



Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

# Estudos de Recuperação Biológica de Pt (IV) e Pd (II) de Meios Aquosos

Ana Maria Barreto de Matos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de: Professora Doutora Maria Clara  
Costa

E sob a coorientação de: Mestre Engenheira Ana Assunção

2014

# Estudos de Recuperação Biológica de Pt (IV) e Pd (II) de Meios Aquosos

Ana Maria Barreto de Matos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Agradece-se o apoio financeiro à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do projeto intitulado “Separação por extração Líquido-líquido de Metais Raros e Preciosos a Partir de Matrizes Cloretadas Complexas. Potencial Aplicação em Processos de Reciclagem e Preservação Ambiental”, com a referência: PTDC/QUI-QUI/109970/2009.

# Estudos de Recuperação Biológica de Pt (IV) e Pd (II) de Meios Aquosos

“Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

---

(Ana Maria Barreto de Matos)

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores.  
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas.  
Se não houver folhas, valeu a intensão da semente.”

Henfil

## Agradecimentos

---

Em primeiro lugar à Professora Doutora Maria Clara Costa pela oportunidade que me deu de realizar este trabalho, por todo o apoio prestado e por toda a atenção e disponibilidade.

À Mestre Engenheira Ana Assunção pelo apoio incondicional, tempo despendido, ensinamentos, paciência, conselhos, conhecimentos partilhados, amizade, companheirismo e ao bom tempo passado.

Aos professores João Lourenço e José Moreira que foram essenciais para o trabalho desenvolvido, pelo tempo dispensado e pelo apoio prestado.

Ao laboratório Hercules da Universidade de Évora destacando os professores António Candeias e José Mirão na disponibilidade que prestaram na análise das amostras através do SEM-EDS, por todo o tempo despendido e por toda a ajuda.

Ao Ruben Almeida pelo apoio prestado sempre que necessitei, conhecimentos partilhados que sempre ajudaram.

À Bernardete Vieira por atravessar este percurso ao meu lado, no mesmo laboratório, com ela esta caminhada tornou-se mais fácil.

Às minhas amigas Jaqueline, Carina, Ana e Caramelo que tiveram sempre disponíveis quando precisei, pelos seus conselhos, por nunca deixarem de estar presentes.

Ao Ruben Lagoa por todo o apoio, paciência e amor, por me ouvir, por estar sempre comigo, por acreditar em mim, por lutar a meu lado todos os dias, por ser o que mais acreditou, por ser o meu passado, presente e futuro.

Aos meus pais e avó por todo o esforço que fizeram, toda a paciência que demonstraram e por terem acreditado, sem eles nada disto era possível.

À minha sobrinha por me dar força através do seu sorriso.

## Resumo

---

Os metais do grupo de platina (PGM) fazem parte dos metais mais escassos da superfície terrestre, contudo, devido às suas capacidades catalíticas a sua procura tem sido bastante efusiva o que leva ao aumento do preço destes metais. Desta forma a pesquisa de métodos que consigam recuperar os PGM tem vindo a crescer nos últimos anos.

O uso de bactérias, nomeadamente de bactérias sulfato-redutoras (SRB) na remoção ou recuperação de PGM tem sido reportado na literatura como uma alternativa com vista à recuperação destes metais de resíduos industriais. Contudo, as bactérias não se mostram resistentes a concentrações elevadas de metal, o que poderá ser uma limitação. Assim, neste trabalho pretendeu-se verificar se os produtos metabólicos (PM) produzidos pelas bactérias, por si só, têm capacidade de remover ou recuperar estes metais, ultrapassando-se assim o problema da toxicidade dos metais sobre as bactérias.

Este trabalho utilizou dois consórcios bacterianos provenientes de lamas de duas estações de tratamento de águas residuais (ETAR) (Quinta do Lago e Silves). Estes dois consórcios foram sujeitos a uma seleção bacteriana ao serem enriquecidos num meio nutriente com sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), privilegiando o crescimento de SRB, e sem  $\text{SO}_4^{2-}$ , favorecendo o crescimento de outras bactérias que não as SRB.

Outra das técnicas que tem vindo a ser utilizada na recuperação de PGM envolve um processo químico, a extração líquido-líquido. Neste trabalho conjugaram-se ambas as técnicas de remoção de PGM (química e biológica), testando-se a capacidade que os PM apresentam na remoção de PGM presentes em soluções aquosas provenientes de ensaios de extração líquido-líquido.

Este trabalho permitiu concluir que os PM provenientes de consórcios de SRB apresentam resultados mais favoráveis, sobretudo na remoção de paládio (Pd(II)) (quase 100%). A remoção de platina (Pt(IV)) e ródio (Rh(III)) não foi tão favorável, removendo-se cerca de 10% e 30% de cada metal, respetivamente.

**Palavras-chave:** bactérias sulfato-redutoras; consórcios bacterianos; metais do grupo da platina; biorremediação; produtos metabólicos, extração líquido-líquido.

## Abstract

---

The platinum group metals (PGM) are part of the scarcest metals in the earth's surface. However, due to its catalytic capabilities the demand of it has been quite effusive, which leads to the increase in the price of these metals. Thus, the research of methods that can recover the PGM has been growing in recent years.

The use of bacteria, including sulfate-reducing bacteria (SRB) in the removal or recovery of PGM has been reported as an alternative for the recovery of these metals from industrial waste. However, generally, bacteria do not show resistance to high concentrations of metals, which becomes a limitation. Thus, this work aims to verify if the metabolic products (MP) produced by bacteria have the ability to remove or recover these metals, overcoming the problem of toxicity caused by metals in bacteria.

This study involved the use of two bacterial consortia collected from sludge from two wastewater treatment plants (WWTP) (Quinta do Lago and Silves). These two consortia were subjected to a bacterial selection, favoring the SRB enrichment in nutrient medium containing sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). The enrichment of other bacteria than SRB was performed in a similar nutrient medium but without  $\text{SO}_4^{2-}$ .

A chemical technique, named liquid-liquid extraction, was also used for the recovery of PGMs from aqueous media. In this work, the combination of both techniques of PGM removal (chemical and biological) was attempted. Therefore, the ability that MP presents in PGM removal from aqueous solutions was tested, using solutions derived from liquid-liquid extraction assay.

This work revealed that MP from the SRB consortia showed very good results, in the removal of Palladium (Pd(II)) – almost 100%. The removal of Platinum (Pt(IV)) and Rhodium (Rh(III)) was not as favorable, since only 10% and 30% of each metal were removed, respectively.

**Keywords:** sulfate-reducing bacteria; bacterial consortia; platinum group metals; bioremediation; metabolic products, liquid-liquid extraction.

# Índice

---

Agradecimentos .....	V
Resumo .....	VI
Abstract.....	VII
Índice de Figuras .....	X
Índice de Tabelas .....	XIV
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos .....	XVI
1. Objetivo.....	1
2. Introdução.....	3
Biotecnologia Ambiental .....	3
Biorremediação.....	3
Metais do Grupo da Platina .....	5
Ciclo do Enxofre.....	7
Redução Biológica de Sulfato .....	9
Bactérias Sulfato-Redutoras .....	11
Cultura de Bactérias Sulfato-Redutoras .....	15
Estação de Tratamento de Águas Residuais .....	16
Biorremediação/Biorrecuperação de Metais do Grupo da Platina usando Microrganismos .....	19
Escolha dos consórcios.....	20
Recuperação de Metais do Grupo da Platina através de Extração Líquido- -líquido .....	20
Estruturação do trabalho laboratorial e escolha dos PGM .....	22
3. Planificação do Trabalho.....	24
4. Materiais e Métodos .....	29
Reagentes e Equipamentos .....	29
Consórcios .....	29
Meios de Crescimento .....	30
Enriquecimento dos Consórcios .....	31
Inoculação dos Consórcios .....	32
Análise dos parâmetros de crescimento bacteriano .....	34
Recolha dos PM.....	35

Ensaio de adição dos PM a soluções aquosas contendo PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) .....	35
Análise dos parâmetros do contacto entre os PGM e os PM.....	37
Ensaio de adição dos PM a fases aquosas contendo Pt(IV) ou Pd(II) resultantes de ensaios de extração e re-extração líquido-líquido .....	40
Ensaio de re-extração líquido-líquido de fases orgânicas carregadas com Pt (IV) ou Pd(II) usando os PM como agentes de re-extração .....	43
5. Resultados e Discussão .....	44
Ensaio de adição dos PM a soluções aquosas contendo PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) .....	44
Ensaio de adição dos PM a fases aquosas contendo Pt(IV) ou Pd(II) resultantes de ensaios de extração e re-extração líquido-líquido .....	80
Ensaio de re-extração líquido-líquido de fases orgânicas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II) usando PM como agentes de re-extração.....	87
6. Conclusões .....	88
7. Trabalho Futuro.....	90
8. Bibliografia.....	91
9. Anexos.....	97
Anexo 1 – Árvore filogenética das SRB <i>Deltaproteobacteria</i> , com ênfase na família <i>Desulfobivibrionaceae</i> .....	97
Anexo 2 – Árvore filogenética das SRB <i>Deltaproteobacteria</i> , com ênfase na família <i>Desulfobacteriaceae</i> .....	98
Anexo 3 – Árvore filogenética das SRB formadoras de esporos Gram- -positivas ...	99
Anexo 4 – Árvore filogenética das bactérias termófilas.....	100
Anexo 5 – Lista de Reagentes e Equipamentos.....	101
Anexo 6 – Esquema dos ensaios de enriquecimento.....	103
Anexo 7 – Inoculações dos consórcios.....	104
Anexo 8 – Análise dos parâmetros de crescimento .....	105
Anexo 9 – Adição dos PM a soluções aquosas contendo o metal.....	105
Anexo 10 – Análises aos parâmetros do contacto entre os PGM e os PM.....	106
Anexo 11 – Esquema dos ensaios de re-extração líquido-líquido da FO para água do mar.....	107
Anexo 12 – Esquema dos ensaios de re-extração líquido-líquido da FO para PM ..	108

## Índice de Figuras

---

Figura 2.1 – Indústrias onde os três PGM mais utilizados são aplicados.....	7
Figura 2.2 – Ciclo do enxofre.....	8
Figura 2.3 - Ciclo biológico do enxofre. ....	9
Figura 2.4 – Duas formas de redução biológica de sulfato.. ....	10
Figura 2.5 - Árvore filogenética baseada em sequências de rRNA das SRB.....	12
Figura 2.6 – Imagem de algumas espécies de SRB.....	14
Figura 2.7 – Interações das SRB. ....	15
Figura 2.8 – Mapa do sistema multimunicipal de saneamento do Algarve.....	18
Figura 2.9 – Processo de extração líquido-líquido. ....	22
Figura 3.1 – Esquema geral dos ensaios de adição dos Produtos Metabólicos. ....	25
Figura 3.2 – Esquema dos ensaios de extração líquido-líquido para identificação das fases orgânicas e aquosas utilizadas nos estudos biológicos.....	26
Figura 3.3 - Esquema geral dos ensaios de adição dos Produtos Metabólicos a fases aquosas resultantes da re-extração ou extração com Pt(IV) ou Pd(II). ....	27
Figura 3.4 – Esquema geral dos ensaios de re-extração líquido-líquido de fases orgânicas carregadas com Pt (IV) ou Pd(II). ....	27
Figura 3.5 – Esquema resumo de todos os estudos efetuados neste trabalho.....	28
Figura 4.1 – Recolha das lamas sólidas numa ETAR. ....	29
Figura 4.2 – Meio Postgate C modificado depois de esterilizado por calor húmido.....	31
Figura 4.3 - Enriquecimentos dos diferentes consórcios. ....	32
Figura 4.4 – Inóculos dos diferentes consórcios.....	33
Figura 4.5 – Filtração do sobrenadante para obtenção dos PM.....	35
Figura 4.6 – Recolha da amostra para análise dos parâmetros após contacto entre os PGM e os PM. ....	38
Figura 4.7 – A) Espectrofotómetro de Absorção Atómica. B) Análise de amostras no AAS de chama. ....	38
Figura 4.8 – Equipamento de Difração de raios-X (X’Pert Pro, PANalytical). ....	39
Figura 4.9 – SEM-EDS (Hitachi 3700N; Bruker Xflash 5010).. ....	40
Figura 4.10 – Ensaio de extração líquido-líquido usando como agente de <i>stripping</i> a água do mar e as FO provenientes de outros ensaios de extração líquido-líquido.....	42

Figura 5.1 – Perfil de pH ao longo dos 28 dias de crescimento dos consórcios de QL e Sil em meio com e sem sulfato.....	45
Figura 5.2 – Perfil do eh ao longo dos 28 dias de crescimento dos consórcios de QL e Sil em meio sem e com $\text{SO}_4^{2-}$ .....	45
Figura 5.3 – Perfil de redução de $\text{SO}_4^{2-}$ ao longo do tempo de crescimento (28 dias) das bactérias de ambos os consórcios em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ .....	46
Figura 5.4 - Perfil de pH obtido nos ensaios dos PM de QL e de Sil crescidos em meio sem e com $\text{SO}_4^{2-}$ .....	48
Figura 5.5 - Perfil de eh de ambos os PM de ambos os meios quando adicionados aos PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III))......	49
Figura 5.6 - Perfil de concentração de sulfato ao longo do tempo de contacto dos metais com os PM.....	50
Figura 5.7 – Perfil de remoção de metal (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) com os PM de QL e de Sil crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ .....	52
Figura 5.8 – Imagem dos precipitados obtidos no <i>batch</i> com os PM de Sil crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ em contacto com uma solução padrão contendo Pd(II)......	53
Figura 5.9 – XRD correspondente ao precipitado obtido através da remoção de Pd(II) por parte dos PM obtidos através do consórcio de Sil crescido em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ .....	54
Figura 5.10 – Precipitados recolhidos do ensaio que juntou: os PM de QL e de Sil crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ com Pd(II) de uma solução padrão analisados por SEM-EDS. ....	55
Figura 5.11 – Mapa dos precipitados obtidos através do ensaio que juntou os PM de QL e de Sil crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ com Pd(II) de uma solução padrão por SEM-EDS. ....	56
Figura 5.12 – Espetros EDS correspondentes aos precipitados obtidos através dos PM de QL e de Sil crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ ambos colocados em contacto com uma solução padrão de Pd(II).....	57
Figura 5.13 - Perfil de pH dos inóculos QL e Sil ao longo dos 21 dias de crescimento. crescidos em meio sem e com sulfato. ....	59
Figura 5.14 - Perfil de eh ao longo dos dias de crescimento dos inóculos de QL e de Sil .....	60
Figura 5.15 – Perfil de redução de sulfato nos consórcios de QL e de Sil e no controlo abiótico. ....	61

Figura 5.16 – Perfil de crescimento bacteriano por parte dos consórcios de QL e de Sil. em meio sem e com $\text{SO}_4^{2-}$ .....	61
Figura 5.17 – Perfis de concentração de sulfato dos <i>batches</i> em estudo. Cada gráfico apresenta os PM recolhidos num determinado momento de crescimento:.....	63
Figura 5.18 – Perfil de remoção (%) dos diferentes metais em estudo (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) de acordo com os PM de QL e de Sil recolhidos no 3º dia de incubação.....	65
Figura 5.19 - Perfil de remoção (%) dos diferentes metais em estudo (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) utilizando os PM recolhidos ao 7º dia de crescimento.....	68
Figura 5.20 – Representação da estabilidade dos precipitados de Pt(IV) formados. ....	70
Figura 5.21 - Perfil de remoção (%) dos diferentes metais em estudo (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) conseguida com os PM recolhidos no 14º dia de incubação. ....	71
Figura 5.22 - Perfil de remoção (%) dos diferentes metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) com os PM de QL e de Sil recolhidos no 21º dia de crescimento. ....	74
Figura 5.23 – Perfil de remoção de Pd(II) atingida pelos PM dos consórcios de QL e de Sil crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ . ....	77
Figura 5.24 - Difractograma de Raios-X correspondente ao precipitado obtido na remoção de Pd(II) pelos PM provenientes de ambos os consórcios crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ . ....	79
Figura 5.25 – Perfil de pH dos PM recolhidos do consórcio de QL e de Sil (B) aquando da sua adição à água do mar com Pt(IV) e Pd(II).....	82
Figura 5.26 – Perfil de concentração de $\text{SO}_4^{2-}$ na amostra aquando da adição dos PM à FA carregada.....	83
Figura 5.27 – Perfil de remoção (%) de Pt(IV) e Pd(II) utilizando os PM recolhidos dos inóculos de QL e de Sil. ....	83
Figura 5.28 – Perfil de concentração de sulfato ao longo dos 28 dias do contacto entre dos PM com as FA carregadas. ....	85
Figura 5.29 – Perfil de remoção (%) de Pt(IV) e de Pd(II) ao longo dos 28 dias de contacto entre os PM com as FA carregadas. ....	86
Figura 9.1 - Árvore filogenética das SRB mesófilas Gram-negativo, com ênfase na família <i>Desulfovibrionaceae</i> .....	97
Figura 9.2 - Árvore filogenética das SRB mesófilas Gram-negativo, com ênfase na família <i>Desulfobacteriaceae</i> .....	98
Figura 9.3 - Árvore filogenética das SRB formadoras de esporos Gram-positivas. ....	99
Figura 9.4 - Árvore filogenética das bactérias termófilas .....	100

Figura 9.5 – Esquema dos ensaios de enriquecimentos das lamas sólidas de ambas as ETAR (QL e Sil). .....	103
Figura 9.6 – Esquema dos ensaios de inoculação.....	104
Figura 9.7 – Esquematização do procedimento que leva à análise dos parâmetros de crescimento.....	105
Figura 9.8 – Esquema representativo da recolha dos PM e sua adição aos diferentes metais.....	105
Figura 9.9 – Esquema relativo ao procedimento efetuado para a análise dos parâmetros dos ensaios em que os PM e os PGM se encontravam em contacto. ....	106
Figura 9.10 – Esquema dos ensaios de re-extração dos metais para água do mar. ....	107
Figura 9.11 - Esquema geral do ensaio de extração líquido-líquido onde os Produtos Metabólicos são usados com extratante (fase aquosa) dos resíduos de Pt(IV) e Pd(II) existentes no laboratório (fase orgânica). .....	108

## Índice de Tabelas

---

Tabela 2.1 – Vantagens e desvantagens de biorremediação <i>ex situ</i> e <i>in situ</i> .....	4
Tabela 2.2 - Tabela Periódica dos Elementos com destaque para os seis metais que pertencem aos Metais do Grupo da Platina (PGM).....	5
Tabela 2.3 - Espécies de cloro-complexos mais comuns formados com Pt, Pd e Rh... ..	21
Tabela 4.1 - Constituição dos meios usados para o enriquecimento de ambos os consórcios. ....	30
Tabela 5.1 - Resultados dos parâmetros (média das seis réplicas e desvio padrão) dos consórcios QL e Sil em meios de crescimento com e sem $\text{SO}_4^{2-}$ ao 28º dia de enriquecimento (imediatamente antes da recolha dos PM). ....	47
Tabela 5.2 – Resultados de percentagens de remoção do metal (%) obtidos no ensaio de adição dos PM (QL e Sil) crescidos em meio sem $\text{SO}_4^{2-}$ aos diferentes metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)). ....	50
Tabela 5.3 – Resultados de percentagens de remoção do metal (%) obtidos no ensaio de adição dos PM de QL e de Sil crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ aos diferentes metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)). ....	51
Tabela 5.4 – Percentagens atômicas dos elementos que se encontram nos precipitados analisados por SEM-EDS que se encontram em maior concentração.....	58
Tabela 5.5 – Concentração de sulfato presente nos consórcios imediatamente antes da recolha dos PM. ....	63
Tabela 5.6 – Tabela resumo dos melhores resultados de remoção de Pd(II) conseguidos pelos consórcios de QL e de Sil e respetivos tempos de contacto.....	76
Tabela 5.7 – Descrição dos parâmetros (média) dos consórcios de QL e de Sil com $\text{SO}_4^{2-}$ imediatamente antes da recolha dos PM. ....	77
Tabela 5.8 - Resultados obtidos (média) com os PM dos consórcios de QL e de Sil crescidos em meio com $\text{SO}_4^{2-}$ quando adicionados ao Pd(II). ....	77
Tabela 5.9 – Concentração de Pd(II) e de Pt(IV) na FO antes e depois da re-extração para água do mar e respetiva eficiência de extração. ....	81
Tabela 5.10 – Parâmetros de crescimento dos inóculos no início da inoculação e imediatamente antes da recolha dos PM utilizados na realização deste ensaio.....	82
Tabela 5.11 - Concentração de Pt(IV) e Pd(II) na FO, antes da extração, na FA, depois da extração, e respetiva eficiência de extração. ....	87

Tabela 9.1 – Lista dos reagentes utilizados.....	101
Tabela 9.2 – Lista dos metais utilizados.....	101
Tabela 9.3 – Lista dos equipamentos utilizados.....	102

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

---

AAS	Espectroscopia de Absorção Atômica <sup>1</sup>
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
FA	Fase Aquosa
FO	Fase Orgânica
g	Grama
HCl	Ácido Clorídrico
HNO <sub>3</sub>	Ácido Nítrico
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
nm	Nanómetros
OD	Densidade Ótica <sup>2</sup>
p/v	Peso/Volume
Pd	Paládio
PdS	Sulfureto de Paládio
PGM	Metais do Grupo da Platina <sup>3</sup>
PM	Produtos Metabólicos
ppm	Partes por milhão
Pt	Platina
PtS <sub>2</sub>	Sulfureto de Platina
QL	Consórcio das lamas da ETAR de Quinta do Lago
Rh	Ródio
Rh <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	Sulfureto de Ródio
rpm	Rotações por Minuto
S <sup>2-</sup>	Sulfureto

---

<sup>1</sup> Sigla do nome em inglês: *Atomic Absorption Spectroscopy*

<sup>2</sup> Sigla do nome em inglês: *Optical Density*

<sup>3</sup> Sigla do nome em inglês: *Platinum Group Metals*

SEM-EDS	Microscopia Eletrônica de Varrimento - Espectrómetro de Energia Dispersiva <sup>4</sup>
Sil	Consórcio das lamas da ETAR de Silves
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfato
SRB	Bactérias Sulfato-Redutoras <sup>5</sup>
v/v	Volume/Volume
XRD	Difração de Raio-X <sup>6</sup>
eh	Potencial Redox

---

<sup>4</sup> Sigla do nome em inglês *Scanning Electron Microscopy - Energy Dispersive Spectrometry*

<sup>5</sup> Sigla do nome em inglês: *Sulfate-Reducing Bacteria*

<sup>6</sup> Sigla do nome em inglês *X-Ray Diffraction*

# 1. Objetivo

---

No presente trabalho foram utilizados dois consórcios bacterianos enriquecidos a partir de lamas recolhidas em duas ETARs distintas situadas no Algarve: a ETAR de Silves e a ETAR de Quinta do Lago.

A cada um dos consórcios foi realizado um enriquecimento para beneficiar o crescimento de bactérias sulfato-redutoras (SRB) e para tal fez-se crescer as comunidades bacterianas em meio de crescimento com sulfato. Outras bactérias (que não as SRB) foram igualmente enriquecidas a partir da mesma lama, fazendo-se crescer em meio nutriente sem sulfato.

Dos diferentes consórcios (de Quinta do Lago e de Silves crescidos em meio com e sem sulfato) foram recolhidos os produtos metabólicos (PM) expelidos pelas bactérias para o meio de crescimento e foi testada a sua capacidade de remover metais do grupo da platina (mais precisamente Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) em três situações distintas.

No laboratório de Tecnologias Ambientais do Centro de Ciências do Mar (CCMAR) na Universidade do Algarve (UAlg) (onde decorreu a componente prática deste estudo) desenvolvem-se estudos químicos e biológicos de remoção/recuperação de metais raros e preciosos. O projeto “Separação por extração Líquido-líquido de Metais Raros e Preciosos a Partir de Matrizes Cloretadas Complexas. Potencial Aplicação em Processos de Reciclagem e Preservação Ambiental”, com a referência: PTDC/QUI-QUI/109970/2009, que se encontra a decorrer neste laboratório tem como objetivo sintetizar e utilizar succinamidas/malonamidas tretasubstituídas, para a recuperação de Pt(IV) e Pd(II) por extração líquido-líquido. Estes ensaios originam soluções contendo Pt(IV) e Pd(II). Uma vez que estes metais são bastante dispendiosos decidiu-se reaproveitar estas soluções e aplicá-las num estudo de biorremoção de metais. A conjugação destas duas técnicas de remoção/recuperação de PGM constitui uma novidade nesta área, uma vez que, tanto quanto se sabe, ainda não há estudos realizados onde se tivesse conjugado ambas as tecnologias.

O presente trabalho encontra-se dividido em três estudos, no primeiro testou-se a capacidade dos PM, obtidos em diferentes tempos do crescimento bacteriano, para a remoção dos metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)). Neste estudo selecionaram-se os produtos metabólicos que apresentaram melhores resultados de forma a utilizar apenas esses nos estudos seguintes.

O segundo estudo pretendeu analisar a capacidade dos produtos metabólicos selecionados, na remoção de metais do grupo da platina (nomeadamente, Pt(IV) e Pd(II)). Para tal utilizaram-se soluções contendo Pt(IV) e Pd(II) provenientes de ensaios de extração líquido-líquido (existentes no laboratório e produzidas no decorrer do projeto PTDC/QUI-QUI/109970/2009).

Por fim, testou-se a capacidade extratante dos PM. Para tal, realizaram-se ensaios de extração líquido-líquido nos quais os PM foram usados como agentes de re-extração (*stripping*) de Pt(IV) ou Pd(II) de fases orgânicas carregadas. Estas fases eram, também elas, resultantes de ensaios de extração líquido-líquido do projeto com a referência: PTDC/QUI-QUI/109970/2009.

## 2. Introdução

---

### Biotecnologia Ambiental

O ambiente é composto por diversos conjuntos ambientais: ar (atmosfera), água (hidrosfera), solo (litosfera) e seres vivos (biosfera). O aumento da população e das cidades e o rápido desenvolvimento industrial fez com que houvesse uma enorme libertação de diversos tipos de contaminantes para o meio ambiente [1].

Desde há 50 anos até aos dias de hoje vários xenobióticos têm sido introduzidos no meio ambiente, alguns deles altamente tóxicos. Esses xenobióticos acabam por se envolver em processos ambientais e interagir com os seres vivos prejudicando as funções fisiológicas dos mesmos. O DDT (famoso herbicida que provocava cancro nos humanos) e o envenenamento por mercúrio são dois exemplos de xenobióticos lançados no ambiente [1]. Tudo isto contribuiu para a redução da esperança média de vida e fez com que se compreendesse que os poluentes ambientais não representam apenas um problema técnico [1].

A biotecnologia ambiental está fundamentalmente focada nos resíduos, na remediação de contaminação causada por estes, na redução do seu impacto e no controlo da poluição. Assim, os principais objetivos da biotecnologia ambiental são: a fabricação de produtos que diminuam a libertação de líquidos, gases ou sólidos nocivos para a natureza e a limpeza dos resíduos provenientes da ação humana [2].

Existem diversas técnicas de remediação ambiental: técnicas biológicas (emprego de seres vivos), químicas (através de extração líquido-líquido), físicas (concentram os contaminantes num só local, por exemplo em aterros), solidificação (encapsulação dos contaminantes num sólido monolítico) e térmicas (incineração) [2].

A biotecnologia ambiental que aplica microrganismos na melhoria da qualidade do meio ambiente designa-se biorremediação [3; 4].

### Biorremediação

Um dos principais problemas enfrentados pelo mundo industrializado é a contaminação de solos, águas e ar com produtos químicos perigosos e tóxicos [1; 4]. Existe uma grande diversidade de produtos orgânicos e inorgânicos industriais (poluentes ambientais) que acabam por ser lançados intencionalmente ou inadvertidamente para o

ambiente. Exemplos desses poluentes são os combustíveis fósseis (gasolina que contém benzeno, tolueno e xilenos) e metais como o crómio e o mercúrio, usados na indústria e comércio [5]. A necessidade de remediar os locais contaminados levou ao desenvolvimento de novas tecnologias, que melhorem a eliminação dos contaminantes em detrimento dos métodos convencionais (como aterros ou incenerações), que normalmente geram outro tipo de contaminantes [4].

Os microrganismos apresentam um elevado poder geoquímico, sendo considerados os maiores agentes químicos existentes na Terra [3]. Biorremediação é o termo dado à descontaminação e degradação de poluentes ambientais utilizando microrganismos ou processos microbianos [3; 4] e está entre as novas tecnologias usadas para remediar um ambiente poluído [4]. Trata-se de uma forma eficaz na eliminação de poluentes ambientais, sendo por vezes a única maneira prática de executar tal tarefa [3]. O uso de microrganismo na eliminação de poluentes tem-se mostrado muito mais rentável (custo-efeito) que o uso das técnicas convencionais [1].

A biorremediação pode ser classificada como *ex situ* e *in situ*. Na biorremediação *ex situ* os tratamentos do material contaminado envolvem a remoção física para o procedimento de tratamento sob condições controladas. Em contraste, a biorremediação *in situ* envolve técnicas de tratamento de material contaminado no próprio lugar onde se encontra o poluente [1; 4; 6]. Na tabela 2.1 apresentam-se vantagens e desvantagens de cada técnica.

**Tabela 2.1 – Vantagens e desvantagens de biorremediação *ex situ* e *in situ* [2].**

	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b><i>ex situ</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Condições controladas</li> <li>• Condições facilmente otimizadas</li> <li>• Monitorização mais fácil e precisa               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilidade e segurança na introdução de novos microrganismos</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maiores custos</li> <li>• Risco de contaminações secundárias</li> </ul>
<b><i>in situ</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Impede contaminações noutros locais derivadas da deslocação do material</li> <li>• Protege os trabalhadores de entrarem em contacto com os produtos nocivos (gases voláteis por exemplo)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moroso e invasivo</li> <li>• Condições pouco controladas</li> </ul>

A biorremediação remove ou torna os contaminantes menos tóxicos usando microrganismos ou processos microbianos. Como tal, esta técnica apresenta um custo relativamente baixo, já que não necessita de muita tecnologia, podendo ser acoplada a tratamentos físicos e/ou químicos e podendo ser realizada no próprio local contaminado [4; 6]. Existem produtos químicos que não são biodegradáveis, o limita o uso de técnicas de biorremediação [4]. Existem outras limitações ao uso da técnica de biorremediação tais como: o tempo de operação, que é, normalmente, relativamente longo e os níveis de contaminantes residuais alcançados, que podem não atingir os valores necessários [6].

As SRB têm uma grande importância na biorremediação de águas residuais contaminadas com sulfato e metais [7; 8; 9]. Além das SRB outros microrganismos, nomeadamente outras bactérias, têm a capacidade de promover a remediação de zonas contaminadas.

### Metais do Grupo da Platina

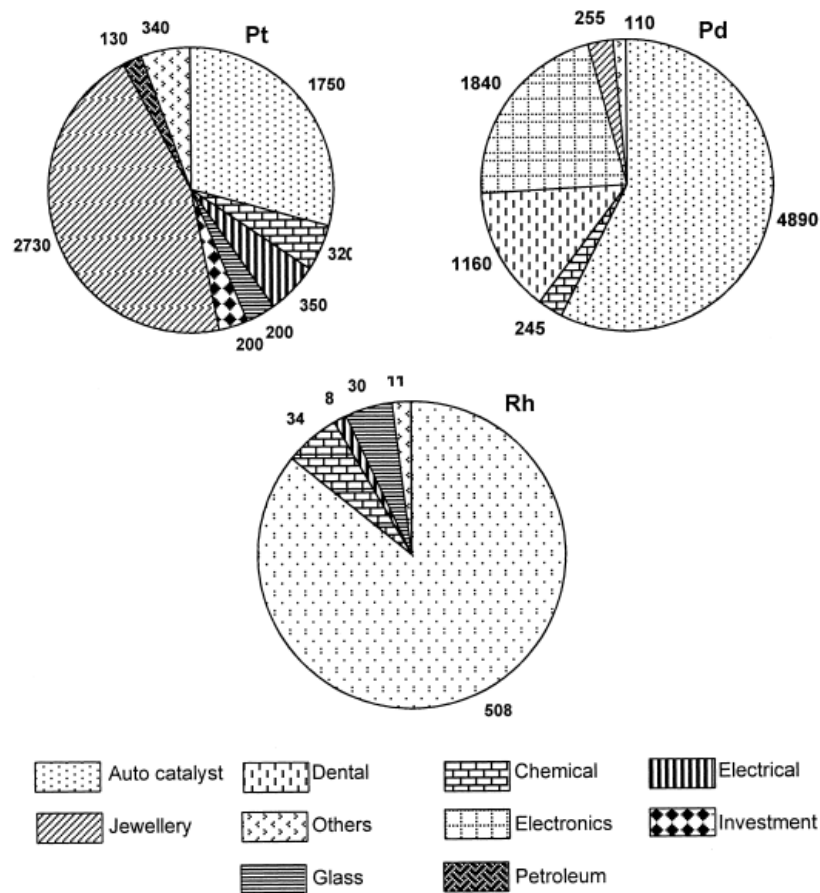
Os Metais do Grupo da Platina (PGM) são compostos por seis elementos: Platina (Pt), Paládio (Pd), Ródio (Rh), Ruténio (Ru), Ósmio (Os) e Irídio (Ir), e estão entre os metais menos abundantes existentes na crosta terrestre [10; 11; 12]. Os PGM encontram-se no bloco d da Tabela Periódica (tabela 2.2), fazendo parte dos designados metais de transição. Os metais de transição possuem uma elevada condutividade térmica e elétrica, formam ligas metálicas com relevante importância industrial, possuem elevada maleabilidade e apresentam brilho metálico. Os metais de transição apresentam vários estados de oxidação (não sendo comum ocorrerem, contudo, estados de oxidação adjacentes) [13].

**Tabela 2.2 - Tabela Periódica dos Elementos com destaque, a amarelo, para os seis metais que pertencem aos Metais do Grupo da Platina (PGM)** ■ – Representa os elementos do bloco s. ■ – Representa os elementos dos bloco d. ■ – Representa os elementos do bloco p.

	1																18	
1	■	2																■
2	■	■	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	■	■	■	■	■	■
3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Os PGM possuem características físicas e químicas semelhantes entre si, daí a designação de metais do grupo da platina. Os seis elementos, em conjunto, abrangem apenas  $2 \times 10^{-6}$  % da crosta terrestre [13]. Estima-se que exista cerca de 0,0001 ppm de Ru, 0,005 ppm (Os), 0,001 ppm de Rh, 0,0001 ppm de Ir, 0,015 ppm de Pd e 0,01 ppm de Pt na crosta terrestre [14].

Estes metais (PGM) mostram ser importantes catalisadores heterogêneos. Tanto o Ru como o Os apresentam enorme capacidade catalítica, sendo considerados como os mais relevantes catalisadores usados em determinadas reações de hidrogenação. Contudo, a nível industrial não são os mais utilizados devido à sua elevada escassez e ao seu, conseqüente, elevado custo. Tanto o Rh como o Ir são frequentemente utilizados na indústria automóvel. São também utilizados, eficientemente, como catalisadores em reações de hidrogenação. Os dois últimos metais (Pd e Pt) são extensivamente usados como catalisadores, o Pd em reações de hidrogenação e desidrogenação e a Pt numa enorme variedade de reações, sendo frequentemente usado na oxidação do amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), no melhoramento dos derivados do petróleo (aumento do número de octanas da gasolina) e na oxidação de vapores orgânicos nocivos emitidos pelos tubos de escape de automóveis. A Pt é ainda utilizada na indústria química, eletrónica e vidreira e ainda no fabrico de bijuteria [14]. É a indústria automóvel que mais utiliza PGM, contudo não é a única indústria a recorrer ao uso de PGM. A figura 2.1 apresenta as indústrias onde os três PGM mais utilizados (Pt, Pd e Rh) são aplicados [15].



**Figura 2.1 – Indústrias onde os três PGM mais utilizados são aplicados. Retirado de Rao e Reddi, 2000 [15].**

Além destas indústrias, os PGM têm sido utilizados em medicamentos contra o cancro [16].

Apesar dos PGM serem dos metais menos abundantes na Terra, devido ao seu potencial catalítico, à capacidade de formar complexos com outros elementos, nomeadamente com o ião cloreto, e aos vários estados de valência que podem apresentar, têm sido bastante explorados e utilizados em diversas indústrias [12; 16]. Por estes dois motivos o preço dos PGM tem vindo a aumentar ao longo do tempo, tornando-os bastante dispendiosos. A escassez destes recursos, o aumento da sua procura e o seu elevado preço faz com haja uma necessidade crescente de recuperar e reutilizar os PGM presentes em resíduos industriais [16; 17].

### Ciclo do Enxofre

O enxofre é um elemento que existe na natureza com alguma abundância, encontrando-se em maior quantidade na água do mar, apresentando-se sob a forma de sulfato. Na

natureza existem ainda outras fontes de enxofre, tais como minerais (por exemplo: pirite,  $\text{FeS}_2$  e calcopirite,  $\text{CuFeS}_2$ ), combustíveis fósseis e matéria orgânica.

