgânicos, no caso, o-cresol (extra-puro da Riedel), clorofenol (para síntese da Merck) e fenol (pró-análise da Merck).

As amostras obtidas à saída das minicolunas foram centrifugadas a uma velocidade de 5000 rpm durante 30 minutos, numa centrífuga angular com capacidade para oito tubos de 15 ml, da Nohita, com o objectivo de remover a biomassa em suspensão eventualmente arrastada para fora do leito. O sobrenadante foi acidificado até pH inferior a 2, utilizando para o efeito ácido nítrico (HNO_3) a 69-71% (Riedel), com o objectivo de conservar as amostras até posterior análise. O valor de pH foi avaliado usando um medidor de pH da marca Orion (Modelo 720 A).

A figura seguinte apresenta a instalação usada nos ensaios de bioadsorção em sistema aberto.



Figura 3.4.3.1.1.1- Instalação laboratorial para a realização de ensaios de bioissorção, sistema aberto.

Foi efectuado o doseamento do Cr total contido nas amostras recolhidas, por espectrofotometria de absorção atómica (VARIAN SPECTRA AA 400- GTA 96 PLUS) e o doseamento de compostos orgânicos pelo método da 4-aminoantipirina (Jasco V-560 Espectrophotometer UV/Vis) (Clesceri *et al.*, 1989).

3.4.3.1.2- Ensaios em reactor piloto

Os reactores piloto utilizados nos ensaios de bioissorção tinham as características constantes da Tabela 3.4.3.1.2.

Tabela 3.4.3.1.2- Características dos reactores piloto

Características dos Reactores Piloto	
Diâmetro interno	14.2 cm
Altura	100 cm
Fracção de enchimento	1/3
Camisa de Isotermicidade	26°C

A formação do biofilme foi feito de modo análogo ao descrito no ponto 3.4.1, apenas tendo sido adaptado às dimensões do novo reactor. Colocaram-se 2 kg de GAC no reactor e foram preparados 18 litros de um meio rico, esterilizado a 121°C durante 30 min, que foi inoculado com a bactéria e posto a passar pelo reactor, durante 24 h com um caudal de 250 ml/min e em recirculação total. Para os dois dias seguintes foram preparados 45 litros de meio diluído, para alimentar o biofilme, igualmente com caudal de 250 ml/min, a recirculação total. Após a formação do biofilme promoveu-se o fluxo das soluções metálicas através das colunas, no sentido ascendente, retirando-se amostras à saída do sistema, ao longo do tempo. As soluções a tratar consistiam em soluções aquosas de dicromato de potássio ($H_2Cr_2O_7$, Riedel), com concentrações de Cr (VI) de 10 e 100 mg/l. As amostras recolhidas foram posteriormente analisadas. O caudal de solução foi de 25 ml/min. O valor de pH ao longo do tempo foi também monitorizado (Jenway 350 pH Meter).

As amostras retiradas foram centrifugadas a uma velocidade de 5000 rpm durante 30 minutos, com o objectivo de remover a biomassa em suspensão eventualmente arrastada para fora do leito. O sobrenadante foi acidificado até pH inferior a 2, utilizando para o efeito ácido nítrico (HNO_3) a 69-71% (Riedel), com o objectivo de conservar as amostras até posterior análise. O valor de pH foi avaliado usando um medidor de pH da marca Orion (Modelo 720 A).

A figura seguinte apresenta a instalação usada nos ensaios de bioissorção com o reactor piloto.



Figura 3.4.3.1.2- Instalação piloto para a realização de ensaios de biossorção.

3.4.3.2- Ensaio com a bactéria *Bacillus coagulans*

Os ensaios realizados com esta bactéria, em minicolunas, seguiram o procedimento descrito no ponto 3.4.3.1.1 para as soluções aquosas de dicromato de potássio e para o efluente real.

3.4.3.3- Ensaio com a bactéria *Escherichia coli*

Os ensaios realizados com esta bactéria, em minicolunas, seguiram o procedimento descrito no ponto 3.4.3.1.1 para as soluções aquosas de dicromato de potássio e para o efluente real.

3.4.3.4- Ensaio com a bactéria *Streptococcus equisimilis*

Os ensaios realizados com esta bactéria, em minicolunas, seguiram o procedimento descrito no ponto 3.4.3.1.1 para as soluções aquosas de dicromato de potássio e para o efluente real.

3.5- Métodos analíticos

3.5.1- Determinação da concentração dos metais pesados por Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA)

A técnica utilizada neste processo foi a espectrofotometria de emissão de chama, a qual promove transições electrónicas entre as orbitais atómicas, com simultânea absorção de luz.

Esta técnica apresenta um vasto campo de aplicação, elevada sensibilidade e boa selectividade, proporcionando também uma elevada rapidez na obtenção de resultados.

