

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

**PROCESSO COMBINADO QUÍMICO-BACTERIANO
PARA A REMOÇÃO DE H₂S DE GASES**

MARIA ESTELA APARECIDA GIRO OPRIME

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Doutor, no curso de pós-graduação em Biotecnologia, área de Concentração: Biotecnologia.

Araraquara
2001

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Oswaldo Garcia Junior (Orientador) - Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. Jonas Contiero - Instituto de Biociências - UNESP- Rio Claro

Prof. Dr. Carlos Ossamu Hokka - Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Prof. Dr. Marcelo Zaiat - Escola de Engenharia - USP - São Carlos

Prof^a Dr^a Rosana Filomena Vazoller - Escola de Engenharia - USP - São Carlos

Dados Curriculares

MARIA ESTELA APARECIDA GIRO OPRIME

1. Dados Pessoais

- 1.1. Nascimento: 15 de outubro de 1964
- 1.2. Nacionalidade: Brasileira
- 1.3. Naturalidade: Boa Esperança do Sul
- 1.4. Estado Civil: Casada
- 1.5. Filiação: Aurélio Giro
Ignês Miné Giro
- 1.6. Profissão: Engenheira Química
- 1.7. Documento de Identidade: 16 691 468
- 1.8. Cadastro de pessoa Física: 138629718 – 64
- 1.9. Endereço: Av. Comendador Alberto Dias, 1385
Araraquara- SP
CEP 14802- 070

2. Formação Acadêmica

- 2.1. Doutorado pela Universidade Estadual Paulista - UNESP – Instituto de Química de Araraquara no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Tecnologia Química, Área de Concentração: Biotecnologia, conferindo o Título de Doutor em Biotecnologia em 31/10/2001.
Título da Tese: “Processo combinado químico-bacteriano para a remoção de H₂S de gases”.

2.2. Mestrado pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, conferindo o Título de Mestre em Engenharia Química em 13/12/1994.

Título da Dissertação: “Produção de biomassa de *Penicillium chrysogenum* com alto rendimento como etapa previa à de produção de penicilina”.

2.3. Graduada em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, concluído em março de 1991.

3. Participação em Simpósio e Congressos.

3.1. OPRIME, M. E. A. G.; SUAZO, C. A. T. Quantificação do efeito de algumas variáveis de processamento no rendimento do crescimento celular ($Y_{x/s}$) de *Penicillium chrysogenum*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 11., SINAFERM, 1996, São Carlos. **Resumos...**São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1996.

3.2. OPRIME, M. E. A. G.; SUAZO, C. A. T. Quantificação do efeito de algumas variáveis de processamento no rendimento do crescimento celular ($Y_{x/s}$) de *Penicillium chrysogenum*. In: JORNADA CIENTIFICA DE ENGENHARIA QUÍMICA, 1., 1996, São Carlos. **Resumos...**São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, 1996.

3.3. OPRIME, M. E. A. G.; GARCIA JR., O. Imobilização de *Thiobacillus ferrooxidans* em suportes de anéis de vidro e fitas de cloreto de polivinila (PVC). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Resumos...**Centro de Convenções, Salvador - Ba, 1999.

3.4. OPRIME, M. E. A. G.; GARCIA JR., O. Oxidação de H₂S de gases utilizando *Thiobacillus ferrooxidans*. In: WOKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, 2., 2001, Campinas. **Resumos...**Campinas: Embrapa, 2001.

4. Trabalhos Completos Apresentados em Congressos

4.1. OPRIME, M. E. A. G.; GARCIA JR., O.; CARDOSO, A. A. Removal of H₂S by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. In: LATIN AMERICAN BIODEGRADATION AND BIODETERIORATION SYMPOSIUM, 3., 1998, Florianopolis, Paper n. 66.

4.2. OPRIME, M. E. A. G.; GARCIA JR., O. Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* cells in polyvinylchloride (PVC) turnings and Glass rings. In: CIMINELLI, V. S. T.; GARCIA JR., O. (Eds). **Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development**. Ouro Preto: Elsevier, 2001. part A, p. 369-375.

5. Artigos Científicos Publicados

5.1. OPRIME, M. E. A.G.; SUAZO, C. A. T. Quantification of the effect of some operational variables on the cell growth yield (Y_{x/s}) of *Penicillium chrysogenum* by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 4, n. 14, p. 417-423, 1997.

5.2. OPRIME, M. E. A. G.; CARDOSO, A. A.; GARCIA JR., O. Oxidation of H₂S in acid solution by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 111-114, 2001,

6. Participação em Cursos

6.1. Curso de Tratamento Biológico de Resíduos realizado no programa de Pós-Graduação de Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Catarina, promovido pelo programa de Pós Graduação em Engenharia Química da UFSC e pelo Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, com apoio do Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia.

Período de 30 de junho a 11 de julho de 1997.

6.2. 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP – I Simpósio de Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista -UNESP – Araraquara.

15 – 20 de agosto de 1999.

Dedico

Ao Pedro,
Por estar sempre ao meu lado....
por respeitar e apoiar o meu trabalho.

Aos meus país, Aurélio e Ignês
pelo exemplo de vida e
por ter me ensinado a nunca desistir de um objetivo.

A Daniela e a Elisa,
Pelo apoio e carinho ...sempre!

Ofereço à

Clarissa e Laura

É pensando em vocês que eu traço meu caminho
.....Cultivo meu saber,
Olhando para vocês que adquiro forças.....
E concretizo meus sonhos...

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior, pela sua amizade, orientação e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat e Prof. Dr. Jonas Contiero pela amizade e contribuição durante o decorrer do trabalho principalmente durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso pela sua ajuda e presteza durante todo o trabalho.

A Profa. Dra. Maria Lucia Araújo, Prof. Dr. Ossamu Hojo e Prof. Dr. Deovaldo Morais pela amizade e grande ajuda prestada.

A Profa. Dra. Olga e Prof. Lima pela amizade durante todo esses tempo.

Ao funcionário Waldenir Ap. Nunes de Menezes pela amizade, dedicação e presteza durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química pela ajuda e dedicação.

As funcionárias da Seção de pós-graduação: Izolina, Vilma e Sandra pelos serviços prestados.

Aos funcionários da Biblioteca pela eficiência e atenção sempre presente.

Aos funcionários Silvio, Paulo e Sebastião Dametto pelos serviços prestado durante a montagem do trabalho.

Aos meus amigos: Susana, Sandra Cruz, Maria Benincasa, Sandrinha, Kátia, Heloísa, Luís Eduardo, Eduardo, Leonice, Telma, Valéria Monteiro, Tereza, Maybi, Ana Pires, Marcos Kobori, Laudemir (Mi), Édson, pela amizade e carinho que sempre me trataram eu lhes agradeço de coração.

Aos amigos Mauricio César e Luciene Villar pela ajuda sempre presente a pela amizade durante todo o tempo.

Aos amigos do Laboratório: Denise, Ana Teresa, Rodolfo, Ronaldo, Ana Paula, Renata pela convivência e amizade.

A amiga Regiane Cabbrio pela amizade e carinho durante todos esses anos.

A todos os demais Funcionários e Professores do Instituto de Química que colaboram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelos recursos concedidos.

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado das transformações do enxofre na biosfera. 1 - redução por microrganismo; 2 - oxidação por microrganismo.....	1
Figura 2. Diagrama simplificado do processo alcanolamina. 1 – Coluna de absorção; 2 – Trocador de calor; 3 – Coluna de separação; 4 – Caldeira; 5 e 6 – trocadores de calor; 7 – Refluxo.....	8
Figura 3. Diagrama simplificado de um típico processo Claus. 1 – Lavador de gás; 2 – Forno de enxofre; 3 – Caldeira, 4 – Reatores; 5 – Condensador de enxofre; 6 – Tanque de separação; 7 – Bomba.....	9
Figura 4. Diagrama simplificado do processo BIO-SR. 1– Coluna de absorção; 2 - Separador sólido-líquido; 3 - Biorreator.....	26
Figura 5. Aparelho de Kipp para obtenção do gás H ₂ S. 1 - frasco de reação; 2 - solução de HCl; 3 - bastões de FeS; 4 - saída do gás; 5 - frasco de recolhimento do gás.....	32
Figura 6. Suportes utilizados para imobilização do <i>T. ferrooxidans</i> -LR: (A) anéis de vidro e (B) fitas de PVC.....	37
Figura 7. Sistema operacional utilizado para imobilização do <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	38
Figura 8. Esquema da coluna de lavagem do gás H ₂ S.....	40
Figura 9. Processo combinado Químico-Bacteriano para remoção de H ₂ S.....	42
Figura 10. Curva padrão de biomassa celular (proteína total) por turbidimetria.....	46

Figura 11. Curva padrão de S^{2-} utilizando o Método de Azul de Metileno.....	50
Figura 12. Difratoograma de raios-X do precipitado obtido no ensaio de oxidação do H_2S por solução de Fe^{3+} . Símbolo: S, enxofre. A barra lateral indica a intensidade de contagem dos picos e os números acima da identificação dos picos indicam a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.....	54
Figura 13. Cinética do desprendimento de H_2S de solução em pH 1,8 para diferentes concentrações iniciais do gás. A - ! 100 mg.L ⁻¹ ; , 50 mg.L ⁻¹ ; Λ 25 mg.L ⁻¹ . B - ! 10mg.L ⁻¹ ; , 5 mg.L ⁻¹	56
Figura 14. Oxidação de H_2S (concentração inicial de 5,62 mg.L ⁻¹) em solução contendo <i>T. ferrooxidans</i> -LR (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.....	59
Figura 15. Oxidação de H_2S (concentração inicial de 6,00 mg.L ⁻¹) em solução contendo <i>T. ferrooxidans</i> -LR (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.....	60
Figura 16. Oxidação de H_2S (concentração inicial de 16,21 mg.L ⁻¹) em solução contendo <i>T. ferrooxidans</i> -LR (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.....	61
Figura 17. Oxidação de H_2S (concentração inicial de 42,03 mg.L ⁻¹) em solução contendo <i>T. ferrooxidans</i> -LR (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.....	62

B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.....

Figura 18. Oxidação de H₂S (concentração inicial de 100 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. ferrooxidans* -LR (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica..... 63

Figura 19. Oxidação de H₂S (concentração inicial de 6,95 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica..... 64

Figura 20. Oxidação de H₂S (concentração inicial de 10,74 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica..... 65

Figura 21. Oxidação de H₂S (concentração inicial de 25,71 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica..... 66

Figura 22. Oxidação de H₂S (concentração inicial de 32,70 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica..... 67

Figura 23. Oxidação de H₂S (concentração inicial de 100 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica..... 68

Figura 24. Valores de medida de absorvância do crescimento celular (!) e oxidação do Fe ²⁺ (.), em ensaio em batelada com a espécie <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	70
Figura 25. Oxidação do Fe ²⁺ (%) pelo <i>T. ferrooxidans</i> -LR durante o primeiro ciclo de imobilização celular utilizando colunas com recheio de vidro (O) e PVC (!).....	72
Figura 26. Oxidação do Fe ²⁺ (%) pelo <i>T. ferrooxidans</i> -LR durante sucessivos ciclos de imobilização celular utilizando colunas com recheio de vidro (O) e PVC (!). (A) segundo; (B) terceiro; (C) quarto ciclo e (D) quinto ciclo.....	73
Figura 27. Oxidação do Fe ²⁺ (%) pelo <i>T. ferrooxidans</i> -LR imobilizado em colunas com recheio de vidro (O) e PVC (!), em dois diferentes ciclos (A e B) realizados durante o período de Junho/Julho.....	76
Figura 28. Microscopia Eletrônica de Varredura das células imobilizadas em fitas de PVC (A-controle, B-biofilme, C-jarosita).....	79
Figura 29. Microscopia Eletrônica de Varredura das células imobilizadas em anéis de vidro (A-controle, B-biofilme, C-jarosita).....	80
Figura 30. Difratoograma de raios-X do precipitado formado nos ensaios de imobilização celular e testes de oxidação de Fe ²⁺ em diferentes vazões de substrato. Símbolo J, jarosita. A barra lateral indica a intensidade de contagem dos picos e os números acima da identificação dos picos indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.....	81
Figura 31. Influência da taxa de diluição na velocidade de formação do Fe ³⁺ (! vidro; , PVC) e na oxidação do Fe ²⁺ (vidro e O PVC) por células imobilizadas de <i>T. ferrooxidans</i> -LR para concentração de substrato de 1,0 g.L ⁻¹	82

Figura 32. Influência da taxa de diluição na velocidade de formação do Fe^{3+} (! vidro; , PVC) e na oxidação do Fe^{2+} (vidro; O PVC) por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR para concentração de substrato de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ 82

Figura 33. Influência da taxa de diluição na velocidade de formação do Fe^{3+} (! vidro; , PVC) e na oxidação do Fe^{2+} (vidro; O PVC) por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR para concentração de substrato de $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ 83

Figura 34. Influência da taxa de diluição na velocidade de formação do Fe^{3+} (! vidro; , PVC) e na oxidação do Fe^{2+} (vidro; O PVC) por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR para concentração de substrato de $6,7 \text{ g.L}^{-1}$ 83

Figura 35. Concentração de H_2S na saída da coluna de lavagem de gás em função do tempo para várias concentrações de Fe^{3+} : (A) $3,0 \text{ g.L}^{-1}$; (B) $1,5 \text{ g.L}^{-1}$; (C) $0,75 \text{ g.L}^{-1}$; (D) $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ (E) $0,38 \text{ g.L}^{-1}$ e (F) $0,30 \text{ g.L}^{-1}$ 87

Figura 36. Concentrações de H_2S (!) e Fe^{2+} (O) na saída da coluna de lavagem de gás obtidas no ensaio contínuo químico-bacteriano para a descontaminação do H_2S do gás de arraste..... 89

Figura 37. Difratoograma de raios-X do precipitado obtido no ensaio contínuo químico-bacteriano do tratamento de gás H_2S . Símbolo: S, enxofre; J, jarosita. A barra lateral indica a intensidade de contagem dos picos e os números acima da intensidade dos picos indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina..... 91

..

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Vazões e Concentrações da solução de Fe^{3+} utilizadas durante os ensaios em batelada de lavagem de H_2S	41
Tabela 2. Teste qualitativo de oxidação de H_2S utilizando papel de filtro em solução de acetato de chumbo como indicador. A - Frasco Controle; B - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> -LR; C - <i>Thiobacillus thiooxidans</i> -FG01; D - Solução de Fe^{3+}	53
Tabela 3. Valores da velocidade de oxidação do Fe^{2+} para os vários ciclos de imobilização celular do <i>T. ferrooxidans</i> -LR em colunas.....	74

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
I – INTRODUÇÃO	1
II – OBJETIVO	5
III – REVISÃO DA LITERATURA	6
III.1 – Processos para tratamento de H ₂ S.....	6
III.1.1 – Processos Físico-Químicos.....	6
III.1.2 – Processos Biotecnológicos.....	12
IV - MATERIAL E MÉTODOS	30
IV.1 – Linhagens bacterianas.....	30
IV.2 – Meios de cultura.....	30
IV.3 – Produção do H ₂ S.....	32
IV.4 – Preparo da Suspensão Celular.....	33
IV.5 – Ensaio Exploratórios.....	33
IV.5.1 – Teste qualitativo.....	33
IV.5.2 - Teste quantitativo: efeito da concentração do H ₂ S na atividade oxidativa das linhagens de <i>Thiobacillus</i>	34
IV.6 – Oxidação do Fe ²⁺ por células livres do <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	35
IV.7 – Imobilização do <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	36
IV.7.1 – Dimensões do Biorreator de leito fixo.....	36
IV.7.2 – Suportes para imobilização do <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	36
IV.7.3 – Descrição geral do processo de imobilização celular.....	37

IV.8 – Influência da Taxa de Diluição (D) na Oxidação do Fe^{2+} por células imobilizadas de <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	39
IV.9 – Descontaminação do gás H_2S	39
IV.9.1 – Coluna de lavagem do gás.....	39
IV.9.2 – Remoção de H_2S - testes variando a vazão de alimentação da solução de Fe^{3+}	40
IV.9.3 – Operação do sistema contínuo químico–bacteriano.	41
IV.10 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), das células de <i>T. ferrooxidans</i> -LR aderidas aos suportes de imobilização.	42
IV.11 - Determinações Analíticas	43
IV.11.1 - Quantificação da biomassa celular	43
IV.12 – Difração de raios-X.....	46
IV.13 - Determinação do H_2S	47
IV.13.1 - Iodometria.....	47
IV.13.2 - Azul de Metileno.....	48
IV.14 – Cálculos e Símbolos utilizados.....	50
V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
V.1 – Ensaio exploratório de oxidação do H_2S	52
V.1.1 - Teste qualitativo.....	52
V.1.2 - Teste quantitativo: efeito da concentração do H_2S na atividade oxidativa do <i>T. ferrooxidans</i> -LR e do <i>T. thiooxidans</i> -FG01.....	54
V.2 – Oxidação do Fe^{2+} por células livres do <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	69
V.3 - Imobilização Celular do <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	71
V.3.1 – Ciclos de imobilização.....	71
V.3.2 – Análise da adesão de células de <i>T. ferrooxidans</i> -LR por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	76
V.4 - Influência da taxa de diluição (D) na oxidação do Fe^{2+} e na velocidade de formação do produto (Fe^{3+}) por células imobilizadas de <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	81
V. 5 – Descontaminação do gás H_2S	85

V.5.1 - Testes variando-se a vazão/concentração de Fe^{3+} na alimentação.....	85
V.5.2 - Sistema contínuo químico-bacteriano.....	88
VI - CONCLUSÕES.....	93
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

RESUMO

A remoção de H₂S de uma corrente gasosa proveniente de indústrias (petroquímica, refinarias de petróleo, etc) ou de tratamento de esgotos domésticos é muito importante tanto sobre o ponto de vista econômico como de saúde pública. Alguns processos convencionais vêm sendo estudados e utilizados porém, são processos que apresentam como inconveniente um alto custo operacional por utilizarem alto consumo de energia e catalisadores específicos. Alternativas biotecnológicas têm sido estudadas usando principalmente espécies do gênero *Thiobacillus* uma vez que essas espécies quimiolitotróficas oxidam compostos reduzidos de enxofre como fonte de energia para o seu crescimento.

No presente trabalho foi investigado a oxidação direta do H₂S por *Thiobacillus ferrooxidans*-LR e *Thiobacillus thiooxidans*-FG01 assim como um processo combinado usando separadamente etapas químicas e etapas biológicas. Este processo é baseado em uma rápida reação entre o íon Fe³⁺ e o H₂S, o qual produz enxofre elementar e íon Fe²⁺, e a capacidade de *T. ferrooxidans*-LR oxidar Fe²⁺ como único caminho metabólico para obter energia, entre as espécies *Thiobacillus*.

Ambas as espécies oxidaram diretamente H₂S presente em solução ácida (pH ~ 1,8) em concentrações no intervalo de 5 a 100 mg.L⁻¹. O desprendimento deste gás em solução ácida foi considerável e a oxidação bacteriana foi somente detectada, em comparação com o frasco não inoculado, em concentrações abaixo de 5 mg.L⁻¹ e após 150 min. Para estudar o processo combinado químico bacteriano, células de *T. ferrooxidans*-LR foi primeiramente imobilizada em fitas de PVC e anéis de vidro. Em ambos os suportes formou-se um espesso biofilme após cinco ciclos de oxidação do Fe²⁺. Durante os ciclos de imobilização celular

houve o aparecimento de um precipitado de cor vermelho-alaranjado que foi identificado, através de análise de raios-X, como jarosita. Entretanto, nenhum efeito negativo desse precipitado foi observado durante os ciclos de imobilização celular. A cinética de oxidação do íon Fe^{2+} por células imobilizadas foi investigado sobre diferentes concentrações do íon e diferentes taxas de diluição. Para concentrações de Fe^{2+} até $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ eficiência da oxidação deste íon ficou no intervalo de 95 a 100% com a taxa de oxidação variando de $0,2$ a $0,8 \text{ h}^{-1}$. Para altas concentrações de Fe^{2+} (acima de $4,0 \text{ g.L}^{-1}$) esse intervalo de oxidação foi mantido somente para baixas taxas de diluição (abaixo de $0,1 \text{ h}^{-1}$). Operações em batelada ou contínuo (escala de laboratório) a oxidação do H_2S em contracorrente com solução de íon férrico produzido por oxidação bacteriana do íon ferroso, alcançou resultados de oxidação do gás acima de 99%. Enxofre elementar, contendo pequenas quantidades de jarosita, foi identificado na solução de saída na coluna de lavagem do gás. Mesmo considerando os vários problemas operacionais que surgiram na escala reduzida, os resultados obtidos neste estudo levam a uma potencial aplicação dessa alternativa tecnológica para uma escala ampliada.

ABSTRACT

Removal of H₂S from gas streams of industrial sources or anaerobic treatment of domestic sewage is a imperative task under economic (corrosion in petrochemical industries), environmental and public healthy point of view. Conventional physico-chemical processes are currently in use but they are very expensive since the necessity of energy in these processes are so high. Biotechnological alternatives have been studied using mainly species of *Thiobacillus* genus, since these chemolithotrophic species oxidize reduced sulfur compounds as energy source for their growth.

In the present work it was investigated the direct H₂S oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*-LR and *Thiobacillus thiooxidans*-FG01, as well as a combined process using separated chemical and biological steps. This process is based on the fast chemical reaction between Fe³⁺ and H₂S, which produces elemental sulfur and Fe²⁺, and the capacity of *T. ferrooxidans*-LR to oxidize Fe²⁺ as a unique metabolic pathway to obtain energy, among *Thiobacillus* species.

Both species oxidized directly H₂S present in acid solutions (pH ~ 1.8) in concentrations ranged from about 5 to 100 mg.L⁻¹. The gas volatilization in these acid solutions is considerable and the bacterial oxidation was only detected, in comparison with non inoculated flasks, for concentrations below 5 mg.L⁻¹ and after 150 min. To study the combined bacterial-chemical process, *T. ferrooxidans* cells were first tentatively immobilized in PVC turnings or glass tubes. In both supports a thick biofilm was formed after five complete cycles of Fe²⁺ oxidation. In the pH value used in the immobilization procedures, an yellow-brownish precipitate (jarosite) was identified by x-rays analyses. Even so, none negative effects were correlated with Fe²⁺ oxidation during experiments time

course. The kinetics of Fe^{2+} oxidation by immobilized cells was investigated under different iron concentrations and dilution rates. For Fe^{2+} concentrations up to $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ the oxidation efficiency ranged from 95 to 100% in dilution rate varying from 0.2 to 0.8 h^{-1} . For higher Fe^{2+} concentrations (above 4.0 g.L^{-1}) this range of oxidation was maintained only for low dilution rates (below 0.1 h^{-1}). Batch or continuous operations (laboratory scale) of H_2S oxidation in counter-current with bacterial produced ferric solutions, presented results of H_2S oxidation above 99%. Elemental sulfur, containing minor jarosite contamination, was identified in the out solution from the H_2S washing column. Even considering that several operating problems normally arise in this reduced scale, the results obtained in this study have indicated a promissory potential to apply this biotechnological alternative in a full scale.

I – INTRODUÇÃO

O enxofre nas suas diversas composições (SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S , etc.), está distribuído de forma ampla na natureza. A interação desses compostos com os fatores bióticos e abióticos, determina uma série de transformações que irão reciclar as várias formas de enxofre. O enxofre orgânico encontrado nas proteínas dos seres vivos (aminoácidos cisteína e metionina), por exemplo, poderá se transformar em gás sulfídrico (H_2S) pela ação dos microrganismos decompositores de matéria orgânica morta. O sulfato presente em ambientes anaeróbios, também poderá se transformar em H_2S , como consequência do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato tais como *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*. A Figura 1 mostra um esquema simplificado, dos principais processos envolvidos no ciclo do enxofre na biosfera. (GARCIA JR., 1997).

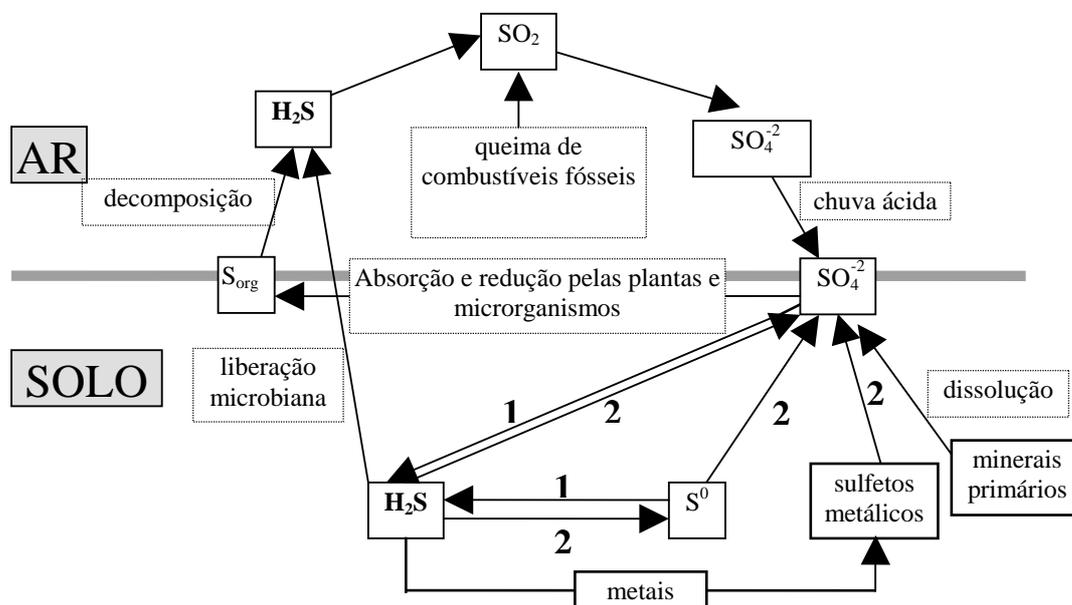


Figura 1. Esquema simplificado das transformações do enxofre na biosfera. 1 - redução por microrganismos; 2 - oxidação por microrganismos. Fonte: Garcia Jr., 1997.

Dentre as várias formas de enxofre encontradas na natureza, o H_2S é considerado um dos principais agentes contaminantes da atmosfera. Após sua liberação pela atividade microbiana natural, esse gás é oxidado a dióxido de enxofre (SO_2) o qual é convertido a ácido sulfúrico (H_2SO_4), que retorna ao solo na forma de “chuva ácida”. Como a presença de H_2S e também de outras formas de enxofre é altamente significativa em combustíveis fósseis (petróleo e carvão, por exemplo), a utilização intensa destes combustíveis em áreas altamente industrializadas, determina uma liberação significativa de SO_2 , agravando a intensidade das chamadas “chuvas ácidas”.

Além dos aspectos ambientais, o H_2S se constitui também em um sério problema sob o ponto de vista industrial e de saúde pública. O H_2S se apresenta como um expressivo contaminante de gases industriais, sobretudo na indústria petroquímica, nas refinarias de petróleo e de gás natural. Sua presença no “biogás” também é relevante, pois na produção deste são utilizados resíduos orgânicos (efluentes de indústrias de alimentos, papel e celulose, tratamento anaeróbios de águas residuária, etc.) que contêm formas parcialmente oxidadas de enxofre, as quais são reduzidas ao gás sulfídrico pela ação de bactérias redutoras de sulfato. Devido à sua natureza ácida, a presença do H_2S nesses gases determina sérios problemas de corrosão em equipamentos, tanques, bombas, tubulações etc., prejudicando dessa forma, os processos envolvidos nessas atividades industriais e aumentando os custos de manutenção (JANSSEN et al., 1995; JANSSEN et al., 1997).