O enxofre é um elemento essencial para os microrganismos entrando na composição de aminoácidos (cistina, cisteína e metionina), co-fatores (tiamina, biotina, e coenzima A), ferredoxinas e enzimas [18].

O ciclo do enxofre é um ciclo complexo. Esta complexidade pode dever-se, em parte, ao facto de o átomo de enxofre apresentar diversos estados de oxidação que variam de -2 (completamente reduzida) até +6 (completamente oxidada) [7, 19; 20]. A vasta gama de estados de oxidação que o enxofre pode apresentar, o elevado número de ligações químicas que estabelece e a sua elevada abundância faz com seja encontrado em diversos compostos existentes na natureza [19]. Os microrganismos desempenham um papel importante na reciclagem destes compostos de enxofre [7].

O ciclo do enxofre (figura 2.2) envolve várias espécies gasosas, sais minerais pouco solúveis, e várias espécies em solução.

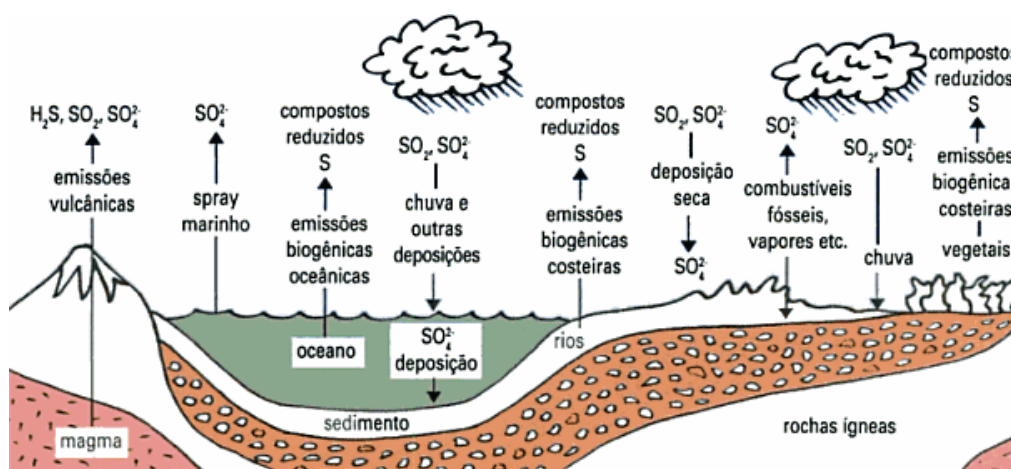


Figura 2.2 – Ciclo do enxofre, retirado de Vidotti *et al.*, 2008 [19].

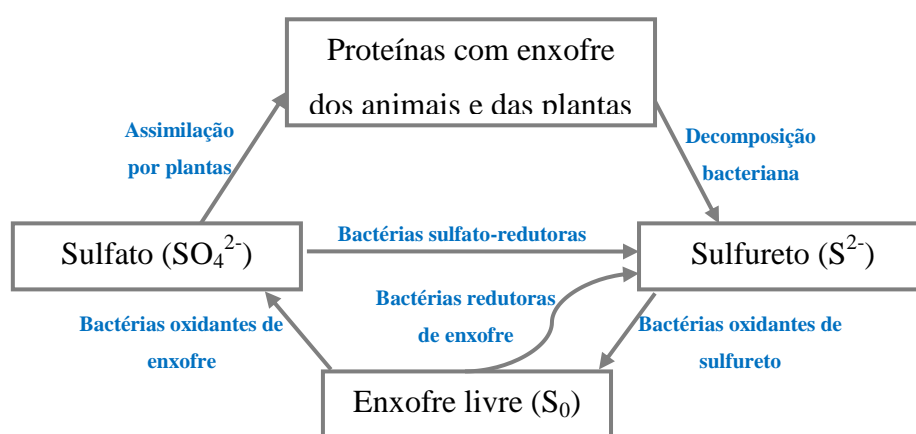
As espécies mais importantes envolvidas no ciclo do enxofre são sulfureto de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{S}$ ); sulfuretos minerais (por exemplo:  $\text{PbS}$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e enxofre biológico (enxofre ligado a proteínas) [21].

O enxofre é incorporado sob a forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) por microrganismos e plantas, e posteriormente pelos animais.

## Redução Biológica de Sulfato

Os nutrientes essenciais para a vida (carbono, azoto, enxofre, ferro, cálcio, fósforo) são reciclados pelos microrganismos assim como pelos macrorganismos, contudo são as atividades microbianas que dominam esta “reciclagem” de nutrientes [3].

A oxidação e a redução de compostos estão sempre associadas. Existem microrganismos que se encarregam da redução de determinados elementos e outros que por sua vez se encarregam de oxidar os elementos anteriormente reduzidos (por outros microrganismos). Esta ação resulta na existência de um ciclo: o ciclo biológico do enxofre [22]. Esse ciclo encontra-se representado na figura 2.3.



**Figura 2.3 - Ciclo biológico do enxofre adaptado de Postgate, 2000 [22].**

Os microrganismos responsáveis pelo ciclo biológico do enxofre são sobretudo bactérias (presentes no solo e na água) denominadas por “bactérias do enxofre” que o único fator que têm em comum é o facto de o seu metabolismo depender do enxofre. No ciclo biológico do enxofre, este pode apresentar-se em 3 estados de oxidação, sendo eles (do mais oxidado para o menos oxidado): o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), o enxofre na sua forma livre ( $\text{S}^0$ ) e o sulfureto ( $\text{S}^{2-}$ ) [22].

A forma reduzida de enxofre pode ser utilizada como fonte de energia ou como poder redutor de alguns procariontes. Já a forma oxidada, principalmente sulfato, pode ser utilizada como aceitador final de elétrons durante a respiração anaeróbia [23]. O sulfureto pode ser oxidado na presença de oxigénio por bactérias de enxofre quimiolitotróficas ou na ausência de oxigénio por bactérias de enxofre fototróficas [7].

Parte do trabalho desta dissertação incide sobre o estudo de consórcios de bactérias sulfato-redutoras. É este grupo de bactérias que reduzem diretamente o sulfato a sulfureto no ciclo biológico do enxofre (figura 2.3) [22].

A redução biológica de sulfato diretamente a sulfureto pode ser efetuada de duas formas distintas: sob a forma assimilatória e sob a forma dissimilatória, tal como é apresentado na figura 2.4 [3; 24]. Na figura 2.4 a sigla APS representa adenosina 5'-fosfossulfato; PAPS representa fosfoadenosina 5'-fosfossulfato. Ambas (APS e PAPS) derivam da adenosina difosfato (ADP) [3], a sigla ATP significa adenosina trifosfato, a sigla  $PP_i$  significa pirofosfato, a sigla AMP dignifica adenosina-5'-monofosfato e a sigla PAP significa adenosina-3'-5'-difosfato.

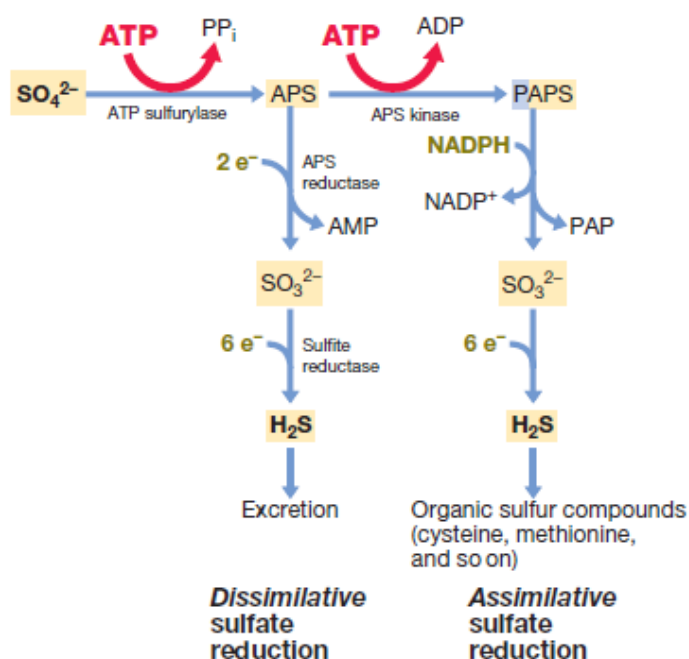


Figura 2.4 – Duas formas de redução biológica de sulfato (assimilatória e dissimilatória) retirado de Madigan et al 2012 [3].

No metabolismo de assimilação apenas é reduzida a quantidade de sulfato necessária para a biossíntese e os produtos são, eventualmente, convertidos em material celular sob a forma de aminoácidos. No metabolismo de dissimilação, uma grande quantidade de sulfato é reduzida e o produto reduzido (sulfureto) é segregado para o meio ambiente podendo reagir, posteriormente, com outros organismos ou com metais existentes no meio formando sulfuretos metálicos insolúveis [3; 24]. Portanto a dissimilação de sulfato refere-se ao uso de sulfato como aceitador final de elétrons para a produção de energia e a assimilação de sulfato refere-se à sua assimilação para fontes biossintéticas

de enxofre [3]. Ambos os processos necessitam de energia química sob a forma de ATP [25].

O ciclo do enxofre é reconhecido como um processo importante do qual a vida no planeta depende, isto porque para mobilizar o enxofre de forma a ser biologicamente usado, este necessita ser reduzido, tal como acontece com a fixação biológica do azoto ou a produção biológica de oxigénio [24].

### Bactérias Sulfato-Redutoras

As bactérias sulfato-redutoras (SRB) são os microrganismos responsáveis pela redução biológica de sulfato a sulfureto (redução dissimilatória) [7; 22; 24; 26].

As SRB são procariontes polifiléticos que se dividem entre dois domínios: *Bacteria* e *Archaea* (figura 2.5) [27]. A análise de sequências de RNA ribossomal (rRNA) 16S possibilitou organizar as várias espécies SRB em quatro grupos filogenéticos distintos (figura 2.5): as mesófilas Gram-negativas (classe *Deltaproteobacteria*), as formadoras de esporos Gram-positivas (classe *Clostridia*), as bactérias termófilas (classes *Thermodesulfobacteria*, *Nitrospirae* e família *Thermodesulfobiaceae*) e as arqueobactérias termófilas (*Archaeoglobus*, *Thermoprotei*) [7; 28].

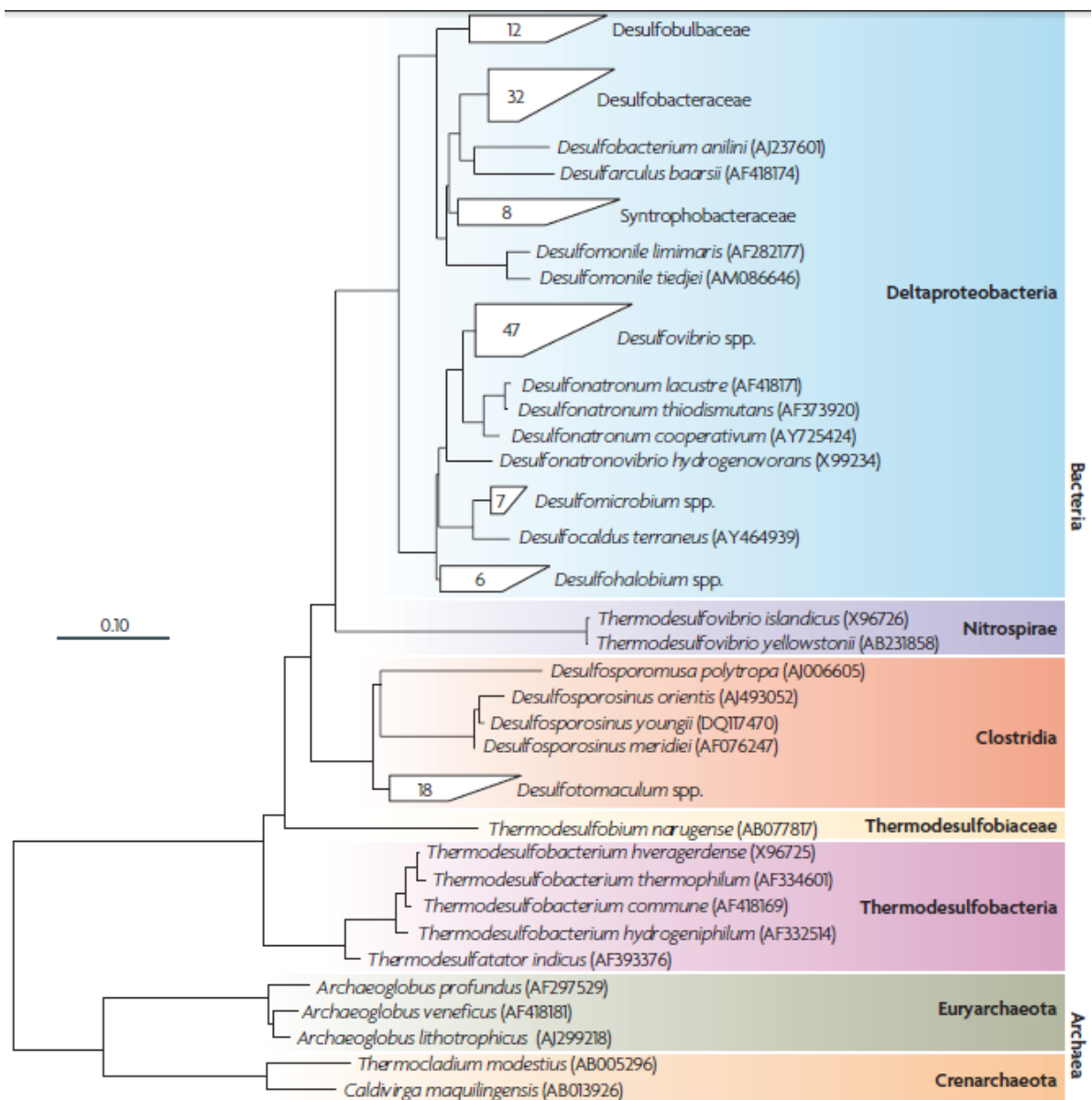


Figura 2.5 - Árvore filogenética baseada em seqüências de rRNA das SRB (retirado de Muyzer e Stams, 2008 [7]).

A classe *Deltaproteobacteria* divide-se em duas famílias: *Desulfovibrionaceae* e *Desulfobacteriaceae* (consultar árvore filogenética nos anexos 1 e 2) [28]. A maior parte das espécies de SRB conhecidas encontram-se no grupo das mesófilas Gram-negativas [27].

O grupo correspondente às bactérias formadoras de esporos Gram-positiva é colocado dentro de bactérias Gram-positivas, tais como, *Bacillus* e *Clostridium*, pois inclui as únicas SRB conhecidas que formam endósporos resistentes ao calor, uma característica comum a muitas espécies de *Bacillus* e *Clostridium*. Este grupo, em geral, é dominado pelo gênero *Desulfotomaculum* (consultar árvore filogenética no anexo 3) [28].

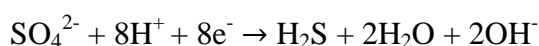
As SRB compreendem o grupo das bactérias termófilas (*Thermodesulfobacteria*, *Nitrospirae* e *Thermodesulfobiaceae*). As duas espécies melhor caracterizadas neste grupo de SRB são *Thermodesulfobacterium commune* [29] e *Thermodesulfovibrio yellowstonii* [30] (consultar árvore filogenética no anexo 4). Estas espécies encontram-se dentro de dois géneros diferentes pois diferem em muitas situações, tratando-se de um grupo que compartilha semelhanças fisiológicas mas que apresenta diferenças a nível filogenético [28].

O último grupo representativo das SRB engloba as bactérias *archaea* termófilas e dele fazem parte três géneros: *Archaeoglobus*, *Thermocladium* e *Caldivirga*. Estas bactérias podem ser encontradas em fontes hidrotermais sendo a sua temperatura ótima de crescimento de 80°C [28].

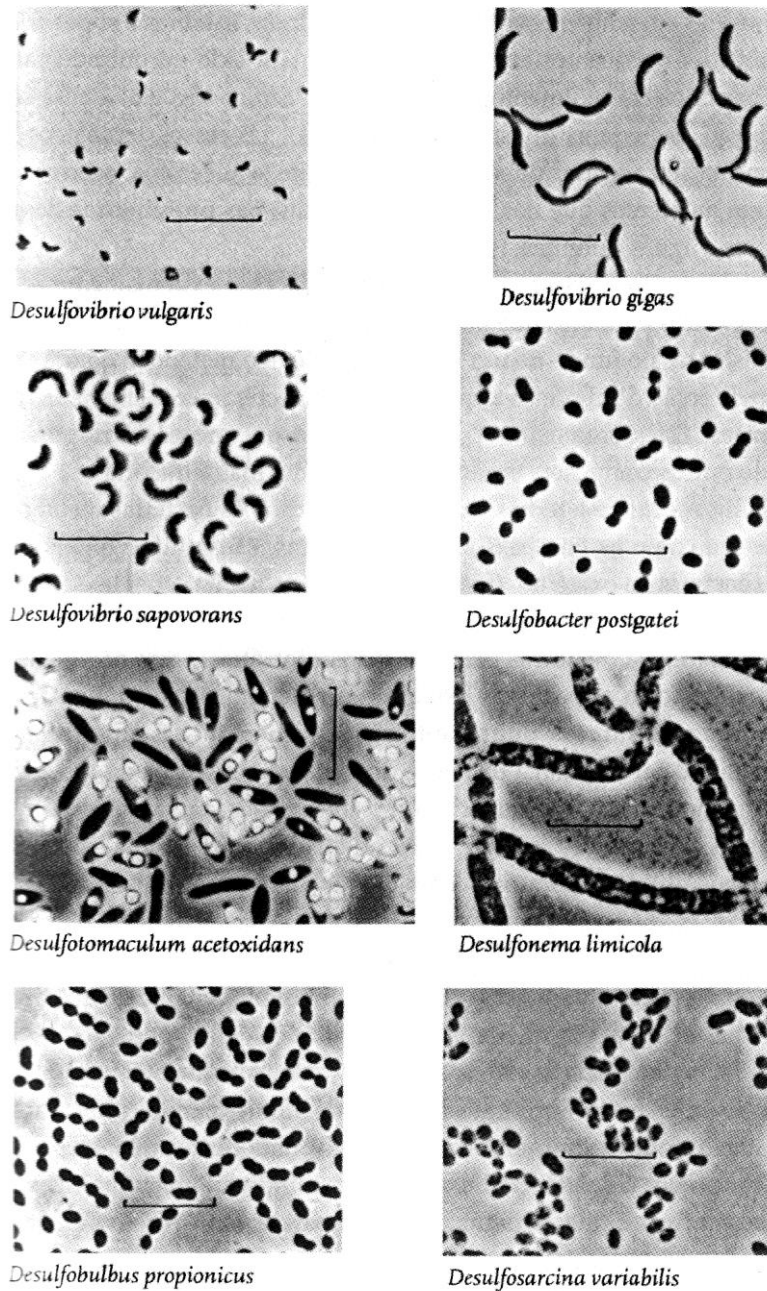
Todas as SRB são bactérias anaeróbias estritas e utilizam o sulfato como aceitador final de eletrões [22]. Na presença de oxigénio, apesar de sobreviverem, não se conseguem reproduzir [22].

Estes organismos utilizam lactato, piruvato, etanol ou ácidos gordos (matéria orgânica) como doadores de eletrões, reduzindo  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$  [3; 7; 31]. A reação que traduz a redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$  encontra-se representada na Equação 1 [3].

**Equação 1 – Redução biológica de sulfato a sulfureto.**



As SRB podem ainda ser divididas em dois grupos metabólicos diferentes. Um dos grupos tem a capacidade de oxidar a matéria orgânica de forma completa produzindo  $\text{CO}_2$  enquanto o segundo grupo não consegue oxidar toda a matéria orgânica acabando por produzir acetato [28]. Estas bactérias apresentam uma variada gama de tamanhos e formas (figura 2.6). A forma mais frequente deste tipo de bactérias é a forma de bastonete curvo, contudo a forma esférica, cilíndrica e a forma de limão também são formas comuns entre as SRB [22]. A figura 2.6 ilustra algumas espécies de SRB, onde se pode ver as diferentes formas e os diferentes tamanhos que este tipo de bactérias pode apresentar

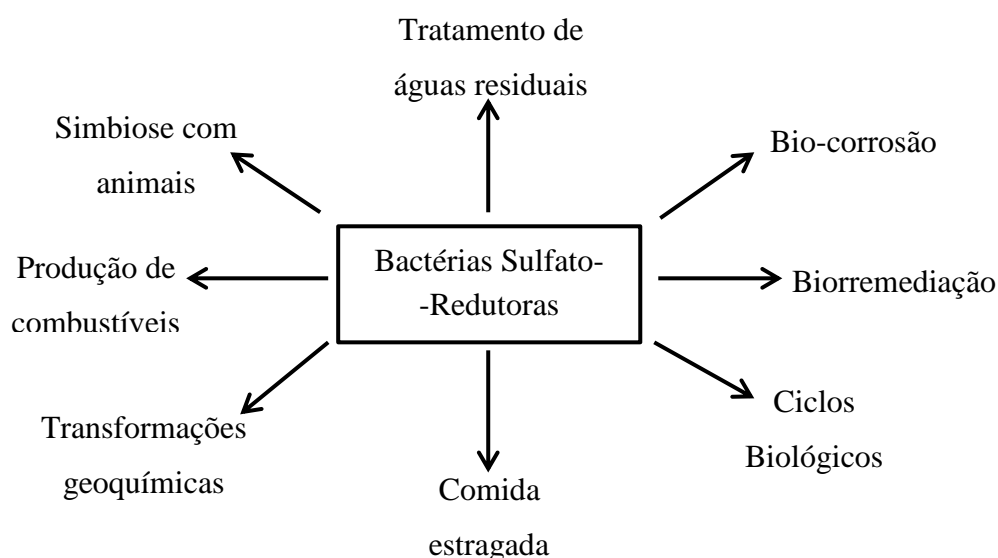


**Figura 2.6 – Imagem de algumas espécies de SRB onde se pode ver os diferentes tamanhos e formas que podem apresentar. A escala em cada imagem representa 10 µm. Imagem foi retirada de Postgate 2000 [22].**

As SRB podem ser facilmente encontradas em ambientes poluídos ou em decomposição uma vez que neste tipo de ambiente já não há presença de oxigénio (outros microrganismos já o consumiram por completo) [22]. Além dos ambientes poluídos ou em decomposição as SRB podem ainda ser encontradas em fontes hidrotermais e zonas vulcânicas (ambientes hostis com temperaturas bastante elevadas) [32], em fendas oceânicas e sedimentos marinhos (ambientes com pressão elevada) [33], em águas

mineiras (ambientes ácidos) [34], em águas residuais [22], nos mares e oceanos [24] e ainda no trato gastrointestinal do homem e de animais [22]. As SRB podem ainda ser encontradas no fundo de lagos e rios [35].

As SRB apresentam atividade em vários processos ambientais (figura 2.7), tais como na biorremediação, ciclos biológicos de certos elementos (ciclo do enxofre e do carbono), tratamento de resíduos entre outros [36].



**Figura 2.7 – Interações das SRB adaptado de Barton e Tomei [36].**

### Cultura de Bactérias Sulfato-Redutoras

O uso de culturas mistas de bactérias e nomeadamente de SRB proporciona vantagens em relação ao uso de culturas puras, uma vez que a ocorrência de contaminações por parte de outros organismos é menos gravosa no primeiro caso. Outra vantagem de se usar consórcios é o facto dos mesmos apresentarem um certo número de populações diferentes, o que faz com que se adaptem mais facilmente a alterações nas condições experimentais (pH, concentração de nutrientes, temperatura e potencial redox). Também a manutenção de culturas puras a longo prazo é mais difícil, uma vez que estas culturas são mais sensíveis a pequenas variações nas condições experimentais [17; 37].

Para que seja possível haver um bom crescimento de um consórcio de SRB, um fator importante a ter em conta é a fonte de carbono e utilizar no enriquecimento e crescimento [35]. Vários autores testaram diferentes fontes de carbono, tais como ácidos gordos (metanoato, acetato, propanoato), álcoois (metanol, etanol), compostos

aromáticos e  $H_2$  [35; 38], ácidos com 3 ou 4 carbonos (lactato, piruvato, malato) e, por vezes, açúcares e ácidos de cadeia longa [35]. Deve-se, contudo, optar por fontes de carbono simples (ácidos gordos de cadeia curta ou etanol), uma vez que estas podem ser utilizados diretamente pelas SRB, em contraste com as fontes de carbono mais complexas (proteínas e hidratos de carbono, por exemplo), que antes de poderem ser utilizadas pelas SRB precisam de ser hidrolisadas e/ou fermentadas por outro tipo de bactérias [39]. Resíduos da indústria alimentar também foram estudados como fontes alternativas de carbono para o cultivo de SRB, tais como resíduos da indústria do vinho [40] e resíduos da indústria de produção de queijo [40; 41]. Estas fontes alternativas apresentam grande interesse económico uma vez que, como se tratam de resíduos, o seu custo é bastante reduzido (podendo ser mesmo obtidas a custo zero ou negativo) [40; 41].

Para o sucesso de uma cultura de SRB a escolha da fonte de carbono a utilizar é essencial [35]. O lactato é uma boa escolha como fonte de carbono uma vez que fornece energia suficiente para a redução de sulfato e favorece o crescimento de várias espécies de SRB [42], podendo ser oxidado completa ou incompletamente por espécies do mesmo género [43].

A temperatura também tem influência no sucesso do crescimento das SRB. Como existem diversas espécies de SRB a temperatura ideal de uma cultura vai depender da espécie ou espécies que compõem a mesma. As SRB mesófilas apresentam uma gama de temperatura ótima que vai entre os 25°C e os 40°C, enquanto as SRB termófilas vivem em temperaturas que variam entre os 50°C e os 70°C [26].

O ambiente favorável ao crescimento das SRB deve ter um pH acima de 5,5 e um ambiente redutor com valores de  $e_h$  inferiores a -100 mV [44]. Outros autores indicam o meio nutriente Postgate C como o meio ideal para o crescimento de SRB, com o pH de 7,2 e o  $e_h$  abaixo de -150 mV [36].

## Estação de Tratamento de Águas Residuais

Numa cidade as águas provenientes de tanques de lavagens, de fossas, de esgotos domésticos e até mesmo alguns efluentes industriais acabam por se juntar numa estação de tratamento de águas residuais (ETAR). Posto isto, verifica-se que as águas com destino às estações de tratamento de águas contêm excrementos humanos, papel, restos

de comida, cabelos e detergentes. Toda esta mistura é rica em matéria orgânica, tornando-se portanto um ótimo meio de crescimento bacteriano [22].

O objetivo das estações de tratamento de águas passa por purificar a água lá recebida. A água purificada pode ser devolvida à natureza (libertada em rios), pode ser utilizada em aplicações industriais e pode ainda voltar a ser utilizada para irrigação uso doméstico [21].

Da purificação das águas residuais resultam, além da água purificada, mais dois produtos: lamas e gases (dióxido de carbono e metano). As lamas podem ser utilizadas no solo como fertilizante. O dióxido de carbono acaba por ser libertado para a atmosfera enquanto o metano pode servir como fonte de energia da própria estação de tratamento de água [22].

Na maioria dos casos quando a água residual chega à estação de tratamento o primeiro procedimento passa por uma triagem. Aqui os sólidos de maiores dimensões são reduzidos ou, se se tratar de materiais que não sejam biodegradáveis, são eliminados (areias, plásticos, entre outros) [21]. Após esta seleção, a água e os resíduos que restaram passam normalmente para o decantador primário, onde os materiais sólidos acabam por se depositar no fundo formando as lamas primárias. As lamas primárias são então encaminhadas para um digestor de lamas não arejado. A fase líquida proveniente do decantador primário passa para um tanque de arejamento, onde bactérias aeróbias vão oxidar a matéria orgânica. A fase de oxidação da matéria orgânica vai originar novas bactérias, sendo por isso necessário passar para um novo tanque de sedimentação de onde se vão recolher as lamas ativadas [21; 22]. Após esta etapa, a água já se encontra bastante purificada, podendo ser descarregada para um recetor, como por exemplo um rio [22]. A fase líquida pode ainda ser sujeita a outros processos de tratamento (tratamento terciário) até que se encontre em condições aceitáveis para descarga em ambientes mais sensíveis ou para uso doméstico [21; 22]. As lamas ativadas (provenientes do tanque de sedimentação secundário) podem ser utilizadas como fertilizante, ou podem voltar a entrar no decantador primário, ou podem ainda ser encaminhadas para o digestor de lamas [22].

No digestor de lamas não há entrada de ar para que se desenvolvam bactérias anaeróbias tais como SRB, bactérias celulolíticas e metanobactérias. Estas bactérias têm a função de decompor material orgânico, produzindo sulfureto de hidrogénio (SRB) ou metano (metanobactérias) e decompor papel e material semelhante (celulolíticas). O metano aqui produzido pode ser recuperado pela própria ETAR e servir como fonte energética

da mesma. As lamas daqui recolhidas acabam por ser secas e poderão ser utilizadas como fertilizante [22].

As lamas utilizadas no trabalho experimental que conduziu a esta dissertação foram recolhidas em duas ETAR distintas (Quinta do Lago e Silves) do Algarve, no sul de Portugal. A figura 2.8 representa todas as ETAR existentes no Algarve, destacando-se a ETAR de Quinta do Lago e a ETAR de Silves.



**Figura 2.8 – Mapa do sistema multimunicipal de saneamento do Algarve com destaque à ETAR de Silves (azul) e à ETAR de Quinta do Lago (cor-de-laranja). Imagem obtida online de: <http://www.aguasdoalgarve.pt/content.php?c=53> (consultado dia 2 de Março de 2014).**

Ambas as lamas recolhidas para a elaboração deste trabalho experimental provêm do processo de desidratação (secagem) das lamas. Como já foi referido, as lamas, antes do processo de secagem, encontram-se no digestor de lamas onde não há entrada de ar favorecendo o crescimento e desenvolvimento de bactérias anaeróbias. Por esta razão optou-se por utilizar este tipo de resíduo como fonte de bactérias anaeróbias úteis para este trabalho.

## Biorremediação/Biorrecuperação de Metais do Grupo da Platina usando Microrganismos

A remoção/recuperação de PGM presentes em efluentes pode ser efetuada por processos hidrometalúrgicos (lixiviação ou extração líquido-líquido, vulgarmente designada por extração por solventes) e processos pirometalúrgicos (pirólise ou calcinação). Ambos os métodos de recuperação são relativamente dispendiosos, trabalhosos e morosos [16]. Além disso, são frequentemente geradas grandes quantidades de resíduos secundários, resultante da adição de produtos químicos. Portanto, existe a necessidade de desenvolver alternativas para a recuperação destes metais a partir de resíduos que apresentem baixo custo e que sejam ecológicas [16].

Além do potencial que os microrganismos apresentam para a recuperação ou remoção de metais de meios aquosos, a sua capacidade de produzir partículas metálicas, muitas vezes de dimensões nanométricas, é uma mais-valia, uma vez que, as nano-partículas metálicas possuem propriedades únicas, tais como a elevada resistência à corrosão e a estabilidade à oxidação a altas temperaturas [17].

Nano-partículas de Pd e de Pt já foram produzidas através de culturas puras de SRB, como *Desulfovibrio desulfuricans* [45; 46], *Desulfovibrio fructosivorans*, *Desulfovibrio vulgaris* [46]. Através de culturas mistas de SRB também já se conseguiu recuperar Pd [17] e Pt [47] produzindo também nano-partículas metálicas de ambos os metais. Consórcios de SRB também conseguiram recuperar Rh a partir de um efluente [48].

Além das SRB outros microrganismos têm a capacidade de recuperar PGM de zonas contaminadas com esses metais sob a forma de nano-partículas metálicas.

Estudos precedentes demonstraram a capacidade que bactérias, não SRB, têm de reduzir Pd(II) a Pd(0) sob a forma de nano-partículas. Como exemplos dessas bactérias tem-se a *Escherichia coli*; *Cupriavidis metallidurans*, *Arthrobacter oxydans* e *Micrococcus luteus*. Todas estas bactérias conseguem recuperar Pd metálico com propriedades catalíticas [49; 50].

Além de bactérias também leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) [51; 52], algas (*Chlorella vulgaris*) [51; 53] e musgo aquático (*Racomitrium lanuginosum*) [54] demonstraram conseguir remover Pd e Pt de soluções aquosas.

O uso de bactérias no tratamento de efluentes com metais apresenta uma forte limitação: a falta de resistência bacteriana aos metais. A procura de bactérias resistentes a metais é

muito importante para o desenvolvimento de processos eficientes de biorremediação baseados na utilização direta destas bactérias [9]. Este trabalho experimental tenta superar essa limitação utilizando apenas os PM produzidos por dois consórcios bacterianos diferentes com o intuito de testar a sua capacidade de recuperação/remoção de PGM. Os PM foram extraídos de consórcios enriquecidos para SRB e de consórcios enriquecidos para outras bactérias anaeróbias.

### Escolha dos consórcios

Como já foi referido várias espécies de microrganismos conseguem recuperar PGM na sua forma catalítica ativa (Pd(0), Pt(0) e Rh(0)). Para este trabalho optou-se por escolher bactérias anaeróbias na tentativa de recuperar/remover PGM de soluções aquosas.

Tendo em conta a vantagem de se usar consórcios bacterianos em detrimento de culturas puras, este trabalho pretendeu testar a capacidade de consórcios bacterianos, de SRB e de outras bactérias anaeróbias, na recuperação de PGM. Além disso, outro fator que influenciou a escolha de consórcios bacterianos foi o facto de não haver muitos estudos que tenham explorado o uso dos consórcios para este fim.

Os consórcios utilizados neste trabalho provêm de lamas de duas ETARs distintas. As lamas sólidas recolhidas eram provenientes do processo de desidratação das lamas. Como já referido este processo sucede o digestor de lamas onde não há entrada de ar, o que favorece o crescimento e desenvolvimento de bactérias anaeróbias. Para além de fornecerem consórcios bacterianos anaeróbios (material que se pretende para a elaboração deste trabalho), as lamas são obtidas gratuitamente, pois trata-se de um subproduto indesejável obtido do tratamento de águas residuais.

### Recuperação de Metais do Grupo da Platina através de Extração Líquido-líquido

Como foi referido em cima, a recuperação de PGM pode ser efetuada por processos químicos hidrometalúrgicos e por processos pirometalúrgicos que apresentam algumas desvantagens.

A extração líquido-líquido é um processo químico de recuperação de PGM através de um processo hidrometalúrgico. Este método apresenta habitualmente as seguintes vantagens: evita a formação de precipitados, alta eficiência de separação do elemento

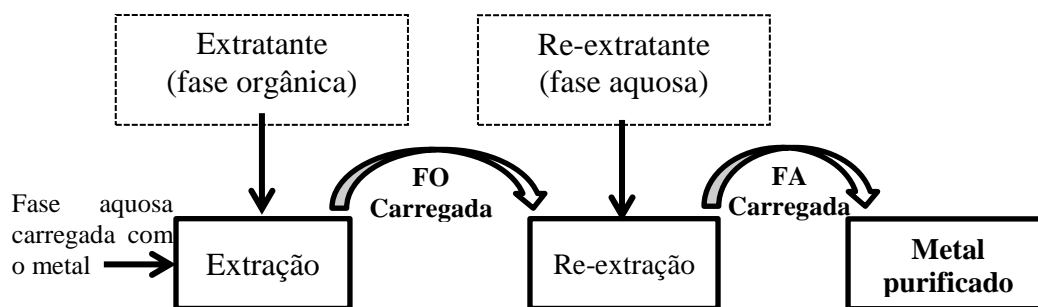
desejado e boa seletividade para esse mesmo elemento [55]. Este método baseia-se na separação do metal desejado a partir da fase aquosa com um solvente orgânico imiscível. É importante que o metal consiga ser re-extraído para uma nova fase aquosa purificada. As duas fases devem respeitar as condições do processo, devem ser ambientalmente seguras e deve-se ter em conta os seus custos [55].

Os PGM formam facilmente cloro-complexos. A separação e a purificação de PGM podem ser feitas através das diferenças químicas dos seus cloro-complexos aniônicos [56]. Os cloro-complexos com metais do grupo da platina são geralmente muito mais estáveis do que os cloro-complexos de outros metais. Isto permite que ocorra uma melhor separação dos PGM. A tabela 2.3 apresenta os cloro-complexos mais comuns formados entre Pt, Pd e Rh [55].