Neste processo, as amostras são vaporizadas devido à acção de um nebulizador, misturadas com o combustível e gases oxidantes e recebem a incidência de uma radiação luminosa. Esta mistura passa por um queimador e é então decomposta em átomos sendo a concentração da amostra assim determinada por medição da extensão da luz absorvida.



Figura 3.5.1.1- Espectrofotómetro de Absorção Atómica, VARIAN SPECTRA AA 400-GTA 96 PLUS.

3.5.1.1- Modo de operação

Prepararam-se padrões dos vários metais, dentro da gama de trabalho, a partir de soluções standard do respectivo metal. Os padrões foram acidificados com 1.5 ml/litro de HNO₃ e conservados no frigorífico.

O modo de operação do aparelho encontra-se descrito no manual do mesmo.

Tabela 3.5.1.1- Condições de operação fixas e variáveis para o doseamento do metal crómio

Crómio		
Condições Fixas		
Corrente da lâmpada	5 mA	
Combustível	Acetileno	
Suporte	Ar	
Estequiometria da chama	Redutora	
Condições variáveis		
Comprimento de onda (nm)	Largura da fenda (nm)	Gama de trabalho óptima (mg/l)
357.9	0.2	0.06 – 15
425.4	0.2	0.4 – 40
428.9	0.5	1 – 100
520.8	0.2	20 – 2600

3.5.2- Quantificação de compostos orgânicos

A quantificação dos compostos orgânicos utilizados neste trabalho foi efectuada pelo método da 4- aminoantipirina (Clesceri *et al.*, 1989). Este método é baseado na reacção dos compostos fenólicos com K₃Fe(CN)₆ (ferrocianeto alcalino) (Sigma) e 4- aminoantipirina (Sigma) de modo a formar um complexo vermelho cuja absorvância é medida a 500 nm (Jasco V- 560 Espectrophotometer UV/Vis). Este método consiste na adição, a 2 ml de amostra, de 100 µl de solução de amoníaco a 1.5 % (solução a 25%

da Panreac), 50 µl de solução de 4-aminoantipirina a 2% e 50 µl de solução de ferrocianeto alcalino a 8%. Após alguns segundos, forma-se o complexo vermelho cuja absorvância é medida a 500 nm.

3.5.3- Quantificação de polissacáridos e polímeros totais

O método aplicado para a quantificação de polissacáridos e polímeros totais é composto por três fases (Oliveira *et al.*, 1996):

- 1º Solubilização dos exopolímeros por uma solução de glutaraldeído;
- 2º Diálise da solução resultante da 1ª fase, com o objectivo de remover o glutaraldeído, sais e pequenas moléculas;
- 3º Quantificação, por pesagem, dos polímeros totais precipitados com nitron e dos polissacáridos, pelo método de Dubois.

3.5.3.1- Solubilização dos exopolímeros

O carvão com biofilme aderido foi colocado num matraz de 100 ml com 30 ml de glutaraldeído (solução de glutaraldeído a 25% da Fluka). Durante 2 dias foi colocado numa incubadora orbital (Certomat/S da B. Braun Biotech Internacional), à temperatura ambiente e agitação suave (80 rpm). Após este período de tempo, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 5000 rpm durante 30 min, para remover a matéria em suspensão e o sobrenadante foi recolhido para posterior diálise.

3.5.3.2- Diálise

Foram cortadas fracções de 15 cm de membrana de diálise (diâmetro interno 27/32" - 21.5 mm: 30 M (Aprox.); MWCO: 12 - 14000 Daltons) e colocadas em água destilada até amolecerem. Com a ajuda duma pipeta foi introduzida nas membranas uma quantidade conhecida do sobrenadante proveniente do ponto anterior. As membranas foram fechadas e colocadas numa tina com água destilada e com ligeira agitação. Mudou-se a água regularmente. Ao fim de 2 ou 3 dias as membranas foram abertas e o volume retido nas membranas, após o processo de diálise, foi medido.

3.5.3.3- Doseamento de polissacáridos

A 1 ml de amostra proveniente da diálise, foi adicionado 1 ml de fenol (Riedel) a 5% e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (Riedel), com o objectivo de desenvolver um complexo colorido. Deixou-se arrefecer e leu-se a absorvância a 490 nm, utilizando como branco água destilada (Jasco V- 560 Espectrophotometer UV/Vis). O método utilizado é um método colorimétrico que relaciona a intensidade da cor com a concentração do composto que se pretende dosear.

A glucose e outros açúcares, como por exemplo galactose e manose, apresentam uma grande semelhança química com os monómeros que compõem os polissacáridos. Deste modo, a utilização de glucose como padrão no doseamento destas macromoléculas permite estimar a sua quantidade nas amostras.

Prepararam-se soluções padrão de glucose de concentração conhecida e aplicou-se o procedimento descrito para as amostras a 1 ml de cada uma destas soluções padrão, com o objectivo de construir a curva de calibração.