Um outro aspecto altamente relevante é a alta toxicidade e o odor desagradável do H_2S . É um gás extremamente venenoso, mais do que o cianeto ou o monóxido de carbono. Felizmente, o olfato humano pode detectá-lo em níveis que estão muito abaixo de sua concentração letal; infelizmente, porém, ele tem a propriedade de gradualmente diminuir a sensibilidade olfativa, tornando o olfato um detector imperfeito do H_2S .

Dessa forma, sua remoção e disposição tornam-se de fundamental importância devido, como já salientado, à sua alta toxicidade e propriedades corrosivas. Nesse sentido, diversos tipos de processos físico-químicos têm sido desenvolvidos e utilizados industrialmente. Em geral, esses processos apresentam boa eficiência, aumentando a qualidade do gás industrial e levando, algumas vezes, à produção de sub-produtos como por exemplo, o enxofre. Entretanto, esses processos apresentam custos elevados por exigirem altas pressões e temperaturas, catalisadores específicos, etc.

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias alternativas para contornar essa limitação econômica dos processos convencionais. Como exemplo, pode ser citado um processo de natureza biotecnológica, que tem como característica básica, a metabolização do H_2S por alguns microrganismos. Dentre os organismos capazes de oxidar H_2S , pode-se destacar espécies autotróficas do gênero *Thiobacillus*, as quais oxidam formas reduzidas de enxofre (incluindo o H_2S) como fonte energética para seu crescimento.

Esses processos apresentam como vantagens principais o baixo requerimento energético, consumo reduzido de reagentes, redução nos custos de capital inicial e operacional, conversão direta do H_2S e geração de uma quantidade mínima de sub-produtos indesejáveis.

Apesar dos inúmeros trabalhos desenvolvidos e em desenvolvimento em outros países sobre a utilização de processos biotecnológicos para a remoção do H_2S , nota-se uma lacuna significativa de trabalhos nessa área em nosso país. Em função dos problemas que o gás sulfídrico pode determinar e das exigências cada vez maiores dos órgãos responsáveis pela legislação ambiental, é de fundamental importância o desenvolvimento de estudos nessa área no Brasil, considerando-se ainda, as limitações de ordem econômica dos processos físico-químicos convencionais.

Assim, em função da necessidade de se desenvolver um processo alternativo para o tratamento do H₂S presente em diversos tipos de gases, e em função da inegável potencialidade biotecnológica da utilização de bactérias sulfo-oxidantes principalmente a bactéria *Thiobacillus ferrooxidans*, esse trabalho foi conduzido como uma alternativa pioneira em nosso país.

II – OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um processo sobre utilização de bactérias do gênero *Thiobacillus* para a remoção de H₂S de gases, através de:

- Escolha da cultura mais “eficiente” na oxidação direta do H₂S, através de ensaios exploratórios com os gêneros *T. ferrooxidans*-LR e *T. thiooxidans*-FG01 além da oxidação química pelo íon Fe³⁺.
- Estudo da imobilização do *T. ferrooxidans*-LR em dois diferentes suportes.
- Estudo da oxidação do íon Fe²⁺ por bactéria do gênero *T. ferrooxidans*-LR utilizando células livres e células imobilizadas em biorreator.
- Avaliação da eficiência na remoção do H₂S de gases em um processo contínuo utilizando uma coluna com células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR.

III - REVISÃO DA LITERATURA

A remoção do H₂S de gases em geral, é de extrema importância sob o ponto de vista de aspectos ambientais, econômicos e de saúde pública. Nesse sentido, a legislação ambiental tem se tornado cada vez mais exigente quanto aos índices máximos permitidos para a liberação do H₂S para a atmosfera, bem como para sua presença em gases de utilização industrial. Cork et al. (1986) destacaram que este gás deve ser removido de gases industriais para concentrações inferiores a 1 ppm. Segundo Clesceri (1989), o limiar da percepção humana do H₂S em água limpa é de 0,025 a 0,25 µg.L⁻¹. A norma específica da CETESB (1990) indicou essa faixa de concentração para potabilidade de água e, em relação ao ar, impede a emissão desse gás em qualquer concentração.

Desta forma, devido à sua alta toxicidade e ao odor desagradável, a sua remoção e disposição tornam-se de fundamental importância. Conforme destacado na **Introdução** deste trabalho, diversos processos físico-químicos são utilizados industrialmente para o tratamento desse gás e, por outro lado, diversos estudos tem mostrado uma potencialidade real para a utilização de rotas biotecnológicas alternativas. Assim, serão discutidos a seguir alguns desses processos físico-químicos, bem como os fundamentos essenciais das rotas biotecnológicas.

III.1 – Processos para o tratamento de H₂S

III.1.1 - Processos Físico-Químicos

O processo comercial mais utilizado para a remoção de H₂S é o processo “Alcanolamina”, no qual vários tipos de aminas podem ser utilizadas: monoetanolamina,

dietanolamina, diglicolamina e metildietanolamina (KOHL & RIESENFELD, 1985; JENSEN & WEBB, 1995a). Um diagrama simplificado do processo pode ser visto na Figura 2.

Uma solução de amina “pobre” (sem H_2S), após seu resfriamento (5), é bombeada para o topo de um absorvedor (tanque 1), e a seguir entra em contato em contra-corrente com o gás contaminado (contendo H_2S), o qual é então absorvido pela solução de amina. O gás já purificado sai pelo topo do absorvedor (1). A solução de amina rica em H_2S , passa por um trocador de calor (2) e a seguir essa solução já aquecida, entra pelo topo de uma coluna de separação (3), a qual é aquecida na base por uma caldeira geradora de vapor (4). Nessas condições, o gás H_2S é separado da solução de amina rica. O gás que sai da coluna de separação é resfriado (6) para condensar o excesso de vapor (7) e o condensado é bombeado de volta à coluna de separação (3). Finalmente, o gás H_2S é retirado a partir do tanque de refluxo (JENSEN & WEBB, 1995a).

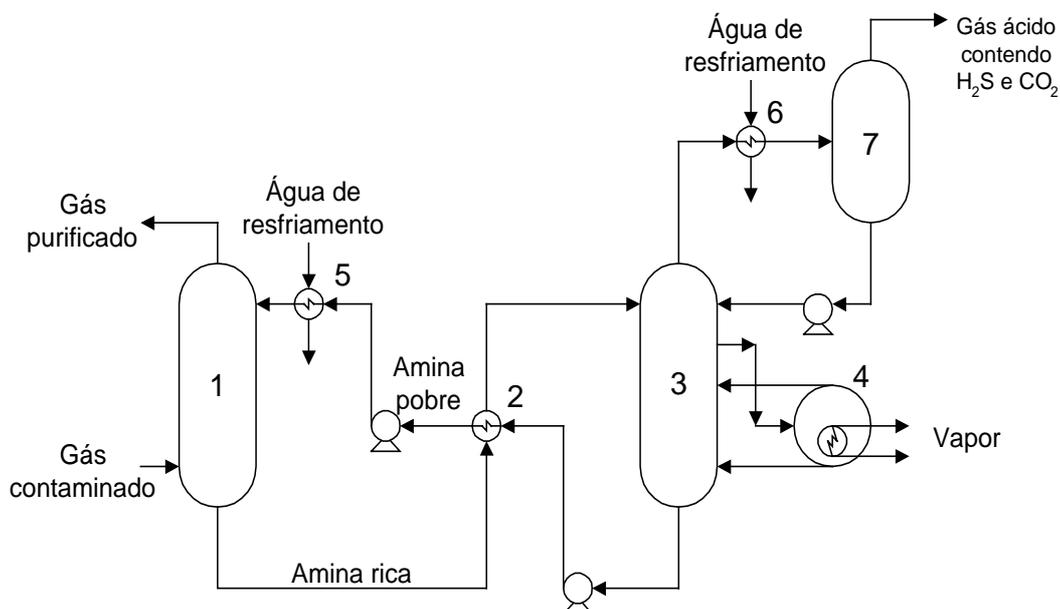


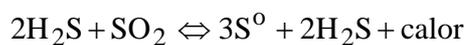
Figura 2. Diagrama simplificado do processo alcanolamina. 1 – Coluna de absorção; 2 – Trocador de calor; 3 – Coluna de separação; 4 – Caldeira; 5 e 6 – Trocadores de calor; 7 – Refluxo.

Fonte: Jensen & Webb, 1995a.

Como pode-se notar, o processo descrito acima é usado somente para remoção de H₂S da corrente de gás e não para sua eliminação (KOHL & RIESENFELD, 1985). Este gás produzido durante a regeneração do solvente amina é normalmente incinerado. Entretanto, a incineração de H₂S produz dióxido de enxofre (SO₂), que embora menos tóxico, também é um agente poluente conforme já destacado (SUBLETTE & SYLVESTER, 1987a). Uma alternativa que vem sendo utilizada é a conversão do H₂S a enxofre elementar, através do processo Claus, representado na Figura 3.

O gás contendo H₂S liberado no processo “Alcanolamina” passa inicialmente por um lavador (1) e a seguir, junto com uma quantidade estequiométrica de ar, é alimentado em um forno de reação (2). Neste forno, um terço do H₂S é oxidado a SO₂. Os gases H₂S e SO₂

reagem e são convertidos parcialmente a enxofre elementar. Essa mistura de gases, contendo H_2S , SO_2 e enxofre elementar, é resfriada até 650 a 500 $^\circ\text{C}$, gerando vapor de alta pressão (3). Parte dessa mistura é conduzida ao condensador (5) para condensação do S° que é então recuperado no tanque de separação (6). A outra parcela da mistura de gases é conduzida aos reatores (4) onde ocorre a reação catalítica de Claus (equação 1) para produção de S° . Os gases de saída dos reatores são condensados em (5) e o enxofre é recuperado em (6). Normalmente os catalisadores usados durante a reação de Claus são bauxita natural ou amina.



[1]

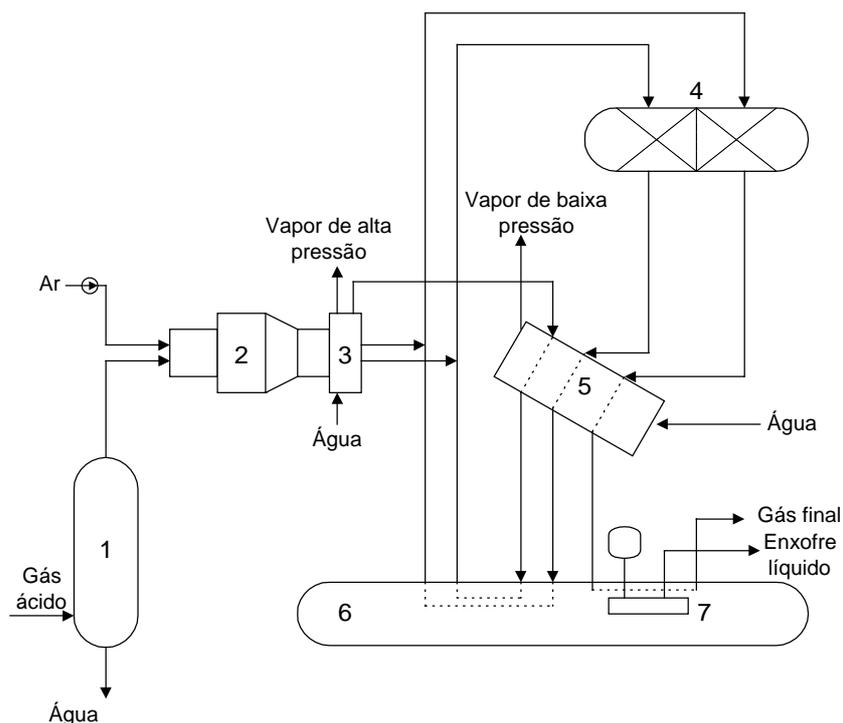


Figura 3. Diagrama simplificado de um típico processo Claus. 1 – Lavador de gás; 2 – Forno de enxofre; 3 – Caldeira, 4 – Reatores; 5 – Condensador de enxofre; 6 – Tanque de separação; 7 – Bomba.

Fonte: Jensen & Webb, 1995a

A recuperação de enxofre de 92 a 95% é usualmente obtida utilizando-se dois reatores catalíticos, como mostrado na Figura 3 (JENSEN & WEBB, 1995a).

O processo Claus é o mais convencional para a recuperação de enxofre. No entanto, este processo requer uma concentração do H_2S maior que 15% nos gases a serem tratados, para sua eficiente operação. Como alternativa, pode-se citar o processo Stretford-Holmes no qual o H_2S é absorvido e oxidado a enxofre elementar, enquanto ainda em solução. Tem-se ainda outros processos de recuperação de enxofre como por exemplo: Takahax e Giammarco-Vetrocoke (CORK et al., 1986).

Um outro processo que vem sendo utilizado para a recuperação de enxofre a partir do H_2S liberado no processo “Alcanolamina”, é o processo “Clinsuf-DO” que tem como característica principal a oxidação direta do H_2S . A recuperação de enxofre nesse processo alcança aproximadamente 95%, utilizando gás com baixa concentração de sulfeto de hidrogênio (1 a 20% em volume), faixa na qual o processo tradicional de Claus não se aplica (HEISEL et al., 1996).

Outro método utilizado para lavagem de gases é a utilização de colunas empacotadas, porém, sua construção e operação demanda alguns cuidados que serão descritos a seguir.

O modelo mais comum para a construção de torres de absorção de gás é uma coluna recheada com material inerte, operando em sistema contra-corrente: entrada do gás pela parte inferior da coluna e o líquido de lavagem pela parte superior da mesma.

Segundo Pizzo et al. (1998), o uso eficiente de colunas empacotadas é diretamente relacionado com a distribuição do líquido. Para que a coluna tenha um funcionamento ideal, o líquido uma vez distribuído no topo do empacotamento deve percorrê-lo em forma de filmes finos, molhando-o de forma homogênea.

Pode ocorrer também, especialmente trabalhando-se com baixa vazão do líquido, que muitos dos constituintes do empacotamento podem estar secos ou recobertos por um filme de líquido estagnado formando canais preferenciais ao longo da coluna. Esse efeito pode ser minimizado desde que o diâmetro da coluna seja no mínimo 8 vezes maior que o diâmetro do suporte utilizado para empacotá-la. Se a relação entre o diâmetro da torre e o diâmetro do empacotamento for menor que 8/1, o líquido tende a descer pela parede da coluna, tornando o sistema ineficiente (COLBURN, 1981).

Deve-se ter ainda, como fase contínua o gás e como fase dispersa o líquido absorvedor. Se a vazão, ou outras condições, são tais que o líquido torna-se contínuo e o gás torna-se disperso, ocorre uma condição ineficiente chamada de “inundação” da coluna.

O material a ser utilizado para empacotar uma coluna de absorção de gás também é um fator importante que deve ser levado em consideração, pois o mesmo é influenciado pelas condições de operação da coluna destacando-se a temperatura e a natureza corrosiva das substâncias presentes no sistema (CHEN, 1984). Desta forma, esse material deve apresentar resistência a tais fatores, associada a um baixo custo. Como exemplos podem ser citados materiais confeccionados em argila, porcelana e plásticos tais como: Anel de Rasching (vidro ou plástico), Anel de Pall (plástico ou cerâmico), Anel de Ballast, etc. O uso de um ou de outro conforme já salientado, depende das características da coluna que se deseja trabalhar e das características das substâncias envolvidas no sistema (McCABE et al., 1993).

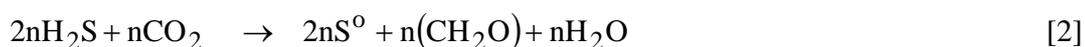
A maioria dos processos físico-químicos acima descritos para tratamento do H₂S apresentam custos elevados devido a uma série de fatores, entre os quais devem ser mencionados: o alto consumo de energia, custo elevado de capital inicial, geração de produtos secundários poluentes, entre outros. Dessa forma, torna-se necessário o

desenvolvimento de tecnologias alternativas para contornar essas limitações dos processos convencionais (GUOQIANG et al., 1994).

A utilização de microrganismos para a remoção de H₂S se apresenta como uma alternativa bastante promissora, pois, além de apresentar boa eficiência, é significativamente mais econômica que os processos físico-químico convencionais (CHO et al., 1992).

III.1.2 - Processos Biotecnológicos

O princípio básico da rota biotecnológica é a capacidade de oxidação do H₂S que certas espécies de microrganismos apresentam, principalmente espécies de bactérias do gênero *Thiobacillus* (SUBLETTE & SYLVESTER, 1987a, GUOQIANG et al., 1994). Além deste gênero, bactérias fotossintetizantes das famílias *Chromatiaceae* e *Chlorobiaceae* se constituem em microrganismos capazes de remover H₂S. Como se sabe, essas bactérias utilizam o H₂S como doador de elétrons, durante o processo de fotossíntese, segundo a reação de van Niel mostrada abaixo (JENSEN & WEBB, 1995a):



Baseando-se nesse tipo de metabolismo, Cork et al. (1983) e Cork et al. (1986), desenvolveram um processo para remoção de H₂S de uma corrente de gás usando *Chlorobium limicola* linhagem *thiosulfatophilum*. Estes autores empregaram um reator contínuo tipo tanque agitado (CSTR), tendo obtido uma eficiência de remoção de H₂S de 99,6%. O enxofre elementar foi o produto final obtido em maior quantidade, representando 67,1% da oxidação de H₂S; o restante foi convertido em produtos solúveis de enxofre.

Entretanto, a acumulação de compostos de enxofre no sistema (sulfato, por exemplo) determina um decréscimo da conversão do H₂S à enxofre.

Outro estudo interessante, também utilizando células de *Chlorobium limicola* linhagem *thiosulfatophilum*, foi desenvolvido por Kim et al. (1990). Nesse estudo, as células desta espécie bacteriana foram imobilizadas em uma matriz de alginato-estrôncio (alginato de sódio 1,5 m/v e cloreto de estrôncio 0,1 moles.L⁻¹) e colocadas em um reator anaeróbio para a conversão do H₂S à enxofre. Foi também investigada a influência do acúmulo de sulfato no meio reacional sobre a eficiência do processo. O acúmulo de enxofre e de sulfato no reator foi dependente da intensidade de luz e da velocidade de alimentação de H₂S no sistema. Dessa forma, condições ótimas de operação, onde não ocorreu um acúmulo significativo de sulfato, foi estabelecido em um reator anaeróbio operando em batelada com células livres e imobilizadas na matriz de alginato-estrôncio. Provavelmente a absorção de luz pelas células imobilizadas foi eficiente devido à transparência da matriz de imobilização. Nesse sistema conseguiu-se uma velocidade máxima de oxidação de H₂S de 3,8 mmoles.L⁻¹.h⁻¹.

Chung et al. (1996a) estudaram a descontaminação de H₂S utilizando *Pseudomonas putida*-CH11. Observaram que quando as células dessa bactéria foram imobilizadas em solução contendo 4% de alginato de cálcio, houve uma alta eficiência de remoção (96%) de H₂S para concentrações no intervalo de 10 a 150 mg.L⁻¹.

Apesar desses estudos terem indicado um bom potencial sob o ponto de vista de aplicabilidade industrial, as limitações significativas da utilização de microrganismos fotossintetizantes, derivam da natureza anaeróbia e das consideráveis necessidades de energia luminosa desses microrganismos (GADRE, 1989; JENSEN & WEBB, 1995a).

Como um exemplo de utilização de um microrganismo heterotrófico no processo de descontaminação de H_2S , merece ser destacado da bactéria *Xanthomonas* sp. linhagem DY44. Cho et al. (1992) isolaram essa linhagem em ambiente contendo sulfeto e a utilizaram em ensaios de bancada para a remoção de H_2S de um gás contendo 2% (v/v) de H_2S em atmosfera de N_2 . A remoção observada do gás sulfídrico nos ensaios provavelmente não foi devida à oxidação deste, mas sim decorrente de um processo fisiológico de destoxificação desse gás pela bactéria, resultando na produção de polissulfetos. Como limitação básica da potencial utilização de microrganismos heterotróficos em processos de remoção de H_2S deve ser destacada a necessidade de nutrientes orgânicos específicos, nem sempre disponíveis como rejeitos para o cultivo dessas espécies.

III.1.2.1 - Processos biotecnológicos utilizando espécies do gênero *Thiobacillus*

III.1.2.1.1 - O gênero *Thiobacillus*

Outras bactérias que vêm sendo muito utilizadas em estudos de remoção de H_2S são as quimiolitotróficas do gênero *Thiobacillus*. Essas bactérias são caracterizadas pela capacidade de oxidar compostos reduzidos de enxofre (incluindo o H_2S) como forma de obter energia para a fixação do CO_2 atmosférico (LEDUC & FERRONI, 1994). Além disso, essas bactérias necessitam de poucos requerimentos nutricionais, também estritamente inorgânicos, para o seu crescimento. Devido a essas características, esses microrganismos apresentam um potencial até mais expressivo para sua utilização biotecnológica na descontaminação de H_2S , do que as espécies citadas anteriormente (GADRE, 1989; CADENHEAD & SUBLETTE, 1990; JENSEN & WEBB, 1995a). Como exemplos de espécies do gênero *Thiobacillus* podem ser citadas: *T. denitrificans*, *T.*

ferrooxidans, *T. thioparus*, *T. thiooxidans* e *T. versutus* (SUBLETTE & SYLVESTER, 1987a; CHO et al., 1991).

Uma das espécies que tem sido mais amplamente estudada com o objetivo de sua utilização em processos de descontaminação de H_2S é o *T. denitrificans*. Essa espécie cresce autotroficamente em condições aeróbias, utilizando formas reduzidas de enxofre em geral (tiosulfato, tetrionato, sulfeto, etc.) como fonte de energia em meio com pH próximo à neutralidade (6,8 a 7,4). Por outro lado, esta espécie é anaeróbia facultativa pois pode usar nitrato, nitrito ou óxido nítrico comoceptor final de elétrons durante a oxidação dos compostos de enxofre mencionados acima (HOLT, 1994; BAALSRUD & BAALSRUD, 1954). Tais características foram destacadas por Sublette & Sylvester (1987a) como altamente favoráveis para a utilização dessa espécie em processos biológicos de remoção do H_2S .

Em ensaios de oxidação desse gás em reator anaeróbio, Sublette & Sylvester (1987a) demonstraram que o *T. denitrificans* cresceu adequadamente em concentração de 1% de H_2S em atmosfera de N_2 , resultando em uma saída de gás contendo menos que $1\mu M$ de H_2S .

Sublette (1987) estudou o comportamento dessa espécie em experimentos em reator aeróbio em fluxo contínuo e em batelada. Nos dois regimes de operação foi notado como fator limitante do crescimento da espécie a concentração de H_2S . Além disso, no processo aeróbio houve pouca eficiência na produção de biomassa comparado a resultados obtidos em processo anaeróbio em reator operando em batelada. Esses resultados indicaram que talvez o O_2 pode ser o substrato inibitório de crescimento, quando *T. denitrificans* cresce em meio contendo o H_2S . Em estudos complementares, procurou-se avaliar o efeito da

contaminação dos reatores por microrganismos heterotróficos, tendo-se demonstrado que a presença desses contaminantes praticamente não interferiu na atividade do *T. denitrificans* (SUBLETTE & SYLVESTER, 1987c). Esses mesmos autores ainda estudaram a eficiência do processo em reator contínuo tipo tanque agitado (CSTR) para cultura de *T. denitrificans*, tentando minimizar a baixa produção de biomassa encontrada nos outros trabalhos. Basicamente, os resultados obtidos indicaram que a utilização do reator CSTR tornava-se mais eficiente desde que a operação fosse realizada com reciclo da biomassa (SUBLETTE & SYLVESTER, 1987b).

Em relação a outras espécies do gênero *Thiobacillus*, Cadenhead & Sublette (1990) demonstraram que as espécies *T. thioparus*, *T. versutus*, *T. neapolitanus* e *T. thiooxidans* foram menos eficientes na oxidação aeróbia de H₂S que a espécie *T. denitrificans*. Entretanto, foi destacado que uma cultura mista dessas espécies poderia ser eficiente, pois as mesmas apresentaram uma larga faixa de pH adequado (4,0 a 8,0).

Deve ser ressaltado ainda, um estudo sobre a utilização de uma cultura com propriedades floculantes de *T. denitrificans* para o tratamento de gases contendo o H₂S em escala-piloto (SUBLETTE et al., 1994). Esse trabalho foi realizado sob condições aeróbias e foi utilizada uma coluna com capacidade para 0,5 m³. A coluna foi operada continuamente por 7 semanas e alimentada com gás sintético contendo: 10% de H₂S, 5% de CO₂ e 85% de N₂. A vazão de alimentação do gás foi de 0,034 à 0,12 m³.min⁻¹ com H₂S na concentração de 0,25 à 2,9 g.m⁻³. A temperatura de trabalho foi de 30°C. Conseguiu-se um índice de remoção de H₂S superior a 80%, para um total de aproximadamente 300 horas de operação. As limitações no rendimento foram associadas à problemas de transferência de massa (transferência de H₂S no meio de cultura) e não à fisiologia microbiana.

Gadre (1989) estudou o processo de remoção de H_2S utilizando um biorreator de filme fixo. Nesse trabalho foi utilizado um consórcio de bactérias quimioautotróficas (*Thiobacilli*) imobilizadas em anéis de porcelana, objetivando fundamentalmente minimizar a perda de biomassa. Apesar de uma eficiência relativamente baixa (cerca de 70%) na remoção do H_2S , houve contudo, uma boa conversão para enxofre elementar (aproximadamente 80% do total de H_2S removido). Segundo o autor, provavelmente a disponibilidade de O_2 foi o fator limitante no processo. Além disso, um outro fator que também deve ser levado em consideração como aspecto limitante, foi o decréscimo no pH do meio até cerca de 3,0.

Nessa mesma linha de imobilização celular, Ongcharit et al. (1989) testaram a eficiência da imobilização de uma cultura de *T. denitrificans* em lodo ativado com boas propriedades floculantes. Os resultados de remoção de H_2S não indicaram uma eficiência significativa do processo em relação aos outros descritos. Como vantagem principal, entretanto os autores destacam a facilidade de recuperação da biomassa para posterior reciclo em um reator contínuo de mistura completa.

Huang et al. (1996 *apud* OH et al, 1998) imobilizaram *Thiobacillus sp.* em biofiltro e obtiveram uma eficiência de remoção de H_2S de 95% quando trabalharam com uma vazão de entrada de gás até $93 L.h^{-1}$ e concentração de H_2S de $60 mg.L^{-1}$. Porém, quando a vazão do gás aumentou para $180 L.h^{-1}$ a eficiência foi reduzida à 78% devido, conforme os autores, à problemas difusionais gás-partícula imobilizada.

Um outro estudo da remoção biológica do H_2S de gases, utilizando-se um biorreator de leito fluidizado em três fases e *Thiobacillus sp.* linhagem IW imobilizada em carbono ativado foi desenvolvido por Oh et al. (1998). O biorreator foi operado à $30^{\circ}C$ e apresentava um diâmetro interno de 3 cm e comprimento de 75 cm. Foi conseguida uma

remoção do gás de 94% para uma vazão de entrada de gás de 1 a 2 L.min⁻¹ para concentração de gás na faixa de 100 a 200 mg.L⁻¹.