**Tabela 2.3 - Espécies de cloro-complexos mais comuns formados com Pt, Pd e Rh. Tabela adaptada de Charlesworth, 1981 [55].**

<b>Elemento</b>	<b>Estado de Oxidação</b>	<b>Cloro-complexo mais comum</b>
Platina	Pt (II)	$(PtCl_4)^{2-}$
Platina	Pt (IV)	$(PtCl_6)^{2-}$
Paládio	Pd(II)	$(PdCl_4)^{2-}$
Paládio	Pd(IV)	$(PdCl_6)^{2-}$
Ródio	Rh (III)	$(RhCl_6)^{3-}$

O processo de extração envolve os seguintes passos: extração, no qual um dado metal é extraído seletivamente e a re-extração (“Stripping”) que consiste em remover o metal extraído da fase orgânica para uma fase aquosa [56]. A figura 2.9 representa o processo de extração líquido-líquido onde FO significa fase orgânica e FA significa fase aquosa. Todas as fases que contêm o metal chamam-se “fases carregadas”.



**Figura 2.9 – Processo de extração líquido-líquido adaptado de Bernardi et al. 2005 [56] .**

### Estruturação do trabalho laboratorial e escolha dos PGM

O laboratório de tecnologias ambientais, do Centro de Ciências do Mar (CCMAR) situado na Universidade do Algarve, investiga sobretudo a remediação/tratamento de efluentes contaminados com metais, tanto através de estudos de extração líquido-líquido, como através de estudos biológicos usando consórcios bacterianos para a biorremocção/biorrecuperação de metais. Neste trabalho pretendeu-se conjugar estas duas vertentes de investigação química e biológica. Para tal, dividiu-se o trabalho desta tese em três etapas:

- 1ª) Ensaio de adição dos PM a soluções aquosas contendo PGM (Pt(IV), Pd(II) ou Rh(III))
- 2ª) Ensaio de adição dos PM a fases aquosas contendo Pt(IV) ou Pd(II) resultantes de ensaios de extração e re-extração líquido-líquido
- 3ª) Ensaio de re-extração líquido-líquido de fases orgânicas carregadas com Pt (IV) ou Pd(II) usando PM como agentes de re-extração

Assim, os PGM utilizados na 1ª etapa do trabalho provinham de soluções padrão e na 2ª e 3ª etapas encontravam-se em fases aquosas ou orgânicas carregadas, provenientes de ensaios de extração líquido-líquido.

De forma a simular processos em *batch* com os PM foram usadas as fases aquosas carregadas. Ensaio semelhante foram realizados com as fases orgânicas carregadas, mas para tal estas foram sujeitas a um processo de re-extração do metal para uma fase aquosa, permitindo assim o uso desta última fase nestes ensaios (dado que a fase aquosa é miscível com os PM, enquanto a fase orgânica é imiscível). Como referido anteriormente os PGM têm facilidade em formar cloro-complexos, pelo que o agente re-extratante escolhido foi a água do mar (rica em cloretos).

Por fim, a última etapa deste trabalho, baseou-se em ensaios de re-extração líquido-líquido, nos quais, os PM produzidos pelas bactérias foram usados como agente de *stripping* e como fase orgânica utilizaram-se as fases orgânicas carregadas resultantes de outros ensaios de extração por solventes.

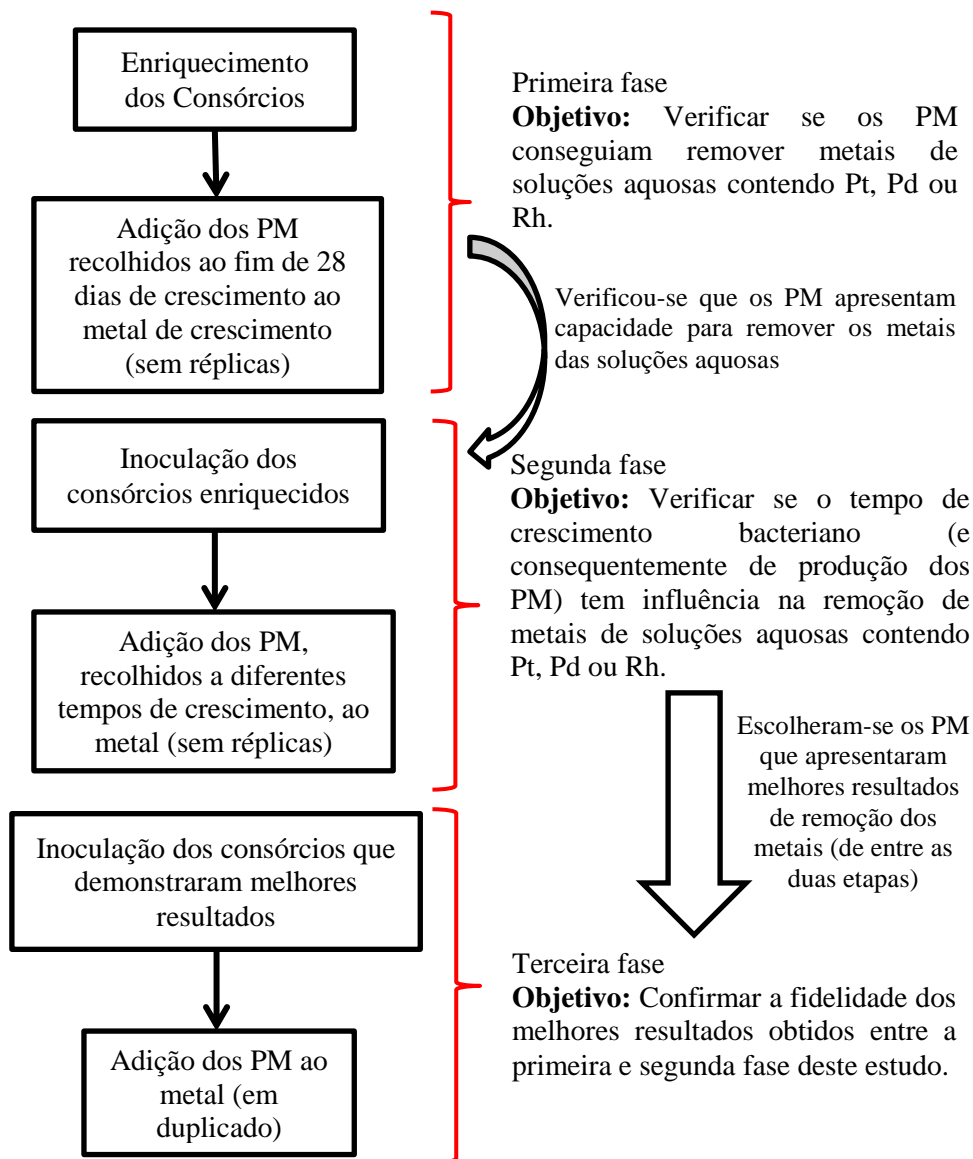
### 3. Planificação do Trabalho

---

As figuras 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 esquematizam o trabalho efetuado ao longo da dissertação. Estes esquemas têm o objetivo de resumir de uma forma simples e esclarecedora o trabalho laboratorial realizado, antes de aprofundar cada uma das diferentes etapas deste trabalho. A figura 3.5 esquematiza todos os ensaios efetuados ao longo da dissertação.

#### **Ensaio de adição dos PM a soluções aquosas contendo PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III))**

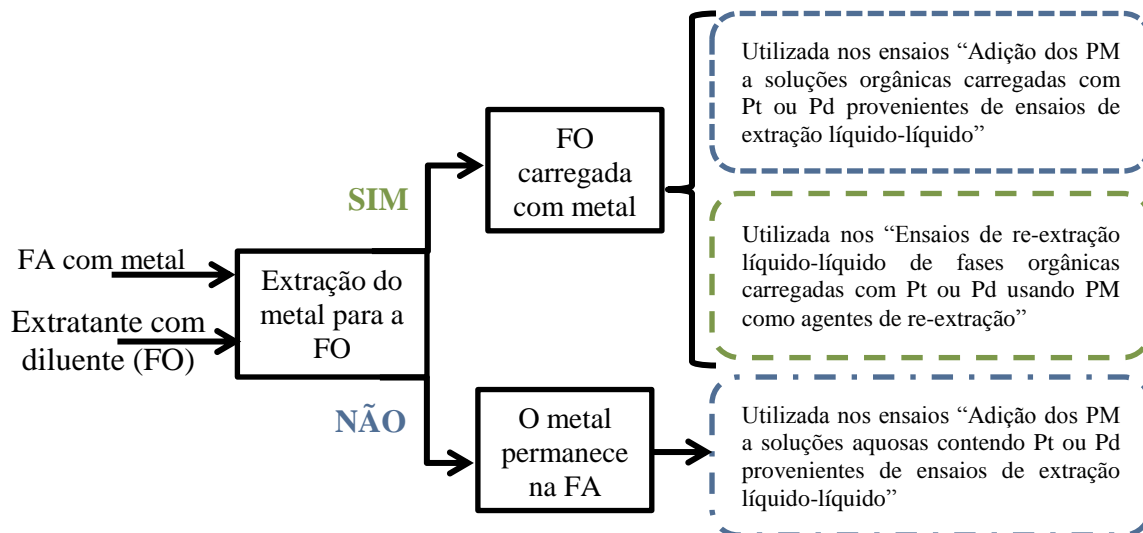
A figura 3.1 representa o esquema geral dos Ensaio de adição dos PM a soluções aquosas contendo PGM (Pt, Pd e Rh). Este estudo teve o objetivo de testar a capacidade dos PM na recuperação/remoção dos metais (Pt, Pd e Rh) de meios aquosos usando, para o efeito, PM obtidos em diferentes tempos de crescimento dos consórcios. Foram realizados ensaios usando os PM resultantes do enriquecimento das lamas e resultantes de inoculações subsequentes (figura 3.1). Este estudo encontra-se dividido em três fases: uma fase inicial na qual se verificou se os PM conseguiam ou não remover os metais de soluções aquosas e para tal utilizaram-se os PM provenientes dos enriquecimentos ao fim de 28 dias de crescimento. Seguiu-se um ensaio para esclarecer se o tempo de crescimento bacteriano e consequentemente os PM produzidos ao longo desse tempo tinha influência na remoção desses metais (2ª fase). Sendo este estudo bastante moroso e dispendioso não foram feitas réplicas nas duas primeiras fases do trabalho. Na terceira fase confirmou-se a fidelidade dos melhores resultados obtidos nas duas etapas anteriores, realizando-se ensaios em duplicado.



**Figura 3.1 – Esquema geral dos ensaios de adição dos Produtos Metabólicos (QL e Sil) a soluções aquosas contendo PGM (Pt, Pd e Rh).**

### Ensaio de extração líquido-líquido

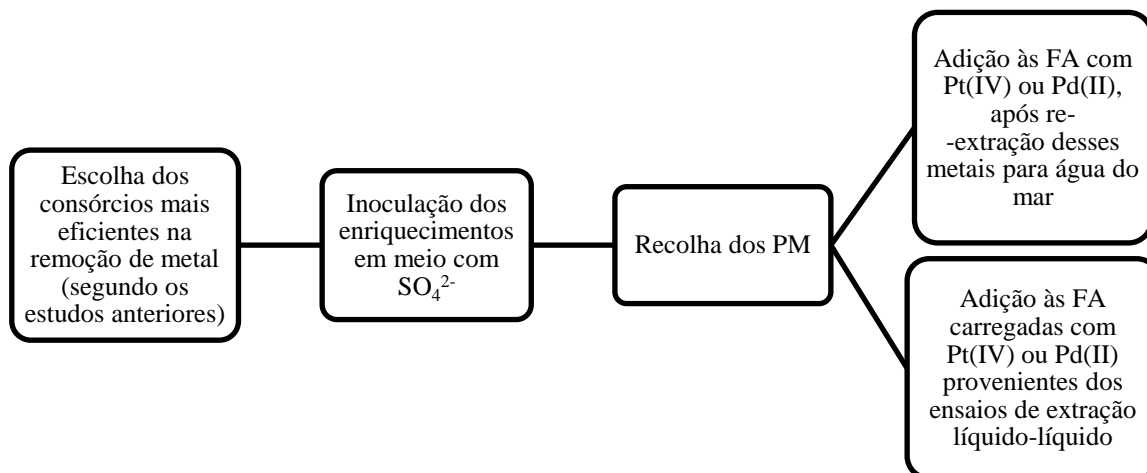
Os ensaios de extração líquido-líquido encontram-se em desenvolvimento no laboratório onde decorreu a realização deste trabalho e incidem sobre a recuperação de PGM. Uma vez que destes estudos resultam várias soluções carregadas com o metal resolveu-se aproveitar essas soluções (visto que os PGM são bastante dispendiosos) e, por via biológica, tentou-se remover os metais nelas existentes. A figura 3.2 mostra quais as fases carregadas que foram aproveitadas para os ensaios biológicos subsequentes.



**Figura 3.2 – Esquema dos ensaios de extração líquido-líquido para identificação das fases orgânicas e aquosas utilizadas nos estudos biológicos subsequentes. FA – Fase aquosa; FO – Fase orgânica.**

### **Ensaio de adição dos PM a fases aquosas contendo Pt(IV) ou Pd(II) resultantes de ensaios de extração e re-extração líquido-líquido**

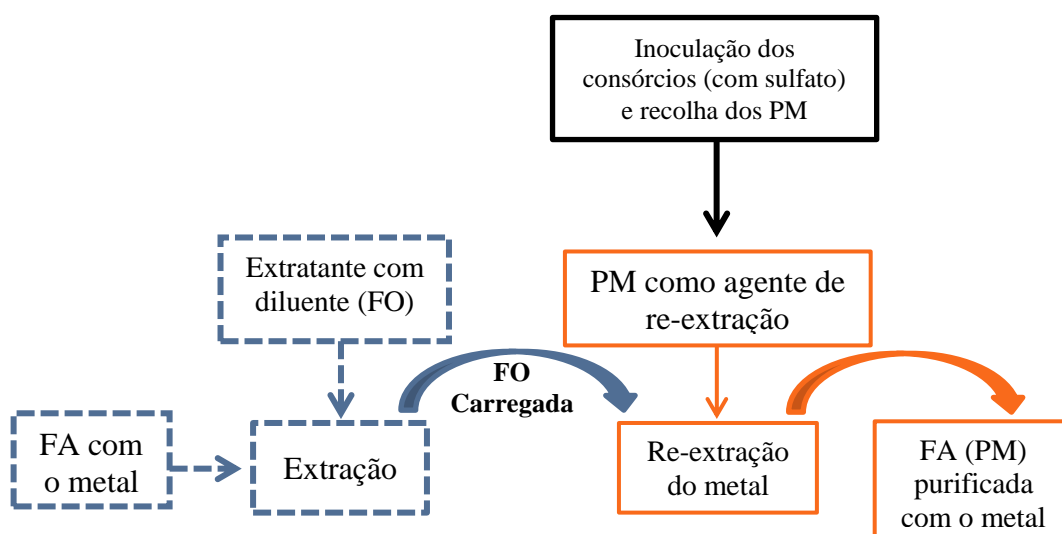
Este conjunto de ensaios descreve a adição dos PM a fases aquosas resultantes de ensaios de extração ou re-extração líquido-líquido contendo Pt(IV) e Pd(II). Esta etapa do trabalho pretendeu testar a capacidade dos PM na remoção/recuperação de metais (Pd e Pd) presentes em soluções existentes no laboratório que provêm dos ensaios de extração líquido-líquido. As fases orgânicas, carregadas com o metal, foram sujeitas a uma re-extração, de forma a transferir o metal para uma nova fase aquosa, usando como extratante a água do mar. No que respeita às fases aquosas carregadas com o metal os PM foram adicionados diretamente a estes. A figura 3.3 esquematiza os ensaios de adição dos PM às FA contendo PGM.



**Figura 3.3 - Esquema geral dos ensaios de adição dos Produtos Metabólicos a fases aquosas resultantes da re-extração ou extração com Pt(IV) ou Pd(II).**

### Ensaios de re-extração líquido-líquido de fases orgânicas carregadas com Pt (IV) ou Pd(II) usando os PM como agentes de re-extração

Neste capítulo foram realizados ensaios de re-extração usando fases orgânicas carregadas com Pt(IV) e Pd(II) existentes no laboratório e os PM como agente re-extratante. Este ensaio teve o objetivo de testar a capacidade dos PM (que demonstraram maior eficiência na remoção de metal nos estudos anteriores) na re-extração direta dos metais presentes em fases orgânicas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II). A figura 3.4 representa o esquema geral destes ensaios, onde a azul estão representados os ensaios de extração líquido-líquido e a cor-de-laranja os ensaios de re-extração.



**Figura 3.4 – Esquema geral dos ensaios de re-extração líquido-líquido de fases orgânicas carregadas com Pt (IV) ou Pd(II) usando PM (que mostraram ser os mais eficientes) como agentes de re-extração.**

A figura 3.5 resume, esquematicamente, todos os ensaios realizados ao longo deste trabalho.

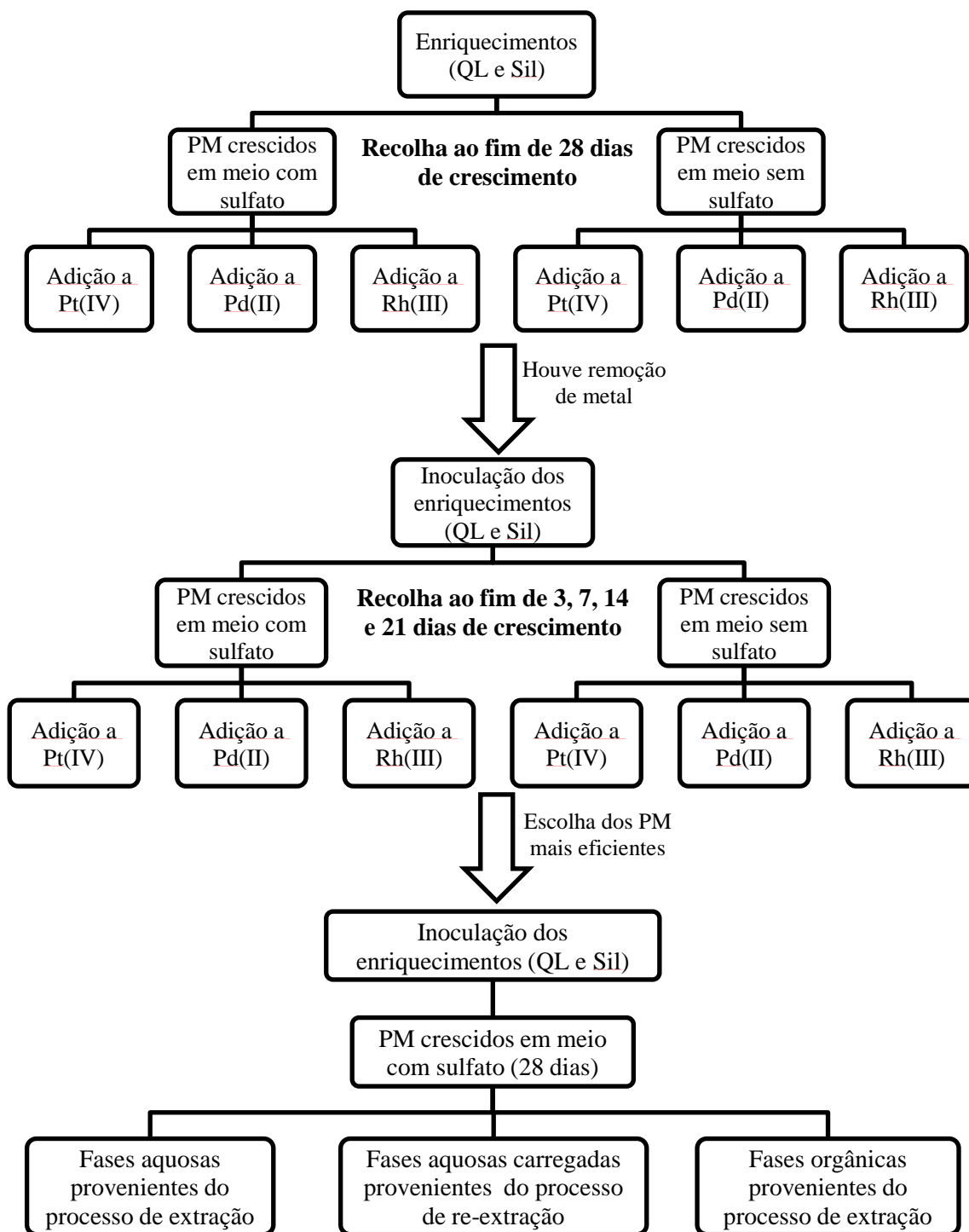


Figura 3.5 – Esquema resumo de todos os estudos efetuados neste trabalho.

## 4. Materiais e Métodos

---

### Reagentes e Equipamentos

Na elaboração deste trabalho foram utilizados diversos reagentes e equipamentos que se apresentam descritos no anexo 5.

### Consórcios

Os consórcios bacterianos usados neste trabalho foram enriquecidos a partir de lamas que foram recolhidas na ETAR de Quinta do Lago (lamas sólidas) e na ETAR de Silves (lamas sólidas). A colheita destas amostras foi feita no processo de secagem e portanto tratam-se de lamas desidratadas com polímero. Optou-se por este local para a recolha das lamas uma vez que imediatamente antes deste passo encontra-se um digestor de lamas onde não há entrada de ar favorecendo o crescimento e desenvolvimento de bactérias anaeróbias, que são as que se pretende usar neste trabalho. A figura 4.1 apresenta o equipamento onde foi efetuada a recolha das lamas sólidas de uma das ETARs. Após a colheita de cada uma das lamas (efetuadas a 22 de Março de 2012) procedeu-se ao seu armazenamento em recipientes próprios para o efeito e à sua identificação. As amostras recolhidas foram posteriormente guardadas no frio ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), até à data da sua utilização.



**Figura 4.1 – Recolha das lamas sólidas numa ETAR.**

## Meios de Crescimento

Os meios de crescimento bacteriano utilizados neste trabalho foram sujeitos inicialmente a testes de solubilidade dos PGM estudados (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)). Esta otimização dos meios pretendeu garantir que o metal não precipitava quimicamente com nenhum dos componente do meio e que se, mantinha a qualidade do crescimento bacteriano (ou seja contendo os nutrientes necessários ao crescimento). Desta forma assegura-se que o metal está solúvel no meio e que a remoção deste é causada pelos PM e não pelos componentes químicos do meio. O meio utilizado nos ensaios foi o meio Postgate C modificado que é um meio eficiente para o crescimento de SRB [24], quando contém  $\text{SO}_4^{2-}$ , e para o crescimento de outras bactérias que não as SRB na ausência de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Na tabela 4.1 apresenta-se a composição dos meios usados (Postgate C modificado com e sem  $\text{SO}_4^{2-}$ ) e o meio Postgate C original para comparação.

**Tabela 4.1 - Constituição dos meios usados para o enriquecimento de ambos os consórcios.**

Componentes	Meio Postgate C	Meio Postgate C	Meio Postgate C
	Original (g/L)	modificado com $\text{SO}_4^{2-}$ (g/L)	modificado sem $\text{SO}_4^{2-}$ (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,50	0,50	0,50
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0	1,0	1,0
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4,5	2,5	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,060	0,089	0,089
Extrato de Levedura	1,0	1,0	1,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0040	0,0071	0,0071
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,060	0,060	-
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0,048
Citrato de Trisódio	0,30	0,30	0,30
Ácido Ascórbico	-	0,10	0,10
Ácido Tioglicólico	-	0,081*	0,081*
Lactato de Sódio	6,0	6,0	6,0
Resazurina	-	3,2 **	3,2**

\* Este componente é líquido portanto adicionou-se 0,081 mL/L.

\*\* Esta quantidade (em mL) provém de uma solução de 0,1 g/L. A resazurina é um indicador do oxigénio presente no meio (quando existe oxigénio no meio este fica com uma tonalidade cor-de-rosa, ficando incolor na ausência de oxigénio).

Os constituintes do meio foram pesados numa balança analítica (Shimadzu, AW 220) e fez-se o volume adequado com água destilada. Posteriormente acertou-se o pH, por adição de uma base (hidróxido de sódio (NaOH)) ou de um ácido (ácido clorídrico (HCl)) até valores entre  $6,8 \pm 0,1$  e  $7,4 \pm 0,1$  medidos num medidor de pH (GLP 21, Crison). Os meios foram esterilizados em calor húmido a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 20 min (min) na autoclave (Uniclave88, 44x60, AJC).

A figura 4.2 ilustra um dos meios de crescimento usados neste trabalho laboratorial depois de ser esterilizado por calor húmido.



**Figura 4.2 – Meio Postgate C modificado depois de esterilizado por calor húmido.**

### Enriquecimento dos Consórcios

Cada consórcio foi enriquecido em anaerobiose em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  para promover o crescimento de bactérias sulfato-redutoras (SRB) e em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  para promover o crescimento de outras bactérias anaeróbias que se encontrem nas lamas.

Para tal pesou-se 10 g (10% p/v de inóculo) de cada amostra (lamas de QL e de Sil) numa balança (Kern, 440-35 N) e adicionou-se a frascos de inóculo de 100 mL (estéreis). Acrescentou-se depois a cada frasco 100 mL de meio previamente esterilizado.

De forma a alcançar condições anaeróbias purgou-se o meio com azoto gasoso, à superfície, durante aproximadamente 5 min e adicionou-se cerca de 10 mL de parafina líquida estéril para evitar trocas gasosas.

Por fim, selou-se os frascos com uma tampa de borracha e outra de alumínio próprias para frascos injetáveis com o auxílio de um encapsulador (Supelco, USA). Os inóculos foram mantidos à temperatura ambiente durante os 28 dias de incubação (tempo durante o qual decorreu o ensaio). A figura 4.3 ilustra o enriquecimento das lamas nos frascos de inóculo.



**Figura 4.3 - Enriquecimentos dos diferentes consórcios.**

Este procedimento foi realizado na câmara de fluxo laminar (Faster, BH-EN 2003), de forma a garantir as condições de esterilidade do ensaio. Para este ensaio realizaram-se 6 réplicas para cada um dos meios de cada consórcio e controlos negativos (meio de crescimento sem inóculo), em duplicado, de cada um dos meios.

O esquema ilustrativo deste procedimento encontra-se no anexo 6.

### Inoculação dos Consórcios

No decorrer do trabalho houve ensaios onde se retiraram os PM de ensaios dos enriquecimentos das lamas e outros onde os PM foram recolhidos de ensaios de inoculações desses enriquecimentos.

As condições de crescimento nos ensaios de inoculação foram as mesmas dos enriquecimentos das lamas. Para o crescimento dos inóculos utilizaram-se os mesmos meios que haviam sido utilizados nos enriquecimentos, ou seja, meio Postgate C modificado com  $\text{SO}_4^{2-}$  e meio Postgate C modificado sem  $\text{SO}_4^{2-}$  (tabela 4.1).

A percentagem de inóculo por *batch* foi 10% (v/v), nos enriquecimentos e nas inoculações. Para o efeito retirou-se 10 mL de cada cultura (enriquecimento de QL e de Sil) com o auxílio de uma agulha e seringa estéreis que se colocou em tubos falcon de 15 mL também estéreis. Procedeu-se à lavagem das células. Para tal centrifugou-se a

4000 rpm durante 10 min (Hettich Zentrifugen, Rotofix 32 A), descartou-se o sobrenadante resultante e ressuspendeu-se o *pellet* em 2 mL do respetivo meio. Voltou-se a centrifugar os tubos falcon a 4000 rpm durante 10 min, descartou-se novamente o sobrenadante e voltou-se a ressuspender o *pellet* desta vez com 1 mL do respetivo meio. Concluída a lavagem das células, adicionou-se a cultura aos frascos de inóculo já com 100 mL de meio esterilizado e previamente purgado com azoto gasoso durante cerca de 5 min, para garantir condições de anaerobiose. De seguida adicionou-se aproximadamente 10 mL de parafina líquida estéril para assegurar que não ocorrem trocas gasosas entre o meio e o ar que existe no frasco.

Por fim, selou-se os frascos com uma tampa de borracha e outra tampa de alumínio próprias para frascos injetáveis com o auxílio do encapsulador. Guardou-se os inóculos à temperatura ambiente durante todo o tempo em que decorreu o ensaio (21 ou 28 dias, consoante o ensaio).

Tal como nos enriquecimentos, o procedimento foi realizado na camara de fluxo laminar de forma a garantir as condições de esterilidade do ensaio. Fizeram-se 6 réplicas para cada um dos meios de cada consórcio e controlos negativos (apenas meio de crescimento sem inóculo), em duplicado, de cada um dos meios. A figura 4.4 ilustra os *batch* das inoculações dos consórcios. No anexo 7 encontra-se um esquema ilustrativo deste procedimento.



**Figura 4.4 – Inóculos dos diferentes consórcios.**

## Análise dos parâmetros de crescimento bacteriano

Em todos os ensaios realizados foram utilizados PM provenientes de dois consórcios distintos. Inicialmente procedeu-se ao enriquecimento desses consórcios e posteriormente realizaram-se inoculações desses enriquecimentos para outros estudos. Tanto nos enriquecimentos como nas inoculações a atividade bacteriana foi seguida através da análise de diferentes parâmetros, tais como: análise do potencial redox (eh), pH, concentração de sulfato e crescimento bacteriano. Essas análises foram realizadas ao dia zero, 1º dia, 7º dia e semanalmente até ao 28º dia de crescimento bacteriano.

Para a medição dos parâmetros recolheu-se cerca de 3 mL de amostra para um tubo falcon de 15 mL com auxílio de agulha e seringa estéreis. As amostras provenientes dos enriquecimentos são amostras que contêm bastante lama e portanto centrifugaram-se essas amostras a 4000 rpm durante 10 min, enquanto as amostras provenientes das inoculações foram centrifugadas a 4000 rpm durante apenas 5 min. Após centrifugação, efetuou-se a análise do eh e do pH. A análise da concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  efetuou-se através de um espectrofotómetro de UV-Visível (UV-Vis) (Hach-Lange DR2800 EUA) usando o método SulfaVer 4 (VWR) [17].

Uma vez que os enriquecimentos foram realizados a partir das lamas não foi possível determinar a densidade ótica ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) e conseqüentemente monitorizar o crescimento bacteriano através deste método. Assim sendo, a atividade bacteriana nos enriquecimentos foi monitorizada através da análise da fonte de carbono (lactato). Nas inoculações analisou-se o crescimento bacteriano através da análise da  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ .

Para analisar a concentração de lactato usou-se um kit (SPINREACT), baseado num teste colorimétrico enzimático, que originou um tom cor-de-rosa, cuja intensidade é proporcional à concentração de lactato existente na amostra. A absorvância foi medida num espectrofotómetro (BIOTEK, Synergy4, Programa Informático Gen5) ao comprimento de onda de 505 nm.

O crescimento bacteriano das inoculações foi monitorizado através do método baseado no aumento da turbidez do meio (a turbidez aumenta devido ao aumento do crescimento bacteriano). Para medir a  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  retirou-se mais 1 mL de amostra e colocou-se numa cuvete. A  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  foi imediatamente analisada através de um espectrofotómetro de UV-Vis a um comprimento de onda de 600 nm [3].

No anexo 8 é possível ver um esquema simplificado do processo descrito acima.

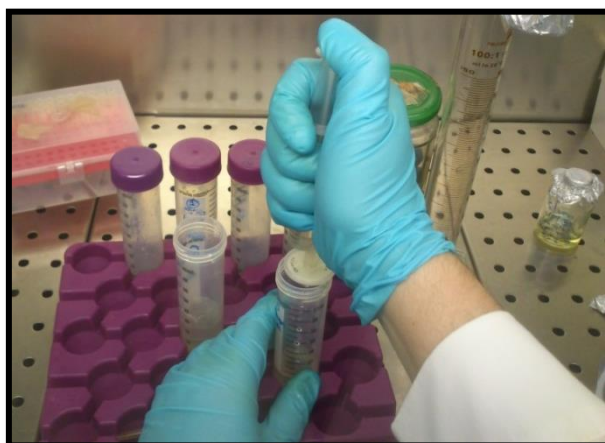
## Recolha dos PM

Recolheu-se cerca de 30 mL de amostra de cada consórcio (QL e Sil) para um tubo falcon de 50 mL usando uma seringa e agulha. Seguidamente, centrifugou-se a amostra a 4000 rpm durante 10 min.

Recolheu-se, cuidadosamente, o sobrenadante com uma agulha e seringa e filtrou-se esse sobrenadante com um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Filter Device, Puradisc™ 25 AS) para um novo tubo falcon de 50 mL.

Ao proceder-se a uma filtração por um poro de 0,22  $\mu\text{m}$  as bactérias ficam retidas no filtro, recolhendo-se apenas os PM e outros componentes do meio para o novo tubo falcon. A figura 4.5 ilustra a filtração que é realizada para a obtenção dos PM.

O material utilizado no decorrer deste ensaio encontrava-se estéril.



**Figura 4.5 – Filtração do sobrenadante da amostra recolhida dos consórcios para obtenção dos PM.**

### Ensaio de adição dos PM a soluções aquosas contendo PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III))

Estes estudos tiveram o objetivo de testar a capacidade dos PM na remoção de metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)), em diferentes tempos do crescimento bacteriano. Começou-se por verificar a capacidade de remoção destes metais com os PM recolhidos a partir dos enriquecimentos. Uma vez confirmada a capacidade de remoção de PGM por parte dos PM, prosseguiram-se os estudos. Assim, no segundo ensaio testou-se a capacidade de remoção dos PGM por parte dos PM recolhidos a diferentes tempos de crescimento. Os

PM utilizados neste ensaio foram recolhidos das inoculações que se realizaram a partir dos enriquecimentos. No final destes dois ensaios verificou-se quais os PM com melhor eficiência na remoção do metal e repetiu-se o ensaio em duplicado.

#### **Adição dos PM, recolhidos no final do ensaio de enriquecimento, aos PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III))**

Como já foi referido, este primeiro ensaio teve como objetivo perceber se os PM realmente apresentavam capacidade de remover metais de soluções aquosas. Para tal recolheram-

-se os PM, dos consórcios de QL e de Sil, ao fim dos 28 dias de enriquecimento com e sem  $\text{SO}_4^{2-}$  (estes 28 dias correspondem ao fim do ensaio). Assim, procedeu-se à recolha dos PM aplicando o procedimento já descrito em “Recolha dos PM” de ambos os consórcios e de ambos os meios (página 35).

Partindo de uma solução padrão de PGM com uma concentração de 1000 mg/L do respetivo metal, adicionou-se o volume correspondente de forma a se obter no final uma concentração de 100 mg/L. Esse volume variou consoante o volume final do *batch*.

Para este ensaio adicionaram-se 3 mL de Pt (IV) ou, Pd (II) ou, Rh(III) a um frasco de inóculo de 30 mL previamente esterilizado. Adicionou-se, aos 3 mL da solução padrão de metal, 27 mL dos PM (volume final por *batch*: 30 mL). Para simular as condições de anaerobiose fez-se uma purga com azoto gasoso durante cerca de 2 min. Selou-se os frascos com uma tampa de borracha e outra de alumínio, com o encapsulador. Os frascos mantiveram-se à temperatura ambiente durante os 28 dias de duração do ensaio.

Este ensaio foi realizado na câmara de fluxo laminar de forma a garantir as condições de esterilidade durante o ensaio. Como já foi referido, como se trata de um estudo moroso e dispendioso não foram feitas réplicas.

No anexo 9 esquematiza-se este procedimento.

#### **Adição dos PM recolhidos ao longo do tempo de crescimento (inoculações dos enriquecimentos) aos PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III))**

O primeiro estudo permitiu perceber que os PM apresentam capacidade de recuperar/remover metais de soluções aquosas. Assim prosseguiu-se para o ensaio

seguinte que pretendeu estudar a eficiência dos PM na remoção do metal ao longo do crescimento bacteriano.

Para a realização deste ensaio procedeu-se à inoculação dos consórcios de QL e de Sil segundo o procedimento já descrito anteriormente (“Inoculação dos Consórcios” na página 32). Extraíram-se os PM desses inóculos ao 3º dia, 7º dia, 14º dia e ao 21º dia de crescimento bacteriano. A recolha dos PM foi realizada de acordo com o procedimento descrito acima (“Recolha dos PM” na página 35). A recolha dos PM foi acompanhada pela análise dos parâmetros dos consórcios ( $\epsilon$ h, pH, concentração de sulfato e OD<sub>600nm</sub>), para perceber em que condições se encontravam os inóculos na altura em que se colocaram em contacto com as soluções aquosas contendo os PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)). A análise destes parâmetros seguiu o protocolo descrito anteriormente (“Análise dos parâmetros de crescimento bacteriano”, página 34).

Após recolha dos PM procedeu-se à adição dos mesmos aos diferentes PGM em estudo (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)), segundo o procedimento descrito acima (“Adição dos PM, recolhidos no final do ensaio de enriquecimento, aos PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III))”, página 36). A diferença entre os dois ensaios residiu apenas no volume final por *batch* que neste ensaio foi de 20 mL e no anterior foi de 30 mL. Para isso adicionou-se 18 mL dos PM a 2 mL de Pt(IV), Pd(II) ou Rh(III) (solução padrão com 1000 mg/L) obtendo-se uma concentração final de 100 mg/L de cada metal. A esquematização deste protocolo encontra-se no anexo 9.