3.5.3.4- Doseamento dos polímeros totais

Num eppendorf devidamente pesado, foi colocado 1 ml de amostra proveniente da diálise, 100 µl de ácido sulfúrico concentrado (Riedel) e 100 µl de solução de nitron (Merck) a 10% em ácido acético (Riedel). A amostra foi deixada em repouso durante 12 horas. Após este período a amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 15000 rpm e rejeitou-se o sobrenadante (Centrífuga angular com capacidade para 12 eppendorfs de 1,5 - 2 ml da Eppendorf). Os eppendorfs foram colocados abertos numa estufa a 40°C durante 2 dias e posteriormente pesados.

3.5.4- Espectroscopia no Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia no Infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR- Fourier Transform Infrared Spectroscopy) permite fazer a análise qualitativa e quantitativa de uma substância orgânica ou mineral, a partir dos grupos funcionais presentes na molécula em análise. É baseada na medição da energia absorvida na vibração de cada uma das ligações químicas presentes no material. Cada amostra sólida foi triturada com um almofariz de forma a obter um pó fino e homogéneo. Ao pó foi

misturado KBr (Riedel), 20 mg de amostra para 200 mg de KBr, e procedeu-se à maceração desta mistura com ajuda de um almofariz e pilão, até completa homogeneização. A mistura obtida foi introduzida no pastilhador e posteriormente prensada sob a forma de pastilha. A pastilha de KBr foi colocada no respectivo suporte e o conjunto inserido na câmara do espectrofotómetro. O espectro de infravermelhos foi obtido para comprimentos de onda na gama de 500 a 4000 cm^{-1} (FTIR BOMEM MB 104). Este procedimento foi efectuado para as bactérias no estado puro e após exposição de 24h a uma solução de Cr (VI).

3.5.5- Microscopia electrónica (SEM) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDXS)

As amostras de carvão revestido com biofilme foram analisadas por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) de modo a confirmar a presença do mesmo (Leica Cambridge S360). As amostras foram previamente desidratadas em solução de etanol de concentração crescente durante 15 minutos (10%, 25%, 50%, 90% e 98%) e secas num exsiccador durante alguns dias. Antes da observação ao microscópio as amostras foram revestidas a ouro, afim de se aumentar a sua condutividade. Amostras retiradas do reactor piloto foram analisadas num espectroscópio de emissão de raios X (Link EXL II), acoplado ao microscópio electrónico. A emissão de raios X foi feita a diferentes valores de energia, a saber 10 keV, 15 keV e 20 keV, podendo-se assim, determinar a concentração metálica a diferentes profundidades da amostra sólida.

3.6- Tratamento das soluções finais de crómio

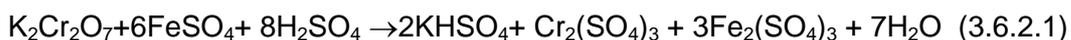
Após os ensaios de biossorção, as soluções de crómio foram tratadas pelo método físico-químico de precipitação, de forma a remover o Cr e assim evitar contaminações das águas residuais do laboratório. O método segue os seguintes passos:

3.6.1- Ajuste do pH

Esta operação tem como finalidade a optimização da redução do crómio hexavalente (Cr^{6+}) a crómio trivalente (Cr^{3+}). Foi usado ácido sulfúrico concentrado (Riedel) para baixar o pH a 2 ou 3.

3.6.2- Redução

Foi utilizado sulfato de ferro (Panreac) como redutor do crômio. São necessárias 16 partes deste agente redutor, por cada parte de Cr^{6+} , na presença de 7.6 partes de ácido.



3.7.3- Precipitação

A precipitação deve ser feita a um pH entre 8 e 9 pelo que se utilizou $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Riedel), em agitação adequada:



O sobrenadante, livre de Cr, foi lançado ao esgoto, após verificação do pH; o precipitado foi seco e tratado como resíduo sólido perigoso.

3.7- Referências bibliográficas

- Clesceri LS, Greenberg AE, Trussell RR.** 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th ed., Washington.
- Kirsop BE, Snell JJS.** 1984 Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods, Academic Press, London
- Oliveira R, Azeredo J.** 1996. A new method for precipitating bacterial exopolysaccharides. *Biotechnology and Technology* 5:341-344.
- Quintelas C, Tavares T.** 2002. Lead (II) and iron (II) removal from aqueous solution: Biosorption by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. *Journal of Resource and Environmental Biotechnology* 3: 196-202.

Quintelas C, Tavares T. 2001. Removal of chromium (VI) and cadmium (II) from aqueous solution by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. *Biotechnology Letters* 23:1349–53.

Torres C.1996. Selecção e manutenção de sistemas de biossorção de metais pesados. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.

Vieira MJ, Melo LF. 1995. Effect of clay particles on the behaviour of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*. *Water Science Technology* 32: 45-52.