Chung & Huang (1997) imobilizaram *Thiobacillus sp.* linhagem CH11 em alginato de cálcio para remoção de H₂S em sistema contínuo. Obtiveram uma remoção de gás de 98,5% para concentração de entrada de gás no intervalo de 13 a 78 g.L⁻¹. Esses autores concluíram que o processo desenvolvido pode ser utilizado para pequenos volumes de efluentes e baixa concentração do H₂S.

Hirano et al. (1996) utilizaram *T. thiooxidans* linhagem JCM7814 para remover sulfeto de hidrogênio emitido a partir de resíduos sólidos domésticos utilizando um reator em escala de bancada. Células de *T. thiooxidans* oxidaram H₂S a uma velocidade máxima de 0,84 mmoles H₂S.g⁻¹.cel⁻¹.

Chung et al. (1996b) utilizaram *T. thioparus* imobilizado em alginato de cálcio (4%) para remoção de H₂S. Esses autores observaram que a velocidade de fluxo de entrada de gás no reator influencia a eficiência da espécie para a remoção do gás. Verificaram que quando uma alta concentração de H₂S é introduzida no reator há a necessidade de diminuir a vazão de fluxo de gás ou aumentar o volume de empacotamento de células imobilizadas para obter a capacidade ótima de remoção de H₂S.

Outra espécie de bactéria do gênero *Thiobacillus* que também merece destaque no processo de tratamento de gases industriais para eliminação de H₂S, é o *T. ferrooxidans* pois essa espécie além de oxidar formas reduzidas de enxofre, oxida também o íon Fe²⁺ a Fe³⁺ característica esta que, como será visto posteriormente, apresenta uma ótima potencialidade para o tratamento do H₂S. Suas características morfológicas e fisiológicas serão descritas a seguir.

III.1.2.1.2 - *Thiobacillus ferrooxidans*

- Características Gerais

O *T. ferrooxidans* se apresenta como pequenos bastonetes Gram-negativos, com dimensões de 0,5 a 0,6 µm de largura por 1,0 a 2,0 µm de comprimento, reproduzindo-se por divisão binária simples. São microrganismos que se movimentam através de flagelo polar simples e são encontrados naturalmente em efluentes ácidos de minas contendo algum sulfeto metálico (NEMATI et al., 1998).

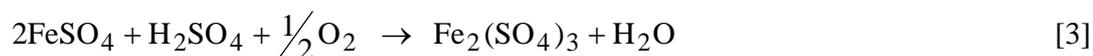
Essa espécie é aeróbia e quimiolitotrófica, pois obtém a energia necessária para a fixação do CO₂ atmosférico para o seu crescimento a partir da oxidação do Fe⁺² e compostos inorgânicos de enxofre de valência reduzida (S⁰, sulfetos metálicos, tiosulfato, H₂S, etc.). São microrganismos acidofílicos, pois o pH ótimo para o crescimento está entre 1,8 e 2,3, ocorrendo crescimento porém, na faixa de 1,0 a 4,5. São microrganismos mesofílicos, sendo que sua temperatura de crescimento está na faixa de 20 e 40°C, com crescimento ótimo em torno de 30°C (LEDUC & FERRONI, 1994; JENSEN & WEBB, 1995b).

Vale também ressaltar que o gênero *T. ferrooxidans* está diretamente associado a dissolução oxidativa de sulfetos metálicos, e em função desse metabolismo, essa bactéria é utilizada em processos de lixiviação de metais em escala industrial. Como exemplo pode ser citado o cobre, urânio e, mais recentemente, o ouro (ROSSI, 1990).

- Oxidação do Fe²⁺

Dentre as espécies do gênero *Thiobacillus* somente o *T. ferrooxidans* pode oxidar o íon ferroso (Fe²⁺) como forma de derivar energia para o seu crescimento. Como resultado

de cerca de 40 anos de pesquisa, existe unanimidade com relação a estequiometria da reação de oxidação do íon Fe^{2+} , a qual pode ser vista na equação abaixo:



Os elétrons transferidos da reação de oxidação do íon Fe^{2+} e das formas reduzidas do enxofre, via cadeia respiratória, liberam a energia necessária para a fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) e a conseqüente produção do trifosfato de adenosina (ATP).

Ingledeew (1986) apresentou um sumário completo dos componentes do sistema oxidativo e de transferência de elétrons (produção de energia) do *T. ferrooxidans*, dentre os quais deve ser destacada a enzima rusticianina, primeiro acceptor de elétrons da cadeia respiratória dessa bactéria. Utilizando a energia proveniente dessas reações de oxidação, a espécie fixa o CO_2 atmosférico via ciclo de Calvin (TUOVINEN & KELLY, 1973).

O crescimento de *T. ferrooxidans* e sua habilidade de oxidar íon ferroso são altamente influenciadas pela concentração desse íon. Silverman & Lundgren (1959) reportaram um decréscimo no crescimento da bactéria devido a exaustão de íon ferroso no meio de cultura. Da mesma maneira, Kelly & Jones (1978 *apud* NEMATÍ et al, 1998) observaram que aumentando a concentração do íon ferroso até $5,6 \text{ g.L}^{-1}$, ocorreu um aumento progressivo na velocidade de oxidação, enquanto que para concentrações superiores ocorre uma diminuição na velocidade oxidativa do Fe^{2+} . Barron & Luecking (1990) encontraram a velocidade máxima de crescimento de *T. ferrooxidans* na presença de 2 a 3 g.L^{-1} de Fe^{2+} porém, como no trabalho anterior, concentrações mais elevadas do Fe^{2+} mostraram um efeito inibitório no crescimento do microrganismo.

Grishin et al. (1983) obtiveram uma velocidade de oxidação do íon ferroso de 0,75 g.L⁻¹.h⁻¹ em solução utilizada na lixiviação de metais. Esses autores observaram ainda que a oxidação do Fe²⁺ pode ser acelerada somente por um aumento na densidade da biomassa em solução. A utilização de um quimiostato com reciclo de biomassa aumentou a densidade populacional bacteriana e desta forma, obtiveram um aumento significativo da oxidação do Fe²⁺ para 7 g.L⁻¹.h⁻¹. Com uma alta densidade de biomassa (1,2 g.L⁻¹) e utilizando-se uma velocidade de diluição de 3 h⁻¹, a velocidade de oxidação do Fe²⁺ aumentou para 5 g.L⁻¹.h⁻¹.

Devido a diversas condições (temperatura, pH, concentração de substrato, CO₂ e O₂ disponível) e os procedimentos empregados em diferentes estudos, significativas discrepâncias tem ocorrido em literatura com relação aos valores de $\mu_{\text{máx}}$ encontrados. Muitos autores tem descrito valores de $\mu_{\text{máx}}$ em meio sintético. O meios mais comumente utilizados são os meio “9K” de Silverman & Lundgren (1959) e o “T&K” de Tuovinen & Kelly (1973). Valores de $\mu_{\text{máx}}$ reportados na literatura estão no intervalo de 0,01 h⁻¹ a 1,78 h⁻¹, sendo que a média desses valores está no intervalo de 0,1 a 0,2 h⁻¹ (LEDUC & FERRONI, 1994).

- Imobilização do *T. ferrooxidans*

Mesmo aumentando a eficiência, os processos biotecnológicos que utilizam reatores contínuos tipo tanque agitado (CSTR), podem se tornar anti-econômicos pois a operação em larga escala demanda, dentre outros requisitos, um alto consumo de energia.

Neste sentido, a utilização de reatores de células imobilizadas tem atraído a atenção de vários pesquisadores, pois permite a obtenção de concentrações celulares mais elevadas que em sistemas com células livres, uma vez que a operação contínua do reator ocorre sem

arraste dos microrganismos. Em muitos casos, estes sistemas permitem a separação contínua de produtos e a remoção de inibidores de reação (BAILEY & OLLIS, 1986). No caso de sistemas contínuos, as células imobilizadas permitem estender o tempo de atuação da função catalítica das células sobre a reação desejada (ZAIAT, 1996). Segundo Fan (1989), células imobilizadas podem ser definidas como “células que são fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço, com manutenção de sua atividade catalítica e/ou viabilidade, podendo ser usadas repetidas e continuamente”.

Vários suportes têm sido utilizados para a imobilização celular e alguns parâmetros devem ser considerados, quando da escolha de um dado material: permeabilidade, geometria, compressibilidade, resistência mecânica, sensibilidade ao cisalhamento, toxicidade e composição iônica (BAILEY & OLLIS, 1986).

Foi citado na literatura uma variedade de suportes utilizados para a imobilização celular como, por exemplo, o alginato de cálcio (WAKAO et al., 1994; LANCY & TUOVINEN, 1984), o anel de porcelana (GADRE, 1989), a espuma de poliuretano (NEMATİ & WEBB, 1996), as partículas de carbono ativado, resina de troca iônica, anel de vidro (GRISHIN & TUOVINEN, 1988), o cloreto de polivinil (PVC) (NIKOLOV et al., 1988), entre outros. O suporte e o método de imobilização devem ser cuidadosamente selecionados a fim de minimizar alguns efeitos, tais como, resistência difusional à transferência de massa e mudanças fisiológicas e morfológicas das células (ZAIAT, 1996).

Lancy & Tuovinen (1984) imobilizaram *T. ferrooxidans* em matriz de alginato de cálcio para estudar a oxidação contínua do íon Fe^{2+} em uma coluna de leito fixo. Os autores constataram que trabalhando com uma taxa de diluição de $0,18 \text{ h}^{-1}$, a velocidade de oxidação foi de $0,54 \text{ Kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$. Aumentando a taxa de diluição para $0,42 \text{ h}^{-1}$, inicialmente houve um decréscimo de 50% na conversão do íon ferroso. Entretanto, após 5 dias de

operação, a conversão do Fe^{2+} alcançou 96%. Uma velocidade máxima de oxidação $1,22 \text{ Kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ foi conseguida nesta taxa de diluição.

Nikolov et al. (1988) estudaram a velocidade de oxidação do íon Fe^{2+} usando o gênero *T. ferrooxidans* imobilizado em cloreto de polivinil (PVC). Esses autores verificaram um aumento progressivo na velocidade de oxidação quando a concentração inicial do Fe^{2+} variou no intervalo de 6 a 30 Kg.m^{-3} , enquanto que, na faixa de 30 a 40 Kg.m^{-3} , não houve um aumento considerável na velocidade de oxidação do Fe^{2+} . Observaram ainda que a aeração de 0,40 para 1,2 vvm não influenciou a atividade de oxidação do Fe^{2+} pelo biofilme para concentrações de até 30 g.L^{-1} , enquanto que em altas concentrações do Fe^{2+} , a cinética da reação foi significativamente dependente da aeração.

Armentia & Webb (1992) imobilizaram *T. ferrooxidans* em espumas de poliuretano. Observaram, por meio de experimentos preliminares realizados em mesa agitadora, que ocorreu boa imobilização das bactérias aos suportes, sugerindo que as células ficavam aderidas ao suporte devido a sua natural tendência a aderência em superfícies e, também, devido à sua afinidade por íon Fe^{3+} , o qual acumulava-se dentro das espumas. Foi constatado também que as células aderidas aos suportes foram resistentes à lavagem e alcançaram uma máxima produtividade para taxas de diluição bem acima do valor teórico.

Utilizando o mesmo tipo de suporte, Nemati & Webb (1996) estudaram o efeito da concentração do Fe^{2+} sobre a atividade catalítica das células imobilizadas do *T. ferrooxidans*. Utilizando um reator de leito fixo, com concentração inicial de Fe^{2+} no intervalo de 5 a 10 Kg.m^{-3} , uma rápida velocidade de oxidação de $34 \text{ Kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ foi encontrada a uma taxa de diluição de 6 h^{-1} (tempo de residência de 10 minutos). Aumentando a concentração de Fe^{2+} para 20 Kg.m^{-3} , obteve-se uma baixa velocidade de

oxidação, com um valor máximo de $10 \text{ kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$, o que indicou uma saturação do Fe^{2+} e, conseqüentemente, um efeito inibitório na atividade oxidativa das células imobilizadas.

Wakao et al. (1994) imobilizaram células de *T. ferrooxidans* em cinco tipos de polímeros: resina “photo-crosslinkable”, agar, alginato de cálcio, K-carraginato e gelrite. De todas as matrizes utilizadas, gelrite mostrou-se a mais promissora para utilização em soluções extremamente ácidas.

A utilização de pérolas de vidro, resina de troca iônica e partículas de carbono ativado foram testadas por Grishin & Tuovinen (1988) para imobilizar células de *T. ferrooxidans* em um biorreator de filme fixo trabalhando como leito empacotado e leito fluidizado. Os estudos cinéticos realizados no reator de leito empacotado mostraram que o tempo necessário para o estabelecimento de um sistema estável, depende da matriz utilizada assim como, da velocidade de fluxo na alimentação. Com uma taxa de diluição abaixo de 2 h^{-1} , o biorreator empacotado com carvão ativado e resina de troca iônica alcançou o estado estacionário em 12 horas. No biorreator empacotado com pérolas de vidro conseguiu-se a estabilidade com uma taxa de diluição de $0,5 \text{ h}^{-1}$.

Halfmeier et al (1993) estudaram a produtividade, em termos de Fe^{3+} gerado a partir da oxidação do Fe^{2+} , usando células imobilizadas de *T. ferrooxidans*. Os dados cinéticos da oxidação do íon ferroso foram determinados em um reator operando em leito fixo ou em leito fluidizado com as células imobilizadas em diferentes suportes (suportes cerâmicos, carbono ativado, anéis de vidro e área quartzo). Obtiveram, trabalhando com anéis de vidro, uma velocidade máxima de oxidação de Fe^{2+} igual a $3,6 \text{ Kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ com uma taxa de diluição de $0,3$ a $0,9 \text{ h}^{-1}$. O reator de leito fixo operou continuamente por seis meses, confirmando que a produtividade pode ter um aumento de cinco vezes com a utilização de células imobilizadas, comparada à alcançada com células em suspensão. Segundo esses

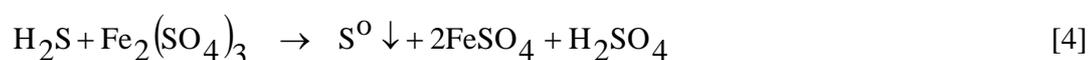
mesmos autores, areia não é um material conveniente para a imobilização de *T. ferrooxidans*.

Wood et al (2001) imobilizaram *T. ferrooxidans* em areia trabalhando com um reator de leito empacotado operando em batelada ou em sistema contínuo. Esses autores obtiveram uma taxa de oxidação do Fe²⁺ de 95 a 99% trabalhando com uma taxa de diluição de 0,64 h⁻¹.

Devido a uma variedade de potenciais aplicações industriais, o uso de células imobilizadas de *T. ferrooxidans*, visando o aumento da velocidade de oxidação do íon ferroso, tem sido realizado por vários autores e diferentes formas e suportes de imobilização tem sido utilizados.

III.1.2.2 - Processos Biotecnológicos com o *T. ferrooxidans*

A utilização do *T. ferrooxidans* tem-se mostrado como uma alternativa promissora para o tratamento de gases contendo H₂S, sob o ponto de vista de redução de custos. O processo denominado BIO-SR, desenvolvido no Japão (IMAZUMI, 1986), baseia-se na oxidação do H₂S pelo íon Fe³⁺, o qual é então re-oxidado pelo *T. ferrooxidans* em um reator separado. A reação básica do processo pode ser vista na equação [4]:



Um esquema simplificado do processo pode ser observado na Figura 4 (JENSEN & WEBB, 1995a).

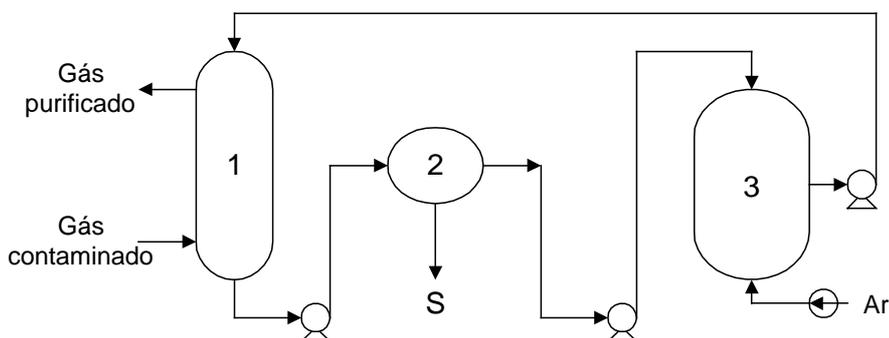


Figura 4. Diagrama simplificado do processo BIO-SR. 1- Coluna de absorção; 2 - Separador sólido-líquido; 3 - Biorreator.

Fonte: Jensen & Webb, 1995a.

O gás contendo o H_2S passa no absorvedor (1) e em contra-corrente entra em contato com a solução rica em Fe^{3+} . O H_2S é oxidado conforme a reação [4] a enxofre elementar e o íon Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} . A seguir a solução rica em enxofre e Fe^{2+} é bombeada para o separador sólido-líquido (2) onde o enxofre é separado da solução. Esta é então bombeada para o biorreator, onde as células do *T. ferrooxidans* irão oxidar o íon Fe^{2+} a Fe^{3+} , conforme a equação [3] mostrada anteriormente.

Uma das grandes vantagens do processo BIO-SR é que a reação entre o Fe^{3+} e o H_2S , reação [4], é extremamente rápida e completa, eliminando dessa forma a possibilidade de emissão de gases tóxicos no processo. Os resultados experimentais do processo indicaram uma eficiência de cerca de 99,9% de remoção de H_2S (JENSEN & WEBB, 1995a). Uma operação utilizando esse processo foi iniciada em 1984 pela “Barite Industries Co.”, Kosaka, no Japão, e os cálculos de custos efetuados mostraram uma economia de 1/3 em relação ao processo de absorção direta do H_2S por NaOH , utilizado anteriormente (IMAIZUMI, 1986).

Todos esses dados mostram inequivocamente, que as alternativas biotecnológicas são diversas e de grande potencial de aplicação industrial. Especificamente, o processo em que se utiliza a espécie *T. ferrooxidans* parece ser um dos mais promissores, uma vez que já vem sendo utilizado em escala industrial no Japão.

Asai et al. (1990) estudaram a cinética de absorção de H₂S em solução de sulfato férrico. Os ensaios foram realizados em frascos agitados e a fase gasosa foi composta de H₂S e N₂ saturados com vapor de água. Foi observado que a velocidade de absorção do H₂S sem ajuste de pH, aumenta com a concentração de Fe₂(SO₄)₃ para baixas concentrações enquanto que para altas concentrações, a velocidade de absorção do gás decresce. Em relação ao efeito do pH, foi detectado pelos autores que a velocidade de absorção aumenta significativamente com a elevação do pH até aproximadamente 2,0. Observaram também, que o FeOH²⁺ formado através da reação de hidrólise de Fe₂(SO₄)₃ é a espécie química que reage com H₂S:



A reação acima é o resultado das seguintes reações parciais:



A reação [6] é considerada como reação irreversível de 2^o ordem e considerada a reação limitante do processo.

Além desses estudos utilizando o *T. ferrooxidans* apenas como “regenerador” do íon Fe³⁺ para a oxidação do H₂S, alguns estudos tem sido feitos utilizando-se diretamente essa

espécie para tratar o H₂S, com base na capacidade do *T. ferrooxidans* de oxidar formas reduzidas de enxofre.

Pagella et al. (1996a) estudaram a remoção de H₂S utilizando cultura pura de *T. ferrooxidans* enfocando principalmente as características biológicas do processo. Observaram que o processo utilizado pode ser influenciado pela temperatura e o pH, sendo que esse último afeta diretamente o crescimento celular e a solubilidade do íon férrico. Pagella et al (1996b) estudaram a descontaminação de H₂S em escala de laboratório utilizando células de *T. ferrooxidans* imobilizadas em um reator de leito fixo. Para ensaios realizados durante um curto período de tempo (2h), conseguiram uma eficiência ao redor de 55% com uma concentração de gás na entrada de 150 mg.L⁻¹ e vazão de 100 L.h⁻¹, correspondendo a um tempo de residência de 18 segundos. Para um período de tempo mais longo de ensaio (44 h), a eficiência atingida nas primeiras 2 horas foi maior do que a corrida inicial (~ 87%), ocorrendo porém um declínio nessa eficiência com o decorrer do tempo. Com relação ao Fe²⁺, sua concentração aumentou comparada ao ensaio de 2 horas, uma vez que a velocidade de oxidação biológica do Fe²⁺ é menor que a velocidade da reação do H₂S com o Fe³⁺, a qual produz o Fe²⁺. De qualquer forma, esses autores acreditaram que o método tem boas perspectivas para uso prático.

Pagella & De Faveri (2000) estudaram a remoção de H₂S em sistema fechado com *T. ferrooxidans* imobilizado em cubos de vidro poroso. O sistema foi baseado na ação combinada de absorção química de H₂S pelo íon Fe³⁺ e a oxidação biológica do Fe²⁺ com produção de Fe³⁺. A concentração de entrada do gás variou duas vezes durante o experimento, para permitir adaptação da bactéria às condições ambientais. Observaram um decréscimo na eficiência ao longo do tempo sendo que, após 300 h de operação, a eficiência declinou para cerca de 30%. Uma hipótese formulada para essa redução na

eficiência da coluna é que, o enxofre produzido no processo não foi removido da solução e acumulou na forma de pequenas partículas suspensas afetando a transferência de massa em diferentes caminhos do processo. Essa redução na eficiência do processo foi observada também por Pagella et al. (1996c).

IV - MATERIAL E MÉTODOS

IV. 1 - Linhagens bacterianas

T. ferrooxidans-LR e *T. thiooxidans*-FG01 foram isoladas respectivamente de lixívia ácida de minério de urânio proveniente da mina de Lagoa Real - BA e efluente ácido da mina de urânio de Figueira - PR (GARCIA JR., 1991). Essas linhagens são mantidas por repiques a cada três meses nos respectivos meios de cultura (ver item IV.2) e mantidas a 4°C no laboratório do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química-Unesp, Araraquara.

IV. 2 - Meios de cultura

Para a manutenção periódica do *T. ferrooxidans*-LR, foi utilizado o meio de cultura “T&K” (TUOVINEN & KELLY, 1973) e para o *T. thiooxidans*-FG01 foi utilizada a solução de sais do meio “9K” (SILVERMAN & LUNDGREEN, 1959) substituindo-se a fonte de energia Fe²⁺, por enxofre elementar (10 g.L⁻¹). A composição e o modo de preparo dos referidos meios estão descritos a seguir:

A) Meio “T&K” (*T. ferrooxidans*-LR)

Solução A:

(NH₄)₂SO₄.....0,5 g

K₂HPO₄.....0,5 g

MgSO₄. 7H₂O.....0,5 g

H₂O destiladaqsp 800 mL

pH1,8 (H₂SO₄, concentrado)

Solução B:

FeSO ₄ .7H ₂ O.....	33,3 g
H ₂ O destilada.....	qsp 200 mL
pH.....	1,8 (H ₂ SO ₄ , concentrado)

A solução A foi esterilizada por 20 minutos a 120°C em autoclave e a solução B foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose (0,45 µm de diâmetro de poro – Millipore – HAWP 04700).

No momento de uso as soluções A e B foram misturadas na proporção de 4:1, respectivamente.

B) Meio “9K” (*T. thiooxidans*-FG01)

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,5 g
KCl.....	0,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
H ₂ O destilada	qsp 1000 mL
pH.....	2.8 (H ₂ SO ₄ , concentrado)
enxofre elementar.....	10,0 g

A solução de sais foi esterilizada pelo mesmo procedimento do meio “T&K”. O enxofre elementar foi esterilizado separadamente por 1 hora à 110°C em autoclave e, no momento do uso, 1 g de enxofre foi adicionado à 100 mL da solução de sais previamente esterilizada. Esse procedimento para esterilização do enxofre revelou-se eficiente uma vez

que testes sem inocular, não mostraram qualquer indício de crescimento, mesmo após 30 dias de incubação.

IV. 3 - Produção do H₂S

Para a realização dos testes preliminares de oxidação do H₂S por *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*, esse gás foi produzido pela reação de FeS com HCl de acordo com a Equação [8], em um aparelho de Kipp (Figura 5). Para realização dos ensaios, o gás foi borbulhado em uma solução de água ácida (pH ~ 1,8).

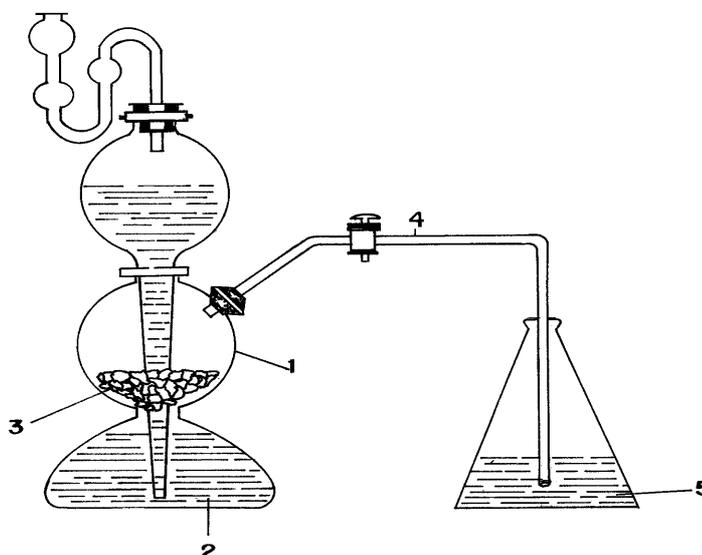


Figura 5. Aparelho de Kipp para obtenção do gás H₂S.

1 - frasco de reação; 2 - solução de HCl; 3 - bastões de FeS; 4 - saída do gás; 5 - frasco de recolhimento do gás.

IV. 4 - Preparo da Suspensão Celular

Para realização dos ensaios de oxidação do H₂S, os inóculos foram obtidos pelo crescimento das linhagens de *T. ferrooxidans*-LR e *T. thiooxidans*-FG01 por 3 dias em meio “T&K” e 7 dias em meio “9K”, respectivamente, sob agitação constante (150 rpm) a 30°C. Após o crescimento, as linhagens foram filtradas em papel de filtro comum para a retirada de precipitados de ferro ou enxofre residual. A seguir as células foram centrifugadas à 4000 rpm por 30 min à 4°C (Sorvall - RT7 - DU Pont - rotor RTH-750) para separar as células do meio de cultura oxidado. As células foram lavadas 3 vezes em água acidificada com ácido sulfúrico (pH ~ 1,8) e finalmente ressuspensas em solução ácida nova e mantidas à 4°C por no máximo 15 dias. A biomassa celular foi avaliada pela determinação de proteínas totais pelo método de Lowry, modificado por Hartree (1972) utilizando soroalbumina bovina como padrão.