Uma vez que este estudo é bastante moroso e necessita de uma grande quantidade de PM e de metal (tornando o ensaio dispendioso), não foram feitas réplicas.

Após análise dos resultados, escolheram-se os PM que mostraram melhor eficiência na remoção dos metais e com o objetivo de provar a fidelidade destes resultados obtidos repetiu-se o ensaio, desta vez com duplicados. As condições dos inóculos antes da recolha dos PM e após o contacto entre o metal e os PM mantiveram-se iguais às do estudo anterior.

### Análise dos parâmetros do contacto entre os PGM e os PM

Os ensaios realizados nos quais o metal esteve em contacto com os PM, tiveram uma duração de 28 dias. Durante este período, analisaram-se diferentes parâmetros, ao longo do tempo, de maneira a perceber se estava a ocorrer a recuperação/remoção do metal (com conseqüente precipitação deste) por parte dos PM. Os parâmetros analisados

foram o  $\epsilon$ , o pH, a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$ , a concentração de metal e a análise do precipitado obtido. As análises a estes parâmetros foram realizadas ao tempo zero de contacto entre o metal e os PM (tempo imediatamente a seguir ao contacto), ao fim de 1 hora de contacto (0,042 dias), após 3 dias, ao 7º dia e semanalmente até ao 28º dia.

Para realizar estas análises recolheu-se 2 mL de amostra com uma agulha e seringa estéril (figura 4.6) e colou-se num falcon de 15 mL.



**Figura 4.6 – Recolha da amostra para análise dos parâmetros após contacto entre os PGM e os PM.**

Centrifugou-se a amostra durante 5 min a 4000 rpm, mediu-se primeiramente o potencial redox seguido da determinação da concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  no espectrofótopmetro UV-Vis e do pH. A concentração de metal foi medida através de Espectroscopia de Absorção Atómica (AAS) com chama (Varian, Spectr AA-20). Este equipamento permite determinar a concentração de metal existente numa solução através da absorção de luz visível ou ultravioleta que incide sobre os átomos do metal, sendo a absorção de radiação diretamente proporcional à concentração do mesmo. A figura 4.7 mostra o espectrofótopmetro de AAS usado neste trabalho para a análise dos metais em solução.



**Figura 4.7 – A) Espectrofótopmetro de Absorção Atómica. B) Análise de amostras no AAS de chama.**

Por fim, centrifugou-se novamente a restante amostra a 5000 rpm durante 15 min (Hettich Zentrifugen, Universal 320), desprezou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado formado ao longo do ensaio numa estufa de vácuo (Binder, VDL) a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Esse precipitado foi recuperado e analisado por Difração de Raio-X (XRD) (X'Pert Pro, PANalytical) (figura 4.8). Com a análise por XRD pretendia-se perceber se o precipitado obtido era cristalino e sob que forma cristalina se encontrava o metal. A XRD faz incidir um feixe de raios-X sobre a estrutura sólida desconhecida. Ao incidir, a luz é difratada pelo cristal e os ângulos das difrações indicam a estrutura cristalina da amostra. Como cada cristal tem uma estrutura própria (como impressões digitais) consegue-se saber que cristal ou cristais estão na amostra.



**Figura 4.8 – Equipamento de Difração de raios-X (X'Pert Pro, PANalytical) utilizado no decorrer deste trabalho.**

O precipitado formado nalguns estudos, foi ainda analisado por Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM, Hitachi, 3700N) acoplada a um Espectrómetro de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS, Bruker, Xflash 5010) (SEM-EDS) para a determinação da composição química e morfológica da amostra. A energia de aceleração dos eletrões utilizada foi de 20 kV em modo de pressão variável (as amostras foram analisadas com uma pressão de 30 Pa). O microscópio eletrónico de varrimento emite um feixe de eletrões que vai percorrer toda a superfície da amostra. Quando o feixe atinge a amostra são formados novos eletrões que ao serem apanhados pelo detetor são convertidos em imagem. A imagem apresentada é uma imagem virtual, uma vez que se trata de uma descodificação da energia emitida pelos elementos da amostra. O detetor de energia dispersiva de raios-X é um elemento importante na identificação dos componentes da

amostra. Ao incidir um feixe de eletrões sobre a amostra, os eletrões são excitados e quando retornam ao seu estado fundamental libertam energia com comprimento de onda no espectro de raios-X. Como cada eletrão de um determinado átomo possui uma energia única é possível determinar os elementos químicos que se encontram na amostra. A figura 4.9 representa o SEM-EDS utilizado neste trabalho (laboratório Hércules da Universidade de Évora).



**Figura 4.9 – SEM-EDS (Hitachi 3700N; Bruker Xflash 5010) utilizado para análise dos precipitados obtidos neste trabalho.**

O esquema que ilustra o processo descrito encontra-se no anexo 10.

Ensaio de adição dos PM a fases aquosas contendo Pt(IV) ou Pd(II) resultantes de ensaios de extração e re-extração líquido-líquido

Os ensaios descritos em seguida consistem da adição dos PM a fases aquosas contendo Pt(IV) ou Pd(II). Estas fases são resultantes de ensaios de extração líquido-líquido e re-extração previamente realizados no laboratório.

Como referido anteriormente, no laboratório onde decorreu este trabalho desenvolvem-se estudos químicos e biológicos de remoção/recuperação de metais raros e preciosos, nomeadamente de paládio e platina. Os estudos químicos baseiam-se sobretudo em ensaios de extração líquido-líquido que, por sua vez, originam soluções contendo Pt(IV) e Pd(II). Uma vez que estes metais são bastante dispendiosos pretende-se reaproveitar estas soluções e aplicá-las em estudos biológicos.

Quando as fases orgânicas (FO) estão carregadas com o metal requerem uma re-extração para uma fase aquosa (FA) de *stripping*, enquanto as fases aquosas contendo o metal podem ser diretamente utilizadas.

A primeira parte deste estudo recaiu sobre a utilização das soluções orgânicas contendo o metal (Pt(IV) ou Pd(II)). Como as fases orgânicas e os PM não são miscíveis, foi necessário recorrer à re-extração do metal dessas FO para uma fase de *stripping* (água do mar). A esta fase, contendo o metal, adicionaram-se os PM.

Na segunda parte deste estudo adicionaram-se os PM diretamente a fases aquosas contendo Pt(IV) ou Pd(II), também estas provenientes de ensaios de extração líquido-líquido. Neste caso, como já se tratam de fases aquosas com o metal, não foi necessário recorrer à re-extração do metal como aconteceu no primeiro estudo.

Os ensaios apresentados neste capítulo utilizam, uma vez mais, os PM para recuperar/remover os metais (Pt(IV) ou Pd(II)). Para estes estudos selecionaram-se, dos ensaios anteriores, os PM que mostraram ser os mais eficientes na remoção de metal, ou seja, os PM de ambos dos consórcios de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .

#### **Adição dos PM a fases orgânicas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II) provenientes de ensaios de extração líquido-líquido**

Nestes ensaios utilizaram-se as fases orgânicas carregadas com o metal e re-extraiu-se o metal para a água do mar (agente re-extratante ou de *stripping*). A água do mar, em estudos anteriormente desenvolvidos no laboratório, mostrou-se um eficiente re-extratante de PGM, tendo por isso sido utilizada. A Pt(IV) e o Pd(II) facilmente formam cloro-complexos [55, 56] e uma vez que a água do mar contém bastantes cloretos disponíveis [57] torna-se um bom re-extratante destes metais.

Para a realização deste ensaio de re-extração (ensaio químico) colocou-se num balão de Erlenmeyer de 50 mL, 15 mL da fase orgânica carregada (com Pt(IV) e com Pd(II)) e 15 mL de água do mar (extratante) que representa a fase aquosa (numa porção 1:1). Levou-se a solução imiscível a agitar com magneto na placa de agitação (VWR, Advanced VMS-C7) entre 900 e 1000 rpm durante 30 min. Concluída a agitação colocou-se a mistura numa ampola de decantação (figura 4.10) e esperou-se que as duas fases se separassem. A fase orgânica ficou em baixo pois é a fase mais densa.



**Figura 4.10 – Ensaio de extração líquido-líquido usando como agente de *stripping* a água do mar e as FO provenientes de outros ensaios de extração líquido-líquido. A fase que exibe a cor amarela representa a fase aquosa (menos densa, fica por cima) e a fase mais clara representa a fase orgânica (mais densa, fica em baixo).**

De seguida, recolheu-se a fase orgânica para um frasco de vidro filtrando-a com um filtro de pregas (Filter Papers, Whatman<sup>TM</sup>) e seguidamente recolheu-se a fase aquosa possivelmente carregada com Pt(IV) ou Pd(II) (caso tenha ocorrido re-extração) para um tubo falcon de 15 mL (VWR), tendo sido também filtrada com um filtro de pregas (Filter Papers, Whatman<sup>TM</sup>). A interfase foi desprezada.

O ensaio de re-extração realizou-se na *hotte* (Industrial Laborum Ibérica, SA) em duplicado. Este procedimento encontra-se esquematizado no anexo 11.

A fase aquosa resultante da re-extração foi analisada por AAS com o propósito de saber se tinha ocorrido re-extração do metal para esta fase.

Tal como referido anteriormente os PM utilizados neste estudo provêm das inoculações dos consórcios de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ . Tanto as inoculações como a recolha dos PM foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos anteriormente (página 32e 35, respetivamente).

Uma vez obtidas as FA de *stripping* (água do mar) contendo Pt(IV) ou Pd(II), procedeu-se à adição dos PM ao metal (FA purificada). Para tal, colocou-se num frasco de inóculo de 30 mL, previamente esterilizado por calor húmido, 10 mL da FA (com Pt(IV) ou

com Pd(II)) e adicionou-se 10 mL dos PM (QL ou Sil). Realizou-se uma purga com azoto gasoso durante 2 min e, por fim, selou-se os frascos. Os *batch* foram conservados à temperatura ambiente durante os 28 dias. O esquema deste procedimento é idêntico ao esquema do anexo 9. O ensaio foi realizado em duplicado.

Ao longo deste averiguou-se a ocorrência de remoção de Pt e de Pd das FA carregadas pela ação dos PM dos dois consórcios crescidos em meio com sulfato. Para isso, recorreu-se à análise dos parâmetros descritos anteriormente (página 37). Uma vez que a quantidade de precipitado obtido neste estudo foi reduzida, não se efetuaram as análises aos precipitados.

#### **Adição dos PM a fases aquosas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II) provenientes de ensaios de extração líquido-líquido**

O segundo ensaio utilizou as soluções aquosas produzidas durante os ensaios de extração líquido-líquido. Os PM utilizados foram os mesmos dos ensaios anteriores.

O procedimento de adição dos PM às FA carregadas é idêntico ao referido anteriormente (página 41). Analisaram-se os parâmetros, tal como no ensaio anterior e também neste caso os precipitados não foram analisados. O procedimento é idêntico ao esquematizado no anexo 9.

#### **Ensaio de re-extração líquido-líquido de fases orgânicas carregadas com Pt (IV) ou Pd(II) usando os PM como agentes de re-extração**

Uma vez que nos dois ensaios anteriores os PM mostraram boa capacidade na remoção de Pd(II), neste capítulo testou-se a capacidade direta dos PM como agente re-extratante. Para tal, foi realizado um ensaio de re-extração líquido-líquido no qual se usaram fases orgânicas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II) provenientes dos ensaios de extração líquido-líquido e os PM como agente re-extratante. Tal como nos ensaios anteriores, usaram-se os PM de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ . O ensaio de re-extração foi idêntico ao ensaio de re-extração do estudo anterior onde foi usado como agente re-extratante a água do mar. O ensaio foi realizado em duplicado. O esquema ilustrativo deste último ensaio encontra-se indicado no anexo 12.

Com o objetivo de saber se ocorreu ou não extração do metal da fase orgânica para a fase aquosa analisou-se o metal nesta fase, através de AAS com chama.

## 5. Resultados e Discussão

---

Ensaio de adição dos PM a soluções aquosas contendo PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III))

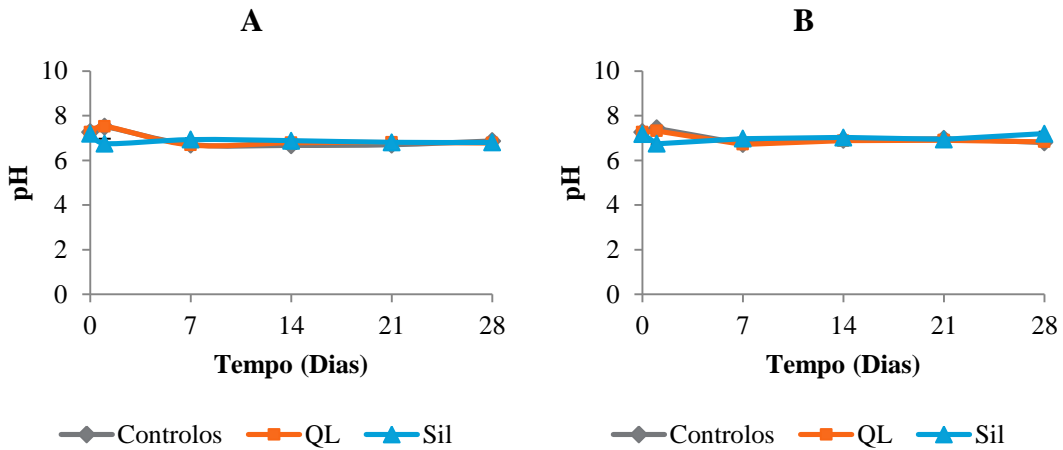
O objetivo deste estudo foi testar a capacidade dos PM na remoção dos metais (Pt(IV), Pd(II) ou Rh(III)). Para tal, os PM de ambos os consórcios (QL e Sil) crescidos em ambos os meios (com e sem  $\text{SO}_4^{2-}$ ) foram recolhidos em diferentes tempos de incubação durante o crescimento bacteriano. Este estudo dividiu-se em três partes: a primeira parte corresponde à adição dos PM recolhidos dos enriquecimentos das lamas ao fim de 28 dias de crescimento a soluções aquosas contendo (Pt(IV), Pd(II) ou Rh(III)). Uma vez que se verificou que os PM removiam o metal de soluções aquosas prosseguiu-se para a segunda parte deste estudo: verificar se o tempo de crescimento dos consórcios bacteriano tem influência na remoção de metais (Pt(IV), Pd(II) ou Rh(III)) presentes em soluções aquosas. Nestas duas primeiras partes do estudo foram realizados ensaios sem réplicas uma vez que são bastante morosos e dispendiosos. A terceira parte deste estudo teve o objetivo de confirmar os melhores resultados obtidos nas duas partes anteriores, portanto realizaram-se os ensaios em duplicado.

**Adição dos PM, recolhidos no final do ensaio de enriquecimento, aos PGM (Pt(IV), Pd (II) ou Rh(III))**

Como referido anteriormente, os PM utilizados neste ensaio foram retirados dos consórcios de QL e de Sil enriquecidos em meio com e sem sulfato. Inicialmente procedeu-se ao enriquecimento das duas culturas mistas de bactérias (QL e Sil) utilizando dois meios de crescimento, um com  $\text{SO}_4^{2-}$  para promover o crescimento de SRB e outro sem  $\text{SO}_4^{2-}$  para promover o crescimento de outras bactérias existentes nas lamas. O crescimento bacteriano foi controlado através da determinação do  $\text{e}_h$ , do pH, da concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  e da concentração de lactato. As análises foram realizadas ao dia zero, 1º dia, 7º dia e semanalmente até ao 28º dia de crescimento bacteriano.

Os resultados apresentados de seguida dizem respeito à média de seis réplicas. De notar que, por vezes as barras de erro são muito estreitas e por esta razão não são visíveis nos gráficos.

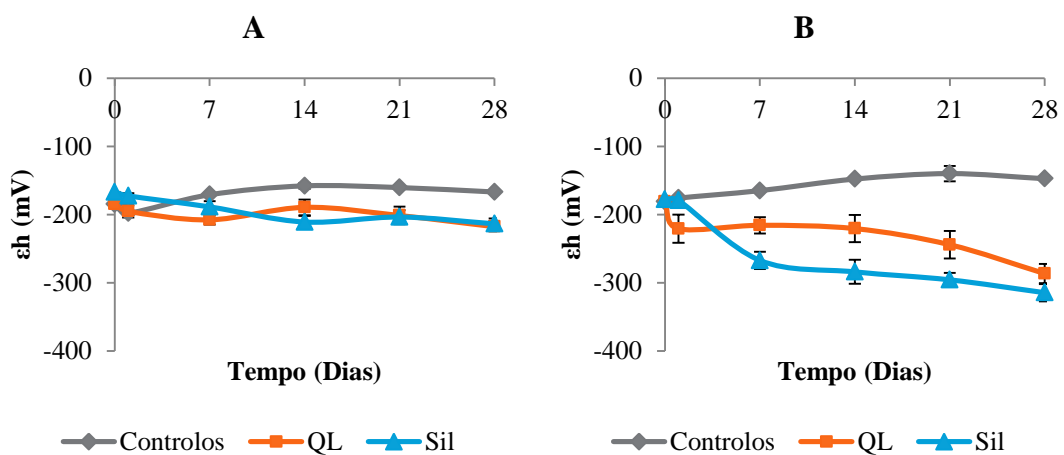
A figura 5.1 apresenta os gráficos do perfil de pH ao longo do ensaio.



**Figura 5.1 – Perfil de pH ao longo dos 28 dias de crescimento dos consórcios de QL e Sil em meio com e sem sulfato. A) corresponde ao meio de crescimento sem  $\text{SO}_4^{2-}$  e B) ao meio de crescimento com  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Os resultados obtidos mostraram que o pH se manteve constante e próximo de 7 ao longo do tempo de crescimento (28 dias) nos meios com e sem sulfato, tanto para o consórcio de QL como para o consórcio de Sil. Os controlos negativos aparecem sob os valores dos consórcios e uma vez que são semelhantes não se tornam perceptíveis nos gráficos.

A figura 5.2 apresenta o perfil de  $\epsilon h$  ao longo do ensaio.

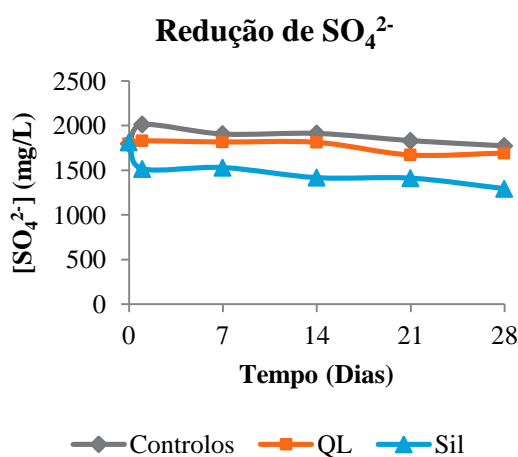


**Figura 5.2 – Perfil do  $\epsilon h$  ao longo dos 28 dias de crescimento dos consórcios de QL e Sil em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  (A) e com  $\text{SO}_4^{2-}$  (B).**

Analisando os consórcios enriquecidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.2 B)), observa-se que o potencial redox vai decrescendo em ambos os consórcios, enquanto nos controlos

positivos este parâmetro mantém-se praticamente constante. O consórcio de QL baixa até -280 mV e o de Sil atinge -315 mV. No que respeita ao meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.2 B)) os valores de  $\text{eh}$  mantiveram-se sensivelmente constantes próximos de -200 mV (tanto QL como Sil). Os diferentes resultados de  $\text{eh}$  podem indicar que no meio com sulfato ocorreram mais reações de redução, pois segundo Liu, *et al.* (2011) [58] quanto mais negativo for o  $\text{eh}$  mais reações de redução estão a ocorrer. No meio de crescimento sem  $\text{SO}_4^{2-}$  não ocorreu uma descida tão acentuada de  $\text{eh}$ , isto pode dever-se ao facto de não ocorrerem tantas reações de redução no meio, nomeadamente no que respeita à redução de  $\text{SO}_4^{2-}$ , que neste caso não ocorre. Contudo, em ambos os meios observa-se um decréscimo do  $\text{eh}$  o que indica que está a haver atividade bacteriana (metabolização dos componentes do meio) (figura 5.2 A)).

Na figura 5.3 apresentam-se os resultados da concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  ao longo do ensaio.



**Figura 5.3 – Perfil de redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  ao longo do tempo de crescimento (28 dias) das bactérias de ambos os consórcios em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Confrontando os resultados do  $\text{eh}$  com a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.3), pode-se observar que à medida que o sulfato vai desaparecendo do meio o  $\text{eh}$  vai diminuindo. Este resultado pode indicar que as reações de redução que estão a ocorrer no meio de crescimento se tratam, entre outras, da redução de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a sulfureto ( $\text{S}^{2-}$ ) [22; 59].

Embora não tenha havido uma grande redução de  $\text{SO}_4^{2-}$ , o consórcio de Sil reduziu mais  $\text{SO}_4^{2-}$  que o de QL (aproximadamente 28,5% e 6,2%, respetivamente), sendo o  $\text{eh}$  de Sil também um pouco mais negativo (aproximadamente -315 mV e -280 mV

respetivamente) (figura 5.2) O facto de Sil ter reduzido mais  $\text{SO}_4^{2-}$  que QL pode indicar que o consórcio de Sil é mais rico em SRB que o consórcio de QL. Tal como nos resultados acima, estes resultados dizem respeito à média de seis réplicas e as barras de erro, nas figuras 5.2 e 5.3, não são visíveis uma vez que são demasiado pequenas.

Como as amostras provêm das lamas o crescimento bacteriano não pode ser acompanhado pela análise da  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  pois as lamas tornam o meio bastante turvo. Portanto, para se poder acompanhar o crescimento bacteriano tentou analisar-se o consumo da fonte de carbono, lactato. O método utilizado para esta análise, baseado num teste colorimétrico enzimático não parece ser um método viável, provavelmente devido a interferências que podem ocorrer com os componentes do meio. Deste modo, o crescimento bacteriano nos enriquecimentos foi seguido apenas pelo decréscimo do potencial redox. Analisando a figura 5.2 pode-se verificar que em ambos os meios houve um decréscimo de  $\epsilon_h$  comparativamente aos controlos negativos, o que indica metabolização dos componentes do meio por perto das bactérias.

Após os 28 dias de crescimento retiram-se os PM de cada enriquecimento e colocaram-se em contacto com uma solução aquosa contendo 100 mg/L de Pt(IV), ou Pd(II) ou Rh(III). A tabela 5.1 mostra as condições em que se encontravam os enriquecimentos imediatamente antes da recolha dos PM (ao fim dos 28 dias de crescimento).

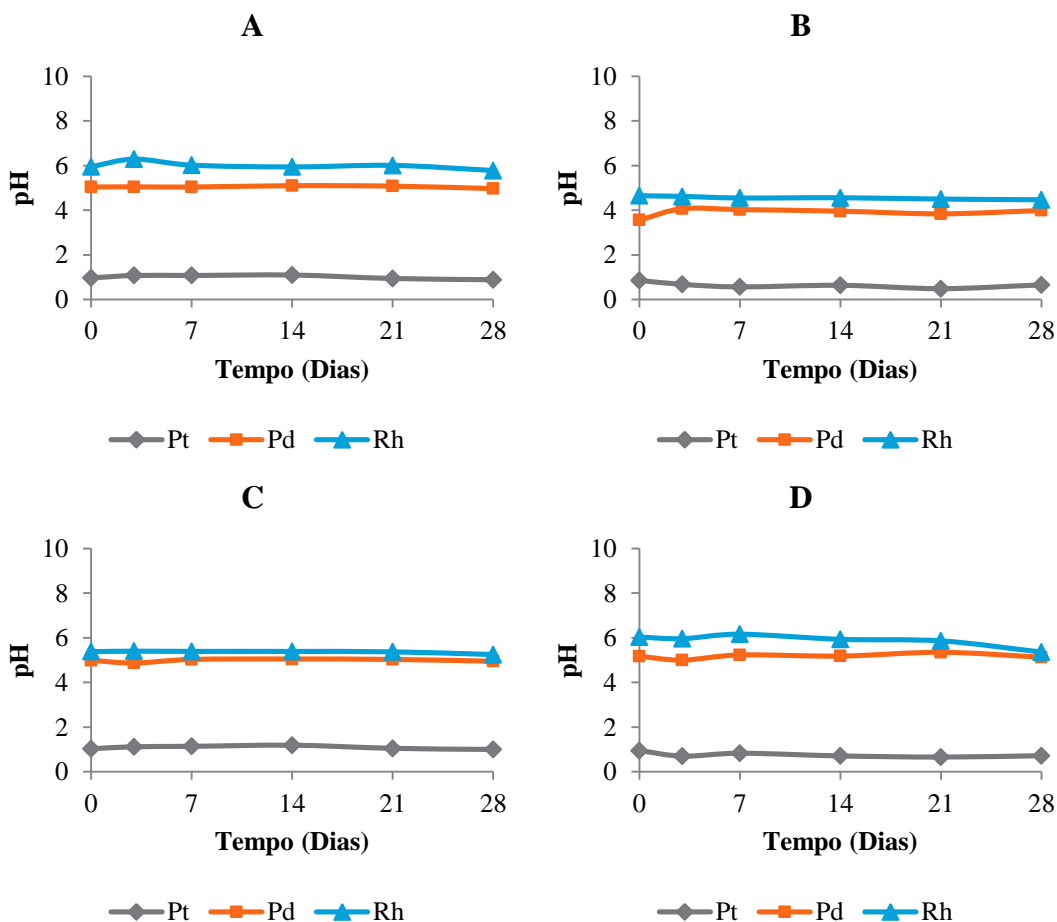
**Tabela 5.1 - Resultados dos parâmetros (média das seis réplicas e desvio padrão) dos consórcios QL e Sil em meios de crescimento com e sem  $\text{SO}_4^{2-}$  ao 28º dia de enriquecimento (imediatamente antes da recolha dos PM).**

<b>Parâmetros</b> <b>Consórcios</b>	<b><math>\epsilon_h</math> (mV)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração de</b> <b><math>\text{SO}_4^{2-}</math> (<math>\text{mgL}^{-1}</math>)</b>
<b>QL com <math>\text{SO}_4^{2-}</math></b>	$-308 \pm 2$	$6,83 \pm 0,08$	$1693 \pm 1$
<b>QL sem <math>\text{SO}_4^{2-}</math></b>	$-208 \pm 2$	$6,65 \pm 0,15$	-
<b>Sil com <math>\text{SO}_4^{2-}</math></b>	$-314 \pm 13$	$7,2 \pm 0,09$	$1294 \pm 2$
<b>Sil sem <math>\text{SO}_4^{2-}</math></b>	$-213 \pm 8$	$6,8 \pm 0,10$	-

A remoção dos metais pelos PM foi monitorizada pela análise de diversos parâmetros:  $\epsilon_h$ , pH, concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$ , concentração de metal em solução e análise do precipitado obtido. Este ensaio teve a duração de 28 dias. Os resultados apresentados

neste estudo referem-se apenas a um ensaio sem réplicas pois pretendeu-se saber inicialmente se os PM apresentavam capacidade de remoção de Pt(IV), Pd(II) e Rh(III) presentes em soluções aquosas.

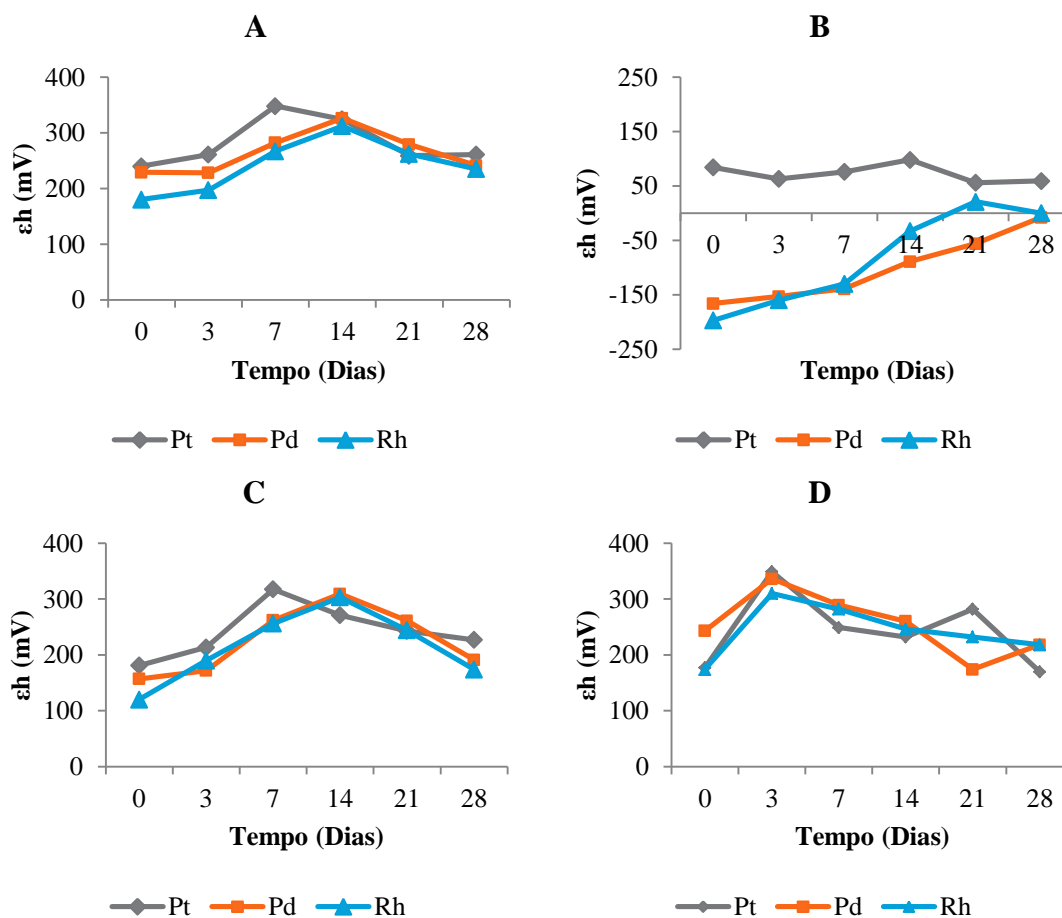
Na figura 5.4 apresentam-se os resultados de pH obtidos ao longo deste ensaio.



**Figura 5.4 - Perfil de pH obtido nos ensaios dos PM de QL e de Sil crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  (A) e B) respetivamente) e dos PM de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (C) e D) respetivamente).**

Como se pode notar na figura 5.4, devido à acidez das soluções padrão de metal, o pH da mistura resultante da adição dos PM baixou, dependendo essa descida do pH de cada solução padrão. No que respeita ao ensaio dos PM com Pt(IV) o pH diminuiu consideravelmente, para valores inferiores a 1. No caso do ensaio com Pd(II) o pH decresceu para valores próximos de 5 e nos ensaios com Rh(III) para valores de pH próximos de 6. Este decréscimo de pH ocorreu assim que os PM entraram em contacto com o metal, mantendo-se constante até ao final do ensaio (28º dia de contacto entre o metal e os PM), para todos os casos em estudo (meios de crescimento com e sem  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

A figura 5.5 apresenta os valores de potencial redox observados ao longo deste ensaio.

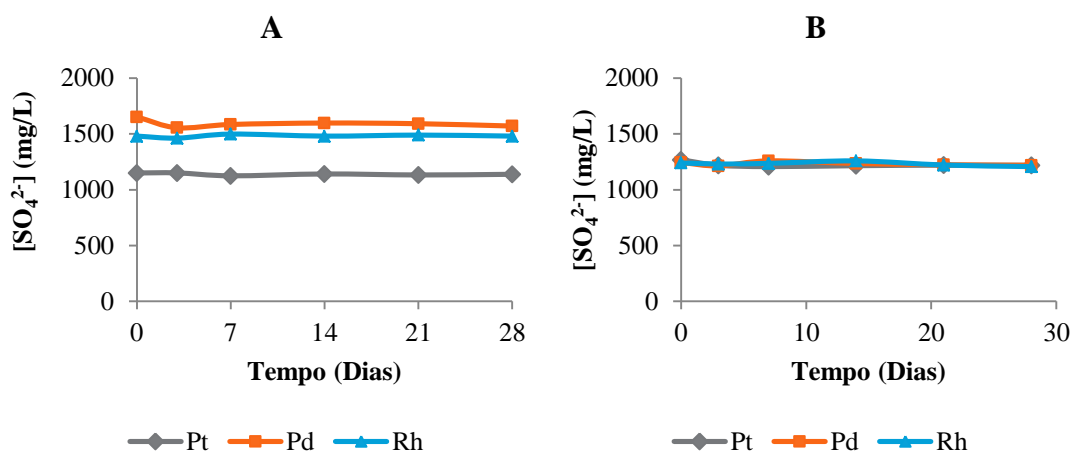


**Figura 5.5 - Perfil de eh de ambos os PM de ambos os meios quando adicionados aos PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)). A) e B) eh dos PM de QL e Sil, respectivamente, crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ . C) e D) eh dos PM de QL e Sil, respectivamente, crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Em relação ao eh pode-se observar (figura 5.5) que nos quatro casos em estudo este parâmetro aumenta. Tal resultado pode indicar que as reações que estão a ocorrer no meio reacional são maioritariamente reações de oxidação [58].

Contudo estes resultados não são esclarecedores relativamente à ocorrência de redução do metal. Isto pode dever-se à concentração de metal por *batch* ser de apenas 100 mg/L, enquanto os constituintes do meio de crescimento se encontram numa concentração muito superior, sendo as reações entre estes constituintes do meio mais evidentes que a reação de redução do metal.

A figura 5.6 apresenta os resultados da concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  ao longo do ensaio.



**Figura 5.6 - Perfil de concentração de sulfato ao longo do tempo de contacto dos metais com os PM. A) PM de QL e B) PM de Sil. Em B os perfis são quase idênticos o que faz com que as linhas correspondentes a cada metal se sobreponham.**

Tal como esperado a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  manteve-se constante ao longo do ensaio uma vez que não existiam bactérias, em solução, que o pudessem reduzir. Deste modo, a concentração de sulfato que os dois consórcios apresentavam quando se procedeu à recolha dos PM manteve-se ao longo de todo o ensaio, mesmo após a adição dos PM ao metal.

A tabela 5.2 mostra os resultados da remoção de (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) por parte dos PM de QL e de Sil crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ .

**Tabela 5.2 – Resultados de percentagens de remoção do metal (%) obtidos no ensaio de adição dos PM (QL e Sil) crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  aos diferentes metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)).**

Tempo (Dias)	0	0,042	3	7	14	21	28
<b>Pt(IV) + PM QL</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Pd(II) + PM QL</b>	0,0	0,0	2,0	4,0	2,4	8,0	0,0
<b>Rh(III) + PM QL</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0
<b>Pt(IV) + PM Sil</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Pd(II) + PM Sil</b>	0,0	5,0	2,6	0,0	0,0	1,1	5,2
<b>Rh(III) + PM Sil</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

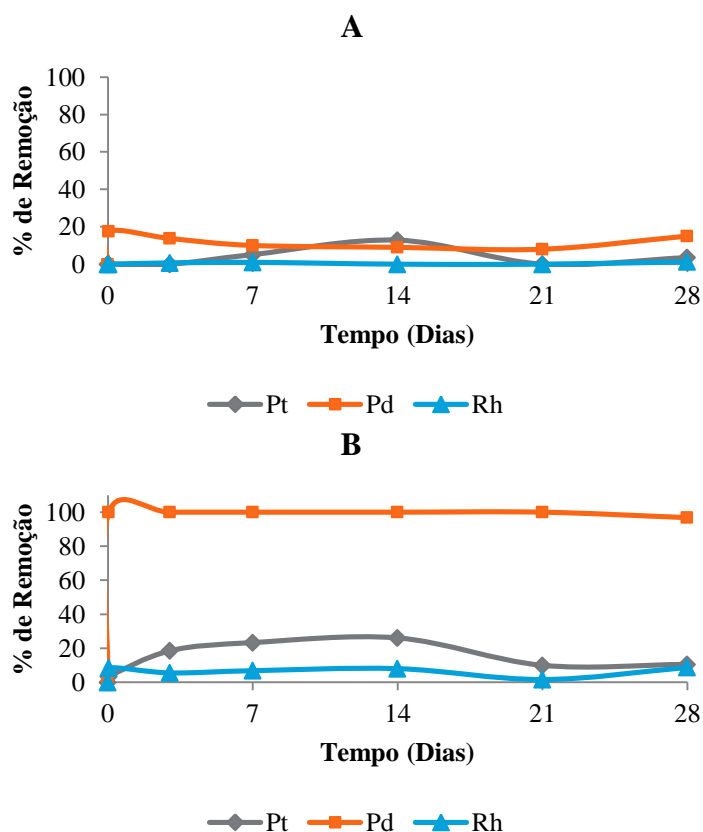
Em relação à remoção de metal pode-se observar através da análise da tabela 5.2 que não ocorreu remoção de nenhum dos metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) com os PM de QL e de Sil crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Por sua vez a tabela 5.3 mostra os resultados da remoção de (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) por parte dos PM de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .

**Tabela 5.3 – Resultados de percentagens de remoção do metal (%) obtidos no ensaio de adição dos PM de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  aos diferentes metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)).**

Tempo (Dias) Amostra	0	0,042	3	7	14	21	28
<b>Pt(IV) + PM QL</b>	0,0	0,0	0,0	5,1	12,8	0,0	3,5
<b>Pd(II) + PM QL</b>	0,0	17,5	13,8	10,0	9,0	8,0	15,0
<b>Rh(III) + PM QL</b>	0,0	0,0	0,7	1,0	0,0	0,0	1,3
<b>Pt(IV) + PM Sil</b>	0,0	3,3	18,5	23,3	26,1	10,0	10,5
<b>Pd(II) + PM Sil</b>	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	96,8
<b>Rh(III) + PM Sil</b>	0,0	8,4	5,5	6,8	8,0	1,6	8,7

Os resultados obtidos aquando da adição dos PM de QL e de Sil crescidos em meios com  $\text{SO}_4^{2-}$ , aos três metais em estudo (tabela 5.3) mostram que ocorreu 15% de remoção de Pd(II) pelos PM de QL e remoção total (100%) e imediata (após 1 hora de contacto = 0,042 dias) deste metal pelos PM de Sil. Assim, os PM de Sil mostraram-se mais eficientes na remoção de Pd(II) que os PM de QL. Apesar da fraca remoção de Pt(IV) e Rh(III) pode observar-se que os PM de Sil mostraram-se mais eficientes que os PM de QL, removendo para a Pt(IV) 10,5 % e 3,5 %, respetivamente, enquanto que para o Rh(III) se atingiram valores de remoção de 8,7% e 1,3% com os PM de QL, respetivamente. A figura 5.7 mostra mais claramente os resultados apresentados pela tabela 5.3.



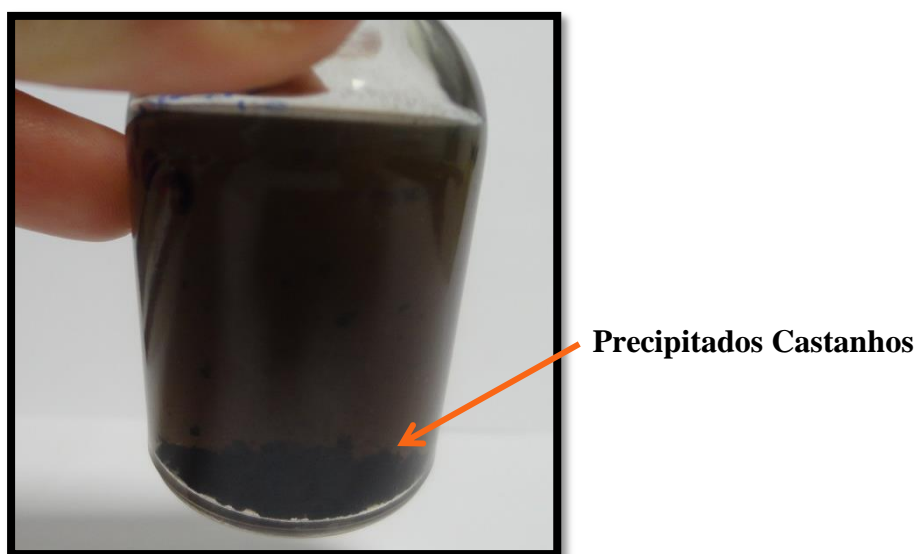
**Figura 5.7 – Perfil de remoção de metal (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) com os PM de QL (A) e de Sil (B) crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Os resultados obtidos com os PM de QL e de Sil em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  não conseguiram remover nenhum dos metais. Perante este resultado pode concluir-se que as bactérias favorecidas naquele meio de crescimento não produzem produtos metabólicos com capacidade de remover Pt(IV), Pd(II) e Rh(III) de soluções aquosas. Em contrapartida, os resultados obtidos com os PM produzidos pelas bactérias crescidas em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  mostram que estes têm a capacidade para remover metais. No caso da Pt(IV) e do Rh(III) conseguiu-se remover parte destes metais e no caso do Pd(II) a remoção foi total. Também pode-se observar que, nestas condições de crescimento, os PM de Sil apresentam maior capacidade/eficiência na remoção dos metais estudados. Este comportamento pode estar relacionado com o facto do consórcio de Sil (antes da recolha dos PM) apresentar maior redução de sulfato a sulfureto, o que parece contribuir para a remoção dos metais das soluções aquosas. Apesar do  $\text{S}^{2-}$  ser bastante volátil ( $\text{H}_2\text{S}$ ), uma percentagem permanece em solução. Esta quantidade de sulfureto em solução é provavelmente suficiente para precipitar os metais sob a forma de sulfuretos metálicos. Portanto, como Sil reduziu uma quantidade de sulfato maior que QL, a

percentagem de  $S^{2-}$  presente em solução também é maior em Sil do que em QL e consequentemente terá ocorrido maior remoção dos metais.

Segundo a literatura o PdS apresenta uma cor acastanhada e o  $PtS_2$  apresenta uma cor preta [14]. A análise dos precipitados obtidos nos frascos contendo Pd(II) e PM (figura 5.8) está de acordo com esta informação, indicando, mais uma vez, que os precipitados formados poderão ser sulfuretos metálicos.

Além disso, os resultados parecem indicar que o consórcio de Sil é mais rico em SRB que o consórcio de QL, uma vez que reduz menos  $SO_4^{2-}$ .



**Figura 5.8 – Imagem dos precipitados obtidos no *batch* com os PM de Sil crescidos em meio com  $SO_4^{2-}$  em contacto com uma solução padrão contendo Pd(II).**

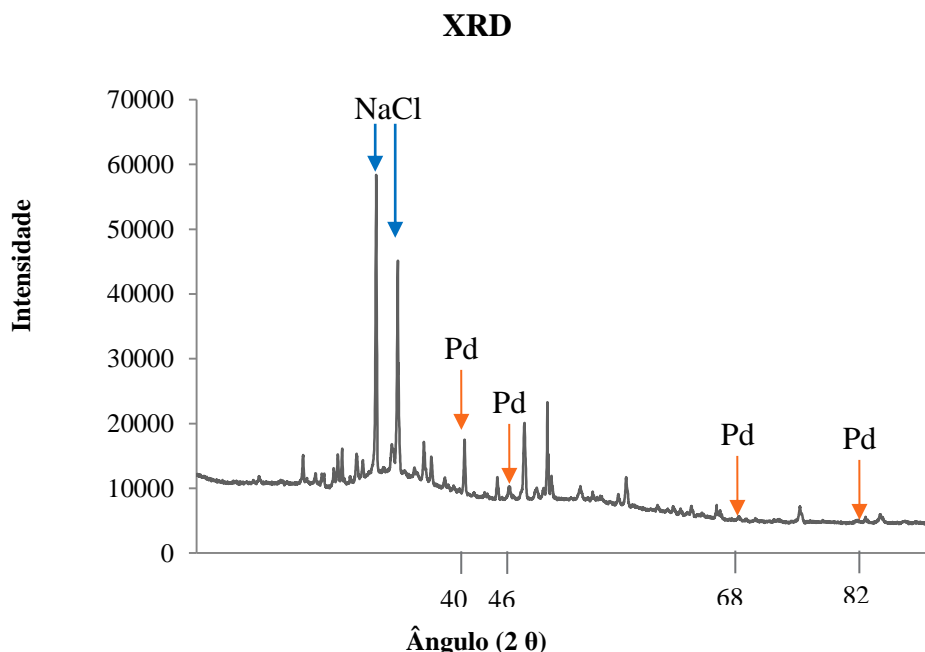
A reduzida remoção de Pt(IV) poderá estar relacionada com o baixo pH do meio reacional (abaixo de 1), uma vez que estes metais são bastantes solúveis em meio ácido [60]. Um pH tão baixo também poderá influenciar a atividade dos PM. Estes poderão perder a sua atividade e, desta forma, não promoverem a remoção do metal. Por outro lado, o baixo valor de pH poderá estar a afetar a reação que ocorre quando os PM entram em contacto com o metal. Outra das hipóteses para a ausência de remoção de Pt(IV), sob a forma de sulfureto de platina, pode estar relacionada com a quantidade de sulfureto disponível. Este pode não ser suficiente para precipitar a Pt(IV) sob a forma de sulfureto.

A baixa remoção de Rh(III) pode estar relacionada com o facto dos PM produzidos não terem capacidade para remover o metal. Todavia, o Rh é um metal que tem originado

problemas analíticos, que poderão falsear os resultados, pelo que, poderá ser necessário recorrer a outras técnicas para a sua determinação [48]. Além disso, tal como no caso da platina, a precipitação através da formação de sulfureto de ródio pode não estar a ocorrer devido à reduzida quantidade de sulfureto disponível em solução.

Contudo, apenas a análise aos precipitados obtidos poderá indicar se se trata ou não de sulfuretos metálicos.

Somente os precipitados obtidos pelo contacto entre os PM de Sil (provenientes do consórcio crescido em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ ) com Pd(II) (ensaio que mostrou melhores resultados) foram analisados por XRD. Estes resultados apresentam-se na figura 5.9.

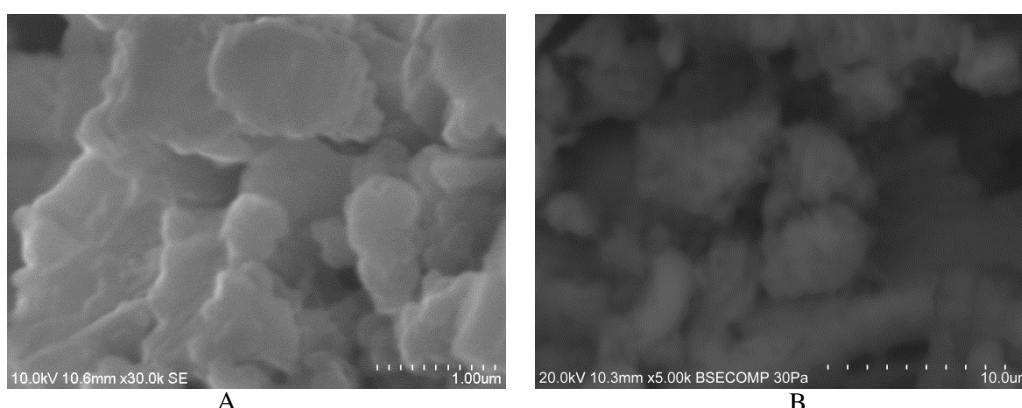


**Figura 5.9 – XRD correspondente ao precipitado obtido através da remoção de Pd(II) por parte dos PM obtidos através do consórcio de Sil crescido em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Os resultados obtidos no XRD não se mostram muito conclusivos uma vez que existem diversos picos de grande intensidade que provavelmente poderão estar a camuflar os picos de Pd, que apesar de parecerem estar presentes não têm uma forte intensidade. Os picos de maior intensidade correspondem ao cristal NaCl, presente no meio de crescimento numa quantidade muito maior. Existem ainda outros picos representativos de outros cristais formados pelos constituintes do meio de crescimento.

Para que os resultados possam ser mais conclusivos será necessário proceder a uma ou mais lavagens do precipitado obtido na tentativa de eliminar os cristais formados pelos constituintes do meio. Após essas lavagens é necessário recorrer novamente à análise por XRD. Uma vez que a quantidade de precipitado obtido é mínima, uma análise mais eficiente deverá passar pelo uso de um equipamento de micro-XRD.

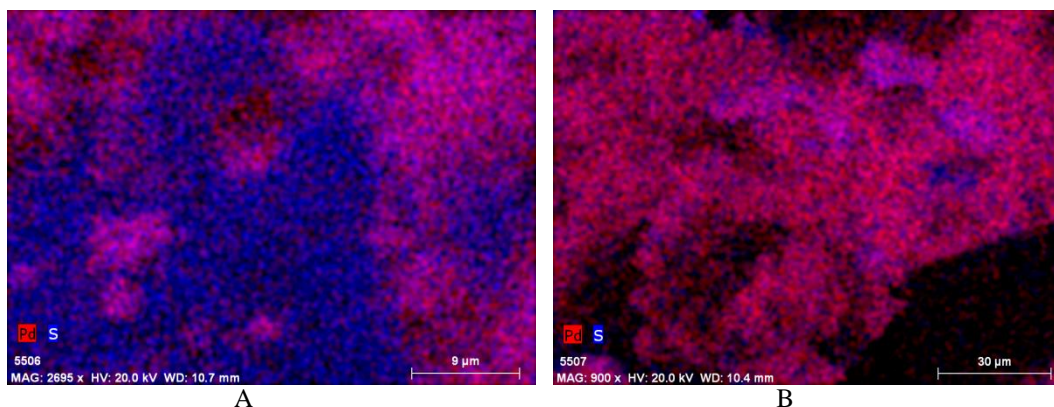
A análise por SEM-EDS mostrou a existência de Pd em ambas as amostras (PM de QL e PM de Sil). A figura 5.10 representa as micrografias obtidas através da análise de SEM (A - PM de QL com Pd e B – PM de Sil com Pd).



**Figura 5.10 – Precipitados recolhidos do ensaio que juntou: A) os PM de QL crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  com Pd(II) de uma solução padrão e B) os PM de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  com Pd(II) de uma solução padrão, analisados por SEM-EDS.**

As micrografias permitem perceber a morfologia dos precipitados obtidos. Analisando as mesmas pode-se observar que não se tratam de nano-partículas, têm uma forma esférica e parecem tratar-se de aglomerados. Para se saber o tamanho exato da partícula deve-se prosseguir para uma análise por microscopia eletrônica de transmissão acoplada a um espectrómetro de energia dispersiva de raio-X (TEM-EDS). Para confirmar se se tratam de aglomerados dever-se-á sujeitar a amostra a sonicação de maneira a separar os aglomerados (caso se tratem mesmo de aglomerados).

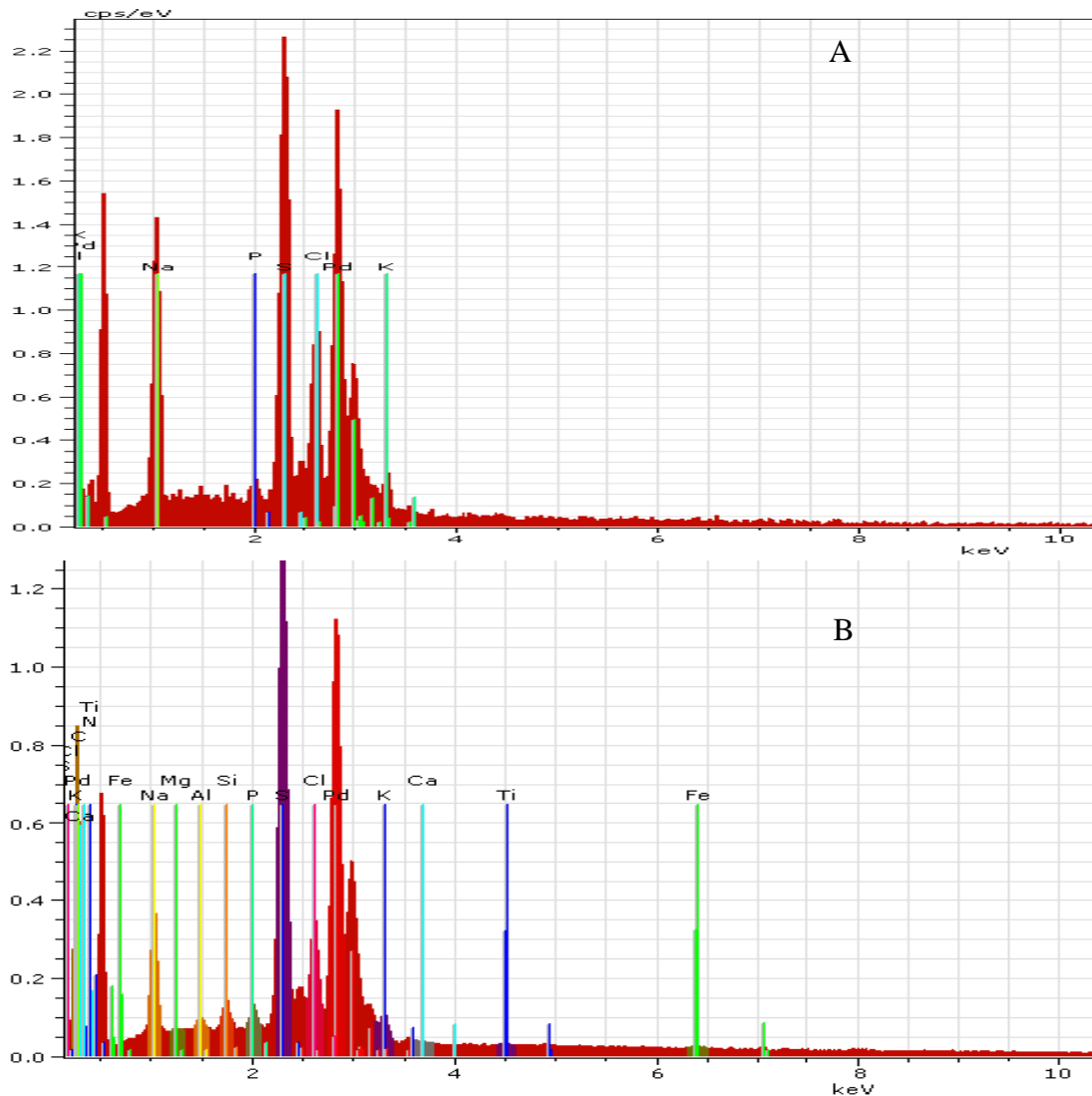
A figura 5.11 representa o mapeamento dos precipitados, por SEM-EDS.



**Figura 5.11 – Mapa dos precipitados obtidos através do ensaio que juntou os PM de QL crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  com Pd(II) de uma solução padrão (A) e os PM de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  com Pd(II) de uma solução padrão (B) analisados por SEM-EDS.**

Os mapas obtidos pela SEM-EDS mostram que o Pd parece estar sempre associado a partículas de enxofre, o que poderá indicar que as partículas se tratam de partículas de sulfureto de paládio (PdS) e não de Pd no seu estado mais reduzido (Pd(0)), tal como mostra a figura 5.11: A confirmação se realmente se tratam de partículas de PdS poderá ser confirmada através da análise por micro-XRD.

A figura 5.12 mostra os espectros obtidos através da análise EDS de ambas as amostras representadas em cima.



**Figura 5.12 – Espetros EDS correspondentes aos precipitados obtidos através dos PM de QL crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (A) e através dos PM de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (B) ambos colocados em contacto com uma solução padrão de Pd(II).**

Uma vez mais obtiveram-se vários picos correspondentes a outros constituintes do meio que acabam por cristalizar. A figura 5.12 A) corresponde ao espectro do precipitado obtido quando foram utilizados os PM de QL crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  e B) corresponde ao espectro do precipitado obtido quando se usou os PM de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Os resultados mostram que em ambas as amostras, apesar de existirem picos correspondentes a outros elementos (constituintes do meio de crescimento), os picos com maior intensidade são os correspondentes aos elementos Pd e S. Isto parece confirmar as hipóteses anteriores de que o metal em estudo (Pd) precipitou sob a forma de PdS.

As análises de SEM-EDS vêm acompanhadas por uma tabela com as percentagens atômicas em que cada elemento se encontra na amostra. As percentagens dos elementos que se encontram em maior quantidade na amostra foram transcritas para a tabela 5.4.

**Tabela 5.4 – Percentagens atômicas dos elementos que se encontram nos precipitados analisados por SEM-EDS que se encontram em maior concentração**

Elementos (%) Amostra	Paládio	Enxofre	Sódio	Cloro
	<b>QL + Pd</b>	24,9	32,9	25,1
<b>Sil + Pd</b>	26,8	30,6	24,5	11,3

Analisando a tabela 5.4 observa-se que a proporção de Pd e S nas amostras é praticamente de 1:1 em termos estequiométricos em ambos os precipitados analisados (PM provenientes de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ ), o que parece estar de acordo com a precipitação de PdS.

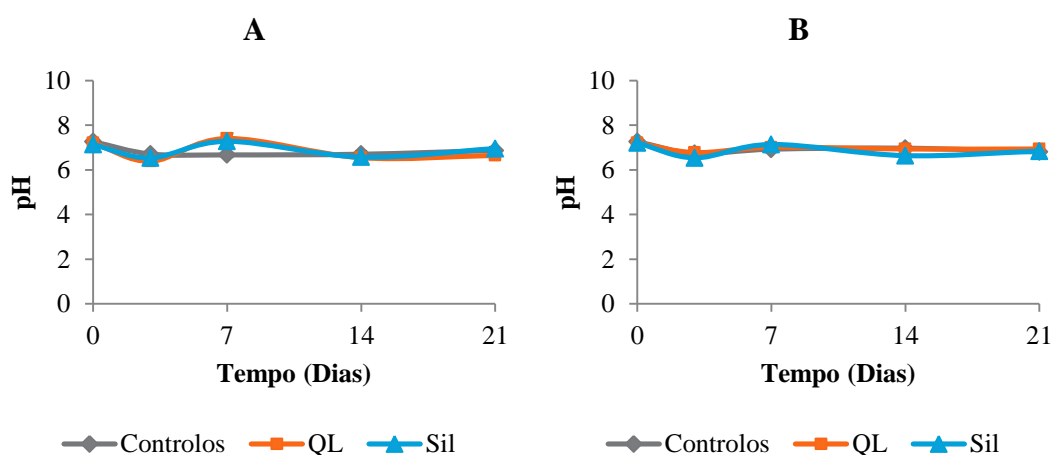
Assim sendo, a hipótese de que o precipitado obtido se trate de PdS começa a ganhar consistência. Todavia, tal só poderá ser plenamente confirmado através de uma análise por micro-XRD. A análise aos precipitados por micro-XRD encontra-se a decorrer, contudo não ficou concluída a tempo de ser apresentada e discutida nesta tese de mestrado.

#### **Adição dos PM recolhidos ao longo do tempo de crescimento (inoculações dos enriquecimentos) aos PGM (Pt, Pd e Rh)**

Os resultados do primeiro estudo mostraram que os PM conseguem remover metais de soluções aquosas. Perante isto, iniciou-se o segundo estudo, com o objetivo de perceber em que fase do crescimento bacteriano são produzidos PM com capacidade de remover o metal e perceber qual o tempo de contacto necessário para que esses PM precipitem o metal. Para isso, procedeu-se à inoculação dos consórcios de QL e Sil em meios de crescimento com e sem sulfato e, tal como no primeiro estudo, procedeu-se à adição dos PM (dos inóculos) aos PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)). Os PM foram recolhidos em diferentes tempos do crescimento bacteriano (3º, 7º, 14º e 21º dias) e as amostras dos *batches* de PM com as 100 mg/L do metal foram recolhidas ao longo do tempo (tempo de contacto).

Tal como no estudo anterior, o crescimento bacteriano foi monitorizado através da análise do  $\epsilon_h$ , pH, concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  e da  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ . Estes parâmetros foram analisados nos dias em que se procedeu à recolha dos PM de forma a conhecer as condições em que se encontravam as culturas imediatamente antes da adição aos PGM. Os resultados que se apresentam em seguida representam a média de duas réplicas. Note-se que as barras de erros são, por vezes, impercetíveis devido aos duplicados apresentarem valores muito semelhantes.

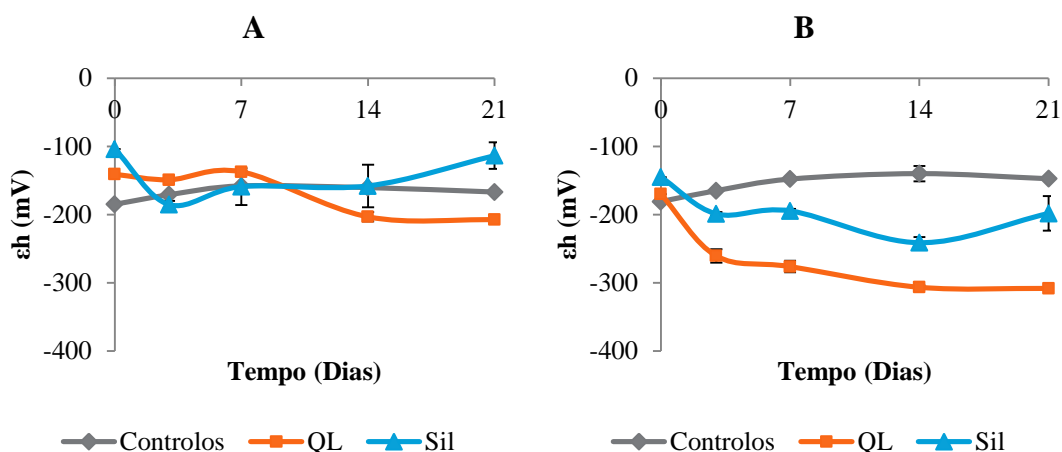
A figura 5.13 apresenta o pH ao longo do tempo de crescimento dos consórcios.



**Figura 5.13 - Perfil de pH dos inóculos QL e Sil ao longo dos 21 dias de crescimento. A) representa o perfil dos inóculos crescidos em meio sem sulfato e B) representa os inóculos crescidos em meio com sulfato.**

O pH em ambos os consórcios apresentou-se próximo da neutralidade e constante ao longo dos 21 de duração do ensaio. Os valores dos consórcios e dos controlos negativos são bastante semelhantes, pelo que, nos gráficos (figura 5.13) as linhas se tornam coincidentes. Estes valores de pH são valores adequados para o crescimento destas bactérias [44].

A figura 5.14 apresenta os valores do potencial redox ao longo do tempo de crescimento dos consórcios.



**Figura 5.14 - Perfil de eh ao longo dos dias de crescimento dos inóculos onde A) consórcio de QL e B) consórcio de Sil.**

Os resultados obtidos mostram que, tal como no ensaio dos enriquecimentos, o eh de QL e de Sil em meio com e sem sulfato foi decrescendo, contrariando os valores dos controlos que se mantêm praticamente constantes. Isto poderá indicar que está a ocorrer atividade bacteriana no meio nutriente. A diminuição do eh foi mais pronunciada nos consórcios crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  pois, tal como referido no ensaio dos enriquecimentos, estão a ocorrer, provavelmente, mais reações de redução, nomeadamente a redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{S}^{2-}$ . O consórcio de QL crescido em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  apresenta valores de eh mais negativos que o consórcio de Sil ao longo de todo o ensaio. Isto poderá sugerir que está a ocorrer mais redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{S}^{2-}$  nos inóculos de QL do que nos de Sil [58]. Esta hipótese poderá ser confirmada pela análise à concentração de sulfato.

No consórcio de Sil crescido em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ , a partir de determinado tempo de incubação, o eh começa a aumentar, o que pode indicar que está a ocorrer uma perda de atividade bacteriana por parte deste consórcio.

A redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  por parte dos dois consórcios pode ser observada na figura 5.15.

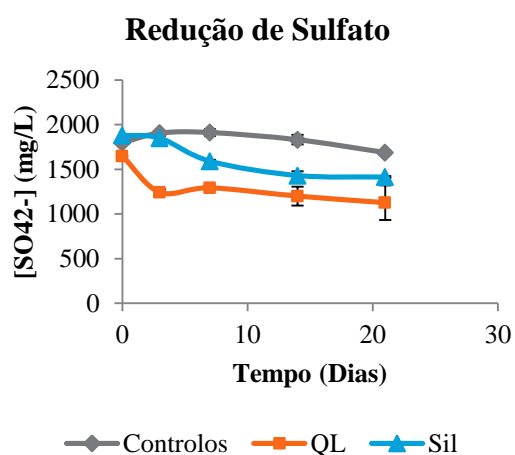


Figura 5.15 – Perfil de redução de sulfato nos consórcios de QL e de Sil e no controlo abiótico.

Perante os resultados de sulfato obtidos, a hipótese proposta através da análise do eh, de que o consórcio de QL reduz mais sulfato que o consórcio de Sil, confirma-se. Este resultado indica que, provavelmente, existirá maior quantidade de  $S^{2-}$  nos consórcios de QL do que nos consórcios de Sil.

Na figura 5.16 estão apresentados os resultados de  $OD_{600nm}$  obtidos ao longo do ensaio e que mostram como se comportou o crescimento bacteriano dos inóculos em estudo.

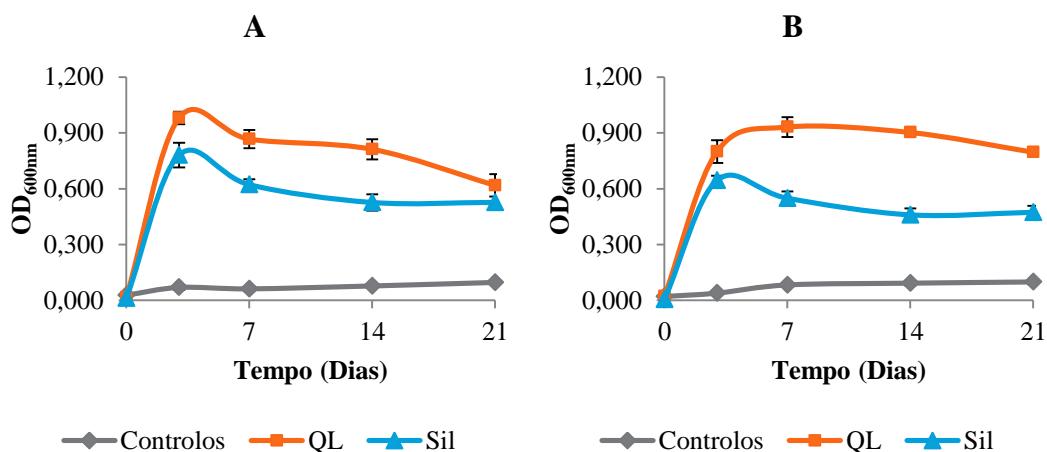


Figura 5.16 – Perfil de crescimento bacteriano por parte dos consórcios de QL e de Sil. Onde A) corresponde à inoculação em meio sem  $SO_4^{2-}$  e B) à inoculação em meio com  $SO_4^{2-}$ .

Nos consórcios crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  existe um decréscimo do crescimento bacteriano após o terceiro dia de crescimento. O mesmo acontece com o consórcio de Sil crescido em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ . Contudo, a  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ , no decorrer do ensaio manteve-se próxima de 0,6. Em contrapartida, o consórcio de QL crescido em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  manteve-se, durante o ensaio, com uma  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  próxima de 0,9.

Como referido anteriormente, os PM foram recolhidos ao 3º, 7º, 14º e 21º dias de crescimento e foram adicionados a Pt(IV), Pd(II) ou Rh(III) para averiguar se o tempo de crescimento bacteriano teria influência na remoção destes metais de soluções aquosas. Esta remoção foi monitorizada pela análise dos parâmetros: eh, pH, concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$ , concentração de metal em solução e análise do precipitado obtido. Cada *batch* teve a duração total de 28 dias.

A adição dos PM ao metal, tal como no ensaio onde se utilizaram os PM dos enriquecimentos, resultou na diminuição do pH. Os valores de pH ácido mantiveram-se ao longo do ensaio. A diminuição deste parâmetro deveu-se ao pH ácido das soluções padrão de metal (necessário para manter o metal em solução). Assim, o pH final das soluções resultantes da adição dos PM (pH próximo de 7) às soluções de metal permaneceu ácido. Quando se adicionaram os PM à solução de Pt(IV) o pH baixou para valores próximos de 1, enquanto que para o Pd(II) baixou para valores próximos de 4, o mesmo tendo acontecido para o Rh(III). Isto aconteceu em todos os ensaios realizados, independentemente dos PM utilizados (ou seja, independentemente do tempo de crescimento do consórcio).

Como concluído no primeiro estudo (com os PM do enriquecimento) os valores de eh não permitem perceber se ocorreu redução do metal. Isto possivelmente deve-se ao facto de a concentração de metal ser bastante inferior quando comparada com a dos restantes componentes do meio. Resultados similares foram obtidos para todos os ensaios realizados independentemente dos PM utilizados.

Para se perceber como variou a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$ , aquando da adição dos PM ao metal, a tabela 5.5 apresenta a concentração de sulfato que os consórcios apresentavam imediatamente antes da recolha dos PM, nos diferentes dias de crescimento.

Tabela 5.5 – Concentração de sulfato presente nos consórcios imediatamente antes da recolha dos PM.

PM	Dia zero de crescimento	3º dia de crescimento	7º dia de crescimento	14º dia de crescimento	21º dia de crescimento
QL	1648 ± 0	1243 ± 31	1293 ± 23	1200 ± 106	1127 ± 193
Sil	1881 ± 0	1849 ± 23	1591 ± 16	1431 ± 47	1413 ± 10

A figura 5.17 mostra o perfil da concentração de sulfato ao longo de todo o ensaio (28 dias) após a adição dos diferentes PM aos metais.

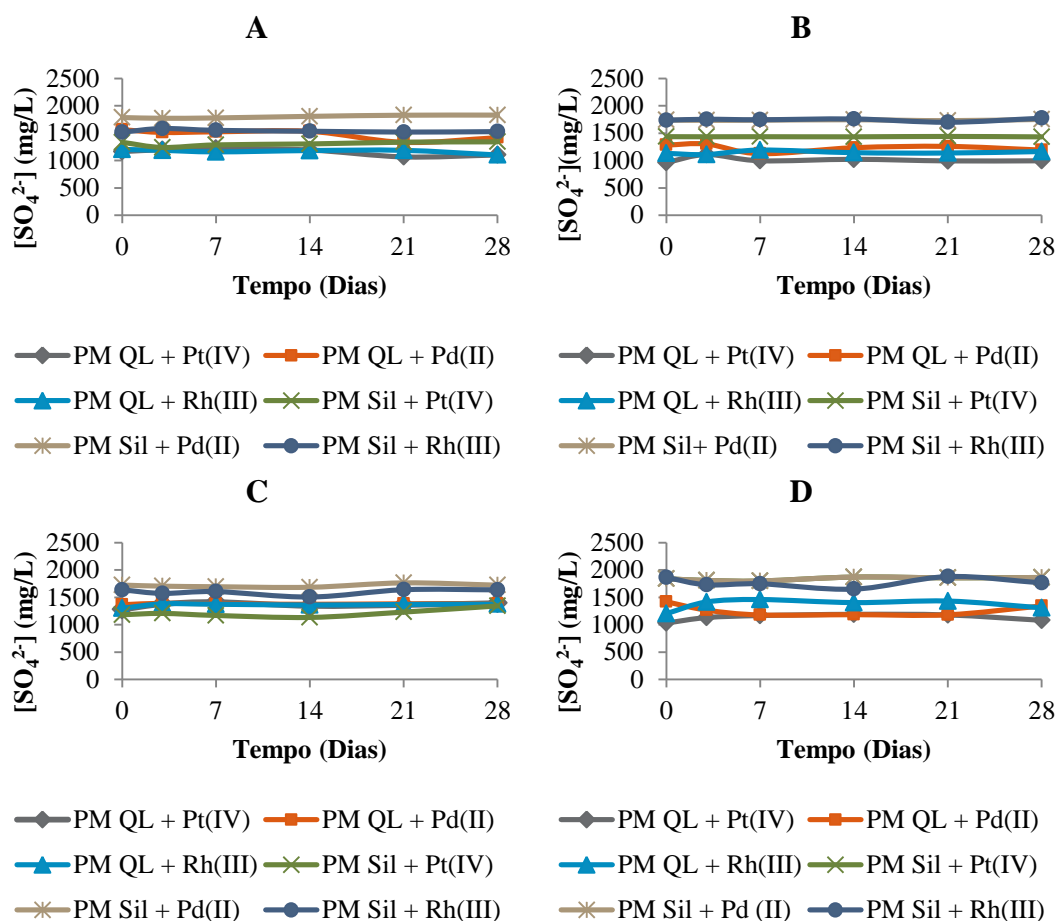


Figura 5.17 – Perfis de concentração de sulfato dos *batches* em estudo. Cada gráfico apresenta os PM recolhidos num determinado momento de crescimento: A) PM recolhidos ao 3º dia de crescimento; B) PM recolhidos ao 7º dia de crescimento; C) PM recolhidos ao 14º dia de crescimento e D) PM recolhidos ao 21º dia de crescimento.

Analisando a figura 5.17 confirma-se que após adição dos PM ao metal, a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  não sofreu alterações durante o decorrer do ensaio, mantendo-se sempre

constante, ou seja, a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  que os PM apresentavam aquando da sua recolha foi o mesmo que se manteve ao longo do *batch* com o metal. Este resultado confirma a ausência de atividade bacteriana nos ensaios em *batch*, tal como seria de esperar uma vez que para se obter os PM se usou um filtro 0,22  $\mu\text{m}$ , que permite reter as bactérias. Desta forma, garante-se que a remoção do metal ocorrerá por ação dos PM e não por ação bacteriana, ultrapassando-se, assim, o problema de toxicidade do metal sobre as bactérias.