IV. 5 - Ensaios Exploratórios

IV.5.1 - Teste qualitativo

Para o início dos estudos de oxidação do H₂S foram utilizadas as duas linhagens citadas (*T. ferrooxidans*-LR e *T. thiooxidans*-FG01). Um teste qualitativo foi realizado, utilizando-se papel de filtro comum (Klabin – F1) embebido com uma solução de acetato de chumbo 0,1mol.L⁻¹ e seco em estufa a 50°C. Esse papel em contato com H₂S apresenta um precipitado negro (PbS) devido à reação do acetato de chumbo com o H₂S.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de água ácida em pH 1,8 (correções com H₂SO₄) contendo H₂S (100 mg.L⁻¹) e inoculados com 1 mL de suspensão celular de *T. ferrooxidans*-LR ou *T. thiooxidans*-FG01 (proteína total=

0,258 mg.mL⁻¹). Os frascos foram incubados sob agitação constante (150 rpm) e amostras de 1 mL foram retiradas periodicamente e aplicadas ao papel impregnado com o acetato de chumbo; a seguir foi observado sua coloração. Em paralelo, foi realizado outro teste substituindo-se as suspensões celulares por uma solução de Fe³⁺ (8,38 g.L⁻¹) obtida através da oxidação completa do meio “T&K” pelo *T. ferrooxidans*-LR; antes do experimento essa solução foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose (0,45 µm). Além desses, foi também preparado um frasco controle, contendo apenas a solução de H₂S em água ácida (pH ~ 1,8) sem inóculo.

IV.5.2 - Teste quantitativo: efeito da concentração do H₂S na atividade oxidativa das linhagens de *Thiobacillus*

Para avaliar a volatilização natural do H₂S em solução ácida, foi realizado um ensaio exploratório quantitativo em que soluções de água ácida (pH ~ 1,8 com H₂SO₄) com concentrações diferentes de sulfeto de hidrogênio (5 a 100 mg.L⁻¹) foram adicionados em Erlenmeyers de 250 mL e incubados sob agitação sem inóculo bacteriano. Utilizou-se essa solução ácida de pH ~1,8 uma vez que esse valor está situado na faixa de pH de crescimento de ambas as espécies. Foram retiradas amostras periodicamente para análise do H₂S presente através do método de azul de metileno (CLESCERI et al., 1989).

Um outro teste foi realizado para avaliar o efeito da concentração do H₂S na atividade de oxidação das linhagens de *T. ferrooxidans*-LR ou *T. thiooxidans*-FG01. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de solução de água ácida (pH ~ 1,8) contendo o H₂S em uma faixa de concentração de 5 a 100 mg.L⁻¹; os frascos foram inoculados com 1 mL de suspensão celular (mesma concentração de proteína total, citada anteriormente). Esses frascos foram vedados com rolha de borracha para impedir a

saída do gás da solução por volatilização, e também incubados sob agitação constante à 150 rpm. Foi também preparado um frasco controle, contendo apenas o referido gás. Foram retiradas amostras periodicamente para a análise do H₂S através do método do azul de metileno (CLESCERI et al., 1989).

IV.6 – Oxidação do Fe²⁺ por células livres do *T. ferrooxidans*-LR

Para determinação do crescimento e, conseqüentemente, da oxidação de Fe²⁺ por células livres de *T. ferrooxidans*-LR utilizou-se um fermentador de 5 L fabricado pela Indústria FGG, São Paulo. A temperatura foi controlada em 30°C através de um banho maria modelo TE-054 (Indústria TECNAL, Piracicaba-SP) no qual o fermentador foi imerso. A agitação foi mantida constante (250 rpm) através de um agitador (TE-039,W20, TECNAL) acoplado ao fermentador. A aeração do meio foi realizada através da entrada de ar estéril pela parte superior do fermentador. No momento do uso o fermentador foi autoclavado com 2.000 mL de meio “T&K” (pH ~ 1,8) e a seguir inoculado com 5% de cultura de *T. ferrooxidans*-LR. Amostras foram retiradas periodicamente para avaliar o crescimento do *T. ferrooxidans*-LR através da oxidação do íon Fe²⁺ e de medidas da turbidez da cultura. As perdas de volume do meio por evaporação foram compensadas pela adição de água esterilizada.

IV.7 – Imobilização do *T. ferrooxidans*-LR

IV.7.1 – Dimensões do Biorreator de leito fixo

Em função dos testes exploratórios terem indicados resultados promissores para o desenvolvimento de um processo fundamentado na oxidação do H₂S pelo íon Fe³⁺, o projeto foi então todo direcionado para a espécie *T. ferrooxidans*-LR devido sua capacidade de oxidar o íon Fe²⁺ à Fe³⁺.

Foram confeccionados dois biorreatores em vidro com 55 cm de comprimento e 9 cm de diâmetro interno, perfazendo uma relação comprimento/diâmetro (L/D) de aproximadamente 6. O volume útil foi de 3.000 mL para cada biorreator.

IV.7.2 – Suportes para imobilização do *T. ferrooxidans*-LR

Foram escolhidos dois suportes para se iniciar os estudos de imobilização celular: anéis de vidro e fitas de cloreto de polivinil (PVC) com densidades de 2.140 kg.m⁻³ e 780 kg.m⁻³ respectivamente. Os anéis foram obtidos pelo corte de tubos de vidro apresentando, em geral, as seguintes dimensões: diâmetro interno de 3 mm, diâmetro externo de 5 mm e comprimento de 6 mm (Figura 6A). As fitas de PVC foram preparadas cortando-se um tubo em um torno mecânico, conseguindo-se fitas de 2 mm de largura e comprimento variável (Figura 6B). O volume reacional para cada biorreator foi de 1.900 e 2.800 mL, respectivamente para os recheios de anéis de vidro e de fitas de PVC.

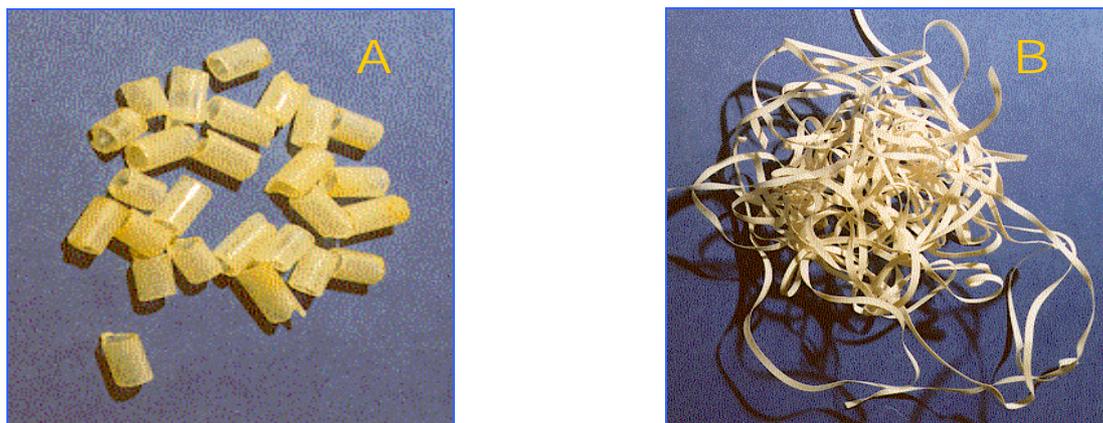


Figura 6: Suportes utilizados para imobilização do *T. ferrooxidans*-LR: (A) anéis de vidro e (B) fitas de PVC.

IV.7.3 – Descrição geral do processo de imobilização celular

Para dar início a etapa de imobilização celular, os biorreatores foram preenchidos com os dois suportes escolhidos e a seguir recirculou-se 4.000 mL de meio “T&K” (pH ~ 1,7), previamente inoculado com *T. ferrooxidans*-LR (5% v/v), até a completa oxidação do íon Fe^{2+} (~ 99%). Vale ressaltar que esses biorreatores trabalharam de forma inundada e a recirculação do meio foi realizada utilizando-se uma bomba peristáltica a uma vazão de 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Após a completa oxidação de Fe^{2+} , as colunas foram lavadas várias vezes com água ácida (pH ~ 1,7) para retirar as possíveis células que poderiam estar livres no meio e também para se tentar remover um material precipitado que se formou nas colunas durante o desenvolvimento dessa etapa. Após as lavagens, foi iniciado um novo ciclo de oxidação do meio “T&K” sem inóculo prévio. Esse procedimento foi repetido várias vezes até a completa oxidação do Fe^{2+} , objetivando-se a formação de um biofilme adequado nos suportes. Amostras foram retiradas periodicamente para análise de Fe^{2+} . A alimentação do

meio de cultura e o sistema de aeração foram realizados pela parte inferior da coluna para garantir um maior contato com os suportes (fluxo ascendente). Alíquotas para análise de Fe^{2+} foram retiradas por uma abertura lateral superior da coluna. O sistema operacional utilizado nessa etapa do trabalho pode ser visto na Figura 7.

Após o término dessa fase de imobilização da bactéria aos suportes, foi iniciado um estudo para se definir o tempo de residência ótimo, variando-se a vazão de alimentação da solução de Fe^{2+} , para se operar em sistema contínuo.



Figura 7. Sistema operacional utilizado para imobilização do *T. ferrooxidans*-LR.

IV.8 – Influência da Taxa de Diluição (D) na Oxidação do Fe^{2+} por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR

Com o objetivo de se avaliar a taxa de oxidação do Fe^{2+} pelas bactérias aderidas aos suportes de vidro e PVC, foram realizados ensaios em diferentes taxa de diluição e em diferentes concentrações de Fe^{2+} (1,0; 2,5; 4,0 e 6,7 g.L^{-1}) utilizando-se uma solução estoque de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH ~ 1,7). Vale salientar que essa solução não foi esterilizada pois as colunas foram mantidas em sistema aberto. O ensaio para uma determinada taxa de diluição e concentração inicial de Fe^{2+} foi conduzido até a estabilização na taxa de oxidação do Fe^{2+} , durante um período de operação de no máximo 3 vezes o tempo de residência, o qual foi estimado utilizando-se o volume do líquido reacional.

IV. 9 – Descontaminação do gás H_2S

IV.9.1 – Coluna de lavagem do gás

A coluna para remoção de H_2S foi construída em tubo de PVC com diâmetro interno de 75 mm e altura igual a 1 metro. A coluna foi preenchida com pequenos cilindros de Teflon (densidade = 1027 kg.m^{-3}), com 10 mm de comprimento por 7 mm de diâmetro interno e 10 mm de diâmetro externo. Um esquema da coluna de lavagem do gás está representado na Figura 8.

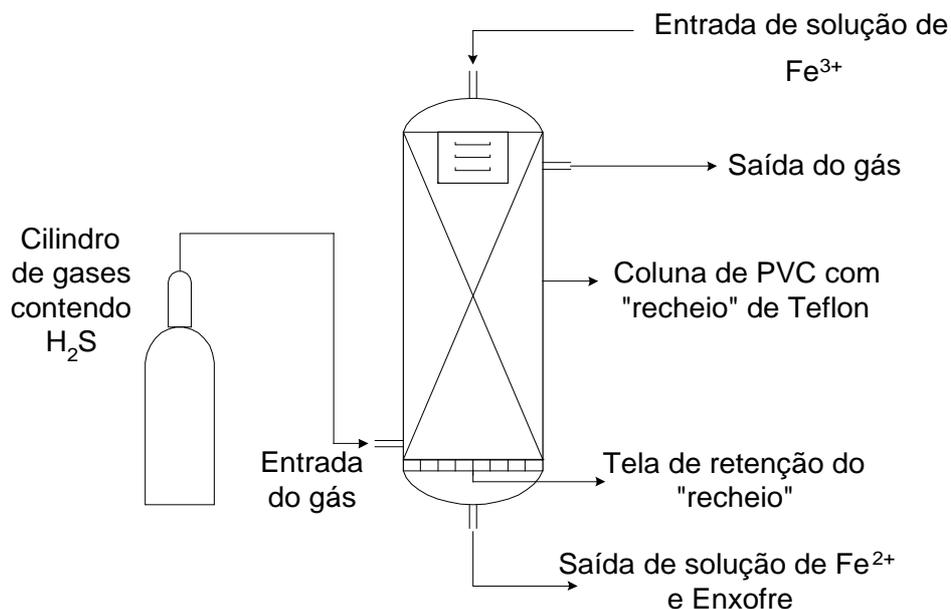


Figura 8. Esquema da coluna de lavagem do gás H₂S.

IV.9.2 – Remoção de H₂S - testes variando a vazão de alimentação da solução de Fe³⁺

A coluna de lavagem do gás foi alimentada com solução de Fe³⁺ proveniente da oxidação de Fe²⁺ por bactérias imobilizadas do *T. ferrooxidans*-LR. Essa solução entrou pela parte superior da coluna de forma a encontrar em contra-corrente, com a mistura de gases, fornecida pela White Martins Gases Industriais S/A, contendo (v/v): 1% de H₂S, 5% de CO₂ e 94% de Nitrogênio.

Para se estabelecer os parâmetros operacionais para uma futura operação contínua, foram realizados vários ensaios em batelada, combinando-se a vazão e a concentração da solução de Fe³⁺ (ver Tabela 1), em função da velocidade de fluxo do gás (100 mL.min⁻¹), de forma a se obter sempre uma concentração de Fe³⁺ 50% maior que aquela requerida pela estequiometria da reação (ver equação [4]). O controle da eficiência do processo foi realizado pela análise do H₂S no gás que saía da parte superior da coluna o qual foi

coletado periodicamente para dosagem do H₂S (borbulhamento por 10 min em solução de sulfato de zinco 5 g.L⁻¹) pelo método de azul de metileno (CLESCERI et al., 1989). A concentração de H₂S dentro do cilindro foi de 3,27x10⁻⁴ moles.L⁻¹.

Tabela 1. Vazões e Concentrações da solução de Fe³⁺ utilizadas durante os ensaios em batelada de lavagem de H₂S.

Vazão de Fe ³⁺ (mL.min ⁻¹)	Concentração de Fe ³⁺ (g.L ⁻¹).
2,5	3,0
5,0	1,5
10	0,75
15	0,50
20	0,38
25	0,30

IV.9.3 – Operação do sistema contínuo químico–bacteriano.

Após a realização desses ensaios em batelada de descontaminação do H₂S realizou-se então ensaios contínuos operando as duas colunas (tratamento do gás e oxidação do Fe²⁺) concomitantemente.

A coluna de lavagem do gás H₂S, foi irrigada com solução de Fe³⁺ à 2,5 mL.min⁻¹ e 3 g.L⁻¹ (conforme estabelecido nos testes em batelada) proveniente da oxidação de Fe²⁺ pelas células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR. Essa solução entrou pela parte superior da coluna de forma a encontrar em contra-corrente com a mistura de gases na vazão de 100 mL.min⁻¹.

A solução de saída da coluna de lavagem do H_2S , foi recirculada ($2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) para a coluna com células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR fechando-se assim o ciclo contínuo (ver Figura 9). O controle da eficiência do processo foi realizado pela análise da concentração do Fe^{2+} na solução de saída da coluna de lavagem do gás, concentração de Fe^{3+} na solução de entrada da coluna de lavagem e pela concentração do H_2S no gás de saída da coluna de lavagem, obedecendo-se a metodologia descrita para os ensaios em batelada.

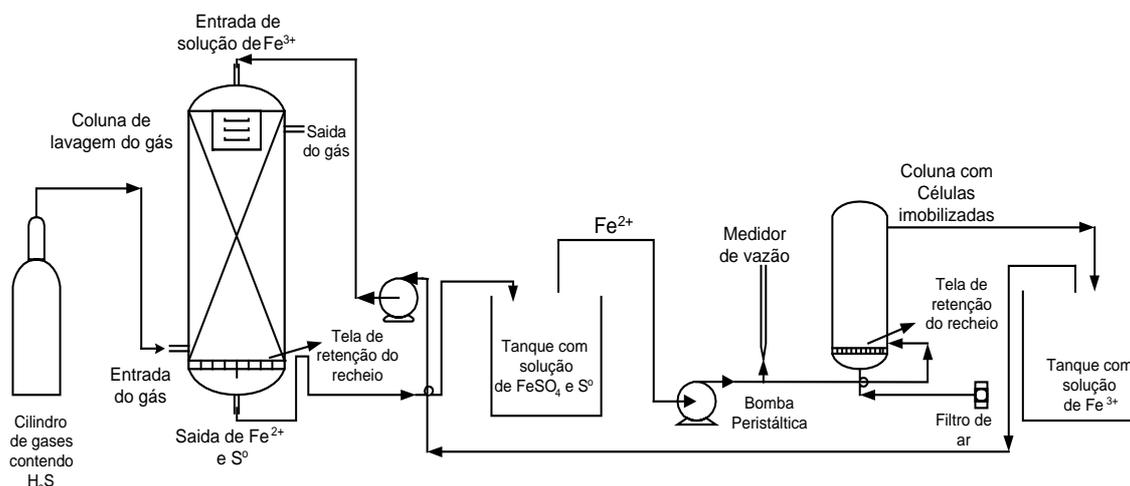


Figura 9. Processo combinado Químico-Bacteriano para remoção de H_2S .

IV.10 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), das células de *T. ferrooxidans*-LR aderidas aos suportes de imobilização.

Após a realização dos ciclos de imobilização celular, amostras dos suportes utilizados foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura para verificar a colonização das bactérias aos suportes, assim como as características morfológicas das mesmas. Desta

forma, anéis de vidro e fitas de PVC foram retirados das colunas e utilizados para a análise. As amostras foram coladas em porta amostra adequado ao microscópio eletrônico e em seguida metalizadas com uma fina camada de ouro para torná-la condutora e assim possibilitar sua análise. Foram utilizados como amostras-controle, suportes que não estavam em contato com a bactéria. Para essa análise foi usado um Microscópio Eletrônico de Varredura LEO – Modelo 440 com detector de espalhamento de energia de raios-X, Marca Oxford.

IV.11 - Determinações Analíticas

IV.11.1 - Quantificação da biomassa celular

A) Proteína total do *T. ferrooxidans* em suspensão

Centrifugou-se 1 mL de suspensão celular (ver item IV.4) por 15 minutos à 1.500 rpm (Eppendorf – Centrifuge 5415). Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹ para hidrólise por fervura em banho durante 30 minutos. A seguir, foram retiradas alíquotas dessa suspensão que, após diluições adequadas, foram utilizadas para a dosagem protéica. Os reagentes utilizados foram os seguintes:

Reagentes:

Solução A:

C ₄ H ₄ KNaO ₆ .4H ₂ O.....	0,5 g
Na ₂ CO ₃	25 g
NaOH 1mol.L ⁻¹	125 mL
água destilada.....	qsp.. 250 mL

Solução B:

$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$	0,2 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,1 g
NaOH 1mol.L ⁻¹	1,0 mL
água destilada.....	qsp..9,0 mL

Solução C:

reagente de Folin-Ciocalteu	10,0 mL
água destilada.....	qsp..30,0 mL

Procedimento

Num tubo de ensaio contendo 1 mL de solução de proteínas totais na diluição apropriada, adicionou-se 0,9 mL da solução A, incubou-se em banho maria a 50°C por 10 minutos e a seguir resfriou-se a temperatura ambiente. Adicionou-se 0,1 mL da solução B e manteve-se em temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente adicionou-se 3 mL da solução C e incubou-se por 10 minutos a 50°C. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Micronal-B395) a 650 nm, e para a construção da curva padrão, utilizou-se soroalbumina bovina.

B) Medida da biomassa celular: método indireto por turbidimetria

O método indireto por turbidimetria foi testado objetivando-se a determinação da biomassa celular de forma rápida e simples. Utilizando-se uma suspensão lavada de células do *T. ferrooxidans*-LR de concentração de proteínas totais conhecida, foram feitas várias diluições e registrou-se a absorvância em espectrofotômetro a 620 nm. A curva padrão foi

feita pela concentração total de proteínas em função da absorbância da suspensão (Figura 10).

Para amostras da cultura em crescimento, foi necessária a descoloração do meio de cultura, o qual apresenta uma coloração verde claro no início passando à vermelho intenso durante o crescimento do *T. ferrooxidans*, devido a oxidação do íon Fe^{2+} à Fe^{3+} . Nessas condições, essa variação de cor interfere na medida da absorbância. Para descolorir o meio, foi utilizado o método de Mandl (1984), modificado por Garcia JR. (1989). Basicamente o método utiliza uma solução descolorante, descrita abaixo.

9 mL de H_3PO_4 concentrado

1 mL de H_2SO_4 concentrado

90 mL de H_2O destilada

Amostras da cultura em crescimento foram retiradas periodicamente e misturadas na proporção de 1:2 com a solução descolorante. A seguir, mediu-se a absorbância a 620 nm em um espectrofotômetro (MICRONAL B395).

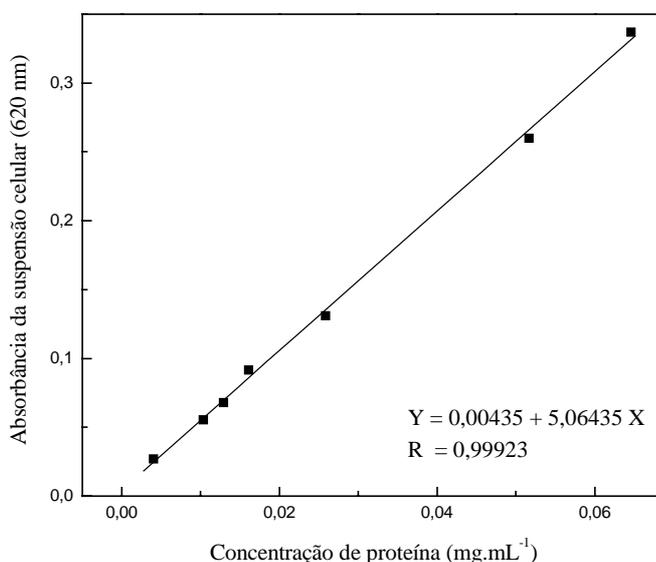


Figura 10. Curva padrão de biomassa celular (proteína total) por turbidimetria.

IV.12 – Difração de raios-X

Durante os ensaios exploratórios de oxidação de H_2S com o íon Fe^{3+} e no processo de imobilização celular e os ensaios contínuos de oxidação do Fe^{2+} foi detectada a presença de um precipitado de cor amarelo-tijolo.

Esse material foi coletado e preparado para identificação através da técnica de difração de raios-X, utilizando um difratômetro D5000 – Siemens, com tempo de contagem de 2s, passo $0,05^\circ$ (2Θ), fendas 2/2/0,6 e ângulo de varredura de 10 a 70° (2Θ). No ensaio exploratório de oxidação do H_2S com a solução de Fe^{3+} , para se obter o precipitado em quantidade suficiente para ser analisado por difratometria de raios-S, foi realizado um ensaio utilizando-se uma concentração inicial de H_2S igual a 360 mg.L^{-1} e solução de Fe^{3+} na concentração de $8,38 \text{ g.L}^{-1}$. Após a reação, o precipitado formado foi decantado, seco em

estufa a 60°C e analisado em difratômetro de raios-X, conforme procedimento descrito por Garcia Jr. et al., 1995.

Essa técnica também foi utilizada para identificar o precipitado formado no ensaio contínuo químico-bacteriano de oxidação do H₂S por solução de Fe³⁺. Neste caso, o precipitado foi separado da solução que saía da coluna de lavagem de gás por decantação e a seguir seco em estufa a 60°C e levado para análise. Utilizou-se um tempo de contagem de 3s, passo 0,02° (2Θ), fendas 2/2/0,6 e ângulo de varredura de 10 a 70° (2Θ).

IV.13 - Determinação do H₂S

IV.13.1 - Iodometria

A) Preparo e padronização dos reagentes:

- Tiosulfato de Sódio (0,0250 moles.L⁻¹)

Para um Erlenmeyer de 250 mL, transferiu-se 10 mL de solução de iodeto de potássio (1 mol.L⁻¹), 10 mL de solução de carbonato ácido de sódio (1 mol.L⁻¹) e 3 mL de solução de ácido clorídrico concentrado. A seguir, adicionou-se uma alíquota de 25 mL de solução de dicromato de potássio (padrão primário) e cobriu-se com vidro relógio, deixando reagir por 5 min no escuro. Titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio até o aparecimento da cor “amarelo-palha” no meio; a seguir adicionou-se uma solução indicadora de amido e prosseguiu-se a titulação. O ponto final é indicado pela mudança de cor do azul esverdeado para o verde claro.

- Solução de Iodo (0,0250 moles.L⁻¹)

Dissolveu-se 20 a 25 g de iodeto de potássio em 800 mL de água destilada, num balão volumétrico de 1L. Pesou-se 3,2 g de iodo ressublimado, num vidro relógio e transferiu-se

para a solução concentrada de iodeto de potássio. Agitou-se a frio até a completa dissolução do iodo. Completou-se o volume com água destilada.

Para a padronização, transferiu-se 25 mL da solução de iodo em Erlenmeyer de 250 mL, diluiu-se para 100 mL com água destilada e titulou-se com uma solução de tiosulfato de sódio previamente padronizada, até a solução apresentar uma cor amarelo-claro. Adicionou-se 2 mL de solução de amido (1%) e continuou-se a adicionar solução de tiosulfato de sódio lentamente até a solução tornar-se incolor.

B) Procedimento experimental

Em um Erlenmeyer de 250 mL adicionou-se um volume conhecido de solução contendo H_2S a um excesso de solução acidificada de iodo de concentração conhecida. A seguir, o excesso de iodo foi titulado por solução padrão de tiosulfato, utilizando como indicador solução de amido 1%. O final da titulação é reconhecido quando a solução se torna incolor.

O método iodométrico para determinação de sulfeto baseia-se na seguinte reação reversível:



IV.13.2 - Azul de Metileno

O método quantitativo utilizado para determinar baixas concentrações de H_2S (0,02 a 50 $mg.L^{-1}$) presente no meio, foi o método do azul de metileno, que é baseado na reação de sulfeto, cloreto férrico e o reagente N, N - dimetil -1,4 fenileno oxalato diamina para

produção de azul de metileno, o qual foi quantificado espectrofotometricamente a 660 nm, de acordo com Clesceri et al. (1989), que será descrito a seguir.

A) Preparo dos reagentes:

- solução estoque de N, N - dimetil -1,4 fenileno oxalato diamina:

dissolveu-se 27 g desse reagente em 50 mL de H₂SO₄ concentrado e 20 mL de água destilada. Resfriou-se a mistura e completou-se o volume para 100 mL com água destilada.

- reagente ácido amina-sulfúrico:

diluiu-se 25 mL da solução estoque acima descrita com 975 mL de H₂SO₄ (1:1).

- solução de cloreto férrico:

dissolveu-se 100 g de FeCl₃.6H₂O em 40 mL de água.

solução de hidrogênio fosfato de amônia:

dissolveu-se 400 g de (NH₄)₂HPO₄ em 800 mL de água destilada.

B) Procedimento experimental

Inicialmente obteve-se uma curva padrão procedendo-se da seguinte forma: determinou-se pelo método iodométrico a concentração de S²⁻, de uma solução de Na₂S.9H₂O obtida pela dissolução de algumas gramas deste sal em H₂O acidificada a pH 1,8 com H₂SO₄ concentrado.

A seguir foram feitas várias diluições dessa solução, as quais foram então utilizadas para elaboração da curva padrão (Figura 11): colocou-se 7,5 mL das soluções de Na₂S de concentrações já conhecidas em tubos de ensaio. Adicionou-se 0,5 mL de solução N, N - dimetil -1,4 fenileno oxalato diamina e misturou-se lentamente 0,15 mL de solução FeCl₃. A presença de S²⁻ é indicada pelo aparecimento da cor azul no tubo. Esperou-se 3 a 5

minutos e adicionou-se 1,6 mL de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ para remover a cor do reagente FeCl_3 . Após 15 min fez-se a leitura da absorbância em calorímetro fotoelétrico a 660 nm (MICRONAL B340). O teste em branco foi feito substituindo-se a solução N, N - dimetil - 1,4 fenileno oxalato diamina por 0,5 mL de H_2SO_4 (1:1).

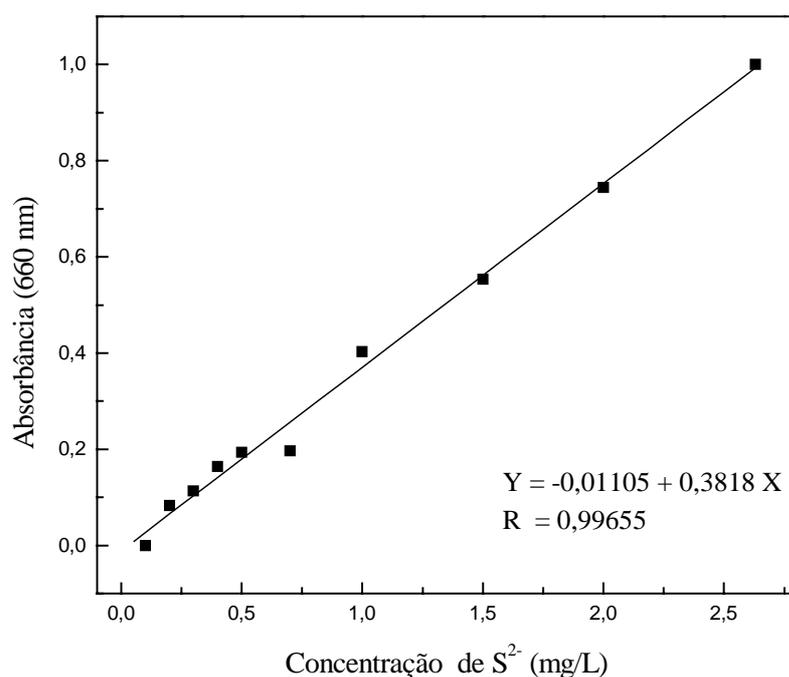


Figura 11. Curva padrão de S^{2-} utilizando o Método de Azul de Metileno.

IV.14 – Cálculos e Símbolos utilizados

Velocidade de formação do produto (Fe^{3+}) no biorreator de leito fixo (GRISHIN & TUOVINEN, 1988).

A velocidade de formação do produto (Pr) no biorreator foi estimada com base na taxa de diluição e volume do reator.

$$\text{Pr} = \text{D} \times \text{P}$$

[10]

onde: $D = F/V$ [11]

$$P = (Fe^{2+}_{\text{entrada}} - Fe^{2+}_{\text{saída}})Y_{p/s} \quad [12]$$

$$Y_{p/s} = 1$$

Pr = Velocidade de formação do produto no biorreator ($g.L^{-1}.h^{-1}$)

D = Taxa de diluição (h^{-1});

F = Vazão de entrada do meio reacional ($L.h^{-1}$);

V = Volume do meio reacional (L);

P = Concentração de produto ($g.L^{-1}$);

$Y_{p/s}$ = Coeficiente teórico de formação do produto a partir do substrato.

– Cálculo da Eficiência do processo de tratamento do H_2S (PAGELLA et al, 1996b)

O cálculo utilizado para medir a eficiência do processo de tratamento de gás H_2S foi realizado através da seguinte equação:

$$E(\%) = (H_2S_{\text{entrada}} - H_2S_{\text{saída}})/H_2S_{\text{entrada}} \times 100 \quad [13]$$

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 – Ensaio exploratório de oxidação do H₂S

V.1.1 - Teste qualitativo

Para avaliar a capacidade das linhagens de *T. ferrooxidans*-LR e *T. thiooxidans*-FG01, quanto a oxidação direta do H₂S, assim como a indireta pelo íon Fe³⁺, foi realizado um ensaio exploratório qualitativo utilizando papel de filtro impregnado por acetato de chumbo.

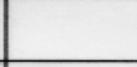
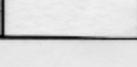
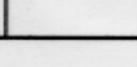
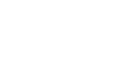
Pode-se observar pela Tabela 2, ilustrativa da resposta de oxidação do H₂S, que nos frascos contendo suspensão celular (0,258 mg S.A.B.mL⁻¹) do *T. ferrooxidans*-LR ou *T. thiooxidans*-FG01, o H₂S não foi mais detectado a partir de 120 min, fato este indicado pelo desaparecimento da cor característica (não formação do precipitado escuro de PbS no papel de filtro). Por outro lado, no frasco-controle a presença do H₂S pôde ser observada durante todo o período de realização do ensaio (210 min). Finalmente, deve ser destacado o rápido desaparecimento do H₂S em contato com a solução de Fe³⁺; em cerca de 4 min a cor escura característica do precipitado de PbS não foi mais detectada.

Deve ser salientado que no teste de oxidação do H₂S com a solução de Fe³⁺, foi observada a formação de um precipitado cor amarelo-clara que foi analisado em difratômetro de raios-X, conforme procedimento descrito por Garcia Jr. et al., 1995.

Apesar do difratograma apresentar-se com um “ruído” muito acentuado, observa-se que o precipitado obtido foi constituído fundamentalmente por enxofre (Figura 12). Quando o H₂S entra em contato com uma solução de Fe³⁺, ocorre uma reação de oxidação do S²⁻ para S⁰, com a conseqüente redução do íon férrico para o íon ferroso (Fe²⁺) conforme apresentado na equação [4].

Em um sistema industrial a formação desse sub-produto da descontaminação do H₂S (enxofre), pode ser interessante sob o ponto de vista econômico, pois o enxofre pode ser recuperado no processo. De acordo com Janssen et al. (1999), essa recuperação pode ser feita através de processo de filtração, flotação, extração por membrana, etc, porém a sedimentação natural apresenta ser tecnicamente e economicamente, um método mais atrativo de recuperação dessas partículas.

Tabela 2. Teste qualitativo de oxidação de H₂S utilizando-se papel de filtro impregnado com acetato de chumbo como indicador. A - Frasco Controle; B - *Thiobacillus ferrooxidans*-LR; C - *Thiobacillus thiooxidans*-FG01; D - Solução de Fe³⁺.

Tempo (min)	A	B	C	D
0				
2				
4				
6				
8				
30				
75				
120				
165				
210				

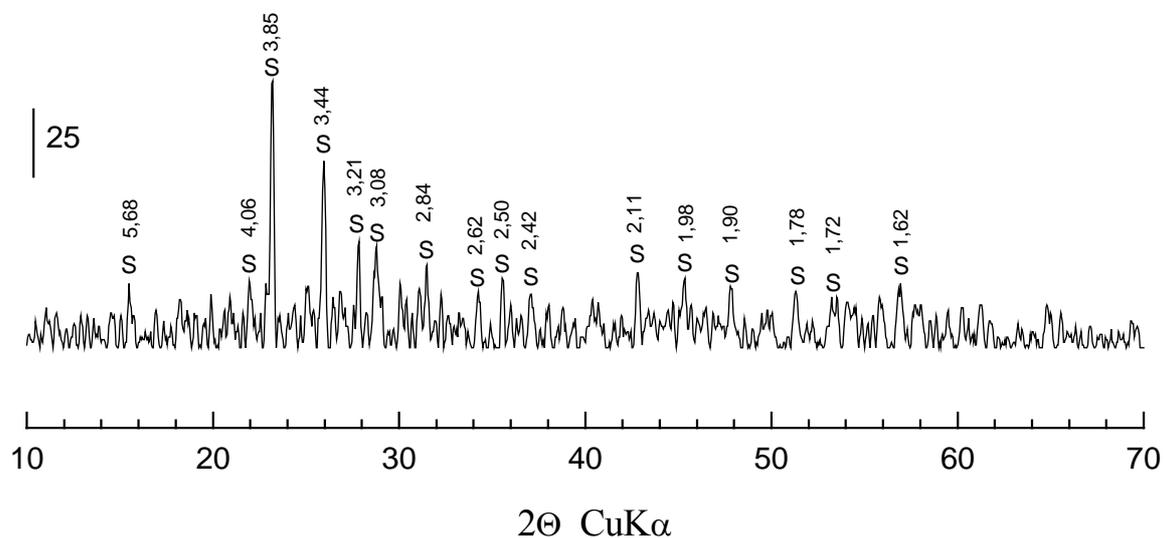
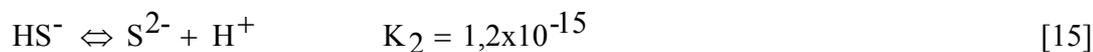
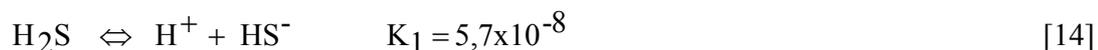


Figura 12. Difratoograma de raios-X do precipitado obtido no ensaio de oxidação do H_2S por solução de Fe^{3+} . Símbolo: S, enxofre. A barra lateral indica a intensidade de contagem dos picos e os números acima da identificação dos picos indicam a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.

V.1.2 - Teste quantitativo: efeito da concentração do H_2S na atividade oxidativa do *T. ferrooxidans*-LR e do *T. thiooxidans*-FG01

A dissociação do H_2S em meio líquido envolve duas etapas (SHINABE et al., 1995), conforme ilustrado abaixo:



Quando o sulfeto de hidrogênio é borbulhado em água, a sua solubilidade é cerca de 0,1 mol.L⁻¹ à temperatura ambiente. Porém quando essa solução é ácida existe uma grande dificuldade em se manter uma concentração alta e estável de H₂S no sistema (GUOQIANG et al., 1994), pois a solubilidade do íon S²⁻ é inversamente proporcional ao quadrado da concentração do íon H⁺ em solução (ALEXEYEV, 1967). Isto é, quando uma solução tem seu pH diminuído em uma unidade (por exemplo, de pH 3 para 2) a solubilidade do S²⁻ diminui em 100 vezes. Dessa forma, antes de se realizar os ensaios biológicos de descontaminação do H₂S, foi avaliado o desprendimento do H₂S da solução ácida em função do tempo, através de um ensaio exploratório quantitativo.

Conforme pode ser observado pela Figura 13, ocorre uma progressiva redução nas concentrações do sulfeto sem, contudo, ocorrer o desaparecimento completo do gás da solução. Essa tendência ao desprendimento da forma não dissociada H₂S vai diminuindo nas menores concentrações testadas (Figura 13B), determinando uma estabilidade do gás para concentrações ao redor de 1 mg.L⁻¹.

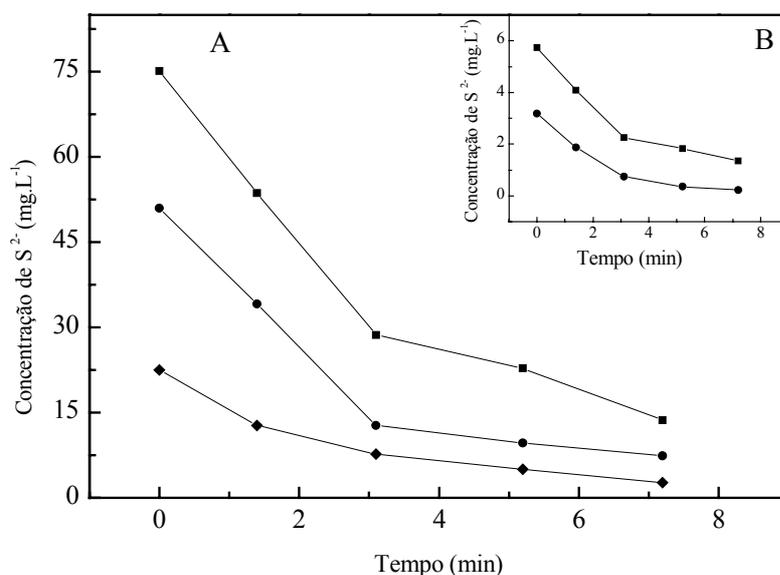


Figura 13. Cinética do desprendimento de H₂S de solução em pH 1,8 para diferentes concentrações iniciais do gás.

(A) ■ 100 mg.L⁻¹; ● 50 mg.L⁻¹; ◆ 25 mg.L⁻¹.

(B) ■ 10mg.L⁻¹; ● 5 mg.L⁻¹.

Mesmo considerando esse efeito de desprendimento do H₂S foram realizados ensaios de oxidação desse gás pelas linhagens de *T. ferrooxidans*-LR e *T. thiooxidans*-FG01, utilizando-se concentrações que variaram de cerca de 5 a 100 mg.L⁻¹. As Figuras 14 a 18 mostram as representações gráficas dos valores de H₂S em solução ácida, obtidas nos ensaios com a linhagem *T. ferrooxidans*-LR e os respectivos controles, bem como os valores calculados das velocidades de decaimento do H₂S, obtido através de uma equação exponencial decrescente de primeira ordem. Novamente pode ser observado o desprendimento do gás, tanto nos frascos inoculados quanto nos controles sem adição de inóculo. Entretanto, a presença da bactéria determinou após cerca de 100 minutos de ensaio, uma significativa redução na concentração do H₂S, em relação ao controle estéril. Essa tendência pôde ser detectada para todas as concentrações utilizadas, sobretudo,

quando se observa os gráficos em escala semi-logarítmica, inseridos nas figuras mencionadas acima. Assim, após cerca de 300 minutos de ensaio, o limite de detecção do método de análise ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$) foi ultrapassado nos frascos contendo as bactérias. Isto é, o H_2S foi oxidado nos frascos inoculados, atingindo concentrações inferiores ao limite de detecção, enquanto que, nos respectivos controles ainda foi possível sua determinação quantitativa.

As representações gráficas dos valores de H_2S em solução ácida pelo *T. thiooxidans*-FG01 podem ser vistas nas Figuras 19 a 23. Basicamente, o comportamento dessa espécie bacteriana em relação à utilização do H_2S como fonte energética, seguiu um padrão semelhante àquele demonstrado pelo *T. ferrooxidans*-LR, no que se refere ao período necessário para a completa oxidação do gás. Também, para essa espécie, ocorreu uma visível redução na concentração do H_2S após os 100 minutos de ensaio (OPRIME et al, 2001).

Desta forma, mesmo considerando a capacidade de oxidação direta do H_2S pelo *T. ferrooxidans*-LR e *T. thiooxidans*-FG01, conforme revelado pela série de ensaios de oxidação do gás, dois fatores associados mostraram uma possível limitação do processo: a baixa solubilidade do H_2S em soluções ácidas (conseqüentemente, um rápido desprendimento do gás para a atmosfera) e a velocidade de sua oxidação pelas espécies bacterianas (somente detectada após cerca de 100 minutos). Isto é, quando a oxidação bacteriana do H_2S tornou-se significativa, ocorreu uma também significativa, volatilização do gás como observa-se nas Figuras 14 à 23. Em solução ácidas contendo concentrações reduzidas de H_2S (<1 ppm) o processo bacteriano tornou-se efetivo, mas para concentrações superiores, a liberação para o ambiente foi praticamente inevitável.

Conseqüentemente, verificou-se a necessidade do desenvolvimento de um processo muito mais rápido, o qual poderia ser estabelecido, com base nos resultados obtidos até o presente, através de duas formas: ou pela elevação significativa da biomassa celular para acelerar a oxidação direta, limitada pelas próprias características fisiológicas das espécies bacterianas utilizadas, ou pela oxidação química do H_2S com o íon Fe^{3+} , pois conforme detectado nos ensaios exploratórios iniciais (Tabela 2) esta é extremamente rápida (< 4 min).

Através da análise dos resultados acima descritos, optou-se por tratar o H_2S utilizando o íon Fe^{3+} como agente oxidante. Para esse procedimento a rota biotecnológica escolhida foi o desenvolvimento de um processo combinado, onde basicamente o gás entra em contato com o íon Fe^{3+} produzido através da oxidação do íon Fe^{2+} pela bactéria *T. ferrooxidans*-LR pois, conforme já salientado anteriormente, essa espécie é a única do gênero que utiliza esse íon como fonte de energia para o seu crescimento. Essa linhagem foi selecionada entre as linhagens disponíveis em nosso laboratório, pois é a que apresenta a mais eficiente taxa de oxidação do íon Fe^{2+} .

A característica marcante dessa rota escolhida é a oxidação química do gás e atividade regeneradora do reagente (Fe^{3+}) pelo *T. ferrooxidans*-LR ciclicamente, em um sistema fechado.

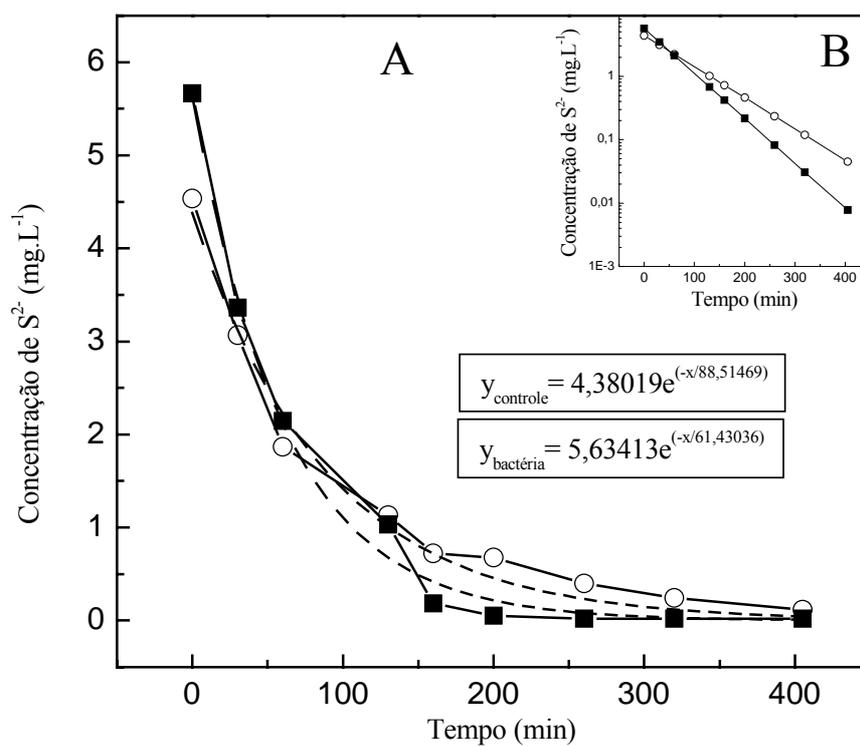


Figura 14. Oxidação do H_2S (concentração inicial de $5,62 \text{ mg.L}^{-1}$) em solução contendo *T. ferrooxidans*-LR (!) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

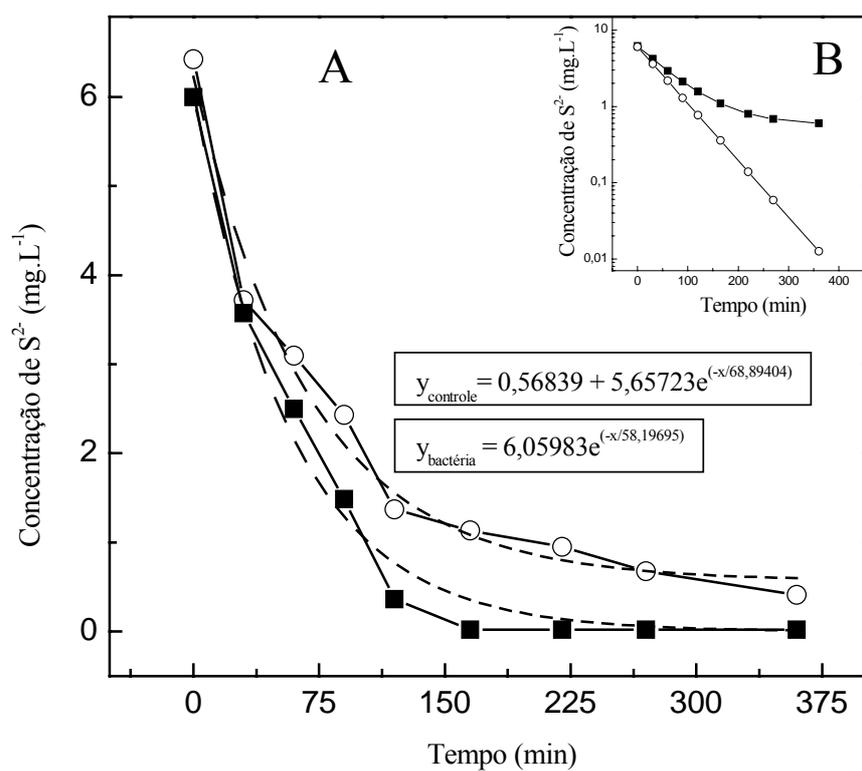


Figura 15. Oxidação do H_2S (concentração inicial de $6,00 \text{ mg.L}^{-1}$) em solução contendo *T. ferrooxidans*-LR (■) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

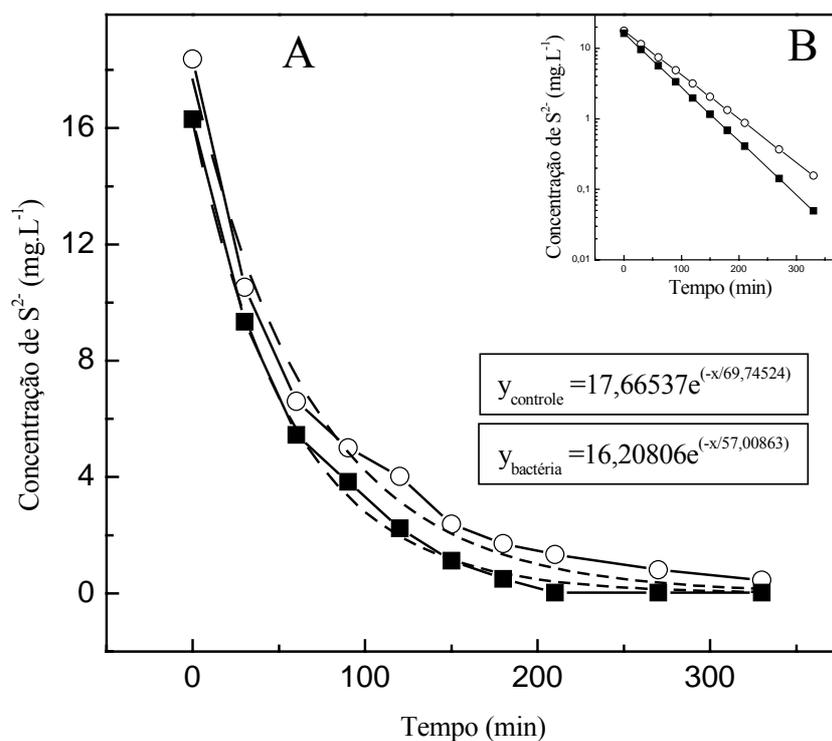


Figura 16. Oxidação do H_2S (concentração inicial de $16,21 \text{ mg.L}^{-1}$) em solução contendo *T. ferrooxidans*-LR (■) e em controle abiótico (○). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

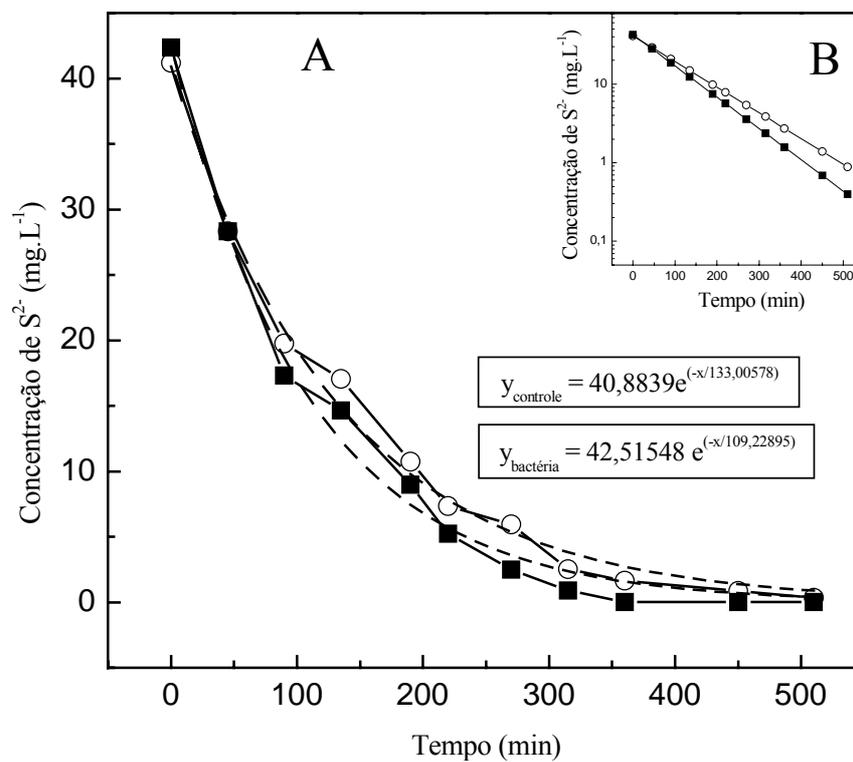


Figura 17. Oxidação do H₂S (concentração inicial de 42,03 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. ferrooxidans*-LR (■) e em controle abiótico (○). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

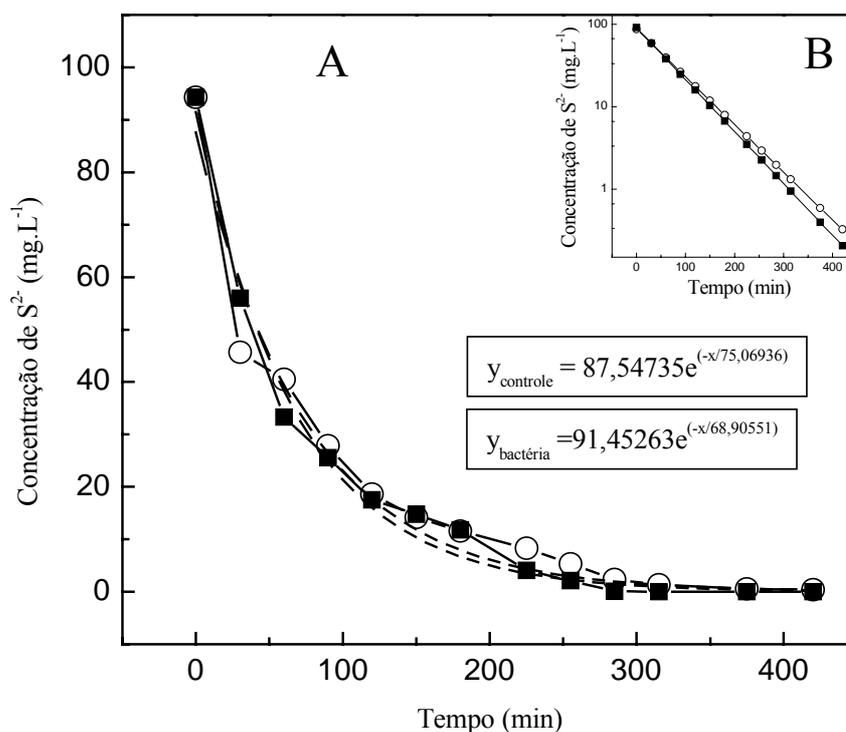


Figura 18. Oxidação do H_2S (concentração inicial de $100,00 \text{ mg.L}^{-1}$) em solução contendo *T. ferrooxidans*-LR (■) e em controle abiótico (○). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