De forma a tornar a análise dos resultados referentes às remoções de metal mais clara optou-se por analisar os resultados por dias de crescimento dos PM. Deste modo, a figura 5.18 ilustra a remoção de metal por parte dos PM recolhidos ao 3º dia de incubação dos consórcios de QL e Sil crescidos em meio com e sem  $\text{SO}_4^{2-}$ .

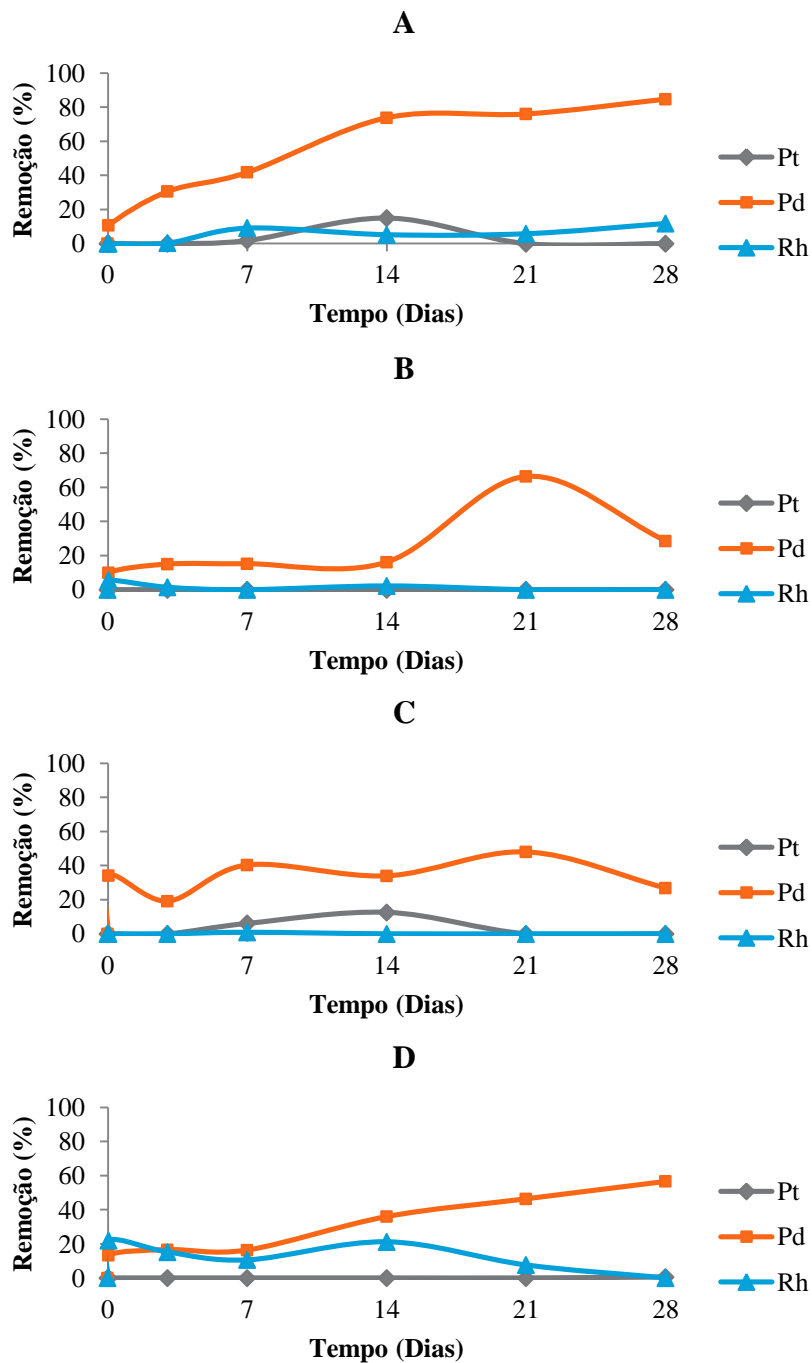


Figura 5.18 – Perfil de remoção (%) dos diferentes metais em estudo (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) de acordo com os PM de QL e de Sil recolhidos no 3º dia de incubação de ambos os meios. A e B representam a remoção (%) de metal por parte dos PM de QL e de Sil (respectivamente) crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ . C e D representam a remoção (%) de metal por parte dos PM de QL e de Sil (respectivamente) crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Como se pode observar, através da figura 5.18, o metal que foi removido por todos os PM foi o Pd (II).

Os PM recolhidos de QL crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.18 A)) são os que apresentam melhor eficiência, removendo 84,7% de Pd(II). Os mesmos PM conseguiram também remover 11,8% de Rh(III). Contudo estes PM não removeram Pt(IV), pois o precipitado formado nos *batches* mostrava-se bastante instável, sendo rapidamente redissolvido na solução quando o frasco era agitado para se proceder à recolha da amostra. Tal instabilidade poderá ser explicada pelo baixo pH que a mistura apresenta após a adição dos PM ao metal, pois P(IV) é bastante solúvel em meio ácido o que poderá impedir a precipitação deste metal [60].

Os PM recolhidos do consórcio de Sil crescido em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.18 B)) removeram, 66,4% de Pd(II) ao fim do 21º dia de contacto entre os PM e o Pd. No entanto, a remoção ao fim de 28 dias de contacto baixou para 28,6%. Esta oscilação poderá dever-se à fraca estabilidade do precipitado de Pd(II), ou seja, ainda não se encontraria estável o suficiente para permanecer insolúvel na solução aquosa. Apesar da remoção de Pd(II) estes PM não removeram mais nenhum metal.

Comparando os resultados dos dois consórcios crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ , os PM recolhidos do consórcio de QL crescido em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  removeram uma maior percentagem de Pd(II), 84,7%, enquanto os PM produzidos pelo consórcio de Sil, crescido nas mesmas condições, removeram apenas 28,6% deste metal. Este resultado parece estar diretamente relacionado com o facto de o consórcio de QL ter reduzido maior quantidade de  $\text{SO}_4^{2-}$ , 24,6%, do que o consórcio de Sil que reduziu apenas 1,7% de sulfato. Além disto, note-se que apesar da baixa redução de sulfato, os PM de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  conseguem remover 28,6% de Pd(II). Este facto sugere que o  $\text{S}^{2-}$  produzido pelas SRB e que permaneceu em solução foi suficiente para remover Pd(II).

A análise dos resultados de remoção dos metais obtidos com os PM do consórcio de QL crescido em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.18 C)) revela que estes têm capacidade para remover 26,8% de Pd(II), percentagem que se mantém sensivelmente constante desde o 7º dia de contacto. Assim, pode concluir-se que os 26% será, provavelmente, a capacidade de remoção máxima de Pd(II) dos PM de QL crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ . Estes PM não removeram Pt(IV) nem Rh(III), o que poderá indicar que não possuem capacidade de remoção destes metais.

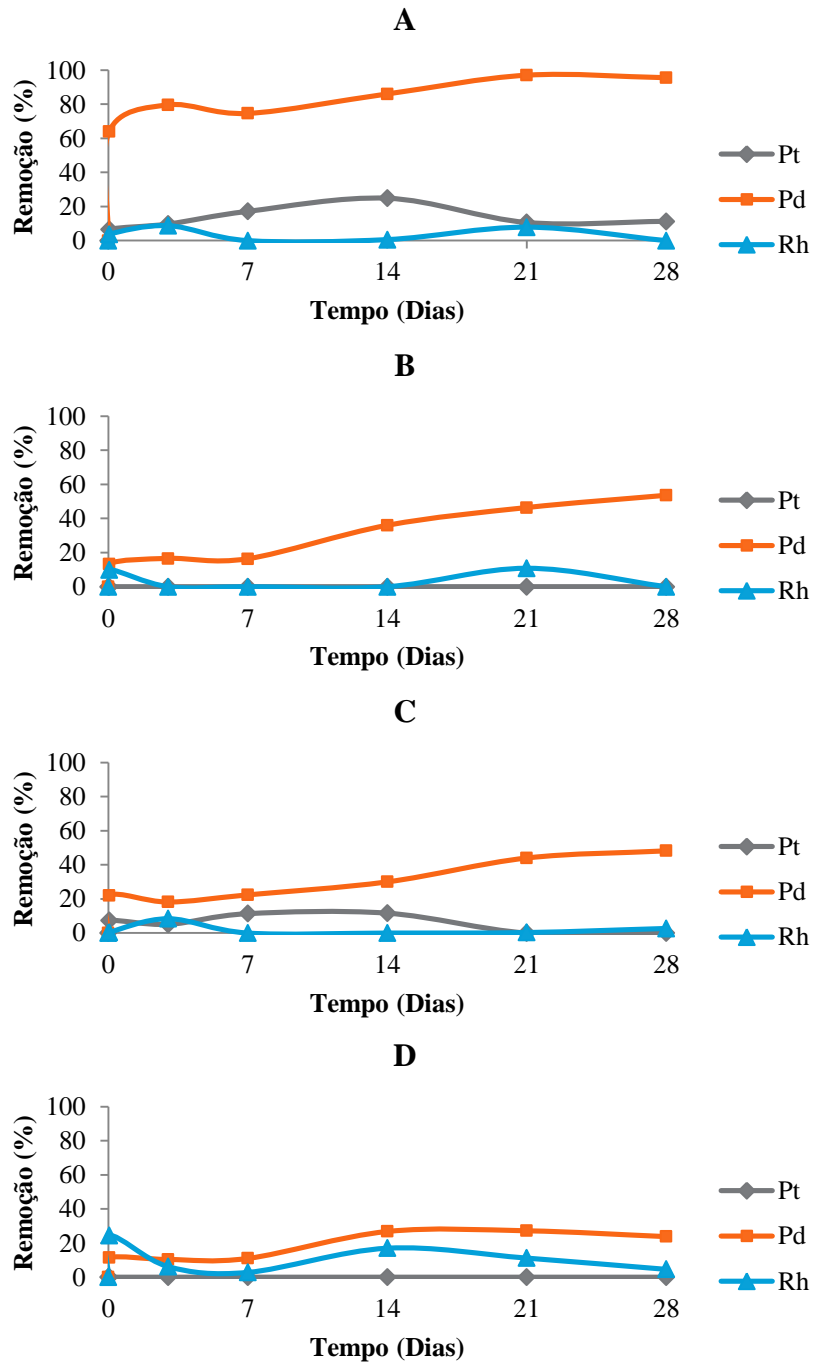
Em relação aos PM resultantes do consórcio de Sil crescido em meio sem sulfato (figura 5.18 D)), ocorreu um aumento substancial da remoção de Pd(II), que atingiu 56,5% de remoção ao fim de 28 dias de contacto. Estes PM não conseguiram remover Pt(IV).

Analisando a capacidade de remoção de Rh(III) por partes destes PM poder-se-á afirmar que os precipitados formados são instáveis devido à baixa capacidade em se manterem solúveis na solução, como mostram as oscilações na percentagem de remoção deste metal.

Em suma e comparando os dois tipos de PM crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  pode-se concluir que os PM obtidos do consórcio de Sil são mais eficientes que os PM obtidos do consórcio de QL na remoção de Pd(II) (56,5% e 26,8%).

Ao 7º dia de crescimento o consórcio de Sil começou a consumir sulfato, como se pode verificar na tabela 5.5, apresentando uma redução de 15,4% de sulfato. Em contrapartida o consórcio de QL manteve a concentração de sulfato constante relativamente à recolha anterior (3º dia de crescimento), ou seja, até ao 7º dia de crescimento este o consórcio reduziu cerca de 21,5% de sulfato.

A remoção de metal por parte dos PM recolhidos ao 7º dia de incubação de ambos os consórcios crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  e em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  encontra-se indicada na figura 5.19.



**Figura 5.19 - Perfil de remoção (%) dos diferentes metais em estudo (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) utilizando os PM recolhidos ao 7º dia de crescimento dos consórcios de QL e de Sil. A) e B) Representam a remoção (%) de metal por parte dos PM de QL e de Sil (respectivamente) crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ . C) e D) Representam a remoção (%) de metal por parte dos PM de QL e de Sil (respectivamente) crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Como se pode observar na figura 5.19, o metal mais removido pelos PM recolhidos, ao 7º dia de crescimento dos consórcios, foi novamente o Pd(II).

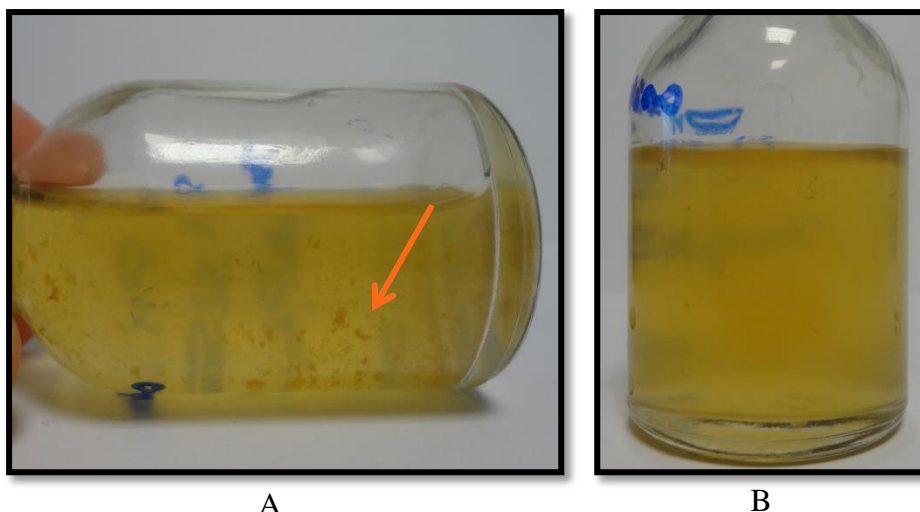
Tal como obtido com os PM recolhidos de QL crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  ao 3º dia de crescimento, ao 7º dia estes PM (figura 5.19 A)) são os que apresentam melhor

eficiência na remoção de Pd(II). Esta remoção de Pd(II) aumentou de 84,7% para 97%, o que revela uma melhor *performance* dos PM de QL com  $\text{SO}_4^{2-}$  ao 7º dia de crescimento.

Os PM recolhidos de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.19 B)), conseguiram remover apenas 48,2% Pd(II). Os precipitados de Pd(II) formados são estáveis, permanecendo insolúveis na mistura, tendo-se observado um aumento da precipitação ao longo do tempo de contacto.

A comparação entre os PM recolhidos dos consórcios de QL e os de Sil, crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ , permite perceber que os PM provenientes do consórcio de QL removeram uma maior percentagem de Pd(II) que os PM de Sil, ou seja, 97% e 48,2%, respetivamente.

Os PM de ambos os consórcios crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  também apresentaram remoção de Pd(II) (figura 5.19 C) e D)), isto é, 53,6% de remoção quando se utilizaram os PM de QL e 23,8% de remoção de Pd(II) com os PM do consórcio de Sil crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ . Ambos os PM permitem a remoção de outros metais, isto é, os PM de QL reagem também com Pt(IV) e os PM de Sil reagem com Rh(III). Contudo, os precipitados obtidos com estes metais são muito instáveis, ou seja, com pouca capacidade de se manterem insolúveis na solução. Esta afirmação é sustentada não só pelas oscilações que apresentam as concentrações destes metais, mas também pela observação visual dos precipitados obtidos. A figura 5.20 A) mostra os precipitados obtidos e a figura 5.20 B) a dissolução do precipitado obtido no frasco quando se agita para recolha da amostra.



**Figura 5.20 – Representação da estabilidade dos precipitados de Pt(IV) formados. A) Representa a amostra antes de agitar (precipitado visível). B) Representa a amostra depois de agitar (sem presença de precipitado).**

Perante estes resultados, no que respeita à remoção de Pd(II) os PM obtidos do consórcio de QL são mais eficientes que os PM obtidos do consórcio de Sil, (53,6% e 23,8% de remoção de Pd(II), respetivamente).

Os resultados obtidos revelam que tanto os PM crescidos com  $\text{SO}_4^{2-}$  como os crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ , conseguem remover Pd(II). O mecanismo de remoção deste metal poderá ser diferente em cada um dos casos.

Todos os PM estudados neste dia de crescimento, exceto os PM recolhidos do consórcio de Sil crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ , melhoraram a sua *performance* quando comparados com os PM recolhidos ao 3º dia de crescimento.

A capacidade de remoção dos metais por parte dos PM recolhidos ao 14º dia de crescimento dos inóculos encontra-se ilustrada na figura 5.21.

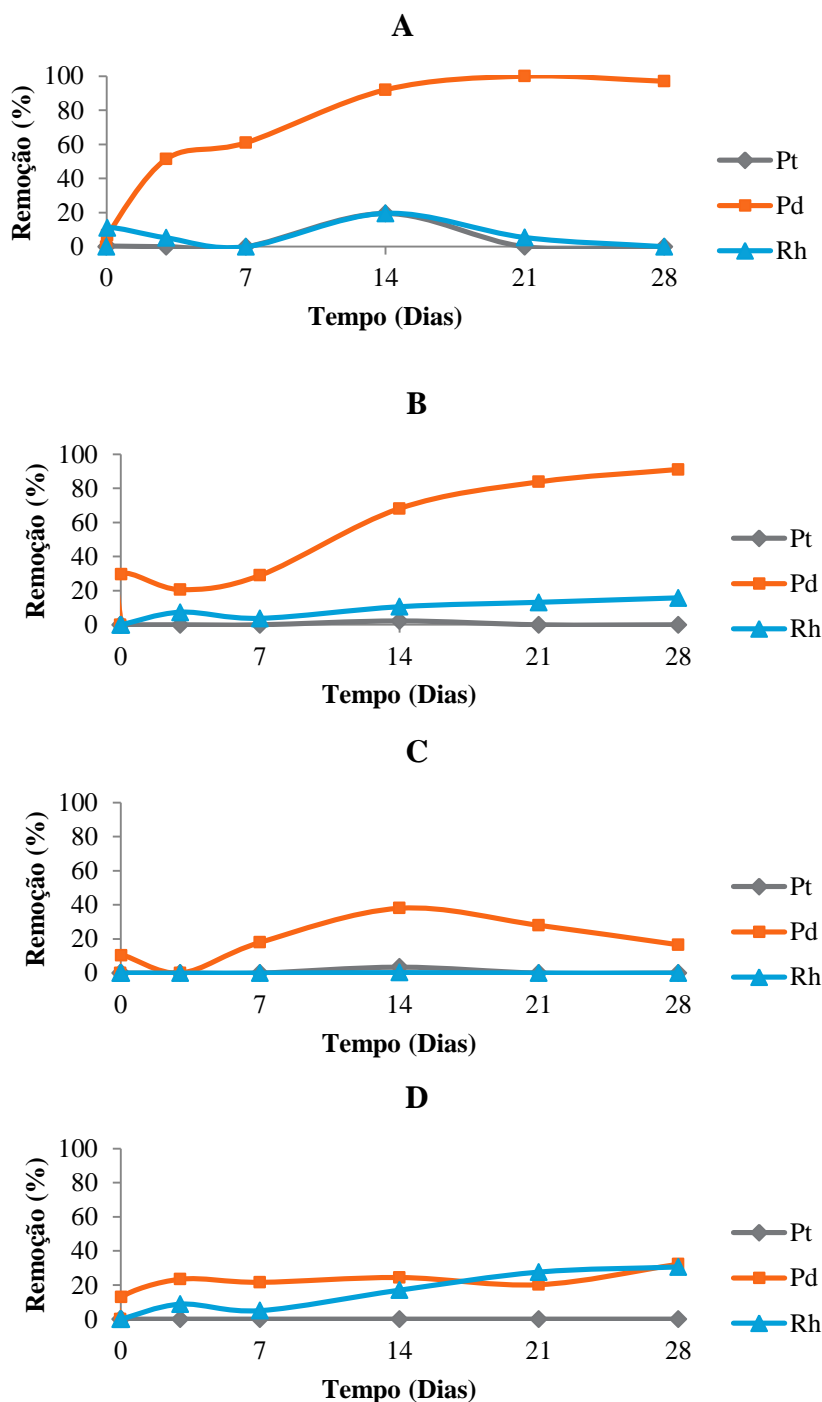


Figura 5.21 - Perfil de remoção (%) dos diferentes metais em estudo (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) conseguida com os PM recolhidos no 14º dia de incubação dos consórcios de QL e de Sil em meio com e sem  $\text{SO}_4^{2-}$ . A) e B) Representam a remoção (%) de metal por parte dos PM de QL e de Sil (respetivamente) crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ . C) e D) Representam a remoção (%) de metal por parte dos PM de QL e de Sil (respetivamente) crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Como se pode observar, na figura 5.21, o metal removido em maior percentagem continuou a ser o Pd(II), como seria expectável, apresentando remoção com todos os

PM. Ao 14º dia de crescimento os PM produzidos pelo consórcio de Sil, crescidos tanto em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  como em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ , também apresentaram remoção de Rh(III).

Os PM recolhidos do consórcio de QL crescido em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.21 A)) são os que apresentam, uma vez mais, melhor eficiência na remoção de Pd(II), removendo 97% deste metal. Esta percentagem de remoção tinha sido conseguida com os PM recolhidos ao 7º dia de crescimento. No que respeita aos outros dois metais, Pt(IV) e Rh(III), estes PM continuam a apresentar algumas oscilações na sua remoção. Tal como referido anteriormente, estas oscilações devem-se, provavelmente, à instabilidade do precipitado formado (figura 5.20). Os PM recolhidos de Sil em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.21 B)) apresentaram uma melhoria na sua *performance* de remoção de Pd(II), obtendo-se 91,1% de remoção deste metal. A remoção, neste caso, ocorreu de forma gradual formando precipitados que permaneceram insolúveis. Este resultado está de acordo com o facto do consórcio de Sil reduzir mais  $\text{SO}_4^{2-}$ , gerando mais sulfureto disponível para a redução do metal e contribuindo, portanto, para a hipótese de que poderão estar a formar-se sulfuretos metálicos (PdS). Os PM produzidos pelo consórcio de QL removeram mais Pd(II), 97,0%, que os PM produzidos pelo consórcio de Sil, 91,1%. Além disto, o tempo de contacto entre os PM e o metal parece ser importante, uma vez que é a partir de 14 dias de contacto que se atingem boas percentagens de remoção.

Os resultados obtidos com os PM de QL e de Sil em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ , ao 14º dia de crescimento, também mostram que ocorre remoção de Pd(II) (figura 5.21 C) e D)). No caso dos PM de QL a remoção de Pd(II) (16,6%) parece ter baixado relativamente à remoção apresentada com os PM recolhidos ao 7º dia de crescimento, facto que pode ser justificado, uma vez mais, pelo precipitado formado apresentar-se instável.

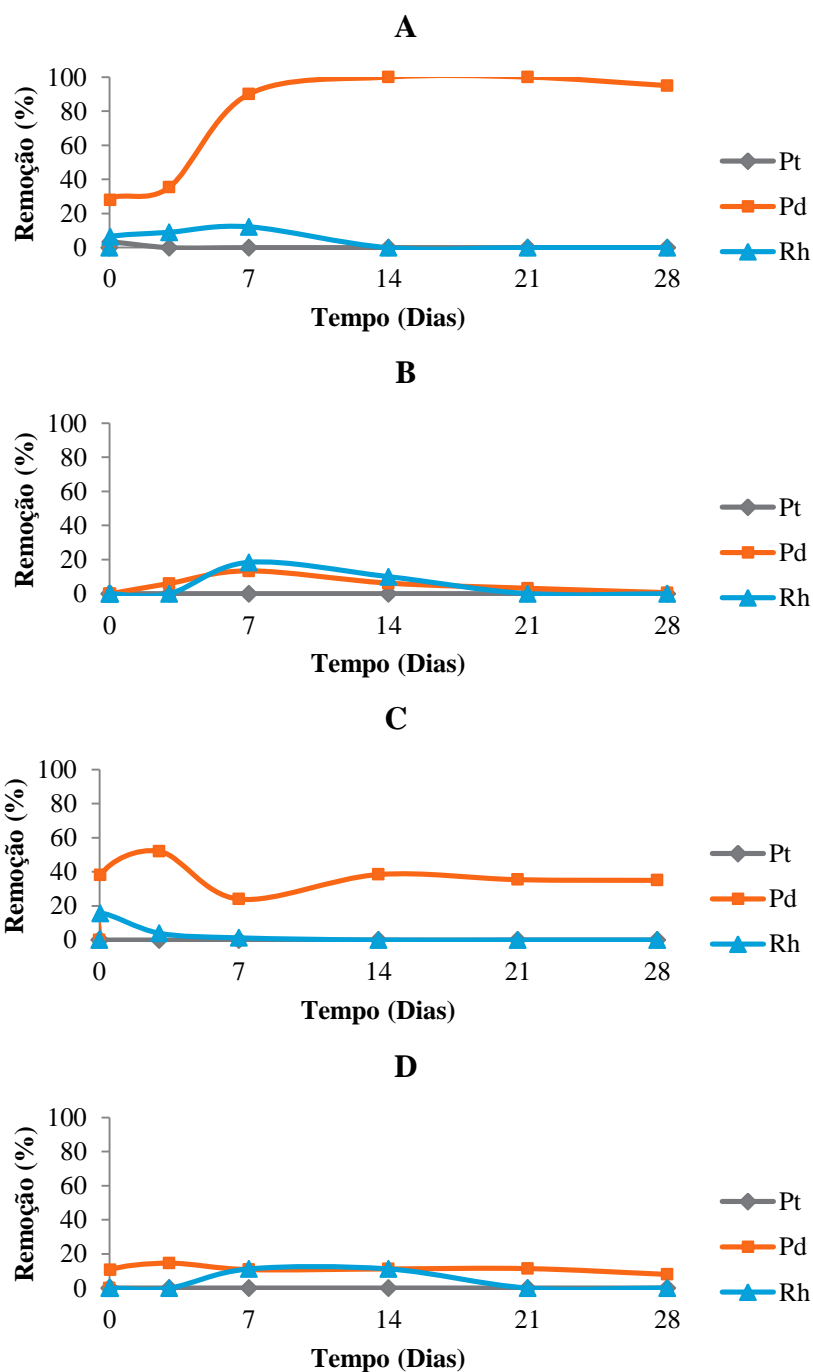
Relativamente aos PM recolhidos do consórcio de Sil crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  a remoção de Pd(II) manteve-se constante e próxima dos 32% e conseguiu atingir-se os 31% de remoção de Rh(III). Os resultados indicam que os PM provenientes de consórcios crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  podem ter capacidade para remover Rh(III) através de processos como a adsorção à biomassa ou por redução. Estes processos de remoção terão que ser estudados com maior cuidado. A remoção de Pt(IV) não foi conseguida por nenhum dos PM crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Contrariamente aos resultados obtidos com os PM recolhidos ao 3º e 7º dias de crescimento, os PM do consórcio de Sil sem  $\text{SO}_4^{2-}$  são mais eficientes que os PM

obtidos do consórcio de QL crescido nas mesmas condições, no que respeita à remoção de Pd(II) e de Rh(III).

De seguida testou-se a eficiência dos PM recolhidos ao 21º dia de crescimento. O consórcio de Sil não reduziu mais  $\text{SO}_4^{2-}$  ao 21º dia de crescimento para além do que já tinha sido atingido ao 14º dia de crescimento, mantendo-se esta redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  nos 24,9%. Em contrapartida, o consórcio de QL atingiu os 31,6% de redução de sulfato e consequentemente, foi produzida maior quantidade de  $\text{S}^{2-}$  (tabela 5.5).

A eficiência que estes PM apresentaram na remoção de metal das soluções aquosas pode ser observada através da figura 5.22.



**Figura 5.22 - Perfil de remoção (%) dos diferentes metais (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) com os PM de QL e de Sil recolhidos no 21º dia de crescimento em meio com e sem  $\text{SO}_4^{2-}$ . A) e B) Representam a remoção (%) de metal por parte dos PM de QL e de Sil (respetivamente) crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ . C) e D) Representam a remoção (%) de metal por parte dos PM de QL e de Sil (respetivamente) crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Como se pode observar, através da figura 5.22, o Pd(II) continuou a ser o metal com melhor remoção. Neste caso os PM que se mostraram mais eficientes nas remoção de Pd(II) foram os PM de QL, independentemente do meio de crescimento. No entanto,

com estes PM recolhidos ao 21º dia de crescimento, não se conseguiu remover nem Pt(IV), nem Rh(III).

A eficiência de remoção de Pd(II) conseguida com os PM recolhidos de QL crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.22 A)) manteve-se constante desde o 14º dia de crescimento (cerca de 95% de remoção).

Os PM recolhidos ao fim de 21 dias de crescimento do consórcio de Sil em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (figura 5.22 B)) apresentam a pior *performance* na remoção de Pd(II), Pt(IV) e Rh(III), não removendo nenhum dos três metais. A ligeira precipitação que ocorreu é bastante instável e o precipitado formado volta a dissolver-se. Este resultado também poderá indicar que o sulfureto gerado pelas SRB do consórcio de Sil já não será suficiente ou poderá mesmo já não estar disponível para a remoção do metal. Por outro lado, o consórcio de QL apresenta redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  o que significa que houve mais produção de  $\text{S}^{2-}$  e a quantidade produzida manteve-se em solução e foi suficiente para voltar a precipitar Pd(II).

Os PM dos consórcios de QL e de Sil crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$ , apresentaram apenas remoção de Pd(II) (figura 5.22 C) e D)). No entanto, os PM de QL mostraram-se mais eficientes que os PM de Sil, removendo 35,0% e 10,0% de Pd(II), respetivamente. Contudo, ambos os precipitados apresentaram alguma instabilidade.

A análise de todos os resultados obtidos para a remoção dos metais usando os PM em diferentes fases do crescimento bacteriano revelou que os PM não apresentam grande capacidade na remoção de Pt(IV) e Rh(III) uma vez que as percentagens de remoção obtidas e a estabilidade dos precipitados são muito reduzidas, independentemente do estágio em que se encontram os PM recolhidos. Em contrapartida, estes mesmos PM (de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  e sem  $\text{SO}_4^{2-}$ ) apresentaram capacidade de remover Pd(II) de uma solução aquosa.

A tabela 5.6 resume os melhores resultados obtidos neste estudo (eficiência dos PM na remoção de Pd(II), Pt(IV) e Rh(III)). Nesta tabela encontra-se o dia de crescimento em que os PM foram recolhidos, a informação de alguns parâmetros aquando dessa recolha, nomeadamente, a  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  e a percentagem de redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  e, por fim, a melhor percentagem de remoção de Pd(II) e o tempo de contacto (entre o metal e os PM) necessário para que ocorresse essa remoção.

**Tabela 5.6 – Tabela resumo dos melhores resultados de remoção de Pd(II) conseguidos pelos consórcios de QL e de Sil e respetivos tempos de contacto.**

Consórcios	Dia Crescimento	OD <sub>600nm</sub>	Redução SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (%)	Remoção de Pd(II) (%)	Dia de Contacto
QL com SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	21°	0,786 ± 0,013	31,6 ± 1,9	95,0	14°
QL sem SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	7°	0,867 ± 0,049	-	48,2	28°
Sil com SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	14°	0,459 ± 0,035	27,1 ± 0,5	91,1	28°
Sil sem SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3°	0,781 ± 0,067	-	56,6	28°

Apesar dos PM de QL crescidos em meio com SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> apresentarem elevada remoção de Pd(II) ao 7° dia de crescimento (aproximadamente 97%), optou-se por se apresentar os resultados obtidos ao 21° dia de crescimento (95%), dado que, neste caso, a remoção ocorreu num menor tempo de contacto entre os PM e o metal (14 dias).

A análise da tabela 5.6 permite concluir que os PM mais eficientes na remoção de Pd(II) foram os de QL crescidos em meio com SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ao 21° dia de incubação, removendo a totalidade do metal ao fim do 14° dia de contacto entre os PM e o Pd(II). Os PM de Sil crescidos durante 14 dias em meio com SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> mostraram-se também eficientes na remoção de Pd(II), atingindo-se os 91,1% de remoção ao fim de 28 dias de contacto.

Os consórcios de QL e de Sil crescidos em meio sem SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> apresentam aproximadamente 50% de remoção de Pd(II), cerca de metade da remoção obtida com os PM provenientes de crescimentos com SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Perante estes resultados, o estudo seguinte foi realizado apenas com os PM crescidos em meio com SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Este estudo, de confirmação dos melhores resultados, foi realizado em duplicado.

- **Confirmação dos melhores resultados obtidos no estudo da eficiência dos PM ao longo do tempo de crescimento**

Com o objetivo de comprovar a fidelidade dos resultados obtidos no estudo anterior procedeu-se à recolha dos PM de acordo com os resultados da tabela 5.6. O ensaio decorreu nas mesmas condições que o ensaio anterior de forma tornar os resultados mais fidedignos. Desta forma, os PM do consórcio de QL foram recolhidos ao 21° dia e os PM de Sil foram recolhidos ao 14° dia de crescimento.

A tabela 5.7 mostra as condições em que se encontravam os consórcios imediatamente antes da recolha dos PM.

Tabela 5.7 – Descrição dos parâmetros (média) dos consórcios de QL e de Sil com  $\text{SO}_4^{2-}$  imediatamente antes da recolha dos PM.

Parâmetros Consórcios	$\varepsilon h$ (mV)	pH	Concentração de $\text{SO}_4^{2-}$ ( $\text{mgL}^{-1}$ )	$\text{OD}_{600\text{nm}}$
QL com $\text{SO}_4^{2-}$	$-373 \pm 2$	$6,58 \pm 0,01$	$109 \pm 17$	$0,813 \pm 0,044$
Sil com $\text{SO}_4^{2-}$	$-268 \pm 4$	$7,67 \pm 0,05$	$1664 \pm 130$	$0,511 \pm 0,002$

A tabela 5.8 representa os resultados obtidos após o contacto dos PM com Pd(II) ao longo do tempo em que decorreu o ensaio (28 dias).

Tabela 5.8 - Resultados obtidos (média) com os PM dos consórcios de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  quando adicionados ao Pd(II). Estes valores correspondem à percentagem de remoção do metal (%).

Tempo (Dias) Amostra	0	0,042	3	7	14	21	28
Pd + PM QL	$0,0 \pm 0$	$96,9 \pm 1,1$	$97,4 \pm 2,4$	$95,6 \pm 1,0$	$95,5 \pm 1,0$	$97,0 \pm 0,5$	$99,8 \pm 0,3$
Pd + PM Sil	$0,0 \pm 0$	$3,7 \pm 2,5$	$20,4 \pm 3,0$	$23,3 \pm 1,1$	$38,2 \pm 1,4$	$78,5 \pm 3,7$	$76,9 \pm 1,3$

Os resultados da remoção de Pd(II) por parte dos PM de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (duplicado) encontram-se indicados na figura 5.23.