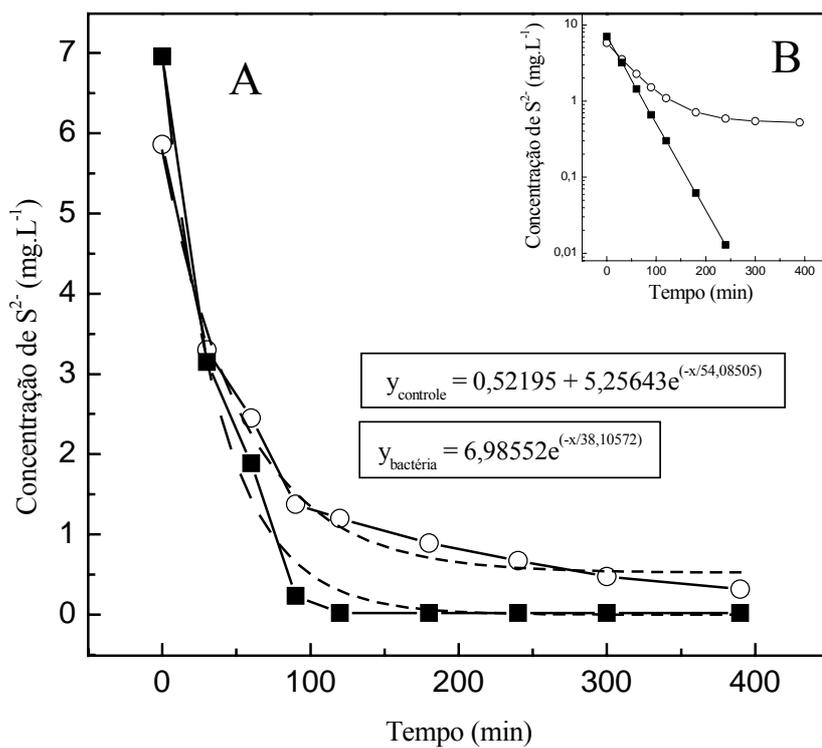


Figura 19. Oxidação do H_2S (concentração inicial de $6,95 \text{ mg.L}^{-1}$) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (■) e em controle abiótico (○) A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

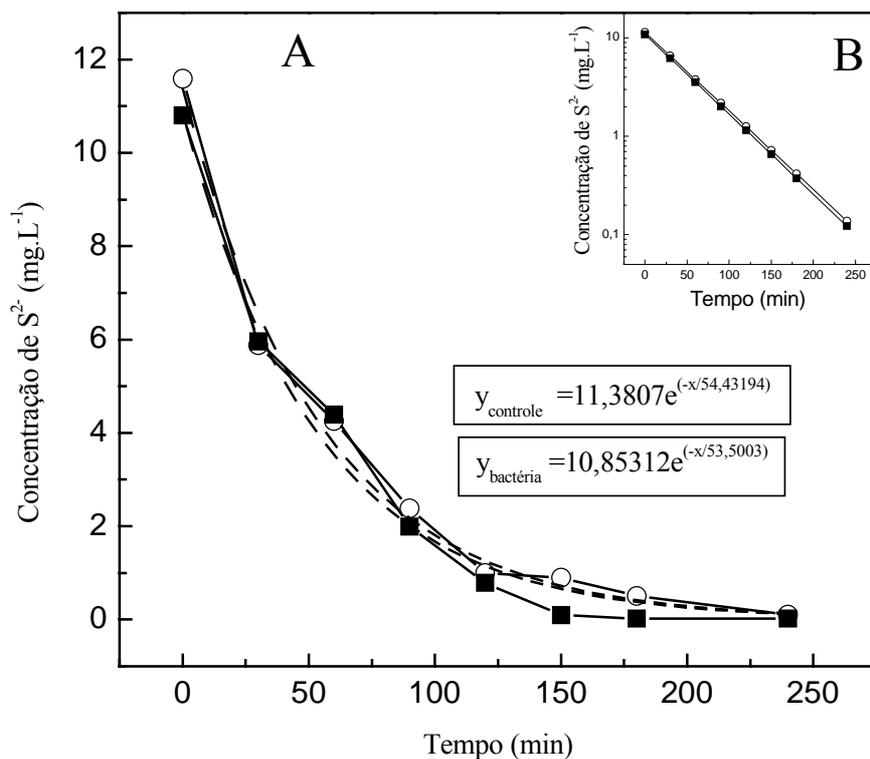


Figura 20. Oxidação do H_2S (concentração inicial de $10,74 \text{ mg.L}^{-1}$) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (+) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

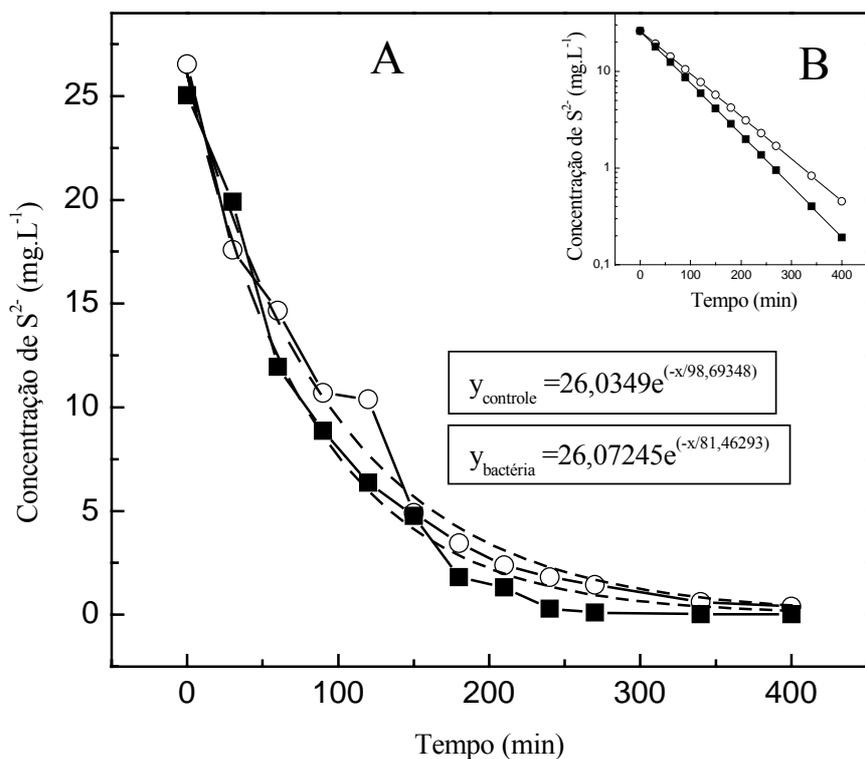


Figura 21. Oxidação do H₂S (concentração inicial de 25,71 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (+) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

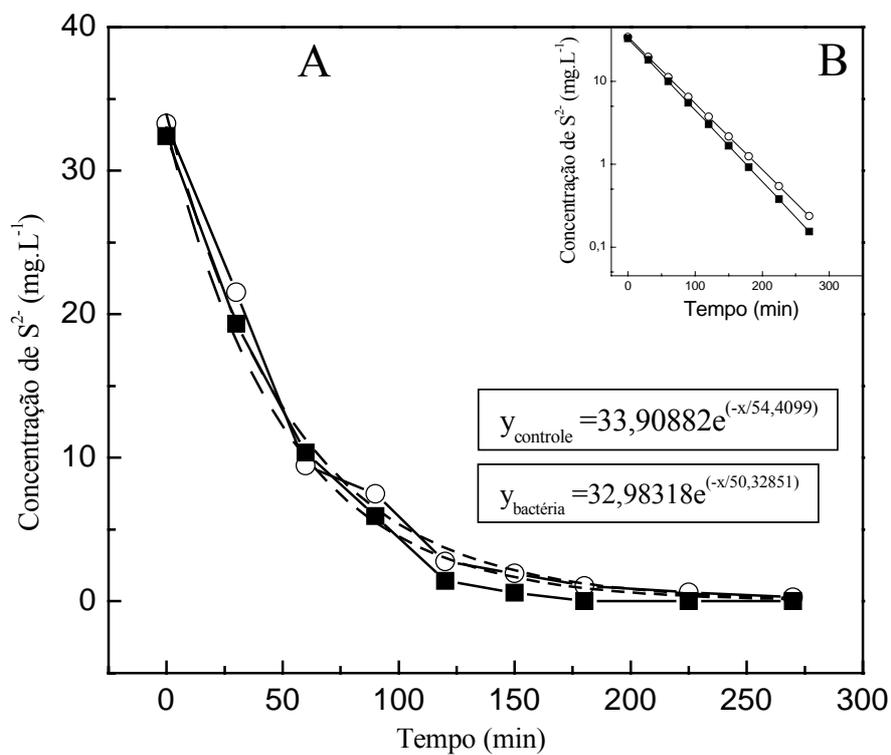


Figura 22. Oxidação do H₂S (concentração inicial de 32,70 mg.L⁻¹) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (+) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

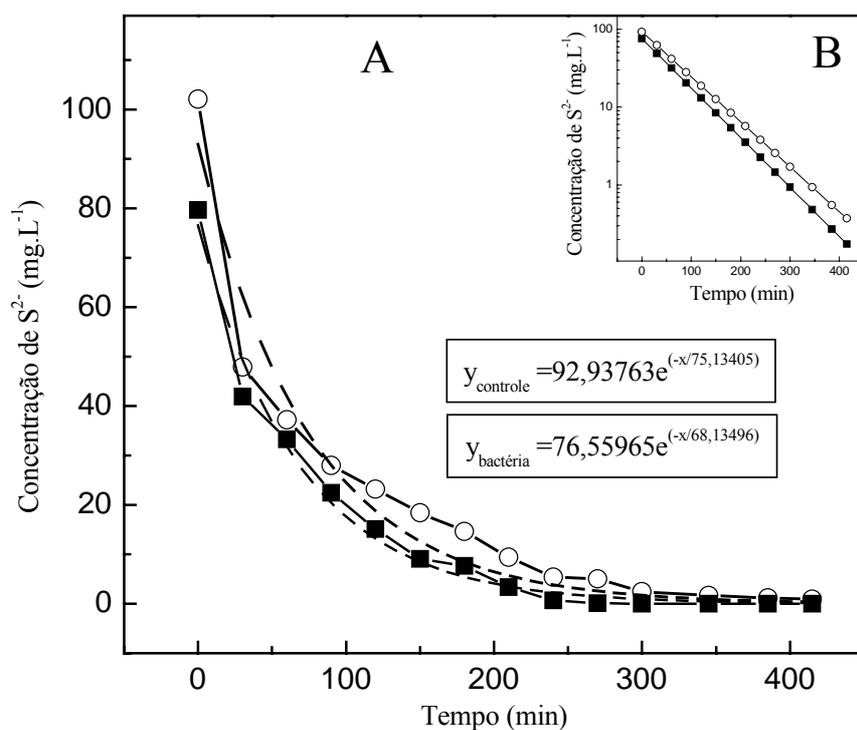


Figura 23. Oxidação do H_2S (concentração inicial de 100 mg.L^{-1}) em solução contendo *T. thiooxidans*-FG01 (+) e em controle abiótico (O). A: curvas originais e respectivos ajustes (curvas tracejadas) pelas equações de decaimento exponencial. B: curvas obtidas pelas equações, em escala semi-logarítmica.

V.2 – Oxidação do Fe^{2+} por células livres do *T. ferrooxidans*-LR

A utilização do *T. ferrooxidans*-LR como um organismo produtor e regenerador do íon Fe^{3+} , se apresentou como uma alternativa promissora para o tratamento indireto de gases contendo o H_2S . Dessa forma, avaliou-se numa primeira etapa, a eficiência da oxidação do íon Fe^{2+} pela espécie em um biorreator.

Pode-se observar pela Figura 24, que em aproximadamente 50 horas obteve-se o máximo crescimento do *T. ferrooxidans*-LR com um $\mu_{\text{máx.}} = 0,16 \text{ h}^{-1}$ e 100% de oxidação do íon Fe^{2+} . Valores de $\mu_{\text{máx}}$ encontrados na literatura, estão no intervalo entre $0,1 - 0,2 \text{ h}^{-1}$ sendo que essa discrepância ocorre devido às diferentes condições (temperatura, pH, concentração de substrato, O_2 e CO_2 disponível, etc) e os procedimentos utilizados em diferentes estudos (Jensen & Webb, 1995b).

Mesmo assim, a utilização de biorreatores com células livres, pode apresentar inconvenientes em operações contínuas, sobretudo o arraste de células dependendo da taxa de diluição utilizada e a velocidade de oxidação do íon ferroso ser relativamente baixa, necessitando portanto, de um reator com um grande volume de trabalho e operando em longos tempos de residência.

Dessa forma, para garantir uma maior concentração celular de *T. ferrooxidans*-LR por unidade de volume do reator, optou-se por utilizá-la na forma imobilizada pois, segundo Nemati et al. (1998), essa bactéria apresenta como característica uma natural tendência de crescimento em superfície, o que a torna um potencial microrganismo para imobilização celular. Além disso, a utilização de células imobilizadas permite estender o tempo de atuação da função catalítica das células sobre a reação desejada.

De acordo com Pagella (1996a,b,c) a utilização do processo combinado químico-bacteriano de descontaminação de H_2S com *T. ferrooxidans*-LR imobilizado, tem apresentado eficiência bastante significativa. Esse sistema envolve reações biológicas e químicas na forma de um ciclo fechado onde o H_2S é absorvido em solução de Fe^{3+} e é convertido a enxofre sem produção de compostos secundários. O íon Fe^{2+} , produzido pela reação do Fe^{3+} com o H_2S (equação 4), vai ser oxidado novamente à Fe^{3+} , através da reação biológica [3].

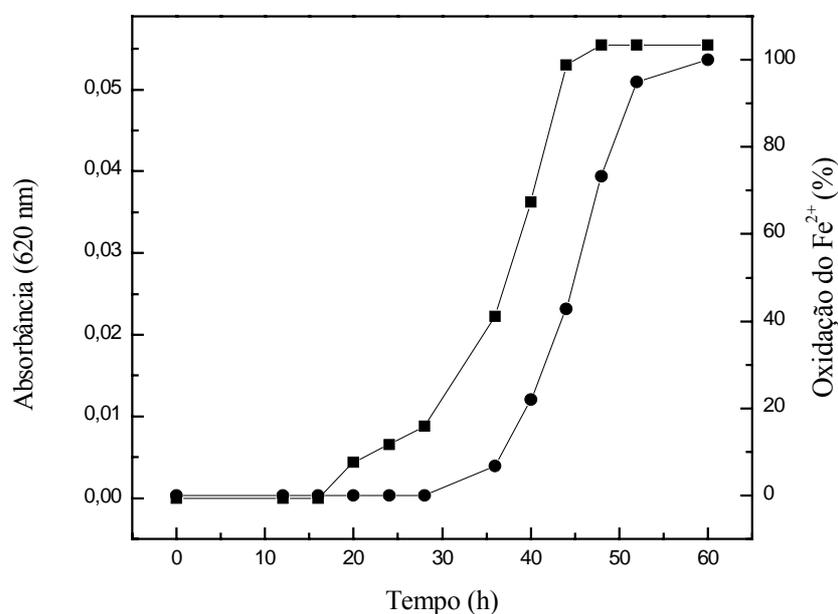


Figura 24. Valores de medida de absorbância do crescimento celular (!) e oxidação do Fe^{2+} (.), em ensaio em batelada com a espécie *T. ferrooxidans*-LR.

V.3 - Imobilização Celular do *T. ferrooxidans*-LR

V.3.1 – Ciclos de Imobilização

Com o objetivo de se aumentar a velocidade de oxidação do íon ferroso por *T. ferrooxidans*-LR, vários métodos operacionais têm sido estudados, ou utilizando sistemas em batelada ou sistemas contínuos, além de projetos de reatores que também vêm sendo testados (JENSEN & WEBB, 1995b). Porém, quando se trabalha com sistemas contínuos, a velocidade de diluição deve ser baixa para impedir o arraste celular. Desta forma, a utilização de células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR pode apresentar vantagens significativas, pois permite obter uma alta concentração celular dentro do reator, além de se trabalhar com velocidades de diluição acima dos valores normalmente utilizados para sistemas com células livres.

Desta forma, foram iniciados os estudos visando a imobilização do *T. ferrooxidans*-LR em anéis de vidro e em fitas de cloreto de polivinil (PVC) para garantir uma maior densidade celular e, conseqüentemente maior velocidade de oxidação de Fe^{2+} , fatores que podem determinar maior eficiência no processo de descontaminação do gás H_2S (método indireto). Para a obtenção de uma imobilização eficiente deste microrganismo nos referidos suportes, vários ciclos de imobilização celular foram realizados, os quais serão descritos a seguir.

A Figura 25 mostra a curva de oxidação do Fe^{2+} para ambos os suportes durante o primeiro ciclo de imobilização celular. Após uma fase “lag” de cerca de 150 horas, ambos os suportes apresentaram praticamente o mesmo comportamento, obtendo-se uma completa oxidação do Fe^{2+} em aproximadamente 300 h de reciclo do meio. Foi observado também, durante essa fase inicial, que para as duas colunas, toda a superfície dos suportes (vidro e

PVC), ficaram recobertas com um precipitado de coloração castanho-avermelhado, que foi eliminado parcialmente pela lavagem das colunas várias vezes com água ácida (pH ~ 1,7).

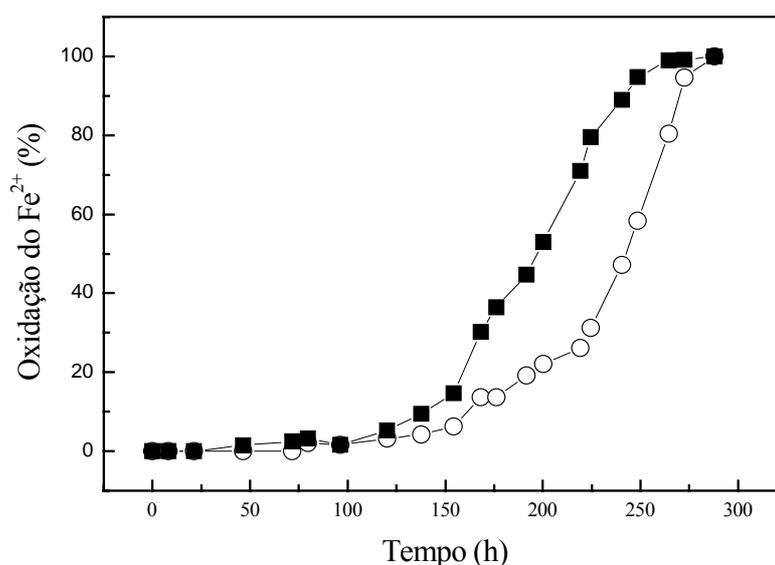


Figura 25. Oxidação do Fe^{2+} (%) pelo *T. ferrooxidans*-LR durante o primeiro ciclo de imobilização celular utilizando colunas com recheio de vidro (O) e PVC (+).

Terminada a fase inicial de imobilização celular (primeiro ciclo), quatro novos ciclos foram realizados, sem o prévio inóculo com a bactéria, com o objetivo de se estabelecer um biofilme adequado de *T. ferrooxidans*-LR sobre os suportes, aumentando assim a eficiência do processo de oxidação do Fe^{2+} .

Pela Figura 26 pode-se observar uma redução significativa no tempo necessário para a completa oxidação do Fe^{2+} nos quatro ciclos subsequentes comparada ao ciclo inicial. Observou-se que em torno de 165 horas todo íon ferroso foi oxidado pela bactéria. Observou-se ainda uma fase “lag” típica de crescimento celular bacteriano, no segundo

(Figura 26A) e terceiro ciclo (Figura 26B) de imobilização para ambos os suportes, porém essa característica desapareceu no quinto ciclo realizado (Figura 26D).

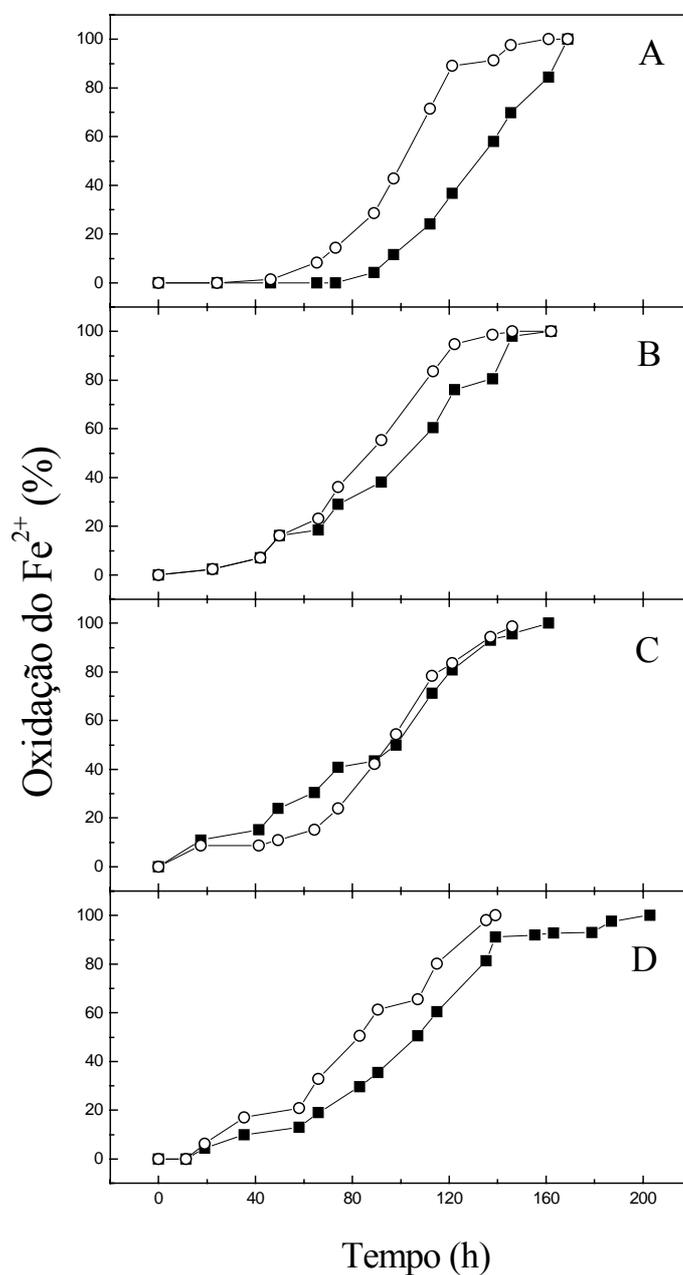


Figura 26. Oxidação do Fe²⁺ (%) pelo *T. ferrooxidans*-LR durante sucessivos ciclos de imobilização celular utilizando colunas com recheio de vidro (O) e PVC (+). (A) segundo ciclo; (B) terceiro ciclo; (C) quarto ciclo e (D) quinto ciclo.

Com relação a velocidade de oxidação do Fe^{2+} pode-se observar pela Tabela 3 que não houve diferenças significativas entre os dois suportes durante os ciclos de imobilização. Entretanto, pode-se verificar um aumento da velocidade de oxidação em ambas as colunas, do primeiro para o segundo ciclo, seguida de uma estabilização para os ciclos subsequentes, indicando dessa forma que os biofilmes formados atingiram a velocidade máxima de oxidação do Fe^{2+} .

Outros dois ciclos realizados posteriormente mostraram o mesmo comportamento (resultados não mostrados), confirmando a estabilização do sistema e o final do processo de colonização das células nos respectivos suportes.

Tabela 3. Valores da velocidade de oxidação do Fe^{2+} para os vários ciclos de imobilização celular do *T. ferrooxidans*-LR em colunas.

Ciclos de Imobilização celular	Velocidade de Oxidação do íon Fe^{2+} ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	
	Vidro	PVC
Primeiro	0,0461	0,0536
Segundo	0,0886	0,0745
Terceiro	0,0661	0,0572
Quarto	0,0752	0,0507
Quinto	0,0667	0,0660

Um fato interessante observado durante a realização dos ciclos de oxidação do Fe^{2+} pelas células imobilizadas, foi o efeito significativo da temperatura sobre a velocidade de oxidação desse íon. Conforme já relatado, as colunas utilizadas no processo de

imobilização celular foram mantidas à temperatura ambiente a qual, durante os primeiros ciclos de oxidação, manteve-se numa faixa de 25 a 30°C. Entretanto, os ciclos subseqüentes foram realizados durante o período de Junho/Julho-1998, período este que apresentou uma queda acentuada da temperatura; foram registradas nessa época temperaturas mínimas ao redor de 10°C, sobretudo durante a noite. Nessas condições, a atividade oxidativa bacteriana foi sensivelmente prejudicada, provocando uma queda significativa na velocidade de oxidação do Fe^{2+} para ambos os suportes (Figura 27A). Pode-se observar pela Figura 27B entretanto, que com a elevação da temperatura ambiente, a oxidação do íon ferroso nas colunas, começou a voltar à sua velocidade normal.

Conforme destacado a espécie *T. ferrooxidans*-LR é mesofílica, sendo que temperaturas entre 20 e 40°C, promove o crescimento celular através da oxidação do Fe^{2+} ; temperaturas abaixo ou acima dessa faixa faz com que a velocidade de oxidação do Fe^{2+} decaia sensivelmente (NEMATI et al., 1998).

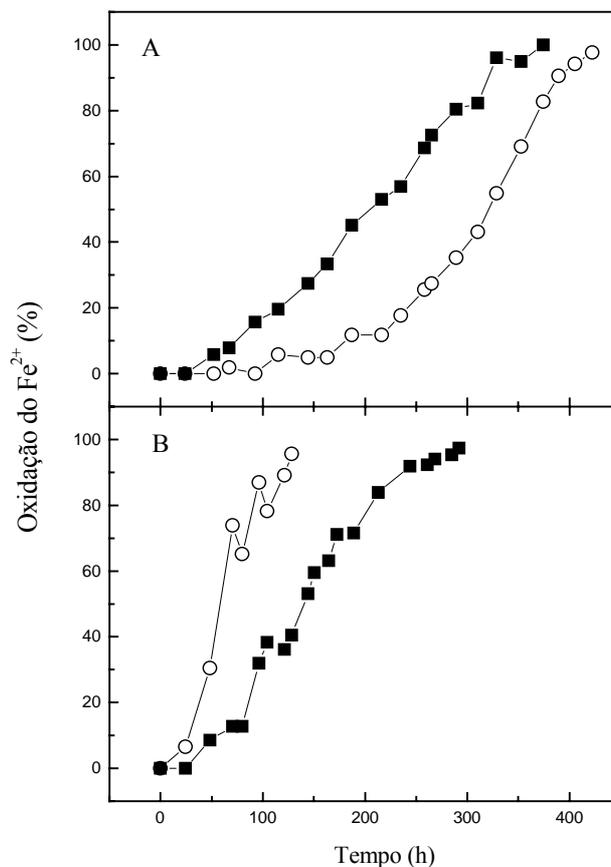


Figura 27. Oxidação do Fe^{2+} (%) pelo *T. ferrooxidans*-LR imobilizado em colunas com recheio de vidro (O) e PVC (+), em dois diferentes ciclos (A e B) realizados durante o período de Junho/Julho.