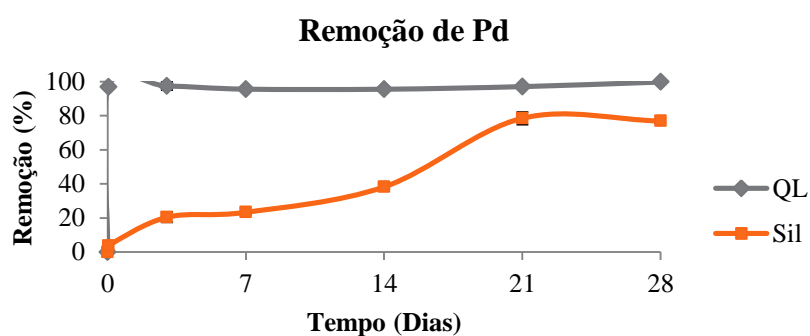


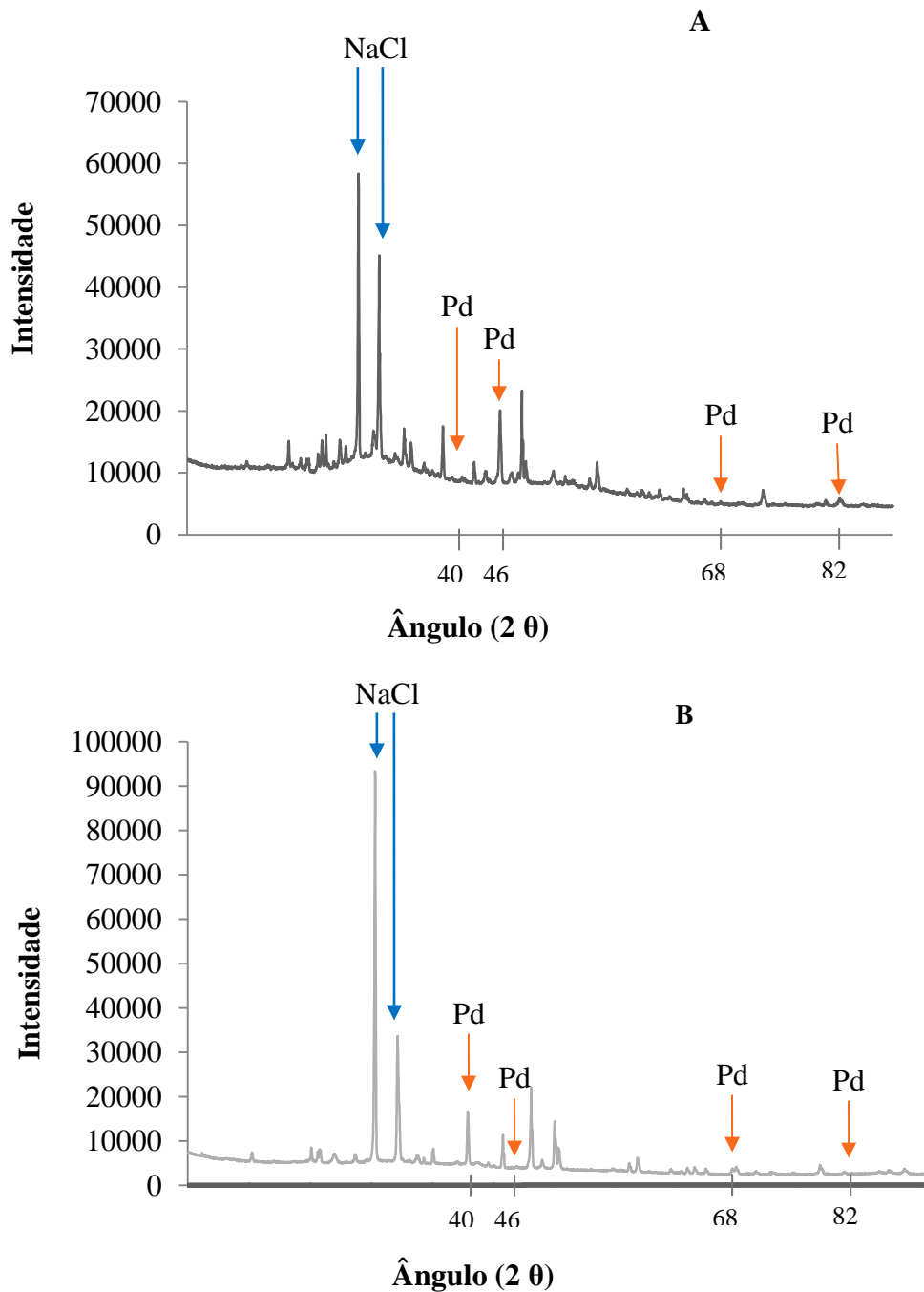
Figura 5.23 – Perfil de remoção de Pd(II) atingida pelos PM dos consórcios de QL e de Sil crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Estes resultados não se mostraram exatamente idênticos aos resultados obtidos no estudo anterior. Os PM recolhidos do consórcio de QL apresentaram uma elevada remoção (96,9%) de Pd(II) logo após 1 hora (0,042 dias) de contacto entre os PM e o metal. Os PM recolhidos do consórcio de Sil removeram cerca de 77% de Pd(II), menos

10% da capacidade de remoção obtida no estudo anterior. Este facto estará provavelmente relacionado com o facto de os consórcios terem reduzido uma percentagem diferente de  $\text{SO}_4^{2-}$ . O consórcio de QL, neste estudo, apresentou uma redução de  $93,4 \pm 1,0\%$  de  $\text{SO}_4^{2-}$  e conseqüentemente ocorreu maior produção de sulfureto, o que poderá justificar o aumento da remoção de Pd(II). No estudo anterior ocorreu apenas  $31,6 \pm 1,9\%$  de redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  o que poderá estar associado à menor remoção do metal. A mesma justificação é válida para os PM de Sil. Enquanto anteriormente o consórcio de Sil apresentava uma redução de  $27,1 \pm 0,5\%$  de  $\text{SO}_4^{2-}$ , neste estudo o consórcio reduziu  $15,2 \pm 0,7\%$ . Uma vez que ocorreu menos produção de  $\text{S}^{2-}$  a precipitação de Pd(II) terá sido mais reduzida.

O facto de os ensaios terem sido realizados com consórcios bacterianos e de terem ocorrido repicagens ao longo dos ensaios poderá ter contribuído para as variações obtidas nos resultados. Tal acontece, provavelmente, devido a uma alteração na eficiência dos consórcios, o que poderá ser inerente à própria dinâmica da população.

Os precipitados obtidos neste ensaio foram analisados por XRD e os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 5.24.



**Figura 5.24 - Difratoograma de Raios-X correspondente ao precipitado obtido na remoção de Pd(II) pelos PM provenientes de ambos os consórcios (A – QL; B – Sil) crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Mais uma vez os resultados obtidos por XRD mostram a existência de diversos picos de grande intensidade que poderão estar a “esconder” os picos de Pd. Estes picos apesar de existirem têm uma fraca intensidade devido à concentração deste metal ser muito inferior à concentração dos vários componentes do meio de cultura os quais

correspondem a alguns picos do difratograma. Os picos de maior intensidade continuam a corresponder ao cristal NaCl (proveniente do meio de crescimento) que existirá em maior quantidade no precipitado.

Como referido anteriormente, para melhorar estes resultados poder-se-á proceder a uma ou mais lavagens do precipitado na tentativa de eliminar os cristais formados pelos constituintes do meio e voltar a fazer a análise por XRD ou por micro-XRD, uma vez que a quantidade de precipitado é mínima. Os picos que devem ser procurados na amostra deverão corresponder aos picos de PdS ou de Pd(0). Não foi possível proceder à análise destes precipitados por SEM-EDS durante a elaboração desta tese de mestrado, contudo esta análise deverá ser realizada futuramente.

Os precipitados obtidos quando se utilizaram os PM de QL e de Sil crescidos em meio sem  $\text{SO}_4^{2-}$  para a remoção de Pd(II) também deverão ser analisados por micro-XRD e SEM-EDS. Estas análises são importantes na medida em que ocorreu remoção de Pd(II) da solução sem que houvesse sulfureto no meio, indicando, portanto, que o precipitado formado não será PdS. Neste caso, a remoção do metal por partes desses PM está a ocorrer por outra via (adsorção à biomassa ou redução, por exemplo) que não a da precipitação na forma de sulfuretos metálicos. Estes diferentes mecanismos de remoção do metal deverão ser melhor estudados. Para tal, dever-se-ão repetir esses ensaios de forma a obter-se uma maior quantidade de amostra (precipitado) para analisar. Esses estudos também já se encontram a decorrer no laboratório de Tecnologias Ambientais do Centro de Ciências do Mar (CCMAR) na Universidade do Algarve (UAAlg), contudo não ficaram concluídos a tempo de serem colocados nesta tese.

## Ensaio de adição dos PM a fases aquosas contendo Pt(IV) ou Pd(II) resultantes de ensaios de extração e re-extração líquido-líquido

Este capítulo teve o objetivo de testar a capacidade dos PM na remoção de Pt(IV) e Pd(II) presentes em soluções existentes no laboratório. Para esse efeito usaram-se PM recolhidos de inoculações dos enriquecimentos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  após 28 dias de crescimento e soluções contendo Pt(IV) ou Pd(II) existentes em fases orgânicas ou aquosas provenientes de ensaios de extração líquido-líquido. Uma vez que as fases orgânicas não são miscíveis com os PM foi necessário de dividir este capítulo em duas etapas. Na primeira etapa procedeu-se à re-extração do metal das fases orgânicas carregadas para uma nova fase aquosa miscível com a solução contendo os PM. Na

segunda etapa procedeu-se à adição direta dos PM às fases aquosas resultantes dos ensaios de extração líquido-líquido.

#### **Adição dos PM a fases orgânicas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II) provenientes de ensaios de extração líquido-líquido**

A realização deste estudo envolveu uma re-extração prévia do metal da fase orgânica para uma nova fase aquosa. Para tal, utilizou-se água do mar como re-extratante, uma vez que, segundo estudos realizados no laboratório de Tecnologias Ambientais do CCMAR/UALG, foi demonstrado que a água do mar poderá ser um bom re-extratante (agente de *stripping*) nos ensaios em que a FO é a dimetil-diciclohexil-succinamida (DMDCHSA) em 1,2-dicloroetano. Assim, esta fase orgânica carregada foi a FO utilizada neste estudo.

A eficiência de re-extração de Pd(II) e de Pt(IV) para a água do mar encontra-se indicada na tabela 5.9.

**Tabela 5.9 – Concentração de Pd(II) e de Pt(IV) na FO antes e depois da re-extração para água do mar e respetiva eficiência de extração.**

<b>Metal</b>	<b>Concentração de metal na FO (mg/L)</b>	<b>Concentração de metal na FA (mg/L)</b>	<b>Eficiência de extração (%)</b>
<b>Pt(IV)</b>	90 ± 2	70 ± 20	77,8
<b>Pd(II)</b>	80 ± 1	55 ± 6	68,8

Os resultados da tabela anterior mostram que a re-extração de Pt(IV) (77,8%), para a água do mar, foi mais eficaz que a extração de Pd(II) (68,8%).

Os PM utilizados para remover os metais da água do mar foram recolhidos ao fim de 28 dias de crescimento das inoculações realizadas a partir dos enriquecimentos do meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  (inóculos que apresentaram melhores resultados nos estudos anteriores).

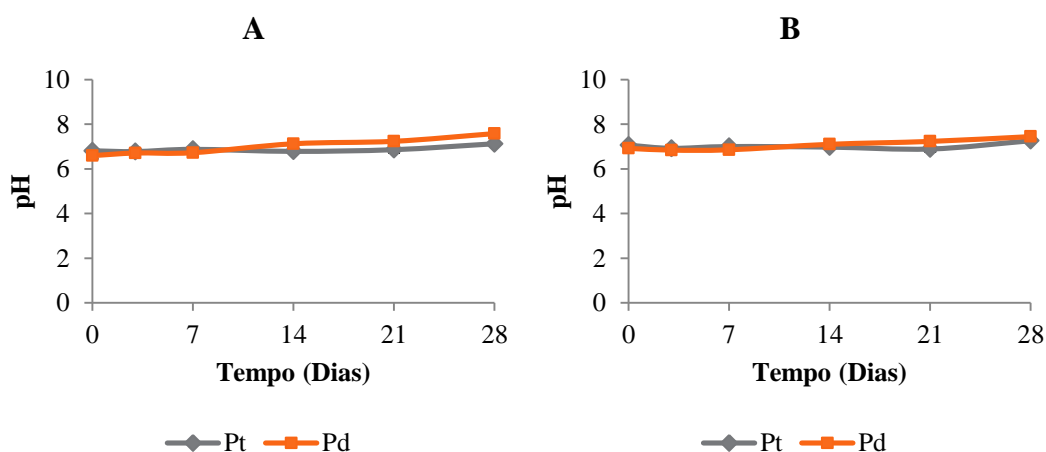
A tabela 5.10 apresenta os valores dos parâmetros que os consórcios apresentaram ao dia zero de crescimento e no dia em que se procedeu à recolha dos PM.

**Tabela 5.10 – Parâmetros de crescimento dos inóculos no início da inoculação e imediatamente antes da recolha dos PM utilizados na realização deste ensaio (28º dia de crescimento).**

Consórcio	$\epsilon h_{\text{inicial}}$ (mV)	$Eh_{\text{final}}$ (mV)	$[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{inicial}}$ (mg/L)	$[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{final}}$ (mg/L)
QL	$-152 \pm 0$	$-223 \pm 7$	$1786 \pm 0$	$1470 \pm 59$
Sil	$-180 \pm 0$	$-243 \pm 3$	$1836 \pm 0$	$1678 \pm 19$

No decorrer do ensaio da adição dos PM ao metal presente na água do mar monitorizaram-se diversos parâmetros: pH,  $\epsilon h$ , concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  e concentração de metal em solução. Os resultados apresentam-se em seguida e dizem respeito à média de duplicados. Na maioria dos casos as barras de erros não são visíveis uma vez que o desvio-padrão dos duplicados é muito pequeno.

A figura 5.25 mostra a evolução do pH ao longo deste ensaio.

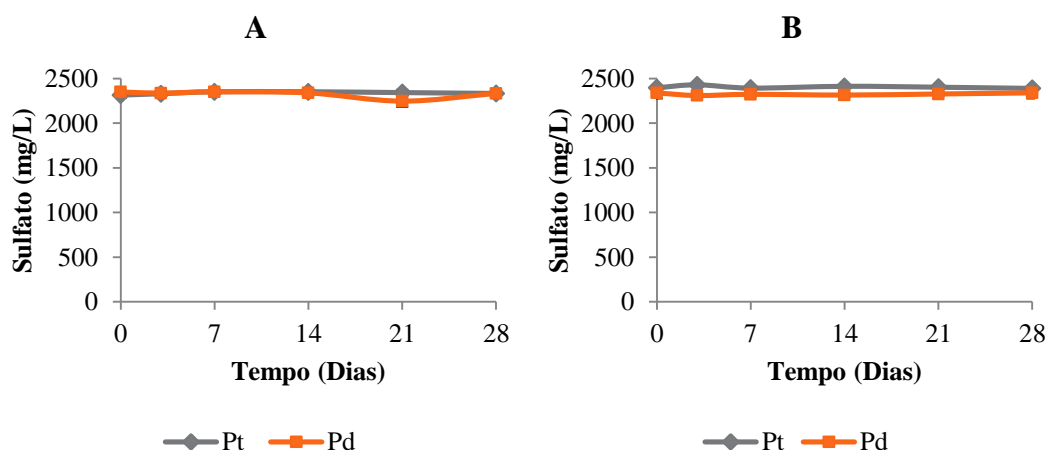


**Figura 5.25 – Perfil de pH dos PM recolhidos do consórcio de QL (A) e do consórcio de Sil (B) aquando da sua adição à água do mar com Pt(IV) e Pd(II).**

O pH mantém-se constante e próximo de 7 ao longo do ensaio (figura 5.25). Nestes ensaios o pH não baixou para valores tão negativos pois tanto os PM como a FA têm um pH próximo da neutralidade.

Em relação ao  $\epsilon h$ , tal como aconteceu nos estudos anteriores, os resultados não se mostraram muito esclarecedores.

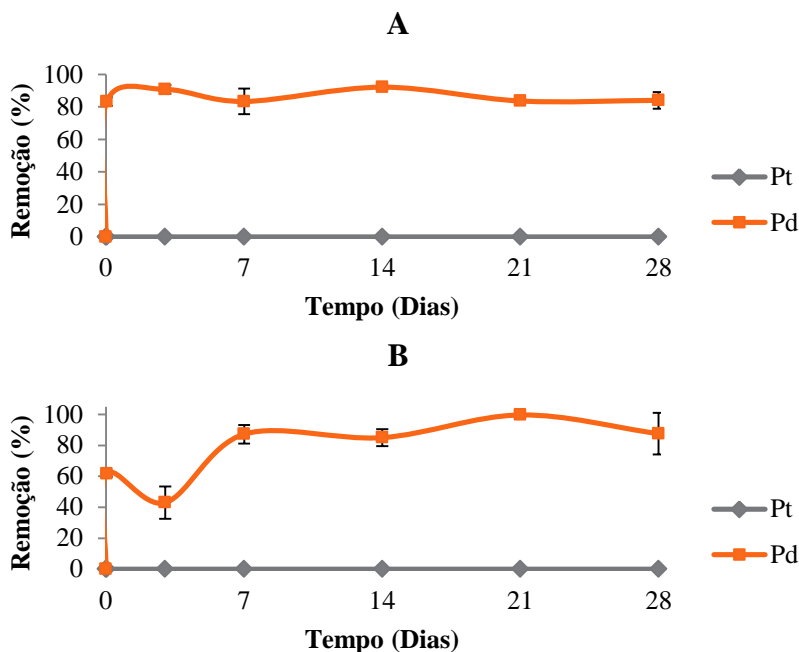
A concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  monitorizada durante o ensaio encontra-se representada na figura 5.26.



**Figura 5.26 – Perfil de concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  na amostra aquando da adição dos PM à FA carregada. A) Representa os PM de QL com a FA contendo o metal e B) representa os PM de Sil com a FA contendo o metal.**

A concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  manteve-se constante (próximo de 2400 mg/L) ao longo de todo o ensaio uma vez que não existia em solução nada que o pudesse reduzir. Note-se que a concentração de sulfato apresentada nos estudos anteriores era menor do que a que se apresenta neste estudo devido à água do mar apresentar sulfato na sua composição [57].

Em relação à remoção de metal os resultados apresentam-se na figura 5.27.



**Figura 5.27 – Perfil de remoção (%) de Pt(IV) e Pd(II) utilizando os PM recolhidos dos inóculos de QL (A) e de Sil (B).**

Perante os resultados obtidos pode observar-se que não houve remoção de Pt(IV) quer com os PM produzidos pelo consórcio de QL, quer pelos PM do consórcio de Sil. Contudo, estes PM conseguiram remover aproximadamente 80% do Pd(II) presente na água do mar. Este estudo reforça e confirma que os PM provenientes dos consórcios de QL e de Sil, crescidos em meio com sulfato, apresentam capacidade para remoção de Pd(II) e não têm capacidade de remover Pt(IV). A remoção de Pd(II), provavelmente, está a ocorrer por precipitação sob a forma de sulfuretos, tal como aconteceu nos estudos anteriores.

Os resultados obtidos por XRD são idênticos aos já apresentados anteriormente. Também neste caso os picos de maior intensidade continuam a corresponder ao cristal de NaCl que existe numa elevada concentração na água do mar. Além disso, a concentração de Pd(II) nesta amostra é ainda menor que a concentração dos estudos anteriores (55 mg/L e 100 mg/L respetivamente). A análise destes precipitados por micro-XRD será realizada mas para tal irá proceder-se previamente a uma ou mais lavagens do precipitado com água destilada para a remoção dos sais provenientes do meio.

#### **Adição dos PM a fases aquosas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II) provenientes de ensaios de extração líquido-líquido**

Para este estudo não houve necessidade de realizar re-extração para uma fase aquosa, uma vez que as fases utilizadas foram as próprias fases aquosas. Estas fases aquosas consistiram em Pt (IV) em HCl 6M e em Pd (II) numa solução de HCl 2M e 1M.

Os PM utilizados neste ensaio foram os mesmos que os utilizados no ensaio anterior. Os valores dos parâmetros de crescimento dos inóculos no início e imediatamente antes da recolha dos PM utilizados na realização deste ensaio encontram-se na tabela 5.10.

No decorrer deste ensaio foram monitorizados diversos parâmetros, tais como, o pH, o  $\epsilon_h$ , a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  e a concentração de metal em solução. Os resultados que se apresentam dizem respeito à média de duplicados. Na maioria dos casos as barras de erros não são visíveis uma vez que o desvio-padrão destes duplicados é muito pequeno.

O pH, neste estudo, manteve-se constante durante todo o ensaio. Os PM em contacto com a FA carregada com Pt(IV) em solução de HCl 6M apresentaram um pH próximo

de 0, enquanto os PM em contacto com a FA carregada com Pd(II) em solução de HCl 1M e 2M apresentaram um pH próximo de 0,8 e de 0,4, respetivamente

Os resultados do  $\epsilon$ h, uma vez mais, não foram esclarecedores e isto pode dever-se à baixa concentração de metal no ensaio.

A evolução da concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  ao longo do ensaio encontra-se na figura 5.28.

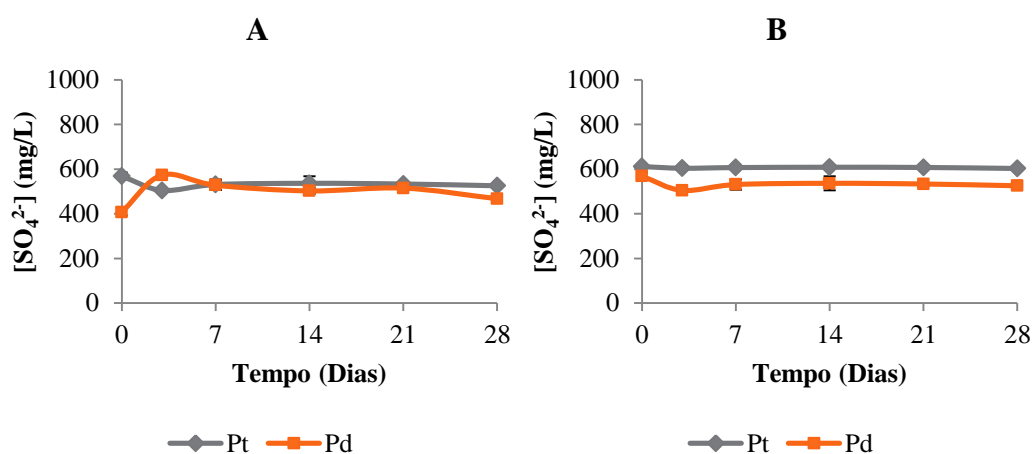
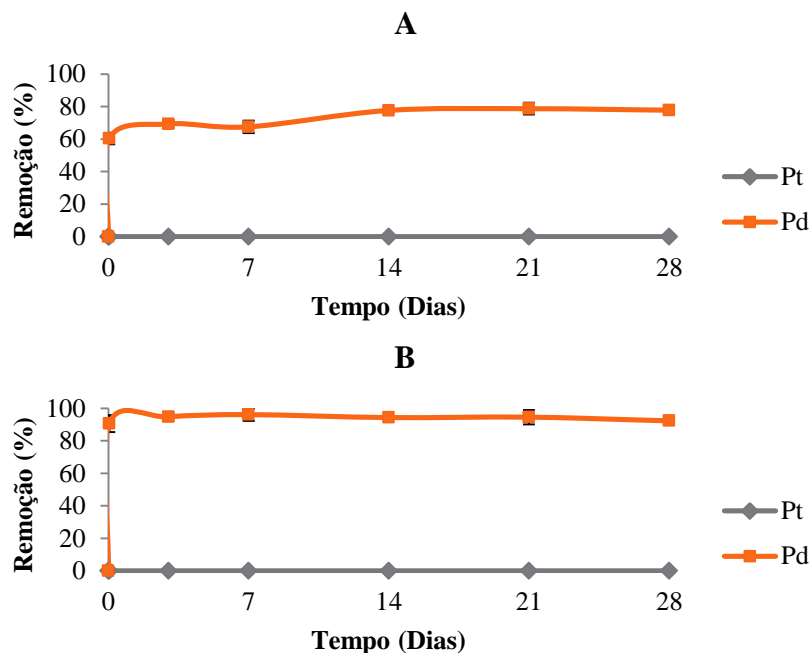


Figura 5.28 – Perfil de concentração de sulfato ao longo dos 28 dias do contacto entre dos PM com as FA carregadas. Onde A) representa os PM de QLe B) os PM de Sil.

A concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  manteve-se constante ao longo do ensaio uma vez que os PM se encontram diluídos de 1:2. Isso fez com que a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  diminuísse para metade (próximo de 600 mg/L). Estes resultados mostram que não existem bactérias presentes no *batch* que pudessem reduzir o  $\text{SO}_4^{2-}$ .

A remoção do metal ao longo do ensaio está apresentada na figura 5.29.



**Figura 5.29 – Perfil de remoção (%) de Pt(IV) e de Pd(II) ao longo dos 28 dias de contacto entre os PM com as FA carregadas. Onde A) representa os PM de QL e B) os PM de Sil.**

Tal como se pode observar na figura 5.29, não ocorreu remoção de Pt(IV), mas houve cerca de 80% de remoção de Pd(II) existente na FA. Este comportamento foi semelhante com ambos os consórcios.

Estes estudos confirmam, novamente, que os PM provenientes de ambos os consórcios (QL e Sil) apresentam capacidade para remoção de Pd(II) e não apresentam capacidade de remoção de Pt(IV).

Neste estudo o pH poderá ser a causa para que não ocorra remoção de Pt(IV) uma vez que este se encontra próximo de zero e portanto bastante ácido. Esse valor tão baixo de pH poderá influenciar a solubilidade de Pt(IV) fazendo com que este se mantenha solúvel na mistura entre os PM e as FA carregadas.

Os resultados obtidos por XRD foram semelhantes aos resultados obtidos anteriormente e portanto as sugestões para melhorar a análise destes precipitados são as apresentadas no estudo anterior.

## Ensaio de re-extração líquido-líquido de fases orgânicas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II) usando PM como agentes de re-extração

O objetivo deste estudo foi verificar se a remoção do metal presente na FO, utilizando os PM dos consórcios de QL e de Sil, poderia ser imediata realizando-se uma extração líquido-líquido. Para tal, realizou-se uma re-extração da fase orgânica carregada para uma fase aquosa (PM de QL e PM de Sil). A fase orgânica utilizada foi a dimetil-diciclohexil-succinamida em 1,2-dicloroetano. Os PM foram os mesmos que se utilizaram nos estudos anteriores.

A eficiência de extração dos dois metais para os PM encontra-se na tabela 5.11.

**Tabela 5.11 - Concentração de Pt(IV) e Pd(II) na FO, antes da extração, na FA, depois da extração, e respetiva eficiência de extração.**

<b>Metal + PM</b>	<b>Concentração de metal na FO (mg/L)</b>	<b>Concentração de metal na FA (mg/L)</b>	<b>Eficiência de extração (%)</b>
<b>Pt(IV) + QL</b>	380,0 ± 26,7	280,0 ± 1,4	73,7
<b>Pt(IV) + Sil</b>	380,0 ± 26,7	130,0 ± 34,2	34,2
<b>Pd(II) + QL</b>	200,0 ± 126,7	190,0 ± 126,7	95,0
<b>Pd(II) + Sil</b>	200,0 ± 126,7	23,0 ± 23,8	11,5

Os resultados obtidos mostram os PM provenientes do consórcio de QL foram mais eficientes na re-extração dos metais, extraíndo 95% de Pd(II) e 73,7% de Pt(IV) existentes na FO. Os PM de Sil apresentaram percentagens de remoção de 34% de Pt(IV) e de 11% de Pd(II). Contudo, como se tratam de ensaios de extração não se recupera o metal na forma de precipitado (sólido).

No ensaio de re-extração usando os PM de Sil surgiu um precipitado preto nos filtros de pregas utilizados na separação das duas fases. Contudo, devido ao facto desse precipitado ser muito reduzido não foi possível analisá-la por XRD. Sendo de considerar a utilização da técnica de micro-XRD.

Como o meio nutriente é rico em NaCl estes PM funcionam como bons agentes de re-extração de Pt(IV) e de Pd(II), possivelmente devido à formação de cloro-complexos destes metais.

## 6. Conclusões

---

Este trabalho teve como principal objetivo averiguar se os PM produzidos por comunidades bacterianas, provenientes de lamas de ETAR, teriam capacidade para remover PGM (Pt(IV), Pd(II) e Rh(III)) de soluções aquosas. Para tal, estudaram-se lamas provenientes de duas ETARs (QL e SiL) que foram enriquecidas em meio com e sem sulfato. Outra das finalidades deste estudo foi perceber se estes PM também poderiam ser utilizados como agente re-extratante de Pt(IV) e de Pd(II) em ensaios de extração líquido-líquido.

O trabalho desenvolvido permite concluir que os PM são eficientes na remoção de Pd(II). Esta remoção foi atingida com ambos os PM crescidos em meio com e sem sulfato. A remoção de Pd(II) com os PM dos consórcios crescidos na presença de sulfato parecem indicar que o precipitado formado é PdS. Os PM dos consórcios crescidos em meio sem sulfato, apesar de mostrarem uma menor eficiência, certamente apresentarão outro mecanismo de remoção deste metal, o qual deverá ser estudado com maior atenção.

Apesar dos resultados promissores obtidos com o Pd(II), a remoção de Pt(IV) e de Rh(III) não foi tão bem sucedida. A fraca remoção de Pt(IV) poderá estar relacionada com os baixos valores de pH do meio, uma vez que estes metais são solúveis em meio ácido. A fraca remoção de Rh(III) poderá estar relacionada com outros fatores ainda desconhecidos, pois a remoção biológica deste metal está ainda pouco estudada.

Este trabalho mostrou ainda que não são necessários muitos dias de crescimento dos consórcios bacterianos para que os PM tenham capacidade de remover Pd(II). Os PM de QL crescidos durante 7 dias em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  removeram 98% de Pd(II) e os PM de SiL crescidos durante 14 dias em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  têm capacidade de remover 91% deste metal. Estes resultados demonstraram que basta que haja em solução uma quantidade de  $\text{S}^{2-}$  suficiente para que ocorra precipitação de Pd(II) muito provavelmente sob a forma de sulfureto metálico. Os resultados obtidos, no estudo da eficiência, dos PM de QL crescidos em meio com  $\text{SO}_4^{2-}$  mostram que, provavelmente, existia em solução  $\text{S}^{2-}$  em excesso o que poderá permitir remover quantidades superiores a 100 mg/L (concentração máxima estudada) de Pd(II).

Os ensaios desenvolvidos com as fases aquosas contendo Pd(II) e Pt(IV), provenientes de ensaios de extração líquido-líquido, confirmaram os resultados

anteriores, ou seja, os PM (de consórcios crescidos na presença de sulfato) conseguiram remover Pd(II) dessas fases aquosas, mas, não se mostraram eficientes na remoção de Pt(IV).

Nos ensaios em que os PM foram utilizados como agente re-extratante verificou-se que os metabolitos recolhidos do consórcio de QL são um bom re-extratante de Pd(II) e de Pt(IV). Contudo, ao extrair os metais da fase orgânica não há recuperação do metal sob a forma de precipitados.

A utilização dos PM na remoção de metais poderá ser bastante importante e promissora para o desenvolvimento de uma tecnologia de biorremediação ou de biorrecuperação. Os PM têm a vantagem de não necessitarem de ser resistentes a metais como é condição necessária quando se colocam consórcios bacterianos em contacto com o metal. Além disso, o facto de os PM serem provenientes de consórcios bacterianos e não de culturas puras é uma mais-valia, uma vez que provavelmente a variabilidade destes metabolitos será muito maior. Este trabalho foi inovador na medida em que estuda a possibilidade de PM produzidos por consórcios bacterianos removerem/recuperarem PGM.

## 7. Trabalho Futuro

---

O trabalho desenvolvido durante este estágio de mestrado poderá ser completado com mais alguns estudos. Assim, apresenta-se de seguida algumas sugestões para trabalho futuro. A caracterização dos consórcios bacterianos parece importante, sobretudo para as comunidades bacterianas que originaram os PM mais eficientes. Para tal, deverá ser realizada uma análise filogenética, de forma a caracterizar e comparar os microrganismos presentes nestes consórcios. Também será importante caracterizar a nível estrutural e funcional os melhores PM obtidos, de forma a perceber que tipo de reação ocorre quando o metal precipita (principalmente no que respeita aos consórcios crescidos em meio sem sulfato).

Sugere-se ainda, que estes ensaios sejam repetidos com controlo do pH para verificar se de facto são os baixos valores de pH que estão a influenciar a reduzida remoção de Pt(IV). Este estudo deverá ser muito bem preparado de forma a garantir que a base utilizada para aumentar os valores de pH não interfere na precipitação do metal.

Futuramente poder-se-á crescer os consórcios utilizados neste trabalho com outras fontes de carbono alternativas (em vez do lactato, uma fonte de carbono economicamente mais atrativo, se possível um resíduo) e perceber se os PM produzidos por esses consórcios serão eficientes na remoção de metais. O crescimento bacteriano poderá ser alterado quando se usam outras fontes de carbono o que poderá influenciar os PM segregados pelos consórcios bacterianos. Estes “novos” PM poderão apresentar diferentes percentagens de remoção dos metais. O etanol, o glicerol, ou os resíduos vinícolas poderão ser fontes de carbono possíveis para novos estudos.

## 8. Bibliografia

---

1. Thakur, I. S. (2006). *Environmental Biotechnology: basic concepts and applications*. Nova Deli, India: I.K. International, cap. 1.
2. Evans, G. M., & Furlong, J. C. (2003). *Introduction to Biotechnology*. England: Wiley, cap. 1 e 5.
3. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Nutrient Cycles, Biodegradation and Bioremediation*. San Francisco, United States of America: Benjamin Cummings, cap. 5, 14 e 24.
4. Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63-67.
5. Madsen, E. L. (2008). *Environmental Microbiology - From genomes to biogeochemistry*. Blackwell, cap. 8.
6. Sharma, S. (2012). Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, 2.
7. Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews*, 6: 441-454.
8. Martins, M., Santos, E. S., Faleiro, M. L., Chaves, S., Tenreiro, R., Barros, R. J., et al. (2011). Performance and bacterial community shifts during bioremediation of acid mine drainage from two Portuguese mines. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 972-981.
9. Martins, M., Faleiro, M. L., Barros, R. J., Veríssimo, A. R., Barreiros, M. A., & Costa, M. C. (2009). Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *Journal of Hazardous Materials*, 166: 706–713.
10. Singer, C., Zimmermann, S., & Sures, B. (2005). Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): Comparison with lead and cadmium exposures. *Aquatic Toxicology*, 75: 65–75.
11. Ravindra, K., Bencs, L., & Grieken, R. V. (2004). Platinum group elements in the environment and their health risk. *The Science of the Total Environment*, 318: 1–43.

12. Daltry, V. D., & Wilson, A. H. (1997). Review of platinum-group mineralogy: compositions and elemental associations of the PG-minerals and unidentified PGE-phases. *Mineralogy and Petrology*, 60:185-229.
13. Heslop, R., & Jones, H. (1987). Os Metais de Transição . In R. B. Heslop, & H. Jones, *Química Inorgânica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, cap. 27 e 37.
14. Greenwood, N. N., & Earnshaw. (1997). *Chemistry of the Elements*. United Kingdom: Elsevier, cap. 1, 25, 26 e 27.
15. Rao, C. R., & Reddi, G. S. (2000). Platinum group metals (PGM); occurrence, use and recent trends in their determination. *Trends in Analytical Chemistry*, 19: 565-586.
16. Das, N. (2010). Recovery of precious metals through biosorption — A review. *Hydrometallurgy*, 103: 180–189.
17. Martins, M., Assunção, A., Martins, H., Matos, A. P., & Costa, M. C. (2013). Palladium recovery as nanoparticles by an anaerobic bacterial community. Society of Chemical Industry.
18. Bitton, G. (2005). *Wastewater - Microbiology*. Canada: Wiley-Liss.
19. Vidotti, I. M., Pitombo, L. R., Marcondes, M. E., Beltran, M. H., Porto, P. A., & Esperidião, Y. M. (2008). *Interações e Transformações I - Guia do Professor*. São Paulo, Brasil: Edusp, cap. 1.
20. Rocha, J. C., Rosa, A. H., & Cardoso, A. A. (2009). *Introdução à Química Ambiental*. Porto Alegre, Brasil: bookman, cap. 3.
21. Manahan, S. E. (2000). *Environmental Science, Technology and Chemistry*. Boca Raton, Florida: Lewis Pub, cap. 1, 8 e 11.
22. Postgate, J. R. (2000). *Os Micróbios e o Homem*. United Kingdom: Cambridge University Press, cap. 2 e 8.
23. Paul, E. A. (2007). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Oxford: Elsevier Academic Press, cap. 15.
24. Postgate, J. R. (1984). *The Sulfate-Reducing Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
25. Ibanez, J. G., Hernandez-Esparza, M., Doria-Serrano, C., & Fregoso-Infante, A. (2007). *Environmental Chemistry – Fundamentals*. Cidade do Mexico: Springer, cap. 7.

26. Tang, K., Baskaran, V., & Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 73–94.
27. Devereux, R., Delaney, M., Widdel, F., & Stahl, D. A. (1989). Natural Relationships among Sulfate-Reducing Eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 171: 6689-6695.
28. Castro, H. F., Williams, N. H., & Ogram, A. (1999). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology Ecology*, 31: 1-9.
29. Zeikus, J. G., Dawson, M. A., Thompson, T. E., Ingvorsen, K., & Hatchikian, E. C. (1982). Microbial Ecology of Volcanic Sulphidogenesis: Isolation and Characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov and sp. nov. *Journal of General Microbiology*, 129: 159-169.
30. Henry, E. A., Devereux, R., Maki, J. S., Gilmour, C. C., Woese, C. R., Mandelco, L., et al. (1993). Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology*, 161: 62-69.
31. Barton, L. L., & Carpenter, C. M. (2013). Suitability of fluorescence measurements to quantify sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 93: 192–197.
32. Elsgaard, L., Prieur, D., Mukwaya, M. G., & Jorgensen, B. B. (1994). Thermophilic sulfate reduction in hydrothermal sediment of lake Tanganyika, East-Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 60: 1473-1480.
33. Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cuff, V., Banta, A., Reysenbach, A.-L., & Prieur, D. (2002). *Thermodesulfobacterium hydrogenophilum* sp nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 765–772.
34. Johnson, D. B. (1995). Acidophilic Microbial Communities: Candidates for Bioremediation of Acidic Mine Effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41-58.
35. Gibson, G. R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 769-797.
36. Barton, L. L., & Tomei, F. A. (1995). *Biotechnology Handbooks: Sulfate-Reducing Bacteria*. New York: Plenum Express, cap. 1.

37. Rashamuse, K. J., & Whiteley, C. G. (2007). Bioreduction of Pt (IV) from aqueous solution using sulphate-reducing bacteria. *Applied Microbiol Biotechnol*, 75:1429–1435.
38. Moosa, S., Nemati, M., & Harrison, S. T. (2002). A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, Part I: Effect of sulphate concentration. *Chemical Engineering Science*, 57: 2773 – 2780.
39. Knobel, A. N., & Lewis, A. E. (2002). A mathematical model of a high sulphate wastewater anaerobic treatment system. *Water Research*, 36: 257–265.
40. Martins, M., Faleiro, M. L., Barros, R. J., Veríssimo, A. R., & Costa, M. C. (2009). Biological sulphate reduction using food industry wastes as carbon sources. *Biodegradation*, 20: 559–567.
41. Costa, M. C., & Duarte, J. C. (2005). Bioremediation of Acid Mine Drainage Using Acidic Soil and Organic Wastes for Promoting Sulphate-Reducing Bacteria Activity on a Column Reactor. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165: 325–345.
42. Okabe, S., Nielsen, P. H., Jones, W. L., & Characklis, W. G. (1995). Sulfate product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Research*, 2: 571-578.
43. Hansen, T. A. (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 66: 165-185.
44. García, C., Moreno, D. A., Ballester, A., Blázquez, M. L., & González, F. (2001). Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering*, 9: 997-1008.
45. Yong, P., Farr, J., Harris, I., & Macaskie, L. (2002). Palladium recovery by immobilized cells of *Desulfovibrio desulfuricans* using hydrogen as the electron donor in a novel electrobioreactor. *Biotechnology Letters*, 24: 205–212.
46. Vargas, I., Macaskie, L., & Guiba, E. (2004). Biosorption of palladium and platinum by sulfate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79: 49–56.
47. Riddin, T. L., Govender, M., Gericke, Y., & Whiteley, C. G. (2009). Two different hydrogenase enzymes from sulphate-reducing bacteria are responsible for the bioreductive mechanism of platinum into nanoparticles. *Enzyme and Microbial Technology*, 45: 267–273.

48. Ngwenya, N., & Whiteley, C. G. (2006). Recovery of Rhodium(III) from Solutions and Industrial Wastewaters by a Sulfate-Reducing Bacteria Consortium. *Biotechnology Progress*, 22: 1604-1611.
49. Yong, P., Mikheenko, I., Deplanche, K., Sargent, F., & Macaskie, L. (2009). Biorecovery of precious metals from wastes and conversion into fuel cell catalyst for electricity production. *Advanced Materials Research*, 71-73: 729-732.
50. Deplanche, K., Bennett, J., Mikheenko, I., Omajali, J., Wells, A., & Meadows, R. (2014). Catalytic activity of biomass-supported Pd nanoparticles: Influence of the biological component in catalytic efficacy and potential application in 'green' synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals. *Applied Catalysis B: Environmental*, 147: 651-665.
51. Godlewska-Zylkiewicz, B. (2003). Biosorption of platinum and palladium for their separation/preconcentration prior to graphite furnace atomic absorption spectrometric determination. *Spectrochimica Acta Part B*, 58: 1531-1540.
52. Godlewska- Zylkiewicz, B., & Kozłowski, M. (2005). Solid phase extraction using immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae* for determination of palladium in road dust. *Analytica Chimica Acta*, 539: 61-67.
53. Dziwulska, U., Bajguz, A., & Godlewska-Zylkiewicz, B. (2004). The use of algae *Chlorella vulgaris* immobilized on Cellex-T support for separation/preconcentration of trace amounts of platinum and palladium before GFAAS determination. *Analytical Letters*, 37: 2189-2203.
54. Sari, A., Mendil, D., Tuzen, M., & Soylak, M. (2009). Biosorption of palladium(II) from aqueous solution by moss (*Racomitrium lanuginosum*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Hazardous Materials*, 162: 874-879.
55. Charlesworth, P. (1981). Separating the Platinum Group Metals by Liquid-Liquid Extraction. *Platinum Metals Rev.*, 25: 106-112.
56. Bernardis, F. L., Grant, R. A., & Sherrington, D. C. (2005). A review of methods of separation of the platinum-group metals through their chloro-complexes. *Reactive & Functional Polymers*, 65: 205-217.
57. Kim, S., Chon, K., Kim, S. J., Lee, S., Lee, E., & Cho, J. (2009). Uncertainty in organic matter analysis for seawater reverse osmosis (SWRO) desalination. *Desalination*, 238: 30-36.

58. Liu, C.-G., Lin, Y.-H., & Bai, F.-W. (2011). Development of redox potential-controlled schemes for very-high-gravity. *Journal of Biotechnology*, 153: 42–47.
59. Borden, R. C., Gomez, C. A., & Becker, M. T. (1995). Geochemical indicators of intrinsic. *Ground Water*, 33: 180-189.
60. Marck, C., Wilhelmi, B., Duncan, J. R., & Burgess, J. E. (2007). Biosorption of precious metals. *Biotechnology Advances*, 25: 264–271.

## 9. Anexos

Anexo 1 – Árvore filogenética das SRB *Deltaproteobacteria*, com ênfase na família *Desulfovibrionaceae*

Um dos quatro grupos distintos das SRB corresponde às mesófilas Gram-negativas (*Deltaproteobacteria*). Este grupo divide-se em duas famílias: *Desulfovibrionaceae* e *Desulfobacteriaceae*. Em baixo encontra-se a árvore filogenética representando o grupo *Deltaproteobacteria* e a família *Desulfovibrionaceae*.

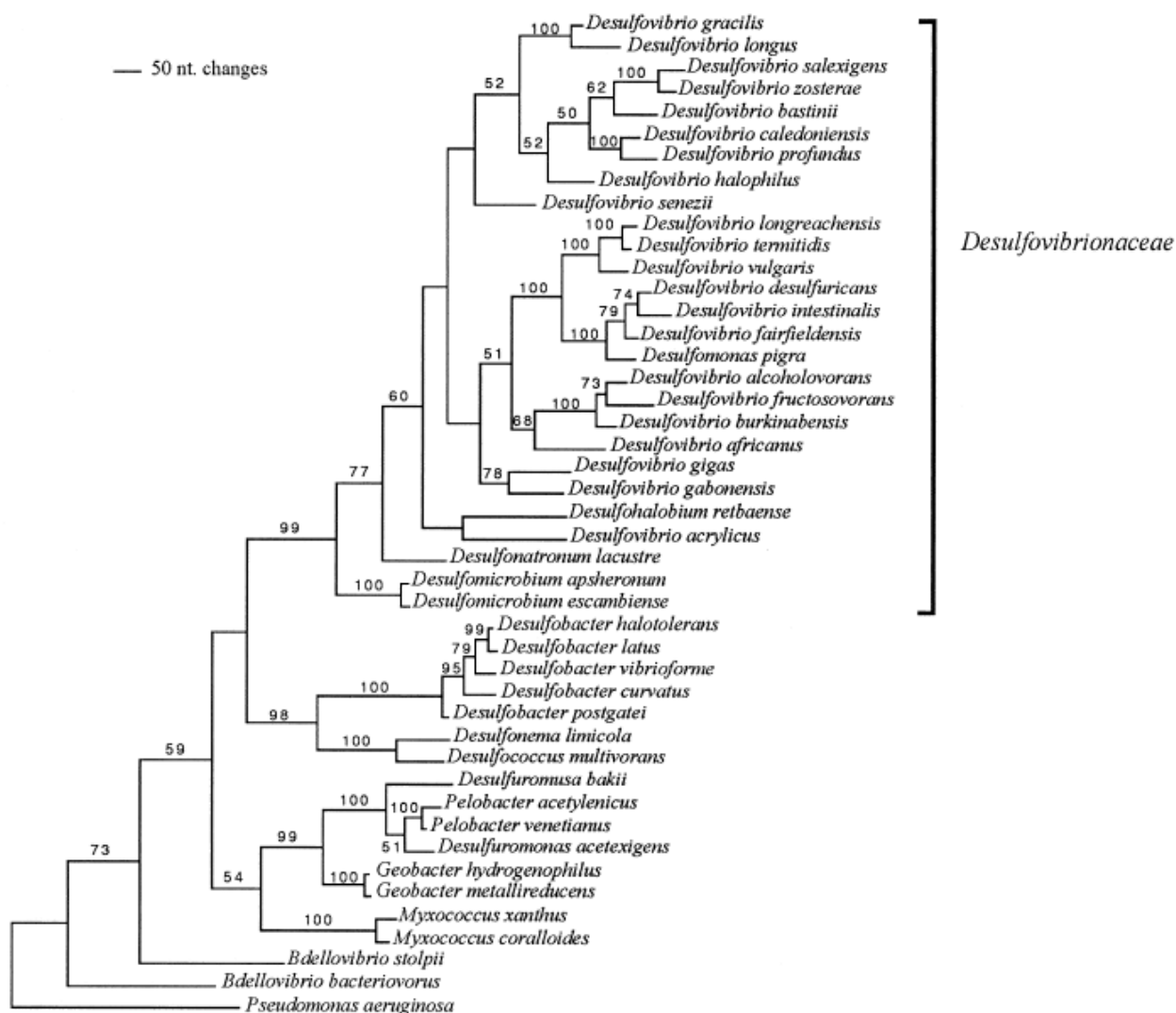


Figura 9.1 - Árvore filogenética das SRB mesófilas Gram-negativas, com ênfase na família *Desulfovibrionaceae* (adaptado de Catro et al. 1999 [28]).

Anexo 2 – Árvore filogenética das SRB *Deltaproteobacteria*, com ênfase na família *Desulfobacteriaceae*

Um dos quatro grupos distintos das SRB corresponde às mesofílicas Gram-negativas (*Deltaproteobacteria*). Este grupo divide-se em duas famílias: *Desulfovibrionaceae* e *Desulfobacteriaceae*. Em baixo encontra-se a árvore filogenética representando o grupo *Deltaproteobacteria* e a família *Desulfobacteriaceae*.

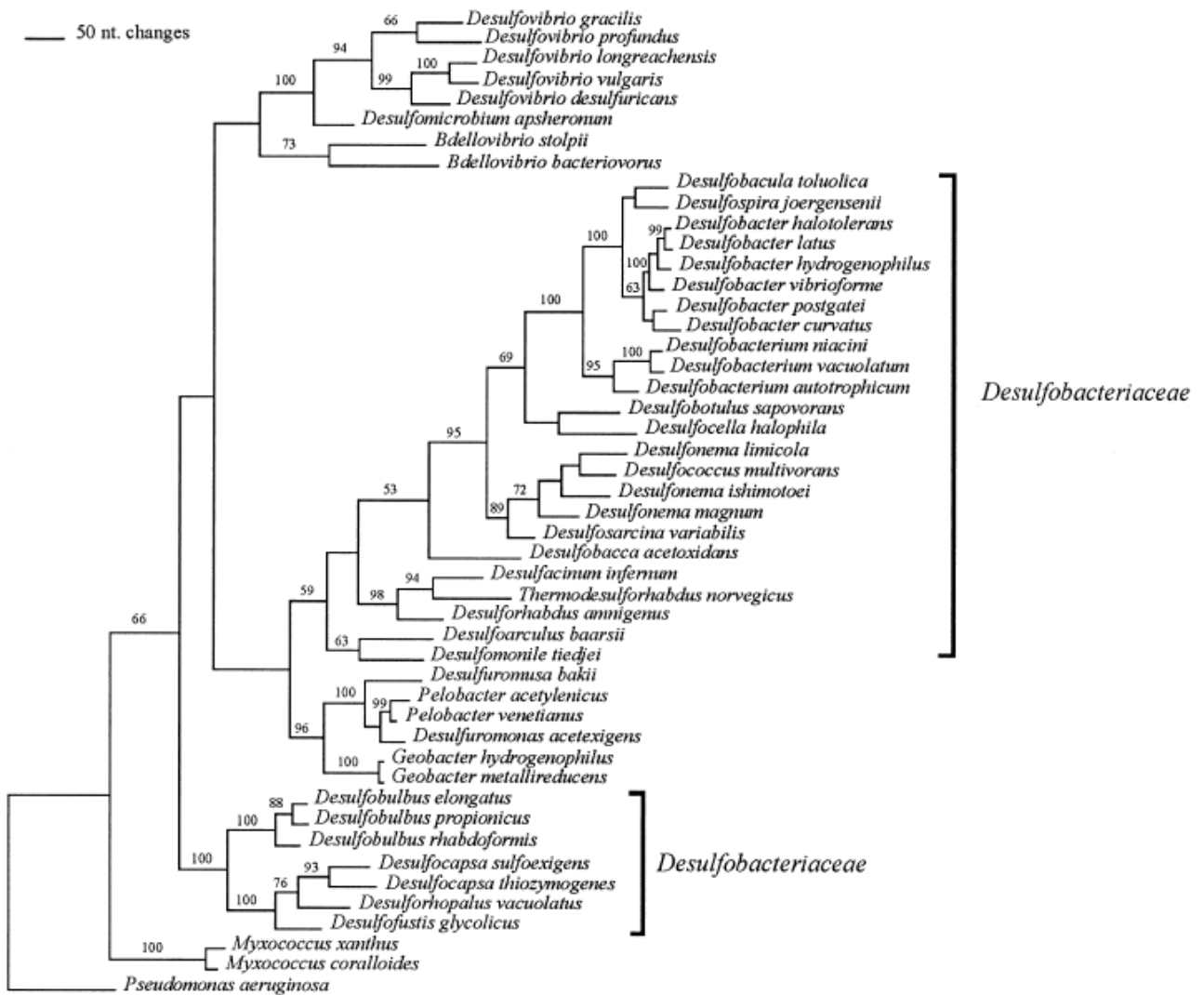


Figura 9.2 - Árvore filogenética das SRB mesófilas Gram-negativo, com ênfase na família *Desulfobacteriaceae* (adaptado de Catro et al. 1999 [28]).



#### Anexo 4 – Árvore filogenética das bactérias termófilas

As bactérias termófilas (*Thermodesulfobacteria*, *Nitrospirae* e *Thermodesulfobiaceae*). Tal como mostra a figura abaixo, as duas espécies melhor caracterizadas neste grupo de SRB são *Thermodesulfobacterium commune* [29] e *Thermodesulfovibrio yellowstonii* [30].

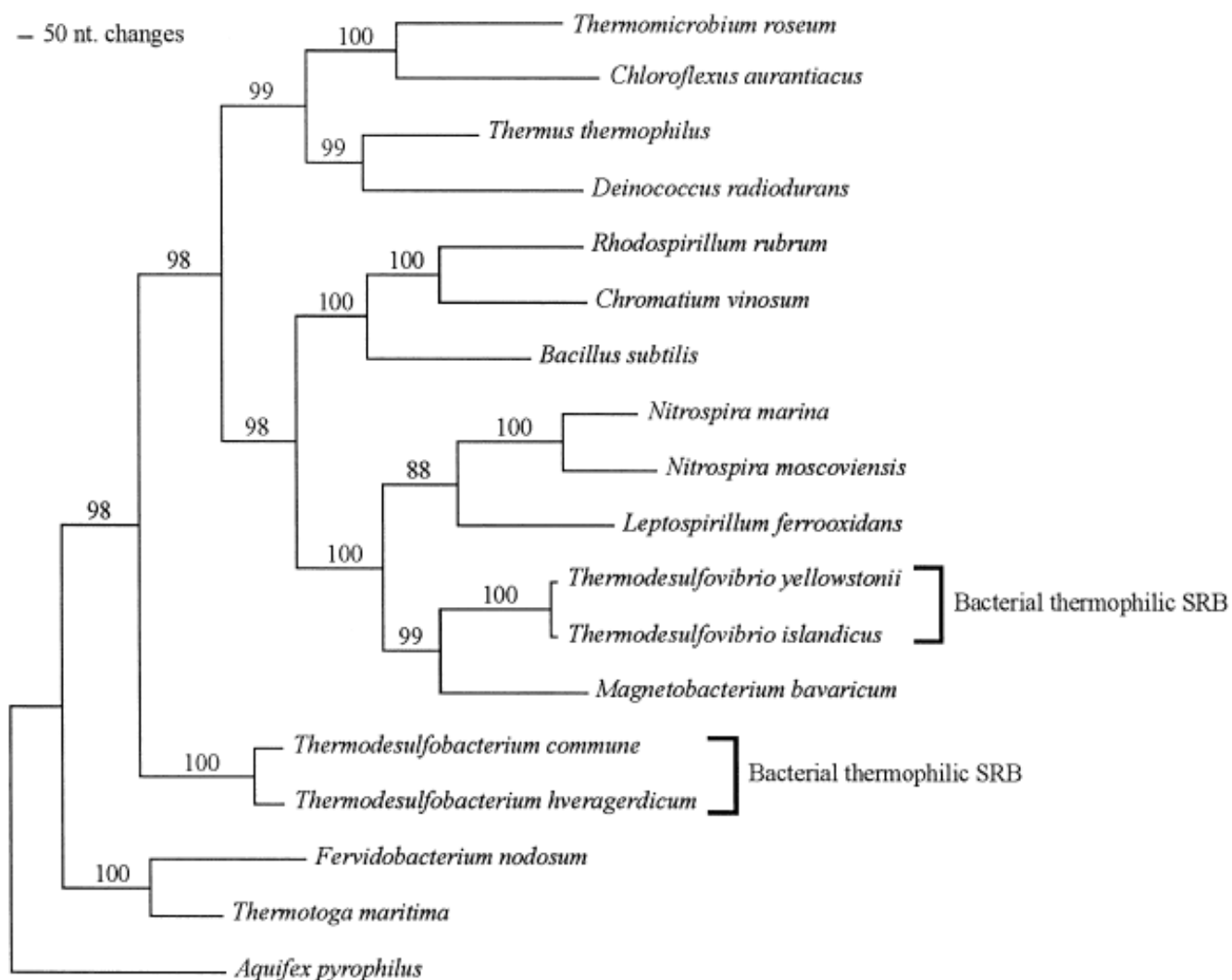


Figura 9.4 - Árvore filogenética das bactérias termófilas

## Anexo 5 – Lista de Reagentes e Equipamentos

Em baixo encontram-se as listagens de todos os reagentes, metais e equipamentos que foram utilizados nos ensaios produzidos nesta tese de mestrado.

**Tabela 9.1 – Lista dos reagentes utilizados.**

<b>Reagentes</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Fornecedor</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	99,9	Assay, VWR
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	99,5	Panreac
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	99,0	Panreac
<b>CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	99,0	GPR Rectapu, VWR
<b>Extrato de Levedura</b>	-	Cultimed, Panreac
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	99,0	Panreac
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	98,0	Panreac
<b>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	99,0	Panreac
<b>Citrato de Trisódio</b>	99,0	Merck
<b>Ácido Ascórbico</b>	-	Prob Labo, VWR
<b>Ácido Tioglicólico</b>	93,0	Fluka
<b>Lactato de Sódio</b>	98,0	Panreac
<b>Resazurina</b>	-	Acros Organics
<b>Parafina</b>	-	Vencilab

**Tabela 9.2 – Lista dos metais utilizados**

<b>Metal</b>	<b>Características</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Observações</b>
<b>Pt(IV)</b>	1 mg/mL Pt em 10% HCl	Acros Organics	Platinum Standard Solution for AAS
<b>Pd(II)</b>	1 mg/mL Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> em HNO <sub>3</sub> 0,5mol.L	Merck	Palladium standard solution traceable to SRM from NIST
<b>Rh(III)</b>	1 mg/mL Rh em 10% HCl	Acros Organics	Platinum Standard Solution for AAS
<b>Pt(IV)/Pd(II)</b>	Dimetil-Diciclohexil-Succinamida em 1,2-Dicloroetano	-	FO carregada
<b>Pt(IV)</b>	HCl 6M	-	FA carregada
<b>Pd(II)</b>	HCl 4M	-	FA carregada

**Tabela 9.3 – Lista dos equipamentos utilizados.**

<b>Equipamento</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>
<b>Balança analítica</b>	GLP 21	Crison
<b>Autoclave</b>	Uniclave 88	AJC
<b>Balança</b>	440-35 N	Kern
<b>Encapsulador</b>	-	Supelco
<b>Câmara de fluxo laminar</b>	BH-EN 2003	Faster
<b>Centrifuga (4000 rpm)</b>	Rotofix 32 A	Hettich Zentrifugen
<b>Medidor <math>\epsilon</math>h/pH</b>	GLP 21	Crison
<b>Espectrofotómetro UV-Vis</b>	DR 2800	Hach-Lange
<b>Espectrofotómetro</b>	Synergy 4	BIOTEK
<b>AAS</b>	Spectr AA-20	Varian
<b>Centrifuga (5000 rpm)</b>	Universal 320	Hettich Zentrifugen
<b>Estufa de vácuo</b>	VDL	Binder
<b>XRD</b>	X'Pert Pro	PANalytical
<b>SEM</b>	3700 N	Hitachi
<b>EDS</b>	Xflash 5010	Bruker
<b>Placa de agitação</b>	VMS-C7	VWR
<b><i>hotte</i></b>	SA	Industrial Laborum Ibérica

## Anexo 6 – Esquema dos ensaios de enriquecimento

As lamas provenientes da ETAR de QL e da ETAR de Sil foram enriquecidas em meio nutriente Postgate C modificado com  $\text{SO}_4^{2-}$  e em meio nutriente Postgate C modificado sem  $\text{SO}_4^{2-}$  tal como descrito no procedimento “Enriquecimento dos Consórcios” na página 31. Esta imagem representa apenas um esquema ilustrativo simplificado de como se procedeu esse ensaio.

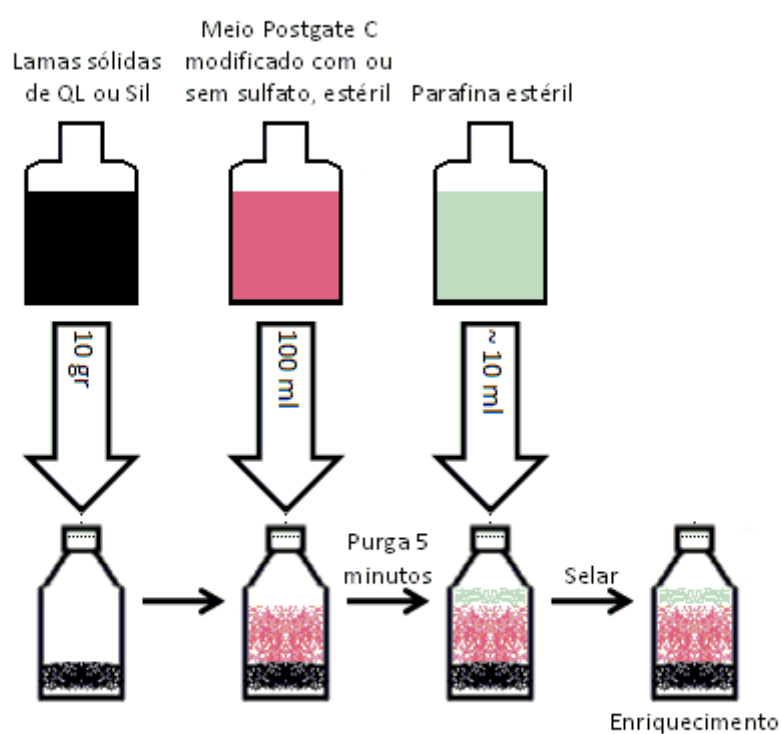


Figura 9.5 – Esquema dos ensaios de enriquecimentos das lamas sólidas de ambas as ETAR (QL e Sil).

## Anexo 7 – Inoculações dos consórcios

Muitos dos PM utilizados neste trabalho provêm de inoculações a partir dos enriquecimentos. Essas inoculações foram feitas em meio nutriente Postgate C modificado com  $\text{SO}_4^{2-}$  e em meio nutriente Postgate C modificado sem  $\text{SO}_4^{2-}$  tal como descrito no procedimento “Inoculação dos Consórcios” na página 32. A imagem seguinte representa um esquema ilustrativo simplificado de como se procedeu esse ensaio.

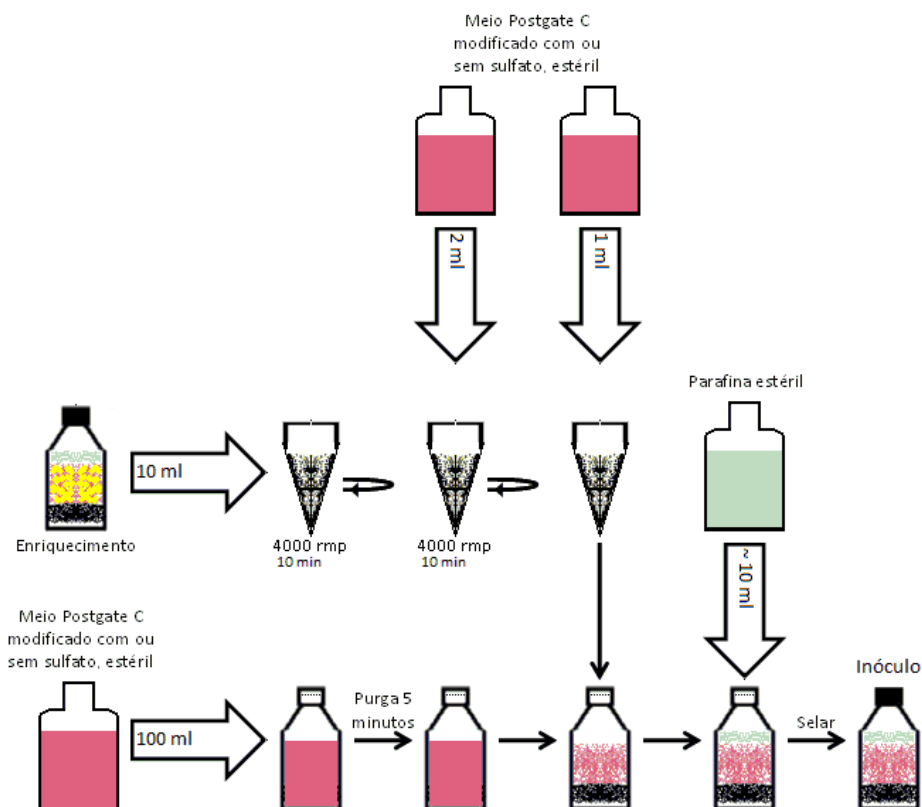


Figura 9.6 – Esquema dos ensaios de inoculação

## Anexo 8 – Análise dos parâmetros de crescimento

As condições dos enriquecimentos e dos inóculos foram seguidas através da análise de diversos parâmetros ( $\epsilon_h$ ; pH;  $[\text{SO}_4^{2-}]$ ; [lactato] ou  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) ao longo do tempo de crescimento (dia 0, 1, 3, 7, 14, 21 e 28). O esquema que descreve a recolha da amostra e posterior leitura dos parâmetros.

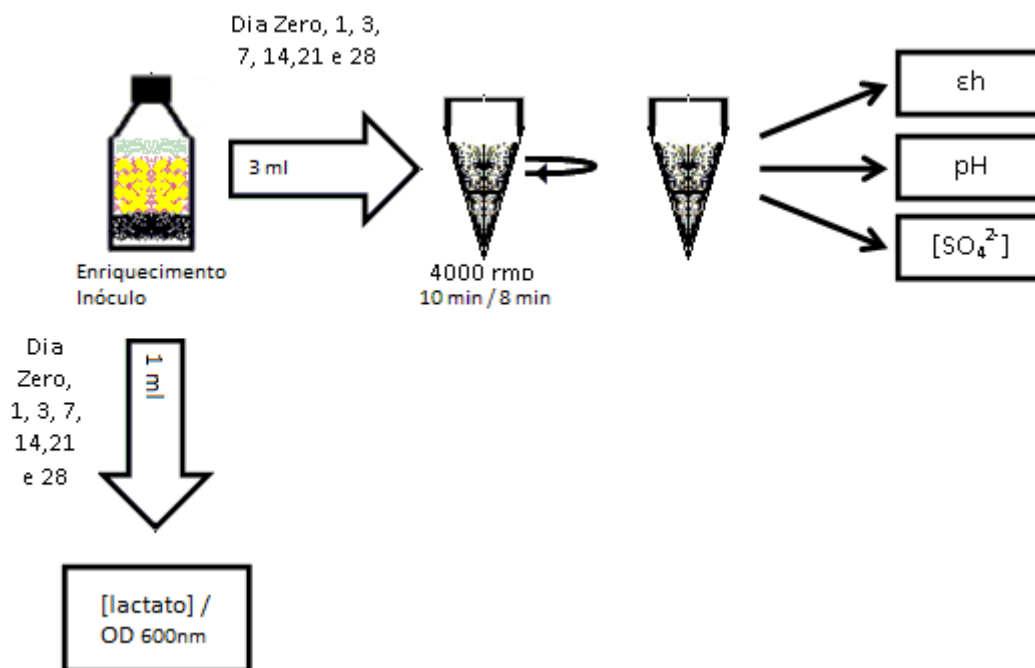


Figura 9.7 – Esquematização do procedimento que leva à análise dos parâmetros de crescimento.

## Anexo 9 – Adição dos PM a soluções aquosas contendo o metal

Após crescimento bacteriano recolheu-se os PM e colocaram-se em contacto com soluções aquosas contendo os diferentes metais em estudo. Esse procedimento encontra-se esquematizado na figura seguinte.

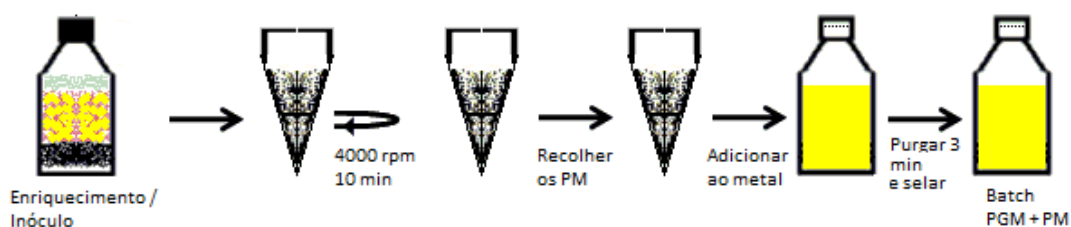
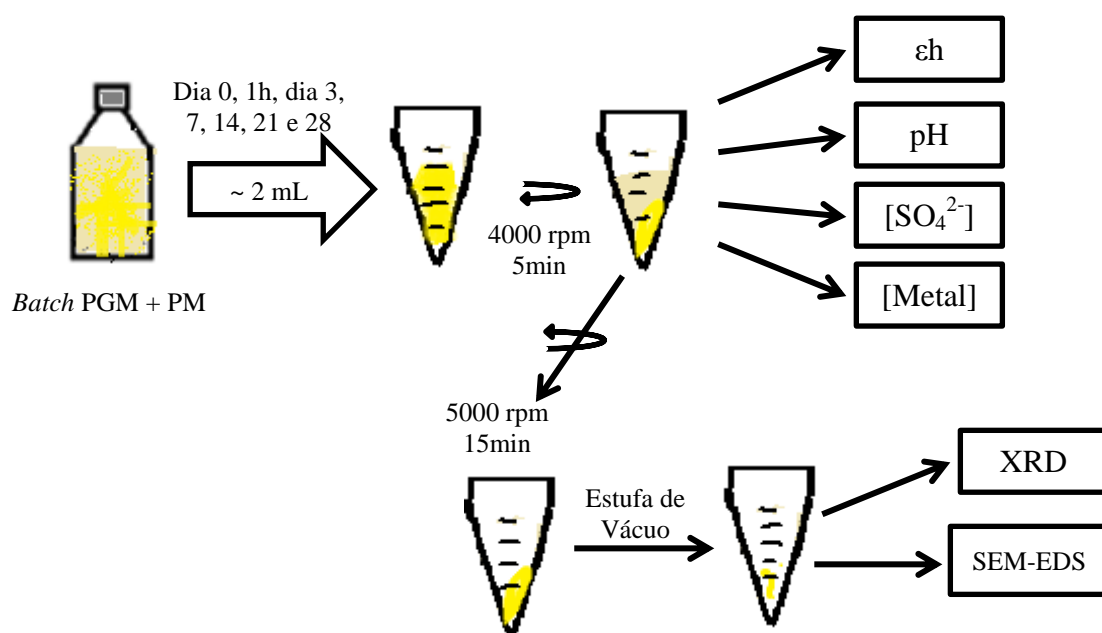


Figura 9.8 – Esquema representativo da recolha dos PM e sua adição aos diferentes metais.

## Anexo 10 – Análises aos parâmetros do contacto entre os PGM e os PM

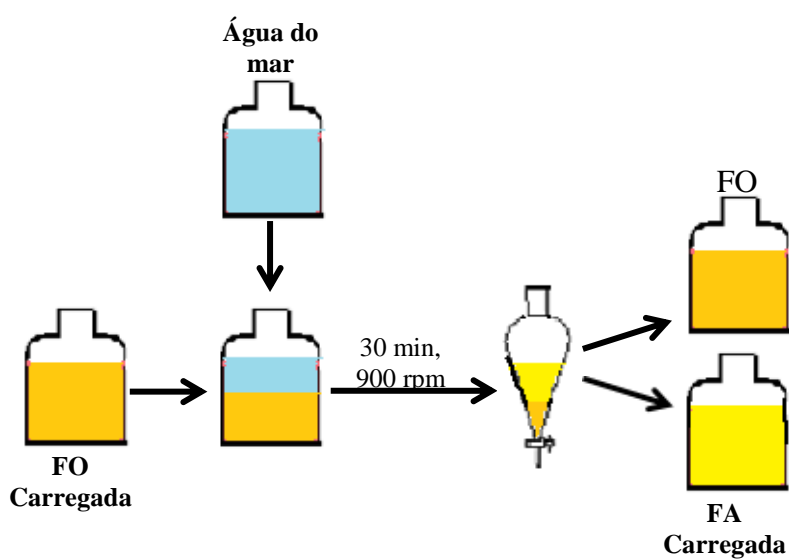
Todos os parâmetros que analisavam o contacto dos PGM com os PM foram medidos ao instante zero ao fim de uma hora, ao 3º dia de contacto, ao 7º, 14º, 21º e 28º dias. Nem todos os ensaios passaram por XRD e SEM-EDS sendo realizada, nesse caso, apenas a leitura do potencial redox, do pH, da concentração de sulfato e da concentração de metal



**Figura 9.9 – Esquema relativo ao procedimento efetuado para a análise dos parâmetros dos ensaios em que os PM e os PGM se encontravam em contacto.**

## Anexo 11 – Esquema dos ensaios de re-extração líquido-líquido da FO para água do mar

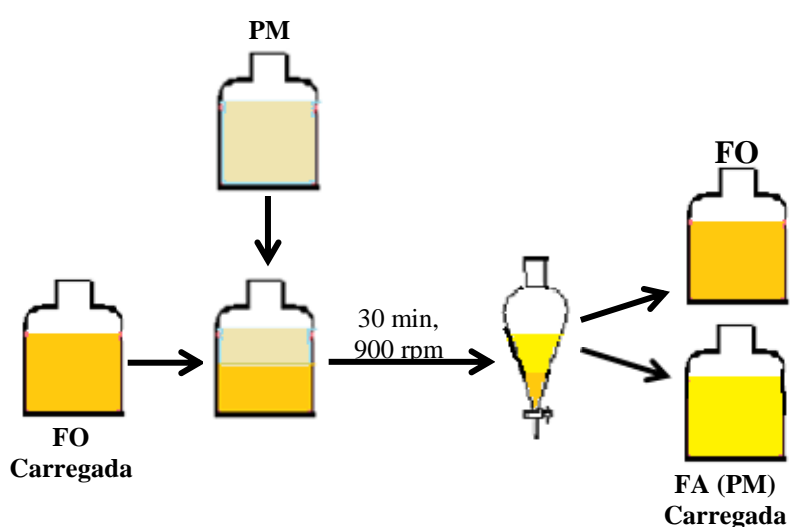
Nos ensaios de “Adição dos PM a fases orgânicas carregadas com Pt(IV) ou Pd(II) provenientes de ensaios de extração líquido-líquido” houve a necessidade de re-extrair a FO proveniente dos ensaios químicos para uma FA, neste caso para água do mar. A figura em baixo representa os ensaios de re-extração.



**Figura 9.10 – Esquema dos ensaios de re-extração dos metais para água do mar. O tracejado azul representa o ensaio químico de extração líquido-líquido. De seguida encontra-se representado o ensaio de re-extração das FO carregadas para água do mar (FA).**

## Anexo 12 – Esquema dos ensaios de re-extração líquido-líquido da FO para PM

O último ensaio teve o objetivo de perceber se os PM funcionam como extratantes da FO carregada. Este procedimento é idêntico ao procedimento de re-extração líquido-líquido da FO para água do mar, so que agora, ao invés de água do mar como agente de *stripping* usa-se os PM.



**Figura 9.11 - Esquema geral do ensaio de extração líquido-líquido onde os Produtos Metabólicos são usados com extratante (fase aquosa) dos resíduos de Pt(IV) e Pd(II) existentes no laboratório (fase orgânica).**