V.3.2 – Análise da adesão de células de *T. ferrooxidans*-LR por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As análises por MEV das amostras tanto de fitas de PVC como de anéis de vidro, revelaram que os dois suportes foram totalmente recobertos por células de *T. ferrooxidans*-LR, formando um significativo biofilme, conforme pode-se observar pelas Figuras 28 e 29. Pode-se notar pelas figuras mencionadas que as células de *T. ferrooxidans*-LR apresentam-se como uma morfologia mais arredondadas, diferentes da sua característica natural que é

de bastonete. Provavelmente essa ligeira mudança em relação à morfologia original da espécie, seja conseqüência das condições usadas para a imobilização celular nas colunas, totalmente diferentes do cultivo da espécie em frascos.

Segundo Nemati & Webb (1996), *T. ferrooxidans*-LR apresenta-se com uma natural tendência de adesão à superfície do suporte. A fixação da bactéria nas interfaces sólido/líquido usualmente ocorre como resultado de um estágio inicial reversível de adesão seguida por uma irreversível formação de biofilme. O processo de adesão é geralmente dependente das propriedades físico-químico da bactéria, solução (meio de crescimento) e interface sólida. Entretanto, a formação do biofilme é associada com a atividade metabólica das células aderidas à superfície dos suportes. Ainda segundo Nemati & Webb (1996), acredita-se que a hidrofobicidade da superfície de *T. ferrooxidans*-LR é a força predominante que influencia a adesão das células as superfícies dos suportes, embora interações eletrostáticas são também importantes e afetam o processo de adesão.

As colunas com células imobilizadas foram operadas a um pH de 1,7 para tentar diminuir a formação de precipitados de íon férrico denominados genericamente como jarositas $[X.Fe_3(SO_4)_3(OH)_6]$, em que X representa um cátion como H_3O^+ , NH_4^+ , K^+ , etc] nas paredes das colunas e também sobre a superfície dos suportes. Porém, apesar desse cuidado ter sido tomado, houve a deposição de jarosita sobre esses suportes, conforme pode ser observado nas Figuras 28C e 29C, comprovado pelo difratograma de raios-X do material cristalino (Figura 30). A formação desse precipitado tem sido amplamente demonstrada em processos envolvendo o *T. ferrooxidans*-LR e sulfetos minerais, nos quais a presença do Fe^{3+} é uma constante (GARCIA JR. et al., 1995). A formação de precipitados de ferro em suportes para imobilização de células do *T. ferrooxidans*-LR foi também demonstrada por alguns autores. Wakao et al. (1994) encontraram após 6 dias de incubação

em “pellets” de gelrite, uma fina camada (0.3-0.4 mm) de um precipitado de íon férrico de cor vermelho-alaranjada sobre toda superfície desses “pellets”. As células recobertas com esse precipitado foram cerca de 90% das células presentes no meio, e demonstrou-se, mesmo assim, que a atividade de oxidação do ferro nesse biofilme foi alta. Somente após 11 dias de cultivo em batelada, quando a camada desse precipitado sobre os “pellets” atingiu cerca de 2.0 mm, foi que a capacidade oxidativa de *T. ferrooxidans*-LR decresceu. Pogliani & Donati (2000), demonstraram por difração de raios-X que o precipitado encontrado em pérolas de vidro usadas para imobilizar *T. ferrooxidans*-LR foi jarosita de amônia, o qual foi também identificado por outros autores (CURUTCHET et al., 1992; LAZAROFF et al., 1982). Ainda Pogliani & Donati (2000) mostraram uma correlação direta entre a precipitação de jarosita e células imobilizadas. Para culturas incubadas na presença de pérolas de vidro e pH menores que 1,6, não foi detectada a formação de biofilme e a precipitação de íon férrico foi desprezível. Alguns anos antes, Karamanev (1991) havia proposto um modelo assumindo que o biofilme de *T. ferrooxidans*-LR é formado sobre os poros da jarosita, o qual primeiramente precipita e adere sobre a superfície do suporte. Esses resultados parecem indicar que a jarosita exerce uma função importante no processo de imobilização das células de *T. ferrooxidans*-LR.

Os resultados obtidos no presente trabalho, tanto sob o ponto de vista de formação do espesso biofilme, conforme mostrado nas Figuras 28-B e 29-B, como nos estudos de oxidação de Fe^{2+} , mostram que, de fato, a presença da jarosita não influenciou negativamente esses processos.

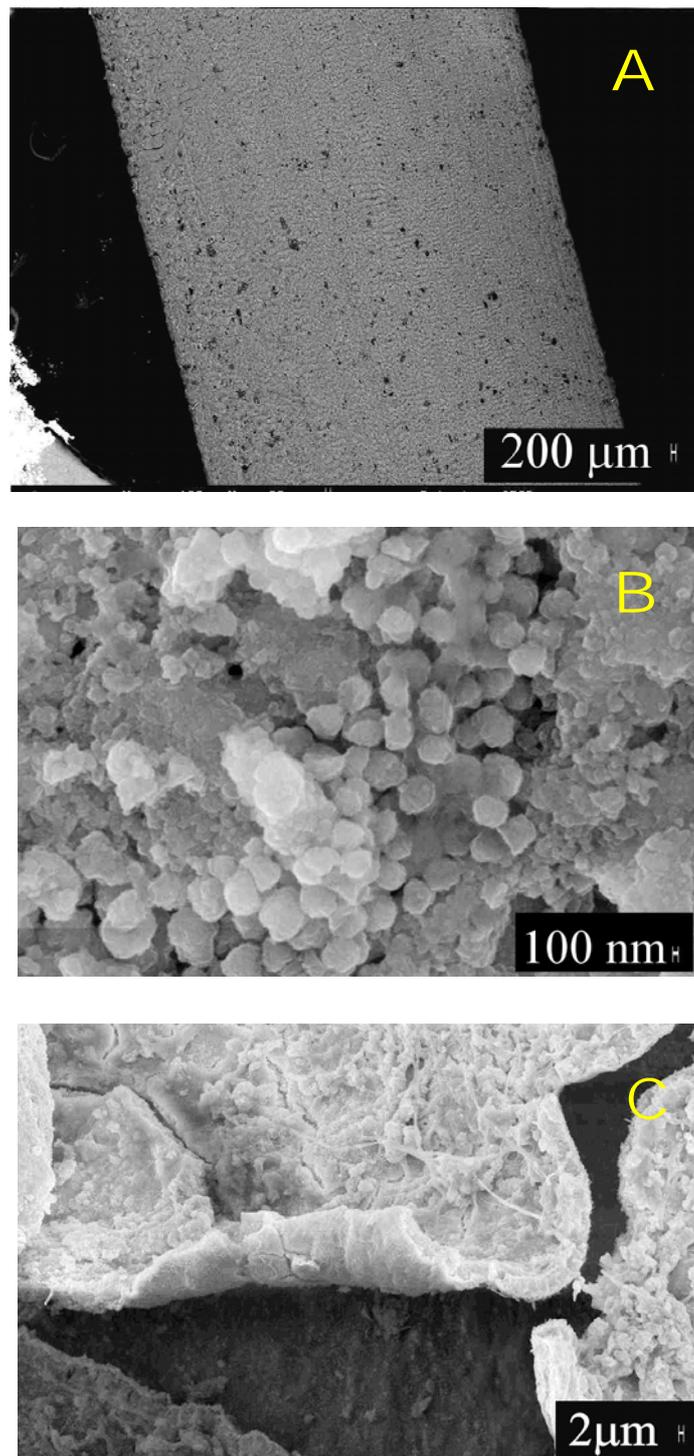


Figura 28. Microscopia Eletrônica de Varredura das células de *T. ferrooxidans*-LR immobilizadas em fitas de PVC (A-controle, B-biofilme, C-jarosite).

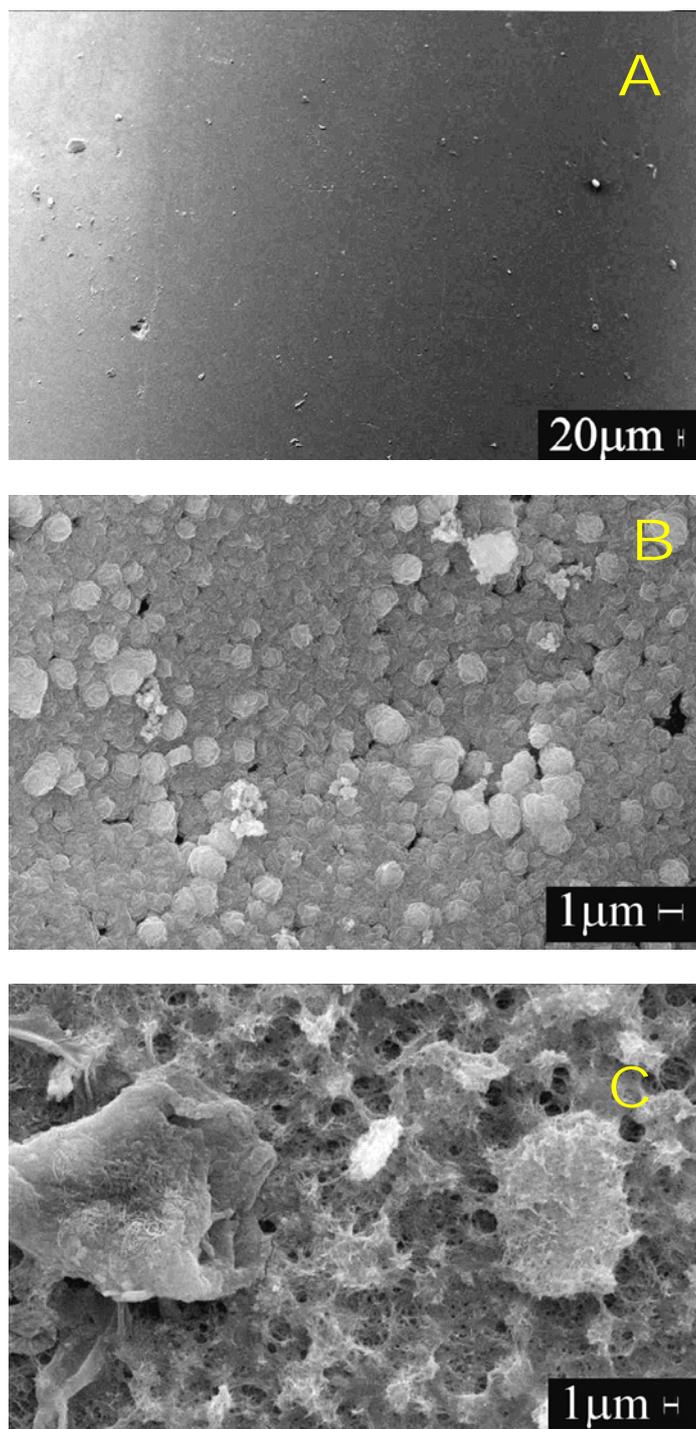


Figura 29: Microscopia Eletrônica de Varredura das células de *T. ferrooxidans*-LR immobilizadas em anéis de vidro (A-controle, B-biofilme, C-jarosita).

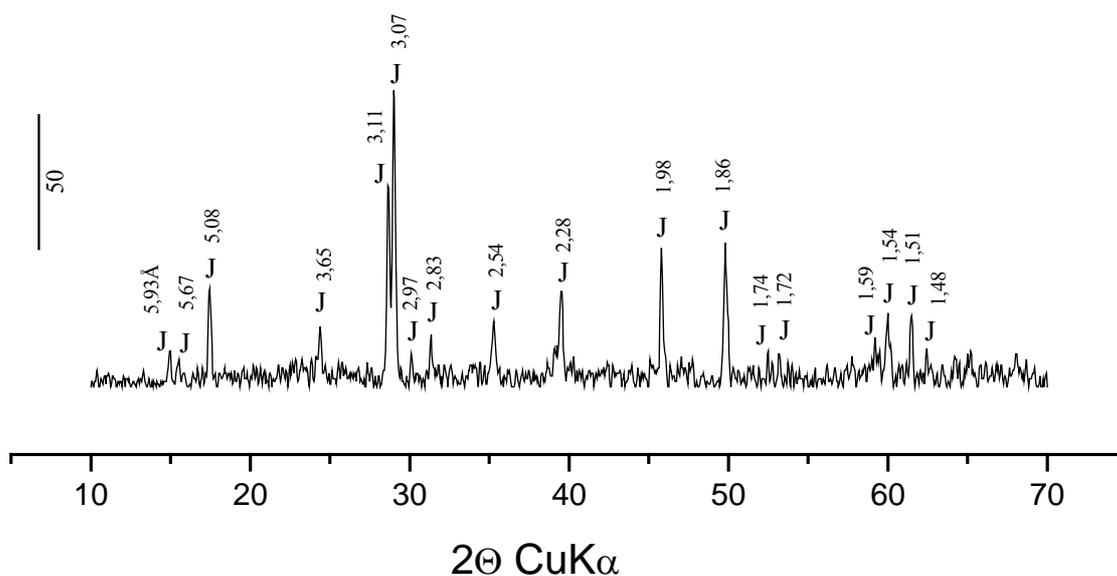


Figura 30. Difratoograma de raios-X do precipitado formado nos ensaios de imobilização celular e testes de oxidação de Fe^{2+} em diferentes vazões de substrato. Símbolo J, jarosita. A barra lateral indica a intensidade de contagem dos picos e os números acima da identificação dos picos indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina..

V.4 - Influência da taxa de diluição (D) na oxidação do Fe^{2+} e na velocidade de formação do produto (Fe^{3+}) por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR

Após o término dos ensaios para colonização dos suportes e estabilização do sistema, foram realizados os ensaios de oxidação contínua do íon Fe^{2+} pela bactéria *T. ferrooxidans*-LR imobilizada nas colunas (PVC ou anéis de vidro), testando-se diferentes taxas de diluição (D) e diferentes concentrações de substrato: 1,0; 2,5; 4,0; 6,7 g.L^{-1} . Os resultados dos ensaios estão representados nas Figuras 31 à 34.

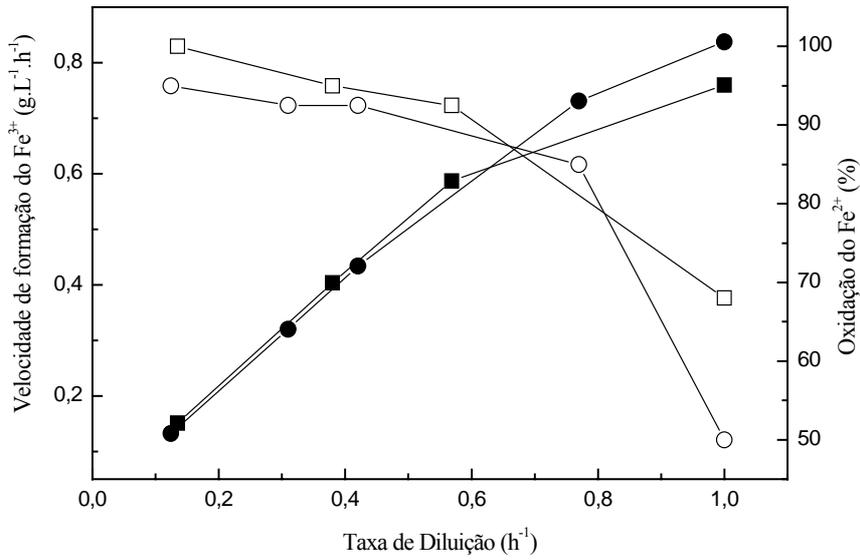


Figura 31. Influência da taxa de diluição na velocidade de formação do Fe³⁺ (● vidro; ■, PVC) e na oxidação do Fe²⁺ (○ vidro, O PVC) por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR para concentração de substrato de 1,0 g.L⁻¹

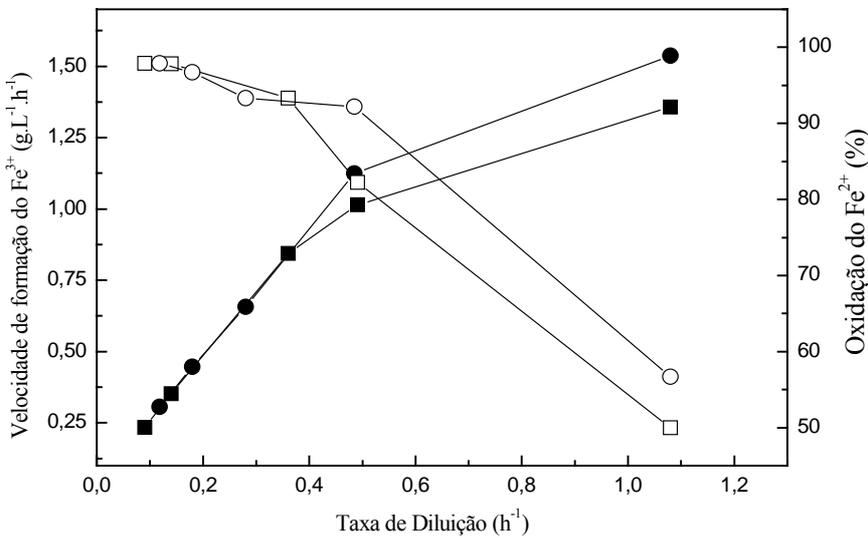


Figura 32. Influência da taxa de diluição na velocidade de formação do Fe³⁺ (● vidro; ■, PVC) e na oxidação do Fe²⁺ (○ vidro; O PVC) por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR para concentração de substrato de 2,5 g.L⁻¹

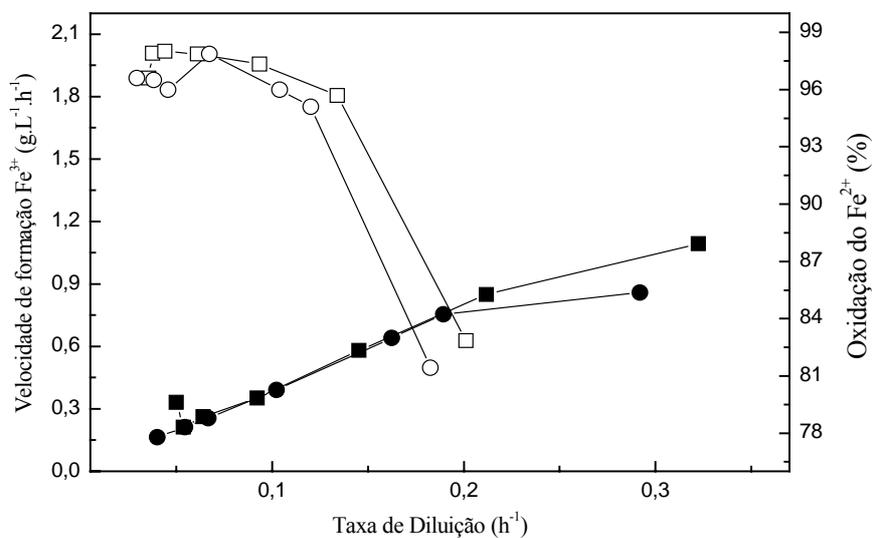


Figura 33. Influência da taxa de diluição na velocidade de formação do Fe³⁺ (■ vidro; ○ PVC) e na oxidação do Fe²⁺ (■ vidro; O PVC) por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR para concentração de substrato de 4,0 g.L⁻¹

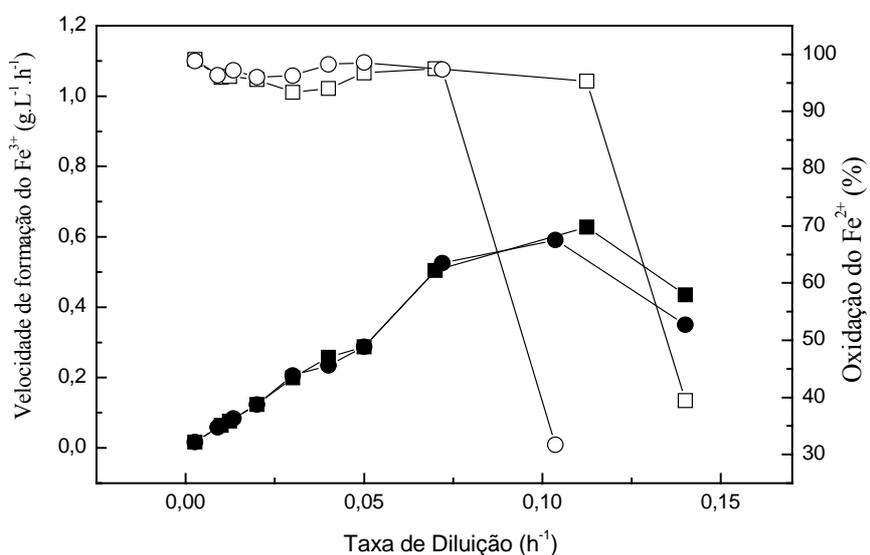


Figura 34. Influência da taxa de diluição na velocidade de formação do Fe³⁺ (■ vidro; ○ PVC) na oxidação do Fe²⁺ (■ vidro; O PVC) por células imobilizadas de *T. ferrooxidans*-LR, para concentração de substrato de 6,7 g.L⁻¹

Utilizando-se uma concentração de Fe^{2+} de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, obteve-se uma oxidação desse íon acima de 90% para uma taxa de diluição de até $0,6 \text{ h}^{-1}$ nos dois suportes utilizados, sendo que na coluna com suporte de vidro a oxidação de Fe^{2+} foi ligeiramente maior em relação à de PVC. Porém, a partir de $0,6 \text{ h}^{-1}$ observa-se um decréscimo significativo na oxidação do Fe^{2+} para os dois suportes (Figura 31) e conseqüentemente, uma diminuição na velocidade de formação do Fe^{3+} . Para a concentração de Fe^{2+} de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 32), obteve-se uma oxidação deste íon acima de 90% quando se trabalhou com taxas de diluição de até $0,5 \text{ h}^{-1}$ para o PVC e de $0,3 \text{ h}^{-1}$ para o vidro. Para valores superiores a estes, observou-se uma queda acentuada na oxidação do Fe^{2+} nos dois suportes a medida que a taxa de diluição foi aumentando.

Em concentrações de Fe^{2+} mais elevadas ($4,0$ e $6,7 \text{ g.L}^{-1}$), os índices de oxidação se mantiveram acima de 90%, somente para baixas taxas de diluição: cerca de $0,13 \text{ h}^{-1}$ para concentração de $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ (para ambos os suportes – Figura 33) e $0,075 \text{ h}^{-1}$ (PVC) e $0,125 \text{ h}^{-1}$ (vidro) para concentração de Fe^{2+} de $6,7 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 34). Desta forma, a oxidação do íon Fe^{2+} esta diretamente relacionada com a taxa de diluição e a concentração deste íon na solução de entrada das colunas com as células imobilizadas.

Dentre as quatro concentrações de Fe^{2+} avaliadas, pode-se dizer que aquela de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ foi a que apresentou o melhor desempenho sob o ponto de vista da eficiência de oxidação do Fe^{2+} associada à velocidade de formação do Fe^{3+} , a qual, em última análise, se constitui no objetivo central desses ensaios. Conforme pode ser visto na Figura 32, a eficiência de oxidação do Fe^{2+} foi mantida (em ambas as colunas) acima de 90% até uma taxa de diluição de cerca de $0,5 \text{ h}^{-1}$; nessas condições, a velocidade de formação do Fe^{3+} situou-se acima de $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nenhuma outra concentração de Fe^{2+} utilizada para qualquer taxa de diluição, apresentou resultado tão expressivo. Pode-se observar pelas Figuras 31, 33, 34 que

quando a velocidade de produção do Fe^{3+} tende à se aproximar de $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, a eficiência de oxidação do Fe^{2+} mostra uma queda acentuada, uma vez que a taxa de diluição necessariamente se eleva.

Conforme salientado acima, a velocidade de produção do Fe^{3+} é de considerável importância nesse estudo, pois este é o reagente para tratar o H_2S , e assim sua disponibilidade contínua (pela manutenção da eficiência de oxidação do Fe^{2+} acima de 90%), e em concentrações compatíveis com a demanda pela sua reação com o H_2S , devem estar asseguradas para a realização do processo combinado químico-bacteriano de remoção (oxidação) do H_2S , operando de forma contínua.

Quanto aos dois tipos de colunas contendo as células imobilizadas, os resultados obtidos nesses ensaios, tanto em relação à eficiência de oxidação do Fe^{2+} e da velocidade de formação do Fe^{3+} , em função da taxa de diluição (fluxo da solução contendo o substrato oxidável Fe^{2+}), mostram que não se obteve diferenças significativas entre os suportes testados.

V. 5 – Descontaminação do gás H_2S

V.5.1 - Testes variando-se a vazão/concentração de Fe^{3+} na alimentação.

O processo em desenvolvimento nesse projeto, a descontaminação do H_2S de gases, tem como base uma reação química e outra biológica. Este sistema, dentre outras vantagens, permite que se trabalhe em temperatura e pressão atmosféricas ambientes, reduzindo assim o custo de energia. Com o objetivo de se avaliar a eficiência do processo químico-bacteriano, realizou-se numa etapa inicial, ensaios de oxidação química do H_2S pelo Fe^{3+} . Conforme apresentado no capítulo **Material e Métodos**, foi utilizada uma coluna de PVC preenchida com cilindros de teflon, na qual o gás contendo o H_2S foi alimentado

em contra-corrente com a solução de Fe^{3+} , trabalhando-se por um período máximo de 600 min. Essa solução foi produzida pela oxidação de uma solução de Fe^{2+} , pelas células imobilizadas do *T. ferrooxidans*-LR.

Conforme pode observar-se na Figura 35 (A-F), a concentração de sulfeto de hidrogênio na saída da coluna de lavagem do gás foi muito inferior a concentração de entrada ($3,27 \times 10^{-4}$ moles. L^{-1}), apresentando valores sempre inferiores a 3×10^{-5} moles. L^{-1} , independente da concentração/vazão de Fe^{3+} que foi usada.

Para uma concentração de Fe^{3+} de 3 g. L^{-1} (Figura 35A), durante as 5 horas iniciais de ensaio, praticamente todo o H_2S reagiu no interior da coluna (concentração média de saída $\sim 2 \times 10^{-6}$ moles. L^{-1}), enquanto que nas demais concentrações houve uma elevação da concentração de saída do H_2S com o tempo no mesmo período, porém conforme já salientado, sempre inferior a concentração de entrada. Nota-se também que ocorreu uma flutuação nas concentrações de saída do H_2S após, aproximadamente, 300 minutos, revelando uma certa heterogeneidade do contato em contra-corrente gás-líquido. Provavelmente, a formação de uma zona inoperante ou estagnada pode ter conduzido a problemas no processo de transferência de massa na coluna. Deve-se ainda considerar que nessa escala de trabalho ocorrem, naturalmente, inúmeros problemas de natureza operacional como os mencionados acima. De qualquer forma, a eficiência da lavagem do gás alcançou valores em torno de 98-99% para as concentrações/vazões de Fe^{3+} usadas.

Durante o período operacional, foi acompanhada também a concentração de saída do Fe^{2+} , como resultado da reação do Fe^{3+} com o H_2S (equação [4]). Os resultados obtidos, independente da concentração inicial de Fe^{3+} , mostraram uma redução desse íon para o Fe^{2+} da ordem de 40 a 50% das concentrações utilizadas para o início do processo. Tais valores

estão coerentes com o excesso de 50% de Fe^{3+} , baseando-se na estequiometria da reação, utilizado com o objetivo de garantir o máximo possível da reação de oxidação do H_2S .

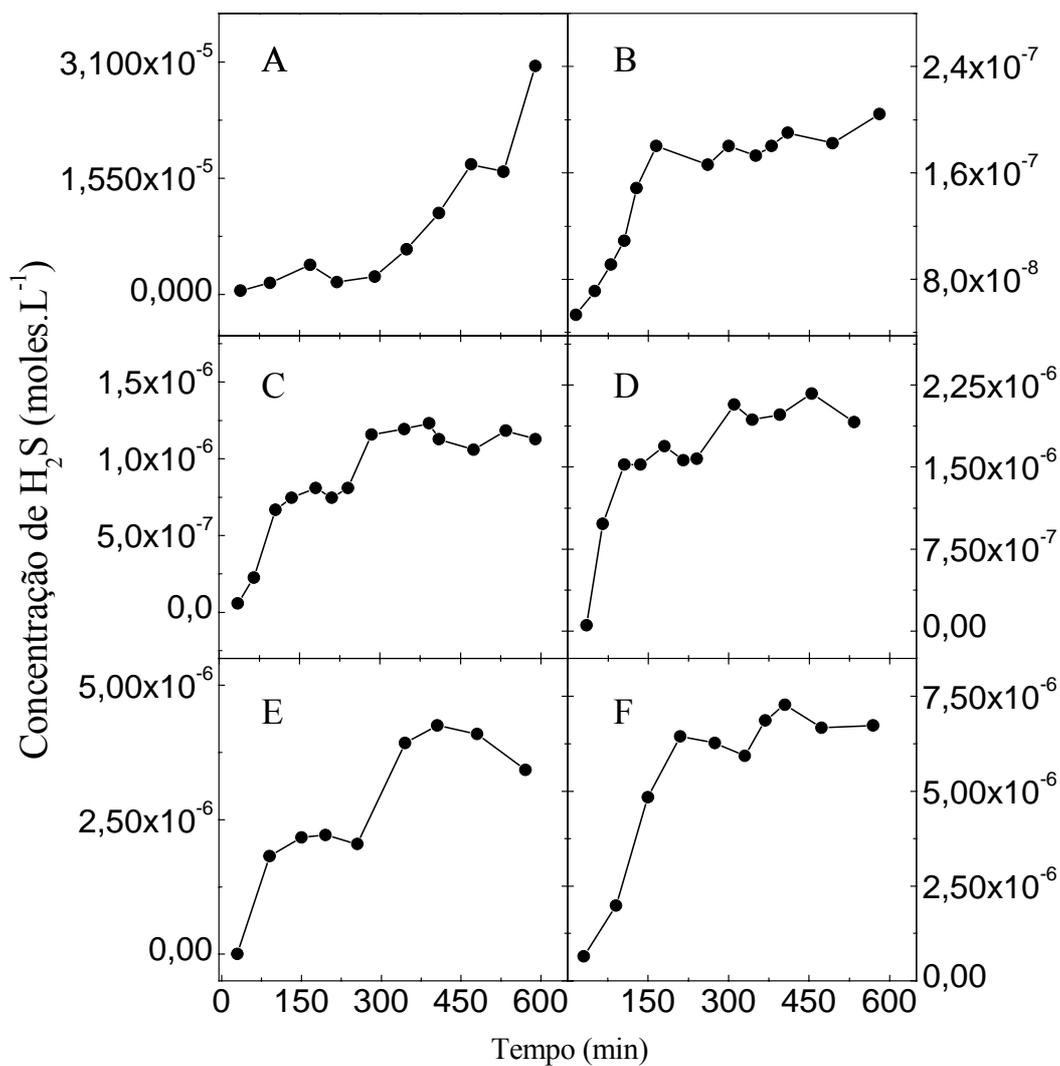


Figura 35. Concentração de H_2S na saída da coluna de lavagem de gás em função do tempo para várias concentrações de Fe^{3+} : (A) $3,0 \text{ g.L}^{-1}$; (B) $1,5 \text{ g.L}^{-1}$; (C) $0,75 \text{ g.L}^{-1}$; (D) $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ (E) $0,38 \text{ g.L}^{-1}$ e (F) $0,30 \text{ g.L}^{-1}$. Concentração de H_2S na entrada da coluna = $3,27 \times 10^{-4}$ moles. L^{-1} .

V.5.2 - Sistema contínuo químico-bacteriano

A partir dos resultados descritos no item V.5.1, foi possível determinar uma vazão/concentração de Fe^{3+} que proporcionasse uma melhor eficiência na remoção do H_2S para a realização do ensaio contínuo de oxidação química do H_2S pelo Fe^{3+} concomitante com a re-oxidação biológica do íon Fe^{2+} (equação [4]) na coluna com células imobilizadas do *T. ferrooxidans*-LR.

Conforme pode-se observar pela Figura 36 a concentração de saída do H_2S no decorrer do ensaio de cerca de 50 horas, apresentou valores significativamente inferiores em relação a concentração de entrada ($3,27 \times 10^{-4}$ moles. L^{-1}), determinando uma eficiência de remoção do gás em torno de 97-99%. Algumas pequenas flutuações da concentração do H_2S observadas durante o período do ensaio podem estar associadas a desvios do próprio método analítico, sobretudo na faixa de concentração utilizada, ou a possíveis problemas no contato gás-líquido, conforme anteriormente destacado. Segundo Colburn (1981), quando se trabalha em baixas vazões da fase líquida pode ocorrer uma secagem do recheio de empacotamento ou mesmo uma cobertura por um filme estagnado de líquido, prejudicando dessa forma o contato entre as fases gasosa e líquida.

Possivelmente problemas dessa natureza também podem explicar a variação das concentrações de saída do Fe^{2+} (variação de 0,9 a 1,6 g. L^{-1}), conforme pode ser observado pela Figura 36. Além disso, deve-se salientar que nas condições do ensaio, alguma precipitação de ferro na forma de jarosita (conforme também já citado) pode ocorrer, determinando dessa forma uma recuperação do ferro solúvel (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) nunca igual ou mesmo próxima de 100%. De fato, na Figura 37 alguns picos desse mineral de ferro ($\text{XFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) foram detectados no precipitado formado durante o tratamento do H_2S .

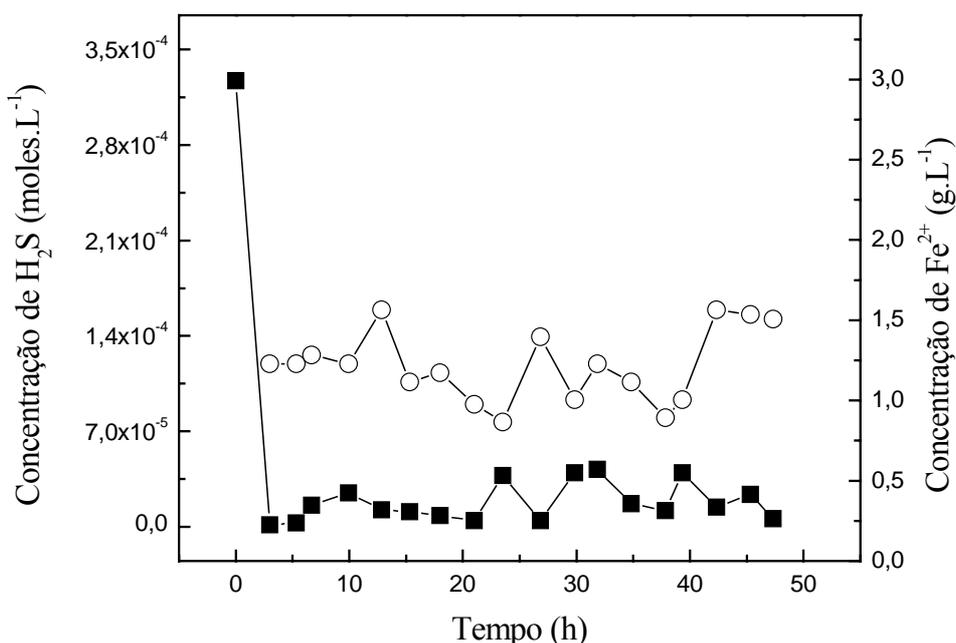


Figura 36. Concentrações de H₂S (!) e Fe²⁺ (O) na saída da coluna de lavagem de gás obtidas no ensaio contínuo químico-bacteriano para a descontaminação do H₂S do gás de arraste.

Conforme pode ser visto na equação [4], um outro produto da reação do H₂S com o íon Fe³⁺ é o enxofre. Uma grande variedade de processos de separação de partículas de enxofre podem ser utilizados, dentre os quais pode-se citar: filtração, flotação, extração e sedimentação natural, sendo que este último representa técnica e economicamente um método mais atrativo para recuperação do enxofre. Porém, a formação de partículas de enxofre com boa propriedade de sedimentação é um fator importante para sua recuperação. Segundo Janssen et al (1999), tem sido demonstrado que o tamanho das partículas agregadas de enxofre aumenta com o aumento da velocidade de alimentação de sulfeto dentro do reator, porém o mecanismo de formação destes agregados não é ainda completamente conhecido.

Durante o desenvolvimento do processo contínuo químico-bacteriano de tratamento do gás H_2S , foi observado na saída da coluna de lavagem do gás junto com a solução de íon Fe^{2+} , partículas de coloração amarelo, que de acordo com a equação [4], poderia ser enxofre proveniente da reação de H_2S com Fe^{3+} . Ao final do processo contínuo, essas partículas foram separadas por decantação, e submetidas a análise de raios-X. Através do difratograma apresentado na Figura 37 pôde-se confirmar como sendo essencialmente enxofre as partículas formadas durante o processo. Deve-se destacar que não foi possível determinar quantitativamente o enxofre formado durante o processo, uma vez que parte das partículas de enxofre ficaram no interior da coluna de lavagem do gás, aderidas aos suportes de preenchimento desta coluna conforme pôde ser detectado por visualização direta. Vale salientar que o enxofre formado através do contato entre o gás H_2S e o íon Fe^{3+} esta na sua forma coloidal, dificultando assim sua separação imediata da solução que sai da coluna de tratamento do gás. Uma possível solução para se equacionar esse fato seria inserir um tanque intermediário entre a saída da coluna de lavagem do gás e a coluna de células imobilizadas, para manter em repouso essa solução e desta forma, permitir uma sedimentação natural do enxofre.

Obviamente outros métodos para a rápida precipitação do enxofre devem também ser futuramente avaliados, considerando as potencialidade de aplicação em larga escala dessa técnica de descontaminação do H_2S de gases.

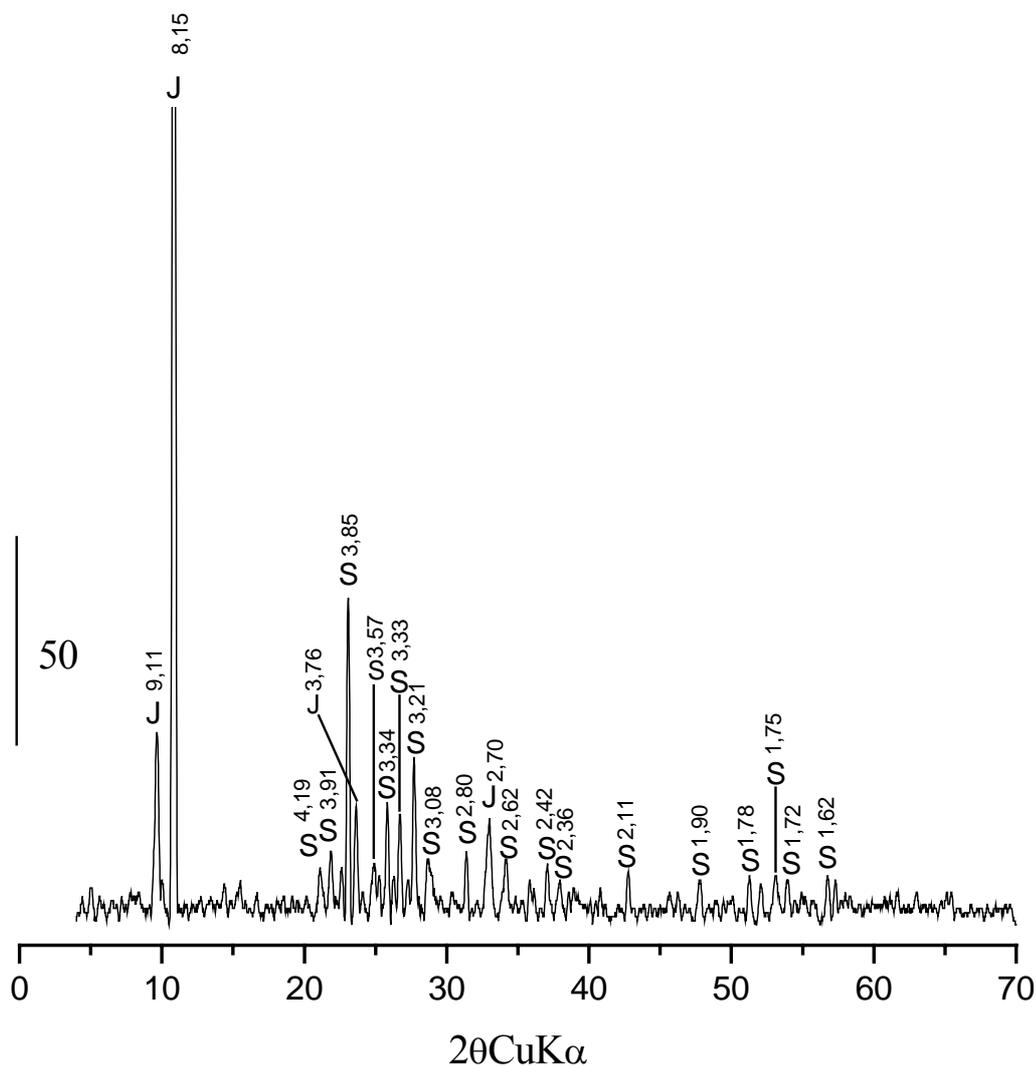


Figura 37: Difratoograma de raios-X do precipitado obtido no ensaio contínuo químico-bacteriano do tratamento de gás H_2S . Símbolo: S, enxofre; J, jarosita. A barra lateral indica a intensidade de contagem dos picos e os números acima da intensidade dos picos indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.

Tendo em vista os resultados apresentados com relação ao processo combinado químico-bacteriano estudado, pode-se dizer que o sistema apresentou-se como uma alternativa promissora para tratamento do gás sulfídrico de gases industriais. Alguns

parâmetros devem ainda serem estudados e otimizados para uma futura ampliação de escala tais como, o efeito do oxigênio dissolvido na oxidação do Fe^{2+} na coluna de célula imobilizada e, eventualmente, o estudo de outros suportes de recheio na coluna de lavagem de gás para aumentar o contato entre gás-líquido, evitando que ocorra a formação de zonas inoperantes dentro da coluna.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXEYEV, V. **Qualitative analysis**. Moscow: Mir Publishers, 1967. 563 p.

ARMENTIA, H.; WEBB, C. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* cells immobilized in polyurethane foam support particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 697-700, 1992.

ASAI, S.; KONISHI, Y.; YABU, T. Kinetics of absorption of hydrogen sulfide into aqueous ferric sulfate solutions. **AIChE Journal**, v. 36, n. 9, p. 1331-1338, 1990.

BAALSRUB, K.; BAALSRUB, K. S. Studies on *Thiobacillus denitrificans*. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 20, p. 34-35, 1954.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

BARRON, J. L.; LUECKING, D. R. Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2801-2806, 1990.

CADENHEAD, P.; SUBLETTE, K. L. Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacilli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 1150-1154, 1990.

CETESB. Secretaria do Meio Ambiente. **Compilação de padrões ambientais**. São Paulo, out. 1990.

CHEN, G. K. Packed column internals. **Chemical Engineering**, v. 91, p. 40-51, 1984.

CHO, K. S.; ZHANG, L.; HIRAI, M.; SHODA, M. Removal characteristic of hydrogen sulphide and methanethiol by *Thiobacillus sp.* isolated from peat in biological deodorization. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, n.1, p. 44-49, 1991.

CHO, K. S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Degradation of hydrogen sulfide by *Xanthomonas sp.* strain DY44 isolated from peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1183-1189, 1992.

CHUNG, Y. C.; HUANG, C.; TSENG, C. P. Biodegradation of hydrogen sulfide by a laboratory-scale immobilized *Pseudomonas putida* CH11 biofilter. **Biotechnology Progress**, v. 12, p. 773-778, 1996a.

CHUNG, Y. C.; HUANG, C.; TSENG, C. P. Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. **Journal of Biotechnology**, v. 52, p. 31-38, 1996b.

CHUNG, Y. C.; HUANG, C. Removal of hydrogen sulphide by immobilized *Thiobacillus sp.* Strain CH11 in a biofilter. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 58-62, 1997.

CLESCERI, L. S.; GREEBERG, A. E.; TRUSSELL, R. R. (Eds). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 17th ed. Baltimore: Port City Press, 1989. part 4000, p. 191-197.

COLBURN, A. P. Continuous differential contacting operations: gas absorption. In: HENLEY, E. J.; SEADER, J. D. **Equilibrium-stage separation operation in chemical engineering**. John Wiley & Sons, 1981. cap. 16, p. 625-676.

CORK, D. J.; GARUNAS, R.; SAJJAD, A. *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*: biocatalyst in the production of sulfur and organic carbon from a gas stream containing H₂S e CO₂. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 913-918, 1983.

CORK, D. J.; JERGER, D. E.; MAKKA, A. Biocatalytic production of sulfur from process waste streams. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, n.16, p. 149-162, 1986.

CURUTCHET, G.; POGLIANI, C.; DONATI, E.; TEDESCO, P. Effect of iron (III) and its hydrolysis products (jarosites) on *Thiobacillus ferrooxidans* growth and on bacterial leaching. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 4, p. 329-334, 1992.

FAN, L. S. **Gas-liquid-solid fluidization engineering**. Boston: Butterworths Publishers, 1989.

GADRE, R. V. Removal of hydrogen sulfide from biogás by chemoautotrophic fixed-film bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 410-414, 1989.

GARCIA JR., O. **Estudos da lixiviação de minérios de urânio por *Thiobacillus ferrooxidans***. 1989. 261 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GARCIA JR., O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista Microbiologia**, v. 20, p. 1-6, 1991.

GARCIA JR., O., BIGHAM, J. M.; TUOVINEN, O. H. Oxidative dissolution of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 508-514, 1995.

GARCIA JR., O. Microrganismo e metais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997. cap.1, p 11-41.

GRISHIN, S. I.; ADAMOV, E. V.; PANIN, V. V.; KARAVAIKO, G. I. Acceleration of ferrous iron oxidation by a *Thiobacillus ferrooxidans* culture. **Mikrobiologiya**, v. 52, n. 2, p. 322-327, 1983.

GRISHIN, S. I.; TUOVINEN, O. H. Fast kinetics of Fe²⁺ oxidation in Packed-Bed Reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n.12, p. 3092-3100, 1988.

GUOQIANG, K.; JIE, P.; YI, Y.; SHIMIN, Z. Bacterial desulfurization of the H₂S-containing biogas. **Biotechnology Letters**, v. 16, n.10, p. 1087-1090, 1994.

HALFMEIER, H.; SCHÄFER-TREFFENFELDT, W.; REUSS, M. Potential of *Thiobacillus ferrooxidans* for waste gas purification. Part 2. Increase in continuous ferrous iron oxidation kinetics using immobilized cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 582-587, 1993.

HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HEISEL, M.; MAROLD, F.; GWINNER, M. Recupero di zolfo da gas contenenti H₂S. **La Chimica e L'Industria**, v. 78, p. 371-374, 1996.

HIRANO, T.; KUROSAWA, H.; NAKAMURA, K.; AMANO, Y. Simultaneous removal of hydrogen sulfide and trimethylamine by a bacterial Deodorant. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 4, p. 337-342, 1996.

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p. 433-436,

HUANG, C.; CHUNG, Y. C.; HSU, B. M. Hydrogen sulfide removal by immobilized autotrophic and heterotrophic bacteria in the bioreactors. **Biotechnology Techniques**, v.10, p. 595-600, 1996 *apud* OH, K. J.; KIM, D.; LEE, I. H. Development of effective hydrogen sulphide removing equipment using *Thiobacillus* sp.IW. **Environmental Pollution**, v. 99, p. 87-92, 1998.

IMAZUMI, T. Some industrial applications of inorganic microbial oxidation in Japan. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 16, p. 363-371, 1986.

INGLEDEW, W. J. Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 16, p. 23-34, 1986

JANSSEN, A. J. H.; SLEYSTER, R.; van der KAA, C.; JOCHEMSEN, A.; BONTSEMA, J.; LETTING, G. Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 327-333, 1995.

JANSSEN, A. J. H.; MA, S. C.; LENS, P.; LETTING, G. Performance of a sulfide-oxidizing expanded-bed reactor supplied with dissolved oxygen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, p. 32-40, 1997.

JANSSEN, A. J. H.; LETTING, G.; KEIZER, A. de. Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 151, p. 389-397, 1999.

JENSEN, A. B.; WEBB, C. Treatment of H₂S-containing gases: a review of microbiological alternatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 2-10, 1995a.

JENSEN, A. B.; WEBB, C. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a Review. **Process Biochemistry**, v. 30, n.3, p.225-236, 1995b.

KARAMANEV, D. G. Model of the biofilm structure of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 1991.

KELLY, D. P.; JONES, C. A. Factors affecting metabolism and ferrous iron oxidation in suspensions and batch culture of *Thiobacillus ferrooxidans*: relevance to ferric iron leach solution regeneration. In: MURR, L. E.; TORMA, A. E.; BRIERLEY, J. A. (Eds.). **Metallurgical application of bacterial leaching and related microbiological phenomena**. New York: Academic Press, 1978, p. 19-43 *apud* NEMATİ, M.; HARRISON, S. T. L.; HANSFORD, G. S.; WEBB, C. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, p. 171-190, 1998.

KIM, B. W.; KIM, I. K.; CHANG, H. N. Bioconversion of hydrogen sulfide by free and immobilized cells of *Chlorobium thiosulfatophilum*. **Biotechnology Letters**, v. 12, n.5, p. 381-386, 1990.

KOHL, A. L.; RIESENFELD, F. **Gas Purification**. 4. ed. Houston: Gulf Publishing Company, 1985. 900 p.

LANCY, E.D.; TUOVINEN, O.H. Ferrous ion oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* immobilized in calcium alginate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 20, p. 94-99, 1984.

LAZAROFF, N.; SIEGAL, W.; WASSERMAN, A. Iron oxidation and precipitation of ferric hydroxysulfates by resting *Thiobacillus ferrooxidans* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n.4, p. 924-938, 1982.

LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 14, p. 103-120, 1994.

MANDL, M. Growth and respiration kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* limited by CO₂ and O₂. **Biologia** (Bratislava), v. 39, n. 4, p. 429-434, 1984.

McCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. Gas absorption. In: **Unit operation of chemical engineering**. 5th ed. McGraw-Hill, 1993.

NEMATI, M.; HARRISON, S. T. L.; HANSFORD, G. S.; WEBB, C. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, p. 171-190, 1998.

NEMATI, M.; WEBB, C. Effect of ferrous iron concentration on the catalytic activity of immobilized cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 250-255, 1996.

NIKOLOV, L.; VALCHONOVA, M. V.; MEHOICHEV, D. Oxidation of high ferrous iron concentrations by chemolithotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* in packed bed bioreactors. **Journal Biotechnology**, v. 7, p. 87-94, 1988.

OH, K. J.; KIM, D.; LEE, I. H. Development of effective hydrogen sulphide removing equipment using *Thiobacillus* sp.IW. **Environmental Pollution**, v. 99, p. 87-92, 1998.

ONGCHARIT, C.; DAUBEN, P.; SUBLETTE, K. L. Immobilization of an autotrophic bacterium by coculture with floc-forming heterotrophs. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 1077-1080, 1989.

OPRIME, M. E. A. G.; CARDOSO, A. A.; GARCIA JR., O. Oxidation of H₂S in acid solution by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 111-114, 2001.

PAGELA, C.; SILVESTRI, P.; FAVERI, D. M. Hydrogen sulphide removal with a biochemical process: the biological step. **Chemical and Biochemical Engineering Quartely**, v. 10, n.4, p. 165-174, 1996a.

PAGELLA, C.; PEREGO, P.; ZILLI, M. Biotechnological H₂S gas treatment with *Thiobacillus ferrooxidans*. **Chemical Engineering Technology**, v. 19, p. 79-88, 1996b.

PAGELLA, C.; SILVESTRI, P.; DE FAVERI, D.M. H₂S gas treatment with *Thiobacillus ferrooxidans*: overall process performance and the chemical step. **Trans IchemE**, v. 74, part A, 1996 c.

PAGELLA, C.; FAVERI, D. M. de. H₂S gas treatment by iron bioprocess. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 2185-2194, 2000.

PIZZO, S. M.; MORAIS JR., D.; FERNANDES, F. A. N.; KOBAYASI, M. S.; PAZINI, R. J. Analysis of liquid distribution in packed column on a pilot scale. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 37, p. 2844-2849, 1998.

POGLIANI, C.; DONATI, E. Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans*: importance of jarosite precipitation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 997-1004, 2000.

ROSSI, G. **Biohydrometallurgy**. Hamburg: McGraw -Hill, 1990.

SHINABE, K.; OKETANI, S.; OCHI, T.; MATSUMURA, M. Characteristics of hydrogen sulfide removal by *Thiobacillus thiooxidans* KS1 isolated from a carrier-packed biological deodorization system. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 6, p. 592-598, 1995.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **Journal of Bacteriology**, v. 77, p. 642-647, 1959.

SUBLETTE, K. L. Aerobic oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 690-695, 1987.

SUBLETTE, K. L.; SYLVESTER, N. D. Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of natural gas. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 249-257, 1987a.

SUBLETTE, K. L.; SYLVESTER, N. D. Oxidation of hydrogen sulfide by continuous cultures of *Thiobacillus denitrificans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 753-758, 1987b.

SUBLETTE, K. L.; SYLVESTER, N. D. Oxidation of hydrogen sulfide by mixed cultures of *Thiobacillus denitrificans* and heterotrophs. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 759-761, 1987c.

SUBLETTE, K. L.; HESKETH, R. P.; HASAN, S. Microbial oxidation of hydrogen sulfide in pilot-scale bubble column. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 611-614, 1994.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison $^{14}\text{CO}_2$ -fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, v. 88, p. 285-298, 1973.

ZAIAT, M. **Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias**. 1996. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

WAKAO, N.; ENDO, K.; MINO, K.; SAKURAI, Y.; SHIOTA, H. Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* using various polymers as matrix. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 40, p.349-358, 1994.

WOOD, T.A.; MURRAY, K.R.; BURGESS, J.G. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* cells immobilised on sand for the purpose of treating acid mine-drainage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 560-565, 2001.